



Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Medicina.

División de Estudios de Posgrado.

Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

**Determinación de Polimorfismos rs37972 y rs37973 del Gen GLCCI1 en
Pacientes Mexicanos con Hepatitis Alcohólica en Tratamiento con
Esteroides**

TESIS

Para Optar por el Grado de Especialista en Gastroenterología

Presenta:

Dra. Raquel Yazmin López Pérez

Asesor de Tesis:

Dra. María Fátima Higuera de la Tijera.

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Agosto de 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

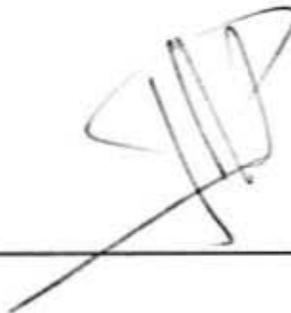
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DRA. MARÍA DE FÁTIMA HIGUERA DE LA TIJERA
JEFA DE SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA
PROFESOR TITULAR GASTROENTEROLOGÍA
SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
TUTORA DE TESIS



DR. JOSE LUIS PÉREZ HÉRNANDEZ
PROFESOR ADJUNTO GASTROENTEROLOGIA
SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
CO-AUTOR DE TESIS

DEDICATORIAS

- *A mi madre esa heroína incansable y con un corazón maravilloso que me animó siempre a ser y dar lo mejor de mí.*
- *A mi padre por sembrar en mí, este amor a la medicina, por invitarme a no rendirme nunca, por creer en mí a cada paso y cada reto.*
- *A mi esposo Jorge gracias por estar en tantos momentos tan maravillosos y por los difíciles nunca dejarme caer. Contigo si, las veces que sean las vidas necesarias.*
- *A mis hermanos Yuri y Aldo porque tenerlos me hace sentir que siempre sabré a dónde pertenezco y de dónde vengo.*
- *A mis cuatro Ángeles en el cielo que guía mis pasos y atiende mis oraciones.*

Llegar hasta aquí el día de hoy es sin duda gracias a su guía y amor.

AGRADECIMENTOS

- *A la Dra. Fátima Higuera y Dr. José Luis Pérez Hernández que con dedicación, enseñanzas y apoyo motivan el camino a la investigación y han hecho que llegue al final.*
- *Al Dr. Jaime Arellanes y su equipo de investigación en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, por su invaluable participación en este proyecto.*
- *A mi Tío Hugo, Tía Delma porque me vieron crecer y he tenido siempre su apoyo en la distancia, este es un paso más en el camino...*
- *A la familia de León Rendón, gracias por hacerme uno de ustedes y recibir su apoyo y bendiciones siempre. Los quiero.*
- *A mis compañeros y hermanos, que, durante esta maravillosa experiencia, han compartido día a día, su vida, sus risas y éxitos.*

INDICE

- 1. Introducción 10**
- 1.1 Antecedentes
- 1.2 Fisiopatología
- 1.3 Presentación clínica
- 1.4 Diagnostico
- 1.5 Rol de la biopsia hepática
- 1.6 Scala's de Severidad
 - 1.6.1 Child Pugh
 - 1.6.2 Maddrey
 - 1.6.3 MELD
 - 1.6.4 Glasgow
 - 1.6.5 ABIC
- 1.7 Tratamiento
- 1.8 Evaluación de respuesta a tratamiento
 - 1.8.1 Score Lille
- 1.9 Descripción del Gen GLCCI1
- 2.0 Planteamiento del problema.....19**
- 3.0 Justificación.....20**
- 4.0 Objetivos**
 - 4.1 Objetivo primario
 - 4.2 Objetivos secundarios
- 5.0 Hipótesis.....22**
 - 5.1 Hipótesis nula
 - 5.2 Hipótesis alterna
- 6.0 Metodología23**
 - 6.1 Diseño estudio
 - 6.2 Población
 - 6.2.1 Tamaño de la muestra

- 6.3 Grupo de estudio**
 - 6.3.1 Criterios de inclusión
 - 6.3.2 Criterios de exclusión
 - 6.3.3 Criterios de eliminación
 - 6.3.4 Grupo control
- 6.4 Procedimientos25**
- 6.5 Diseño experimental.....27**
 - 6.5.1 Extracción de ADN
 - 6.5.2 Cuantificación de ADN
 - 6.5.3 Determinación de polimorfismos
- 7.0 Operacionalización de variables.....29**
 - 7.1 Tipo de variables
 - 7.2 Definición de variables
- 8.0 Análisis estadístico.....39**
- 9.0 Aspectos éticos y de bioseguridad.....40**
- 10.0 Resultados44**
 - 10.1 Descripción de la muestra
 - 10.2 Determinación de Polimorfismos del Gen GLCCI1
- 11.0 Análisis y discusión.....52**
- 12.0 Conclusiones.....56**
- 13.0 Bibliografía57**
- 14.0 Anexos60**
 - Anexo 1. Carta de consentimiento informado
 - Anexo 2. Hoja de recolección de datos
 - Anexo 3. Carta de aprobación del Comité de Investigación del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

| <i>Siglas</i> | <i>Descripción</i> |
|----------------------|---------------------------|
| HA | Hepatitis alcohólica |
| SNP | Polimorfismo |
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| FA | Frecuencias alélicas |
| FG | Frecuencias genotípicas. |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Descripción | Página |
|----------------|--|---------------|
| Tabla 1 | Características demográficas de pacientes con hepatitis alcohólica. | 41 |
| Tabla 2 | Comportamiento bioquímico de pacientes con hepatitis alcohólica a su ingreso hospitalario. | 46 |
| Tabla 3 | Frecuencias alélicas y genotípicas SNP 370972/370913 del gen GLCCI1 en pacientes con hepatitis alcohólica y controles sanos. | 48 |
| Tabla 4 | Frecuencias alélicas y genotípicas SNP 370972/370913 del gen GLCCI1 en pacientes con hepatitis alcohólica y respuesta a tratamiento con esteroides | 49 |
| Tabla 5 | Frecuencias alélicas y genotípicas SNP 370972/370913 del gen GLCCI1 en pacientes con hepatitis alcohólica y respuesta mortalidad | 51 |

Resumen

Antecedentes. La hepatitis alcohólica (HA) es una forma grave de hepatopatía alcohólica. Tiene una alta tasa de mortalidad, que oscila entre el 25-40% en población europea, pero tan alto como el 60% en población mexicana. Además, se ha reportado una proporción muy alta de pacientes mexicanos con HA grave no respondedores a la terapia con prednisona (en México no tenemos prednisolona), con base en el modelo de Lille. La patogenia de HA es multifactorial por la interacción entre el metabolismo del etanol, la participación de la respuesta pro inflamatoria y la inmunidad innata. En la actualidad, el único tratamiento que ha demostrado tener un impacto en la supervivencia es el uso de esteroides. El gen GLCCI1 (receptor de esteroides) fue descrito por Champan y cols., quienes identificaron diferencias significativas en su expresión en células derivadas de timoma con resistencia a glucocorticoides después de la administración de dexametasona. Se ha demostrado que los polimorfismos del gen GCLCCI1 influyen en la respuesta a tratamiento con esteroides en patologías inflamatorias (principalmente en asma), y se argumenta que estos polimorfismos pudieran estar implicados en su expresión génica y relacionarse con la falta de respuesta al tratamiento con esteroides. Sin embargo, el gen GLCCI1 no ha sido explorado en la HA, especialmente en aquellos pacientes con HA grave que no muestran respuesta a la administración de prednisona.

Objetivo. Determinar los polimorfismos rs37972 y rs37973 del genGLCCI1 en pacientes mestizos mexicanos con HA grave, así como evaluar sus asociación con las diferentes características demográficas y clínicas, principalmente con la no respuesta a tratamiento médico con esteroides.

Pacientes y métodos. Se realizó un estudio de casos y controles anidado en una

Cohorte en el que se incluyeron pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de HA grave. Se colectaron las características demográficas, clínicas y bioquímicas de cada paciente mediante la revisión de expedientes clínicos. Se calcularon las

Escalas de gravedad Child Pugh, MELD, MELD-Na, Maddrey, ABIC, Glasgow, y la respuesta a tratamiento médico con esteroides se evaluó mediante el modelo de Lille. En nuestro estudio, denominamos casos a los pacientes clasificados como no respondedores según el modelo de Lille; y controles a los pacientes clasificados como respondedores a tratamiento según el modelo de Lille.

De una muestra de sangre periférica se extrajo y cuantificó el ADN, posteriormente se determinaron los polimorfismos del gen GLCCI1 descritos.

Análisis de resultados. Se utilizó estadística descriptiva para la presentación de las variables y para conocer su distribución se aplicó la prueba de Kolmogorov Smirnov. Las variables continuas se analizaron empleando la prueba T de Student y Chi cuadrada para las variables categóricas. La fuerza de asociación se determinó mediante razón de momios. La significancia estadística se determinó con un valor de $p < 0.05$. Se realizó un análisis univariado y multivariado de tipo regresión logística, para ajuste de variables confusoras. Se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de Chi cuadrada. Se compararon las frecuencias alélicas entre subgrupos mediante el paquete estadístico EPIINFO, versión 5.0. Se compararon las frecuencias genotípicas mediante tablas de contingencia de 2x2 por la prueba de tendencias de Cochran-Armitage.

Resultados. En el análisis de los polimorfismos del gen GLCCI1 con las características clínicas y desenlaces del subgrupo de pacientes con hepatitis alcohólica aguda grave en tratamiento con esteroides no encontramos asociación entre la respuesta o no respuesta a tratamiento con esteroides y los polimorfismos rs370973, rs370972 del gen GLCCI1 sin embargo, los pacientes con los genotipos homocigotos CC rs370972 ($p = 0.01$; OR 0.41 [IC 95% 0.21-0.81]), TT rs370972 ($p = 0. < 0.001$; OR 0.02 [IC 95% 0.00-0.40]) y AA rs37973 ($p = 0.03$; OR 0.48 [IC 95% 0.24- 0.95]), presentaron un menor riesgo de mortalidad temprana (28 días).

y el genotipo heterocigoto AG rs370973 se asoció a la mortalidad de los pacientes a las 24 semanas de seguimiento (13 [18.3%] pacientes vivos vs. 24 [33.8%] finados; $p = \leq 0.001$; OR=13.22 [IC 95%:4.72-36.78]), mismo hallazgo que compartía el genotipo heterocigoto CT rs370972 (12 [16.90%] pacientes vivos y

24 [33.8%] pacientes finados; $p < 0.001$; OR 12.0 [IC 95%:4.46-32.28]) en el seguimiento a 24 semanas.

Conclusión. Los polimorfismos rs370972 y rs37973 del gen GLCCI1 no predicen la respuesta a tratamiento con esteroides en pacientes mestizos-mexicanos con HA. Sin embargo, algunos genotipos de estos polimorfismos estudiados impactan en la mortalidad temprana y tardía de los pacientes mestizos-mexicanos con HA.

Palabras Clave: Hepatitis alcohólica aguda, resistencia a esteroides, polimorfismos genéticos, GLCCI1.

1. Introducción

1.1 Antecedentes.

La enfermedad hepática asociada a la ingesta no medida de bebidas alcohólicas, contribuye a una alta tasa de morbimortalidad en todo el mundo. Actualmente se conoce que un promedio de 15 gramos de alcohol o más de una bebida estándar (255 ml de cerveza, 100 ml de vino,) por semana o más de cinco bebidas de manera ocasional para hombres y cuatro bebidas o más de forma ocasional en mujeres o personas mayores a 65 años confiere riesgo de desarrollo de enfermedad hepática por alcohol. (1)

La cirrosis hepática es uno de los principales problemas de salud pública en México, constituye la sexta causa de mortalidad general y la tercera en hombres de 15 a 64 años de edad. (2) (3)

La hepatopatía por alcohol es una enfermedad muy frecuente en nuestro medio. La estimación de la Clínica de Atención a Problemas Relacionados con Alcohol (CAPRA) del Hospital General de México estima frecuencia 118/ 100 000 en hombres y 21/100 000 mujeres.

La Hepatitis alcohólica (HA) es una causa de falla hepática aguda sobre crónica (ACLF) por sus siglas en inglés (acute on chronic liver failure) que representa un condición dentro de la gama de patologías asociadas al uso y abuso de alcohol, manifiesta por una inflamación aguda del hígado. (4) (5)

Los reportes epidemiológicos en Estados Unidos reportan alto impacto en costo para la salud pública, con un número de 56,809 admisiones hospitalarias con diagnóstico de ingreso hepatitis alcohólica. Generando costos tan elevados como \$37, 769 dólares por pacientes en estancia nosocomial. (6)

La mayoría de los pacientes con Hepatitis alcohólica tiene un pobre pronóstico respecto a la sobrevida, con tasas de mortalidad reportada entre un 30%-50%. (7)

1.2 Fisiopatología

La fisiopatología de la hepatitis alcohólica es multifactorial. Es el resultado final de la compleja interacción entre el metabolismo del etanol, la inflamación y la inmunidad innata. Estas vías metabólicas generan especies reactivas del oxígeno que son potentes inductores de la peroxidación lipídica, que a su vez provoca la muerte de los hepatocitos por necrosis o apoptosis.

La primera lesión que se observa en la glándula hepática ante el abuso de alcohol, es la esteatosis, esta infiltración se observa en la histología como depósitos de adipocitos en los hepatocitos, por incremento en NADH/NAD en los hepatocitos que condicionan oxidación de los ácidos grasos. (8)

Unas variedades de citoquinas se liberan debido a la mayor respuesta Th1, en particular el interferón-gamma y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Los factores quimiotácticos como la interleucina-8 causan la migración de leucocitos e inducen el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica caracterizado por malestar, fiebre y elevación periférica de neutrófilos. TNF- α media sus efectos mediante la unión a dos moléculas de superficie celular, TNF-R1 y TNF-R2. TNF-R1 es el principal inductor de hepatocitotoxicidad a través de necrosis o apoptosis. La respuesta inmune variable a estos neoantígenos puede contribuir a la susceptibilidad individual a AH. (9) (10) (7)

1.3 Presentación clínica

Dentro de las características clínicas se encuentra ictericia, anorexia, fiebre y hepatomegalia, con expresión bioquímica de incremento moderado de aspartato aminotransferasa (AST) o alanino transferasa con una relación tres veces mayor. Las manifestaciones clínicas a la exploración abdominal son dolor en cuadrante superior derecho, dolor en epigastrio y encefalopatía hepática con signos de malnutrición.

Alrededor del 60% de pacientes con hepatitis aguda alcohólica leve o moderada no presentan sintomatología. La hepatitis aguda alcohólica severa se caracteriza por la presencia de leucocitosis marcada, fiebre, hepatomegalia e ictericia e incluso puede manifestarse como un cuadro de falla hepática aguda.

1.4 Diagnóstico

En el grupo de pacientes con cambios compatibles con hepatitis aguda por alcohol es necesario descartar otros factores de riesgo (hipotensión, embarazo, intoxicación por sobredosis de paracetamol o toxicidad por fármacos) cuando la anamnesis no es del todo compatible con un cuadro de hepatitis alcohólica aguda. Por lo cual es necesario realizar estudios de extensión que permitan corroborar el diagnostico, la biopsia hepática se recomienda en datos de gravedad y el tratamiento debe ser iniciado sin demora. (11)

1.5 Rol de la biopsia hepática

Un estudio reciente se ha mostrado que el estudio histológico representa un estudio de extensión relativamente importante comparado con los diferentes puntajes al tener una utilidad predictiva mayor para establecer la mortalidad a 28 días. (12)

Existen distintas características histológicas presentes en la HA, que incluyen esteatosis, inflamación, infiltración de macrófagos espumosos, degeneración balonoide y necrosis en la periferia centrolobulillar. (13)

La balonización de hepatocitos puede condicionar compresión sinusoidal y desarrollo de hipertensión portal. Puede existir un infiltrado celular inflamatorio, en sinusoides y cerca de hepatocitos necróticos. Este infiltrado son células polimorfonucleares e infiltración grasa con cuerpos de Mallory-Denk que son agregaciones de eosinófilos intracitoplásmicos perinucleares en los hepatocitos inflados, positivos en la tinción con hematoxilina-eosina. (14)

Los hallazgos histológicos descritos no son específicos para hepatitis alcohólica. Es frecuente sobre todo encontrar esteatosis con reacción ductal periporta que se

observa en HA grave y es el cambio histológico más específico por una causa alcohólica, pero no es directamente proporcional al grado de severidad de AH. (15)

1.6 Escalas de severidad

1.6.1 Escala Child Pugh

Existen varios sistemas de puntuación clínica, el Child-Turcotte-Pugh (CTP), la función discriminante Maddrey, el modelo de etapa final de enfermedad hepática (MELD) y la puntuación de Glasgow para evaluar el pronóstico y gravedad de la hepatitis alcohólica una vez realizado el diagnóstico. Todas estas escalas pretenden acercar al clínico con el pronóstico esperado al predecir los resultados clínicos de los pacientes con Hepatitis Aguda en los meses de seguimiento.

Para evaluar la estadificación de la cirrosis utilizando el sistema de Child Pugh y el uso diario de esta escala en la práctica clínica es de suma importancia dado que la mortalidad esperada es de aproximadamente 10% a 15%, 25% a 30%, y 70% a 80% a 1 año para las etapas A, B y C de sistema Child Pugh respectivamente. (16)

1.6.2 Índice de función discriminante de Maddrey

El índice de función discriminante (DFI) fue inicialmente descrito por Maddrey y colaboradores en un ensayo clínico controlado por placebo para evaluar el beneficio de la terapia con corticosteroides. Se estudiaron cinco pacientes con hepatitis alcohólica en un ensayo aleatorizado doble ciego de 28 a 32 días que comparó la prednisolona (40 mg por día) con el tratamiento con placebo. Estos estudios sugieren que la terapia con corticosteroides disminuye la mortalidad temprana en pacientes con hepatitis alcohólica grave, pero no tiene un efecto a corto plazo en el desarrollo de la hipertensión portal. De este estudio fue formulada la ecuación: $4.6 \times \text{protrombina Tiempo (PT) en segundos} + \text{bilirrubina sérica (mg / dL)}$. Los resultados arrojaron que pacientes con DFI por encima de 32 y tratados con placebo tenían una supervivencia a los 28 días del 25%, mientras

que aquellos con una puntuación menor tenían sobrevida a seis meses mayor. (17)

1.6.3 Escala MELD

El modelo de enfermedad hepática en etapa terminal (MELD) es una supervivencia se realiza con el valor de bilirrubina sérica, el INR (relación internacional normalizado). A partir de la evaluación de la cohorte multicéntrica de 231 pacientes del seguimiento a corto plazo de pronóstico de pacientes sometidos a transyugular electiva derivación portosistémica intrahepática. Para la evaluación de los pacientes con Hepatitis aguda por alcohol, confiere la predictor mortalidad más específico con un AUROC 87%. (18)

1.6.4 Escala de Glasgow (GAHS)

En Inglaterra se realizó una cohorte de 241 pacientes tratados con esteroides. La supervivencia general a los 28 días fue del 79% (92 pacientes) y del 63% (68 pacientes) para aquellos tratados con corticosteroides y para aquellos que no recibieron corticosteroides, respectivamente ($p = 0.01$) en comparación con ningún tratamiento. En su modelo estadístico este grupo de estudio tomo como punto de corte nueve. En pacientes con GAHS menos de 9 no hubo un beneficio apreciable con tratamiento con corticosteroides. (19)

1.6.5 Escala de ABIC

El equipo de Bataller realizó una cohorte prospectiva entre 2000-2006 en pacientes con HA comprobada por biopsia con evaluación de los parámetros bioquímicos, clínicos y hemodinámicos de la circulación portal. Se incluyeron 103 pacientes y se encontró que la edad, la bilirrubina sérica, la creatinina sérica y la razón internacional normalizada (INR) predijeron de forma independiente la mortalidad a los 90 días. Con estos datos se estableció la puntuación ABIC (edad, bilirrubina sérica, INR y puntaje de creatinina sérica) mediante la fórmula matemática $(\text{edad} \times 0.1) + (\text{bilirrubina sérica} \times 0.08) + (\text{creatinina sérica} \times 0.3) + (\text{INR} \times 0.8)$. El área bajo la curva (AUC) fue 0.82. Usando el análisis de Kaplan-

Meier con los valores de corte de 6.71 y 9.0, se subdividió a los pacientes con bajo, intermedio y alto riesgo de muerte a los 90 días, las tasas de supervivencia reportadas son de 100%, 70% y 25% respectivamente y estos resultados se extendieron hasta la sobrevivida a 365 días por una cohorte confirmatoria (N = 80) para establecer el riesgo de muerte en pacientes con AH a los 90 días y 1 año. (20)

1.7 Tratamiento

El tratamiento general de la hepatitis alcohólica incluye el tratamiento de ascitis por restricción de sal y el uso de diuréticos, tratamiento de encefalopatía hepática con medidas antiamonio (lactulosa, rifaximina, L-ornitida /L-aspartato). En pacientes con infección documentada deben ser tratados con antibióticos elegidos de acuerdo la sensibilidad del organismo aislado.

Respecto a tratamiento nutricional se recomienda una ingesta de 1,5 g / kg de peso corporal junto con vitaminas del complejo B para prevenir la encefalopatía de Wernicke y el uso de benzodiazepinas para el síndrome de abstinencia alcohólica aguda. (11)

Existen distintos tratamientos con inhibidores de TNF-alpha, pentoxifilina, N-acetilsisteina no muestran impacto en mortalidad . (21)

Actualmente el único tratamiento que muestra impacto en el desenlace es el uso de esteroides por al menos 21 días. Los corticoesteroides generan neoantígenos, (citocromo P4502E1 y 3A4, antígeno de la membrana hepática) como inhiben la producción de TNF- α , detienen la cascada inflamatoria de la patogenia en la hepatitis alcohólica.

Un metanálisis publicado en *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* comparo quince ensayos clínicos, para evaluar la calidad metodológica con evaluación de cálculo la muestra, cegamiento, seguimiento, estudio de intención a tratar puntuando la calidad metodológica como baja, media o alta. Doce de los quince incluyeron pacientes con índice de severidad mayor a 32 puntos por puntuación de Maddrey tratados con esteroides por cuatro semanas comparando contra grupo

control (placebo) en el seguimiento a seis meses es la única terapia que ha demostrado incremento en la supervivencia. (22) (23)

Las guías de práctica actual recomiendan el tratamiento con glucocorticoides en pacientes Hepatitis alcohólica grave ($\text{mDF} > 32$) con encefalopatía hepática. (5)

Cartihers y colaboradores diseñaron un ensayo clínico multicéntrico, donde compararon 35 pacientes con 31 controles que recibieron tratamiento con metilprednisolona (40mg/día), encontrando en el análisis descenso de tiempo de protrombina ($p = .000005$) y de aspartato aminotransferasa ($p = 0.0044$) e incremento en supervivencia por Kaplan Mayer en pacientes con tratamiento por veintidós días, con tasa de supervivencia reportada 100% para el grupo de metilprednisolona a los 28 días.

Los principales efectos adversos en pacientes con terapia con esteroides reportados en una cohorte de 89 pacientes en seguimiento a seis meses son: desarrollo de síndrome hepatorenal 25% de los pacientes, desarrollo de infecciones 42% con mayor incidencia de etiología por peritonitis bacteriana espontánea y 1% desarrollo de hemorragia variceal. Solo desarrollo de síndrome hepatorenal fue encontrado como asociación significativa. ($p = 0.02$) al comparar con placebo. (24)

El tratamiento con esteroides está contraindicado en aquellos con infección, sangrado gastrointestinal, pancreatitis aguda o Insuficiencia renal. (25)

1.8 Evaluación de la respuesta a tratamiento

1.8.1 Score LILLE

La respuesta a tratamiento es evaluada a los siete días de inicio de la terapia. Existen múltiples modelos matemáticos que permite al gastroenterólogo conocer la respuesta al tratamiento y la predicción de la supervivencia. La escala más utilizada, es el modelo de Lille, es una fórmula de regresión logística que incluye seis variables (edad, nivel de creatinina, albumina, tiempo de protrombina, bilirrubina y una segunda determinación de bilirrubina a los siete días de inicio de

tratamiento) y es predictor de mortalidad a los seis meses ($p < 0.000001$ con AUROC 0.89) con un punto de corte validado de 0.45. (26)

Este enfoque identificó tres patrones de respuestas, completas, parciales y nulas, con diferencias en el beneficio de supervivencia: 91% vs 79% vs 53%, $P < 0,0001$. Los corticosteroides mostraron un efecto significativo en 28 días de supervivencia en completo (hazard ratio 0.18) y en parcial respondedores (hazard ratio 0,38), pero no en respuesta nula. (27)

1.9 Descripción del Gen GLCCI1

El gen GLCCI1 se encuentra en el cromosoma 7p21.3 y contiene 8 exones. Su rol en señales relacionadas con corticosteroides fue descrito por primera vez por Champan y colaboradores quien identificaron diferencias significativas en su expresión en células derivadas de timoma con resistencia a glucocorticoides o resistencia a glucocorticoides después de la administración de dexametasona. (28)

Este gen codifica una proteína de función desconocida y su expresión es inducida por glucocorticoides como marcador temprano de apoptosis. Los polimorfismos de este gen se han relacionado con respuesta disminuida a esteroides inhalados en pacientes con asma. (29)

En un ensayo realizado por Kelan y colaboradores que incluyó seguimiento de 1041 niños con asma entre 5 y 12 años de edad que recibieron tratamiento con esteroides inhalados en un periodo de 5 a 12 años. Se correlacionó rs37972 y rs37973 con la disminución de la expresión de GLCCI1. (30)

La expresión de GLCCI1 es medida en varios paneles de tejido humano utilizando transcriptasa reversa y ensayo con PCR, con gliceraldehido-3-fosfato como variante de control y tiene alta expresión en pulmón, hepático y tejido linfoide, incluido células T y natural Killer.

2.0 Planteamiento del Problema

La hepatitis aguda alcohólica representa una entidad frecuente dentro de las complicaciones asociadas a ingesta de alcohol en pacientes ya conocidos con hepatopatía crónica alcohólica en todos los estadios de puntuación de estadificación de daño hepático que confiere una tasa de mortalidad que va desde 15% en países anglosajones y en Europa hasta cifras que superan 65% de mortalidad en América Latina. En el momento actual, las pautas de tratamiento se establecen como medidas generales de sostén en el escenario de pacientes con insuficiencia hepática que cursa con descompensación, y en general un pequeño porcentaje de pacientes cumplen criterios para establecer terapia con esteroides, siendo la respuesta de éste último grupo no muy satisfactoria en la mayoría de los casos. Ante este precepto toma importancia establecer diferencias puntuales entre nuestra población y la población caucásica respecto a falta de respuesta a tratamiento con esteroides.

3.0 Justificación

En la actualidad, el único tratamiento que ha demostrado tener un impacto en la supervivencia de los pacientes con HA grave es el uso de esteroides. Sin embargo, la mayoría de estos pacientes no presentan respuesta a tratamiento.

El gen GLCCI1 (receptor de esteroides) fue descrito por Champan y cols., quienes identificaron diferencias significativas en su expresión en células derivadas de timoma con resistencia a glucocorticoides después de la administración de dexametasona. Se ha demostrado que los polimorfismos del gen GCLCCI1 influyen en la respuesta a tratamiento con esteroides en patologías inflamatorias (principalmente en asma), y se argumenta que estos polimorfismos pudieran estar implicados en su expresión génica y relacionarse con la falta de respuesta al tratamiento con esteroides. Sin embargo, el gen GLCCI1 no ha sido explorado en la HA, especialmente en aquellos pacientes con HA grave que no muestran respuesta a la administración de prednisona.

El presente estudio determinó los polimorfismos rs37972 y r37973 del gen GLCCI1 en pacientes mestizos mexicanos con HA grave, y evaluó su asociación con las diferentes características demográficas y clínicas, de la no respuesta a tratamiento médico con esteroides.

Este es el primer estudio a nivel mundial en el que se relaciona a los polimorfismos del gen GLCCI1 con la HA grave, y ofrece nuevos horizontes en la caracterización génica de la enfermedad, en su diagnóstico y tratamiento.

4.0 Objetivos

Objetivo Primario

Determinar los SNP rs37972 y r37973 del gen GLCCI1 en pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de hepatitis alcohólica grave.

Objetivo Secundario

Evaluar la asociación de los SNP rs37972 y r37973 del gen GLCCI1 con la respuesta a tratamiento con esteroides en pacientes con hepatitis alcohólica grave.

Determinar la asociación de los SNP rs37972 y r37973 del gen GLCCI1 con la mortalidad de pacientes mexicanos con hepatitis alcohólica grave.

5.0 Hipótesis

Nula. Los SNP rs37972 y r37973 del gen GLCCI1 confieren susceptibilidad para la no respuesta a tratamiento con esteroides en pacientes mestizos mexicanos con hepatitis alcohólica grave.

Alternativa. Los SNP rs37972 y r37973 del gen GLCCI1 no confieren susceptibilidad para la no respuesta a tratamiento con esteroides en pacientes mestizos mexicanos con hepatitis alcohólica grave.

6.0 Metodología

6.1 Diseño del estudio

Analítico. Transversal. Casos y controles.

6.2 Población

6.2.1 Tamaño de la muestra

Se calculó en base a las fórmulas descritas por Stanley Lemeshow. Para el cálculo de la muestra se consideraron las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de los polimorfismos (rs37972 y rs37973) del gen GLCCI1 en la población sana mestiza mexicana (p2) que se estima se presenta en un 40%. Por otro lado, se tomó una razón de momios de 2 en base a que se considera clínicamente significativa.

Fórmulas:

$$p1 = \frac{(RM) p2}{(RM) p2 + (1-p2)}$$

Llevándose a cabo las operaciones correspondientes se estimó que la frecuencia de los polimorfismos (rs37972 y rs37973) del gen GLCCI1 el grupo de pacientes con hepatitis alcohólica sería del 60%.

En la segunda fórmula, se tomaron las frecuencias en los dos grupos, con un poder del 80% y un valor de alfa de 0.05

$$n = \frac{[Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2 p2 (1-p2)} + Z_{1-\beta} \sqrt{p1 (1-p1) + p2 (1-p2)}]^2}{(p1 - p2)^2}$$

Nivel de significancia estadística alfa= 0.05

Poder= 0.80

RM= 2.0

p1= .40

p2= .60

$$Z_{1-\alpha/2} = 1.96$$

$$Z_{1-\beta} = .8$$

Después de realizar los procedimientos aritméticos correspondientes, se consideró un total de 137 sujetos con hepatitis alcohólica aguda grave para demostrar o refutar la asociación. Durante el seguimiento del estudio se evaluaron 116 pacientes con diagnóstico de hepatitis alcohólica grave, de éstos sólo 71 pacientes cumplían criterios para recibir tratamiento con esteroides. Dado los criterios de inclusión de nuestro estudio sólo se determinaron los polimorfismos descritos en los 71 pacientes con HA grave en tratamiento con esteroides.

6.3 Grupo de estudio

6.3.1 Criterios de inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años.
2. Mestizos mexicanos (definido como una persona nacida en México con al menos dos generaciones anteriores también nacidas en México).
3. Diagnóstico de hepatitis alcohólica grave (según criterios clínicos y bioquímicos con base en el Consorcio de hepatitis alcohólica patrocinado por el Instituto Nacional de Abuso de Alcohol y Alcoholismo, AHC-NIAAA).
4. En tratamiento con terapia con esteroides (prednisona).

6.3.2 Criterios de exclusión

1. Pacientes en estado de inmunosupresión (VIH, cáncer, tratamiento con quimioterapia, agentes biológicos).
2. Paciente con enfermedades inmunológicas (hepatitis autoinmune, anemia hemolítica, trombocitopenia idiopática púrpura, Diabetes mellitus tipo 1,

tiroiditis autoinmune, miastenia gravis, psoriasis, lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide), enfermedad inflamatoria intestinal, pancreatitis aguda.

6.3.3 Criterio de eliminación

Pacientes que no quisieron participar en el estudio.

Pacientes en quienes no se obtuvo DNA a partir de la muestra sanguínea.

26

6.3.4 Grupo Control

Se estudiaron 23 individuos adultos sanos, de ambos géneros, nacidos en México al igual que sus dos últimas generaciones, que aceptaron participar en el estudio y otorgaron el consentimiento informado para la toma y procesamiento de una muestra de sangre periférica (8 mL).

Los individuos incluidos en este grupo control fueron captados en el banco de sangre de nuestra institución (Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”).

6.4 Procedimiento

- Una vez seleccionados los casos se obtuvo consentimiento informado para participar en el estudio, según requerimientos del Comité de Ética de nuestra Institución y de acuerdo a los Principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos Capítulo I, Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.
-
- Se recabó la información enfocada a las características demográficas, clínicas y bioquímicas de cada paciente, se corroboró y completó esta información mediante la revisión del expediente clínico.
- Se calcularon las escalas de severidad Child Pugh, MELD-NA, Maddrey, ABIC, Glasgow.

- De la información recabada en la recolección de datos / revisión del expediente clínico de cada paciente, se categorizó a cada uno de acuerdo a la puntuación obtenida mediante las escalas Child Pugh y MELD NA.
- Se calculó el riesgo mortalidad para hepatitis aguda alcohólica con los índices de Maddrey, ABIC y Glasgow.
- Se evaluó la respuesta a tratamiento médico con esteroides mediante el Índice de Lille.
- Se tomó (previo consentimiento informado y explicación de riesgo mínimo) una muestra sanguínea venosa periférica de aproximadamente 8 mL de sangre, que se colocó en un tubo con anticoagulante (EDTA al 2%), de la cual se extrajo y cuantificó el ADN para la determinar los SNP correspondientes.

6.5 Diseño experimental

6.5.1 Extracción de ADN

Para la extracción de DNA a partir de la muestra de sangre periférica se utilizó el método estandarizado patentado por The QIAmp MIdi Kit (Spin Protocol) ® .

A continuación se expone el método de extracción de DNA con el kit descrito:

Procedimiento (The QIAmp MIdi Kit /Spin Protocol ®)

Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (15-25°C) antes de iniciar:

- Preparar a 70°C baño de agua para paso 4 del protocolo.
 - Preparar el Buffer AW1, Buffer AW2 y QIAGEN® proteasa de acuerdo a instrucciones del proveedor.
-
- Si se precipita reconformar el buffer A1, re disolver por incubación a 56 °C.
1. Tomar con pipeta 100 mcl o 200 mcl QIAGEN® o 200 mcl QIAGEN proteasa en el botón de 15 mcl del tubo centrifugado.
 2. Agregar 0.3-1 ml o 1-2 ml de sangre y mezclar vigorosamente

Cambiar el volumen de la muestra hacia arriba 1ml o 2 ml con PBS, si es necesario, antes de centrifugar el tubo.

3. Agregar 1.2 ml o 2.4 ml de Buffer AL, y mezclar invirtiendo el tubo 15 veces, posterior agitar vigorosamente durante un minuto. Incubar a 70°C por 10 minutos.
4. Agregar 1 ml o 2 ml de etanol (96-100%) a cada muestra, y mezclar invirtiendo los tubos 10 veces, después agitar vigorosamente.
5. Transferir cuidadosamente todo o la mitad de la solución del paso 4 en la columna de 15ml del QIAamp Midi® sin derramar el borde. Cerrar el tubo y centrifugar a 1850 x g (3000 rpm) por 3 minutos.
6. Quitar la columna de QIAamp Midi®, retirar el filtro y reemplazar la columna QIAamp Midi®. Cargar la solución del paso 5 dentro de QIAamp Midi®. Cerrar el tubo y centrifugar a 1850 x g (3000 rpm) por 3 minutos.
7. Quitar y vaciar el filtro de QIAamp Midi® y en su lugar conservar la columna de QIAamp Midi® los 15 mililitros del tubo centrifugado.
8. Cuidadosamente desprender tapón y agregar 2 ml de buffer AW1 de QIAamp Midi®. Cerrar el capuchón y centrifugar a 4500xg (5000 rpm) por 1 minuto.
9. Cuidadosamente desprender tapón y agregar 2 ml de buffer AW2 de QIAamp Midi®. Cerrar el capuchón y centrifugar a 4500xg (5000 rpm) por 1 minuto.
10. Limpiar la columna de QIAamp Midi® y descargar el contenido del tubo fuera de filtro.
11. Tomar con la pipeta 200 mcl o 300 mcl de Buffer AE o agua destilada, equilibrada a temperatura (15-25°C) directamente en la membrana QIAamp

Midi® y cerrarlo. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, y centrifugar a 4500xg (5000 rpm) por 2 minutos.

6.5.2 Cuantificación de DNA

La cuantificación del DNA obtenido se realizó con el equipo Nano Drop® según los requerimientos del proveedor, la longitud de onda con la que se leyó el DNA fue de 280 nm.

6.5.3 Determinación de Polimorfismos

Se evaluaron dos polimorfismos (rs37972 y r37973 del Gen GLCCI1), los cuales fueron genotipificados a través de la técnica de la 5' exonucleasa TaqMan en el procesador ABI Prism 7900 HT de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

El láser del equipo de Tiempo Real leyó cada placa con los diferentes SNP's, y los datos escaneados fueron proporcionado por el software SDS 2.2 de la compañía Applied Biosystems.

7.0 Operacionalización de las variables

7.1 Tipos de Variables

Variable dependiente: Hepatitis aguda alcohólica

Variable Independiente: Polimorfismos rs37972 y r37973 del gen GLCC11

Variables Cuantitativas

- **Discretas:** Edad, comorbilidades, plaquetas, glucemia, colesterol, triglicéridos, TGP, TGO, FA, GGT, DHL, amilasa, lipasa, porcentaje de tiempo de protrombina, fibrinógeno, puntuación Child Pugh C, MELD NA, puntuación Maddrey puntuación ABIC , Glasgow , Índice de Lille.
- **Continuas:** Gramos de alcohol consumido por semana, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, hemoglobina, hematocrito, urea, creatinina, albúmina, bilirrubina total, bilirrubina indirecta, bilirrubina directa, sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo, magnesio, tiempo de protrombina, INR, tiempo parcial de tromboplastina. segunda determinación de bilirrubina.

Variables Cualitativas

- **Nominales:** Nombre paciente, sexo, comorbilidades. Mortalidad hospitalaria.
- **Ordinales:** Puntuación: Child Pugh C, MELD NA, puntuación Maddrey puntuación ABIC, Glasgow, Índice de Lille.

7.2 Definición de las Variables

| Variable | Definición Operacional | Tipo Variable | Unidad de Medición |
|-----------------------|--|-----------------------|---|
| Edad | Tiempo transcurrido a partir del nacimiento del individuo, se describirá en años. | Cuantitativa Discreta | Años |
| Sexo | Se definió como masculino o femenino según características fenotípicas. | Cualitativa Nominal | Masculino / Femenino |
| Comorbilidades | Afecciones que vienen a agregarse a la enfermedad primaria relacionada con la discapacidad pero no se relacionan con ella. | Cualitativa Nominal | Se anotó según sean descritas en los antecedentes del paciente (falla cardíaca, infarto agudo de miocardio, enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad hepática, enfermedad ulcerosa, Diabetes |

| | | | |
|----------------------------|--|-----------------------|--|
| | | | Mellitus, enfermedad renal, cualquier tumor, leucemia, linfoma, metástasis tumoral sólida, SIDA, enfermedad tejido conectivo, demencia, hemiplejía). |
| Leucocitos (Leuc): | Se refiere a la cuenta total de glóbulos blancos reportados en la biometría hemática (BH) | Cuantitativa Continua | Se expresó $10^3/\mu\text{l}$. |
| Neutrófilos (Neutr) | Se refiere al porcentaje de glóbulos blancos de tipo granulocito de la cuenta total de leucocitos reportado en la BH. | Cuantitativa Continua | Se expresó $10^3/\mu\text{l}$. |
| Linfocitos (Linf) | Se refiere al porcentaje de glóbulos blancos de tipo linfoide de la cuenta total de leucocitos reportado en la Biometría hemática. | Cuantitativa Continua | Se expresó $10^3/\mu\text{l}$. |
| Hemoglobina | Heteroproteína de los glóbulos | Cuantitativa | Se expresó en |

| | | | |
|---------------------------|--|-----------------------|----------------------------------|
| (Hb): | rojos que transporta oxígeno reportada en la Biometría hemática. | a Continua | gr/dL. |
| Hematocrito (Hto): | Heteroproteína de los glóbulos rojos que transporta oxígeno reportada en la BH, | Cuantitativa Continua | Se expresó en gr/dL |
| Plaquetas (PLQ): | Se refiere a la cuenta total de las células de la serie megacariocítica reportada en la BH | Cuantitativa Continua | Se expresó en $10^3/\mu\text{l}$ |
| Glucemia (Gluc): | Es la cantidad de glucosa libre en sangre reportada en la química sanguínea (QS) | Cuantitativa Continua | Se expresó en mg/dL |
| Glucosa (Gluc): | Es la cantidad de glucosa libre en sangre reportada en la química sanguínea (QS), | Cuantitativa Continua | Se expresó en mg/dL |
| Urea | Resultado final del metabolismo de las proteínas producido por la degradación de las proteínas en el hígado, reportada en la QS. | Cuantitativa continua | Se expresó en mg/dL |
| Colesterol (Col): | Esterol que se encuentra en el plasma sanguíneo y tejidos corporales de los vertebrados, reportado en la QS. | Cuantitativa discreta | Se expresó en mg/dL. |
| Triglicéridos | Glicérido formado de la | Cuantitativa | Se expresó en |

| | | | |
|--|--|----------------------------|----------------------|
| (Trig): | esterificación de los tres grupos OH del glicerol, reportado en la QS. | a Discreta | mg |
| Albúmina (Alb): | Proteína producida por el hígado siendo la mayor proteína contenida en sangre, reportada en la QS. | Cuantitativa a Discreta | Se expresó en mg/dL |
| Bilirrubina total (BT): | Pigmento de la bilis resultado de la descomposición de la Hb que incluye la suma de la bilirrubina directa e indirecta, reportada en la QS. | Cuantitativa a Discreta | Se expresó en mg/dL |
| Bilirrubina Directa (BD): | Es el total de bilirrubina conjugada con ácido glucorónico, reportada en la QS. | Cuantitativa a Discreta | Se expresó en mg/ |
| Bilirrubina Indirecta (BI): | No conjugada o libre, se produce en la sangre a partir de la degradación de los eritrocitos, reportada en la QS. | Cuantitativa a Discreta | Se expresó en mg/dL. |
| Alanina-aminotransferasa (TGP): | Enzima unilocular que se localiza en el parénquima hepático y en menor proporción en músculo esquelético, corazón, riñón, páncreas y eritrocitos, cataliza la transferencia de un grupo amino desde la alanina a la alfa-ceto-glutarato, reportada | Cuantitativa a Discreta | Se expresó en U/L. |

| | | | |
|--|--|-----------------------|-------------------------|
| | en la QS. | | |
| Aspartato-aminotransferasa (TGO): | Enzima unilocular que se localiza en el parénquima hepático y en menor proporción en músculo esquelético, corazón, riñón, páncreas y eritrocitos, cataliza la transferencia de un grupo amino desde la alanina a la alfa-ceto-glutamato, reportada en la QS. | Cuantitativa Discreta | Se expresó en U/L. |
| Fosfatasa alcalina (FA): | Proteína que se encuentra en todos los tejidos corporales y en proporciones más altas en hígado, vías biliares y hueso; elimina los grupos fosfatos de varios tipos de moléculas (nucleótidos, proteínas y alcaloides, reportada en la QS. | Cuantitativa Discreta | Se expresó en U/L. |
| Gama-glutamil-transpeptidasa (GGT): | Enzima hepática que participa en la transferencia de aminoácidos a través de las membranas celulares con mayor concentración en hígado y vías biliares, reportada en la QS. | Cuantitativa Discreta | Se expresó en U/L. |
| Tiempo de protrombina (TP): | Tiempo en que se forma un coágulo en una muestra sanguínea una vez añadido el factor tisular (evalúa vía | Cuantitativa continua | Se expresó en segundos. |

| | | | |
|--|---|-----------------------|--|
| | intrínseca), se reporta en tiempos de coagulación y | | |
| International normalized ratio (INR): | Forma de estandarizar los valores obtenidos a través del TP, se reporta en tiempos de coagulación | Cuantitativa continua | --- |
| Tiempo de tromboplastina (TTP): | Tiempo en que se forma un coágulo en una muestra sanguínea una vez añadido el factor tisular (evalúa vía extrínseca), se reporta en tiempos de coagulación. | Cuantitativa continua | Se expresó en porcentaje |
| Polimorfismo rs37972 del gen GLCCI1 | Variación de la secuencia en múltiples alelos en un lugar determinado del locus del gen GLCCI1 observado en población mexicana | Cualitativa | 0 Ausente. 1 Presente. |
| Polimorfismo rs37973 del gen GLCCI1 | Variación de la secuencia en múltiples alelos en un lugar determinado del locus del gen GLCCI1 observado en población mexicana | Cualitativa | 0 Ausente. 1 Presente. |
| Child Pugh | Escala predictor de mortalidad a los 12 meses en pacientes con cirrosis y pronóstico de pacientes sometidos a trasplante. Toma en cuenta: albumina sérica, Bilirrubina total, INR, grado de ascitis y encefalopatía y | Cualitativa | 1= Estadio A 2= Estadio B 3= Estadio C |

| | | | |
|--------------------------|--|------------------------|---|
| | etiología de cirrosis. | | |
| MELD-NA | <p>Modelo pronóstico en pacientes con falla hepática para priorizar momento de trasplante.</p> <p>Se realiza mediante formula: $0.957 \times \text{Log}(\text{creatinina mg/dL}) + 0.378 \times \text{Log}(\text{mg/dL}) + 1.120 \times \text{Log}(\text{INR}) + 0.6431 + 1.32 \times (137 - \text{Na})$</p> | Numérica continua | Puntaje |
| Índice de Maddrey | <p>Índice de función discriminante, predice pronóstico a corto plazo (39 días de diagnóstico) permite discernir pacientes candidatos a terapia con esteroides. Toma en cuenta tiempo de protrombina, comparado con limite normal y Bilirrubina total</p> | Cualitativa dicotómica | <p>0 =No severa 1= Severa</p> <p>Punto de corte 32puntos</p> |
| ABIC | <p>Escala de Hepatitis alcohólica determina severidad de Hepatitis alcohólica. Toma en cuenta edad, conteo de leucocitos, BUN, INR y creatinina.</p> | Cualitativa dicotómica | <p>0 =No severa 1= Severa</p> <p>Punto de corte 7 puntos</p> |
| Glasgow | <p>Escala de Hepatitis alcohólica de Glasgow es útil para determinar que pacientes pueden requerir tratamiento intensivo. Toma en cuenta</p> | Cualitativa dicotómica | <p>0 =No severa 1= Severa</p> <p>Punto de corte 9 puntos</p> |

| | | | |
|------------------------|--|------------------------|--|
| | edad, conteo de leucocitos, BUN, bilirrubina total, tiempo de protrombina comparado con referencia. | | |
| Índice de Lille | Identifica los pacientes no respondedores en la hepatitis alcohólica. Una puntuación superior a 0.45 indica una falta de respuesta a los cortico esteroides y predice una tasa de supervivencia a los 6 meses del 25%. Evalúa los parámetros: Edad (años) Albúmina (g/L) Creatinina (mg/dL) Bilirrubina día 0 (mg/dL) Bilirrubina día 7 (mg/dL) Tiempo de protrombina 0 (segundos) | Cualitativa dicotómica | 0= No respuesta 1= Respuesta Punto de corte <0.45=respuesta |
| Vivo/Finado: | En esta categoría se expresa la condición de seguimiento de paciente a las 24 semanas | Cualitativa dicotómica | 0= Vivo 1= Finado. |

8.0 Análisis estadístico

Se usó estadística descriptiva, frecuencias, medias y desviación estándar para la presentación de las variables. La distribución de las variables se determinó mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov.

Las variables continuas se analizaron utilizando la prueba t de Student y para variables categóricas la prueba de Chi-cuadrada.

Se realizó en forma inicial el cálculo de las frecuencias génicas, la cual se obtuvo tomando en cuenta la frecuencia de cada alelo con respecto a un total de $2N$, ya que uno procede del padre y otro de la madre.

El análisis de asociación de la frecuencia de cada alelo se realizó mediante tablas de contingencia de 2×2 y se utilizó la prueba de Chi-cuadrada de Pearson y exacta de Fisher cuando existan frecuencias menores de 5 en ésta última. La fuerza de asociación se determinó por medio de una razón de momios >1 la cual se consideró como positiva o de susceptibilidad y <1 negativa o de protección. La significancia estadística se determinó con un valor de $p < 0.05$.

El valor de p se fue corregido de acuerdo con el número de alelos estudiados mediante la Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Para la correlación de las variables clínicas con los marcadores genéticos, se realizó un análisis univariado y posteriormente multivariado de tipo regresión logística para ajustar las variables confusoras usando el paquete estadístico SPSS versión 25.0.

Se evaluó el equilibrio de Hardy - Weinberg mediante la prueba de Chi cuadrada. Se calculó la razón de momios para la enfermedad en los portadores de alelos específicos. La comparación de las frecuencias alélicas entre subgrupos se realizó utilizando el paquete estadístico EPIINFO versión 5.0.

Las frecuencias genotípicas se compararon para cada una de las tablas 2×2 de contingencia por la prueba de tendencias de Cochran-Armitage.

Aspectos éticos y de bioseguridad

Los aspectos científicos, éticos, administrativos, jurídicos y financieros del presente proyecto de investigación se encuentran apegados a las leyes, reglamentos y las normas vigentes del Hospital General de México, así como a los Principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos. Capítulo I. Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.

Esta investigación se consideró como riesgo mínimo de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los aspectos mencionados con el Artículo 21 de la Ley General de Salud.

Se entregó a cada participante del estudio una hoja con información detallada (riesgos, complicaciones, beneficios del estudio), así como el consentimiento informado con el nombre del investigador principal y del presidente del Comité de Ética en Investigación de nuestra Institución.

La participación en el estudio fue de manera voluntaria aportando una muestra de sangre que fue utilizada para realizar una prueba genética (determinación de polimorfismos), procedimiento que implicó riesgos mínimos o nulos hacia el paciente (dolor e inflamación autolimitados en el sitio de la punción); la cual fue desechada al término del proyecto de investigación.

Se brindó en todo momento información clara y precisa de lo que implica la participación del paciente en este protocolo, de manera verbal y escrita.

La información provista en el curso de esta investigación fue y será estrictamente confidencial y no será utilizada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio.

Se atendieron todas las dudas del paciente respecto al proyecto de investigación y se les informó que tendría respuesta a cualquier interrogante que le surgió durante el estudio. Asimismo, fue informado que podría retirarse del estudio cuando así lo decida sin perder los beneficios que le son otorgados como paciente en nuestra Institución ni ser penalizado.

Tratamiento para desecho de la sangre. La sangre fue desechada en recipientes herméticos color rojo disponibles en el INMEGEN, en ellos, se almaceno temporalmente hasta su recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final por personal especializado de nuestra Institución, según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Toma y recolección de muestras. La toma de muestra se hizo en la cama del paciente, se contó con adecuada iluminación y posición cómoda del paciente. Previo calce de guantes estériles, se localizó una vena adecuada en la cara anterior del codo y se colocó el torniquete en la parte media del brazo. Se desinfectó el área con un algodón humedecido con alcohol al 70% y posteriormente se introdujo la aguja con el bisel hacia arriba de una jeringa estéril de 10 mL. Al empezar a fluir la sangre se retiró el torniquete y una vez que se obtuvo la cantidad de sangre requerida (8 mL), se retiró la aguja y se colocó una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia, posteriormente se colocó un parche adhesivo. Al retirar la aguja, se vertió la sangre en dos tubos estériles con anticoagulante EDTA de 4 mL cada uno de ellos, dejándola resbalar lentamente por la pared para evitar hemólisis. Se tapó el tubo cuidadosamente. Se rotularon cada uno de los tubos con tinta permanente, indicando el nombre completo, edad y número de expediente del paciente. Se colocaron en una bolsa con cierre hermético (contenedor secundario), y se transportaron al Laboratorio del INMEGEN para su procesamiento.

Los guantes estériles, torundas, jeringas y material punzocartante empleado durante la toma de la muestra fueron desechados en los contenedores destinados para ello en el INMEGEN según lo rige la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Procesamiento y conservación de muestras.

Riesgos de la venopunción. Los riesgos y complicaciones de la extracción sanguínea se explicaron al paciente y a su responsable, previo al procedimiento durante la firma del consentimiento informado. Entre los riesgos y complicaciones, así como las medidas para su prevención, se describen a continuación:

- Formación de hematoma. Es la complicación más común de la venopunción. El hematoma se origina por el desbordamiento de la sangre en el tejido, durante o después de la punción, siendo visualizado en forma de protuberancia. El dolor es el síntoma de mayor incomodidad para el paciente, y, eventualmente, puede tener lugar la compresión de algún nervio. Si la formación del hematoma se identifica durante la punción, se debe retirar inmediatamente el torniquete y la aguja, y después, realizar una compresión local durante al menos dos minutos. El uso de compresas frías puede ayudar a atenuar el dolor local.
- Punción accidental de una arteria. La probabilidad de punzar accidentalmente una arteria es relativamente rara. Siempre que tenga lugar está asociado al intento de una punción venosa profunda. Se produce con más frecuencia, cuando se intenta punzar la vena basílica, que se encuentra muy próxima a la arteria braquial. La punción accidental de una arteria se puede identificar por el “rojo vivo” de la sangre y por el drenaje de la sangre a chorro, o por el rimo pulsátil de la sangre. Si tiene lugar una punción inadvertida de una arteria, es importante realizar una presión local, durante, al menos, 5 minutos, además de una oclusión más eficaz de la zona de la punción.
- Infección. La posibilidad de desarrollar un proceso infeccioso en la zona de la venopunción, aunque rara, no se debe descartar. La antisepsia del punto de punción debe ser bien ejecutada y la zona preparada para la punción no se debe tocar después de este proceso. Entre las medidas recomendadas para evitar infección en el sitio de punción se encuentran: el uso de algodón

hidrófilo mojado en alcohol etílico comercial, alcohol yodado o antisépticos basados en yodo, disponibles comercialmente. El intervalo entre la retirada del protector de la aguja y la venopunción debe ser el mínimo posible.

El parche adhesivo debe ser abierto únicamente en el momento de la aplicación en la piel del paciente y mantenido por lo menos 15 minutos después de la extracción.

- Lesión nerviosa. Para prevenir la lesión de algún nervio, se recomienda evitar la inserción muy rápida o profunda de la aguja. No se debe realizar la punción de una vena por medio de múltiples intentos de re direccionamiento de la aguja insertada de forma aleatoria. Si no se tiene éxito en el primer intento de punción, se retirará la aguja y se realizará una segunda punción, preferiblemente en otra zona. Se debe indicar al paciente que no realice movimientos bruscos durante la extracción.
- Dolor. El dolor después de la punción es de baja intensidad y soportable, aunque tranquilizar al paciente antes de la extracción ayuda sobremanera en su relajación, haciendo el procedimiento menos doloroso. La zona de punción debe estar seca, si se ha utilizado alcohol para la antisepsia, lo que disminuye la sensación dolorosa. El dolor intenso, parestesias, irradiación del dolor por el brazo, presentadas durante o después de la venopunción, indican que se ha visto afectado un nervio y requieren de medidas específicas ya mencionadas.

Recomendaciones de la Sociedad Brasileña de Medicina Laboratorial para la Extracción de Sangre Venosa. Segunda Edición. 2009. Recuperado de: <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320100928153008.pdf>

10.0 Resultados

10.1 Características clínicas y demográficas de pacientes con HA grave en tratamiento con esteroides.

Se incluyeron 71 pacientes con diagnóstico de hepatitis aguda grave por alcohol y que cumplieron los criterios de inclusión establecidos en nuestro estudio, 62 hombres (87.3%) y 9 mujeres (12.7%) con edad promedio 43.45 ± 9.97 años, todos con serologías no reactivas para VHC, VBH, VIH. Seis pacientes tenían como comorbilidad hipertensión arterial, y no fue reportado algún otro antecedente de enfermedad cronicodegenerativa.

Los grados de insuficiencia hepática reportados fueron: Child Pugh A, 2 pacientes (2.8%); Child Pugh B, 16 pacientes (22.5%) y Child Pugh C, 91 pacientes (53 %). Según la escala de MELD-Na el puntaje promedio en nuestro grupo de estudio fue de 14 ± 8.9 puntos. Todos los pacientes incluidos en el estudio tuvieron una puntuación en la escala de Maddrey >32 puntos ($M > 32$) y fueron candidatos a recibir terapia con esteroides. Según las escalas de severidad de ABIC y Glasgow: 47 pacientes (66.2%) presentaron ABIC > 9 puntos y 41 pacientes (57.7%) presentaron un Glasgow mayor a 9 puntos.

La respuesta a la terapia con esteroides se determinó de acuerdo al Índice de Lille con un punto de corte para considerar respuesta < 0.45 . Treinta y cuatro pacientes tuvieron respuesta al tratamiento (47.9%) y 37 pacientes no tuvieron respuesta (52.1%). La tasa de mortalidad global fue de 47.11% a las 24 semanas de seguimiento. En este mismo periodo de seguimiento sobrevivieron 17 pacientes (43.5%) con respuesta a tratamiento con esteroides y 6 pacientes (8.4%) sin respuesta a tratamiento con esteroides (Tabla 1).

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes con HA grave en tratamiento con esteroides.

| Variable | N= 71 (%) n(%) |
|---|-------------------|
| Genero | 71 |
| Hombres | 62 (87.3) |
| Mujeres | 9 (12.7) |
| Edad | 43.45 ±9.97 años |
| Consumo de gramos de ingesta de alcohol /día (gramos)* | 236± 12.6* |
| Child Pugh | |
| • A | 2 (2.8%) |
| • B | 16 (22.5) |
| • C | 53 (74.6) |
| MELD Na (puntos)* | 14±8.9* |
| Maddrey | |
| Maddrey >32 puntos | 71 (100) |
| ABIC | |
| > 9 puntos | 47(66.2) |
| <9 puntos | 20(28.2) |
| Glasgow | |
| >9 puntos | 41 (57.7) |
| <9 puntos | 29(40.8) |
| Lille | |
| Con respuesta (< 0.45) | 29 (33.3) |
| Sin respuesta | 58 (66.6) |

* Describe la media del puntaje y la desviación estándar.

Se colectaron los parámetros bioquímicos de cada paciente a su ingreso hospitalario con el afán de calcular las escalas descritas, observando marcada elevación de los parámetros de inflamación tales, como: leucocitosis, incremento de reactantes de fase aguda (VSG y PCR); alteraciones esperadas para los criterios clínicos de diagnóstico en pacientes con hepatitis alcohólica aguda (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento bioquímico de pacientes con HA grave a su ingreso hospitalario.

| Parámetro | X(DE)* |
|---|---------------|
| Hemoglobina (g/dL) | 10.9±12.3 |
| Leucocitos (10³ /μL) | 15.8± 7.1 |
| Neutrófilos (10³ /μL) | 12.5±9.2 |
| Plaquetas (10³ /μL) | 110±68 |
| Urea (mg/dL) | 56.5±15.5 |
| Glucosa (mg/dL) | 103±40.1 |
| Creatinina (mg/dL) | 1.2±2.2 |
| Sodio (mEq) | 132±14.1 |
| Potasio (mEq) | 3.5±1.9 |
| Cloro (mEq) | 96.8±12.3 |
| Fosforo (mEq) | 4.1±1.8 |

| | |
|--|-----------|
| Calcio (mEq) | 7.9±2.0 |
| Magnesio (mEq) | 2.0±0.7 |
| Bilirrubina total (U/L) | 19.5±11.7 |
| Bilirrubina directa (U/L) | 10.4±11.3 |
| Bilirrubina indirecta (U/L) | 8.2±5.5 |
| Albumina (mg/dL) | 2.5±2.7 |
| Alanino aminotransferasa (ALT) (U/L) | 48±59 |
| Alanino amino aspartato transferasa (AST) (U/L) | 78±14.5 |
| Fosfatasa Alcalina (FA) (U/L) | 151±99.2 |
| Gamaglutamilpeptisada (GGT) (U/L) | 185±45 |
| Tiempo de protrombina(TP) (seg) | 25±3.4 |
| Tiempo de tromboplastina (TTP)(%) | 32.3±4.8 |
| INR | 3.6±1.8 |
| Proteína C reactiva (PCR) | 59±80 |
| VSG (seg) | 61.5±46 |
| Procalcitonina (µ/dL) | 1.9±0.85 |

* Describe la media del puntaje y la desviación estándar.

10.2 Susceptibilidad de los SNP del gen GLCCI1 para la HA grave.

Al comparar a los pacientes con HA grave en tratamiento con esteroides y el grupo de pacientes controles sanos, no observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP 370972 y 370973 del Gen GLCCI1 en pacientes con HA grave en tratamiento con esteroides y controles sanos.

| rs370973 | HA | Control | p | OR (IC95%) |
|--------------------------------|----------------|-----------------|----------|--------------------|
| Frecuencias Alélicas | n=71(%) | n=24 (%) | | |
| A | 73 (51.40) | 25 (52.08) | 0.88 | 0.96 (0.55 – 1.67) |
| G | 69 (48.59) | 23 (47.91) | 0.88 | 1.04 (0.59 – 1.81) |
| Frecuencias Genotípicas | | | | |
| AA | 18 (25.35) | 6 (25.0) | 0.69 | 0.87 (0.46 – 1.67) |
| AG | 37 (52.11) | 13 (54.16) | 0.83 | 0.94 (0.54 – 1.64) |
| GG | 16 (22.53) | 5 (20.83) | 0.72 | 1.12 (0.57 – 2.23) |
| rs370972 | | Control | | |
| | | n=23 (%) | | |
| Frecuencias Alélicas | | | | |
| C | 76 (53.52) | 24 (52.17) | 0.82 | 1.06 (0.60 – 1.85) |
| T | 66 (46.47) | 22 (47.82) | 0.82 | 0.94 (0.53 – 1.64) |
| Frecuencias Genotípicas | | | | |
| CC | 20 (28.16) | 6 (26.08) | 0.92 | 1.03 (0.55 – 1.93) |
| CT | 36 (50.70) | 12 (46.15) | 0.77 | 1.08 (0.61 – 1.90) |
| TT | 15 (21.12) | 5 (21.73) | 0.79 | 0.91 (0.45 – 1.80) |

10.3 SNP del GLCCI1 en pacientes con HA grave.

Al realizar el análisis de los polimorfismos del gen GLCCI1 con las características clínicas y desenlaces del subgrupo de pacientes con hepatitis alcohólica aguda grave en tratamiento con esteroides no encontramos asociación entre la respuesta o no respuesta a tratamiento con esteroides y los polimorfismos rs370973, rs370972 del gen GLCCI1 (Tabla 4). Sin embargo, observamos algunos datos de interés asociados a la mortalidad en este grupo de pacientes.

Los pacientes con los genotipos homocigotos **CC rs370972** ($p= 0.01$; OR 0.41 [IC 95% 0.21-0.81]), **TT rs370972** ($p=0.<0.001$; OR 0.02 [IC 95% 0.00-0.40]) y **AA rs37973** ($p=0.03$; OR 0.48 [IC 95% 0.24- 0.95]), presentaron un menor riesgo de mortalidad temprana (28 días).

Identificamos al genotipo heterocigoto **AG rs370973** asociado a la mortalidad de los pacientes a las 24 semanas de seguimiento (13 [18.3%] pacientes vivos vs. 24 [33.8%] finados; $p= \leq 0.001$; OR=13.22 [IC 95%:4.72-36.78]), mismo hallazgo que compartía el genotipo heterocigoto **CT rs370972** (12 [16.90%] pacientes vivos y 24 [33.8%] pacientes finados; $p<0.001$; OR 12.0 [IC 95%:4.46-32.28]) en el seguimiento a 24 semanas (Tabla 5).

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP rs370972, rs370973 del gen GLCCI1 y la respuesta a tratamiento en pacientes con HA grave en tratamiento con esteroides.

| <i>rs370973</i> | No respuesta | Con respuesta | p | OR (IC95%) |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|----------|--------------------|
| <i>Frecuencias Alélicas</i> | | | | |
| A | 39 (27.46) | 34 (23.94) | 0.84 | 1.08 (0.49 – 2.35) |
| G | 37 (26.05) | 32 (25.53) | 0.76 | 0.88 (0.41 – 1.92) |
| <i>Frecuencias Genotípicas</i> | No respuesta | Con respuesta | p | OR (IC95%) |
| AA | 09 (12.67) | 09 (12.67) | 0.63 | 0.80 (0.32 – 1.96) |
| AG | 21 (29.57) | 16 (22.53) | 0.44 | 1.36 (0.61 – 3.00) |
| GG | 08 (11.26) | 08 (11.26) | 0.63 | 0.79 (0.30 – 2.04) |
| <i>SNP rs370972</i> | No respuesta | Con respuesta | p | OR (IC95%) |
| <i>Frecuencias Alélicas</i> | | | | |
| C | 41 (28.87) | 35 (24.64) | 0.95 | 1.02 (0.46 – 2.23) |
| T | 35 (24.84) | 31 (21.83) | 0.95 | 0.97 (0.44 – 2.14) |

| <i>Frecuencias Genotípicas</i> | No respuesta | Con respuesta | p | OR (IC95%) |
|--------------------------------|--------------|---------------|------|--------------------|
| CC | 10 (14.08) | 10 (14.08) | 0.61 | 0.80 (0.33 – 1.91) |
| CT | 21 (29.57) | 15 (21.12) | 0.38 | 1.42 (0.64 – 3.11) |
| TT | 07 (9.85) | 08 (11.26) | 0.51 | 0.72 (0.27 – 1.89) |

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP rs370972, rs370973 del gen GLCCI1 y la mortalidad en pacientes con HA grave en tratamiento con esteroides.

| | Finado 28 días n=5 (%) | Vivo 28 días n=66 (%) | p | OR (IC95%) | Vivo 24 sem n=17 (%) | Finado 24 sem n=54 (%) | p | OR (IC95%) |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------|---------------------------|
| rs370973 | | | | | | | | |
| Frecuencias Alélicas | | | | | | | | |
| A | 06 (60) | 67 (50.75) | 0.201 | 1.44 (0.82-2.52) | 17 (11.97) | 56 (39.43) | 0.85 | 1.07 (0.49 2.32) |
| G | 04 (40) | 65 (49.24) | 0.20 | 0.69 (0.39-1.21) | 17 (11.97) | 52 (36.61) | 0.85 | 0.92 (0.41 – 2.00) |
| Frecuencias Genotípicas | | | | | | | | |
| AA | 01 (20) | 17 (25.75) | 0.03 | 0.48(0.24-0.95) | 2 (2.81) | 16 (22.53) | 0.09 | 3.03 (0.82– 11.20) |
| AG | 04 (80) | 33 (50) | 0.03 | 2.08 (1.05-4.11) | 13 (18.30) | 24 (33.80) | 0.01 | 0.26 (0.09 – 0.75) |
| GG | 00 (0) | 16 (24.24) | 0.52 | 1.24(0.63-2.44) | 2 (2.81) | 14 (19.71) | 0.17 | 2.5 (0.67 – 9.29) |
| rs370972 | | | | | | | | |
| Frecuencias Alélicas | | | | | | | | |
| C | 06 (60) | 70 (53.03) | 0.99 | 1.33 (0.75-2.33) | 18 (12.67) | 58 (40.82) | 0.98 | 0.99 (0.39 – 2.48) |
| T | 04 (40) | 62 (46.96) | 0.31 | 0.75(0.42-1.31) | 16 (11.26) | 50 (35.21) | 0.98 | 1.0 (0.40 - 2.53) |
| Frecuencias Genotípicas | | | | | | | | |
| CC | 01 (20) | 19 (28.78) | 0.01 | 0.41(0.21-0.81) | 3 (4.22) | 17 (23.94) | 0.21 | 2.10 (0.65 – 6.81) |
| CT | 04 (80) | 32 (48.48) | 0.16 | 0.64(0.34-1.19) | 12 (16.90) | 24 (33.80) | 0.02 | 0.33 (0.12 – 0.89) |
| TT | 00 (0) | 15 (22.72) | <0.001 | 0.02(0.00-0.40) | 2 (2.81) | 13 (18.30) | 0.24 | 2.17 (0.58 – 8.13) |

11.0 Análisis y Discusión

Alrededor del mundo 2.4 billones de personas consume alcohol, con una transcendencia en la mortalidad que alcanza 2 millones de personas anualmente por enfermedad hepática, y de éstos el 50% de los que presentan cirrosis es atribuida al alcohol.

A partir de este conocimiento nuevos enfoques traslacionales pueden ayudar al diagnóstico y manejo de la hepatitis por alcohol al identificar biomarcadores y/o desarrollando modelos de predicción para los resultados de la enfermedad y la respuesta a la terapia. Se conoce una necesidad en el desarrollo de biomarcadores que predigan de manera temprana respuesta a la terapia médica, detección de la enfermedad, resistencia a fármacos (esteroides) o detectar recaídas al alcohol.³¹

Por tanto, en el presente trabajo tuvimos como objetivo principal determinar particularidades en nuestra población que confieran una respuesta diferente a tratamiento con esteroides en pacientes diagnosticados con HA grave en tratamiento con esteroides.

Estudios en pacientes mexicanos con consumo de alcohol han demostrado diferencias en la capacidad para metabolizar el alcohol debido a factores que influyen en la cinética enzimática de su metabolismo. Gutiérrez y colaboradores estudiaron algunas diferencias genéticas de diversas poblaciones indígenas y mestizos mexicanos, encontrando que el alelo ADH*1B confiere una mayor capacidad catalizadora del alcohol en contraste con otras poblaciones como de ascendencia asiática donde la variable alélica se presenta solo en 16-24% y se ha asociado a dependencia de alcohol.³²

Esto sugiere que existen diferencias entre la respuesta al consumo tóxico de alcohol entre las poblaciones; si bien ya se han determinado algunos factores que condicionan riesgo de dependencia al alcohol y al daño hepático asociado, existen pocos estudios que permitan asociar diferencias entre la respuesta a tratamiento con esteroides desde una perspectiva génica.

Nuestros datos mostraron que los pacientes con hepatitis alcohólica son altamente susceptibles a la inflamación sistémica, observando un marcado incremento de reactantes de fase aguda, elevación de enzimas hepáticas y falta de respuesta a tratamiento con esteroides. De los pacientes que recibieron esteroides, 29 pacientes (33.3%) respondieron de acuerdo al índice de Lille (< 0.45) y 58 (66.6%) no respondieron. La respuesta a tratamiento con esteroides reportada es menor en nuestra población que la reportada en la literatura, donde la respuesta a tratamiento de acuerdo al estudio original del modelo de Lille,¹⁵ sólo 40% de los pacientes no tuvieron respuesta a esteroides comparado con 66.6% con falta de respuesta a tratamiento descrito en nuestro trabajo.

La tasa de mortalidad global fue de 47.11% a las 24 semanas de seguimiento, con una supervivencia de 17 pacientes con respuesta a tratamiento (prednisona).

Louvet y colaboradores,¹⁶ encontraron una supervivencia (a 6 meses) menor en pacientes sin respuesta a esteroides (puntuación de Lille menor de 0.45). La supervivencia fue de 27.8 % en los pacientes sin respuesta a tratamiento con esteroides comparada con 84.6% de los pacientes respondedores a tratamiento ($p= 0.00001$). En nuestro estudio la tasa de mortalidad de los pacientes sin respuesta a tratamiento con esteroides es menor en un seguimiento a 24 semanas (43.5%).

El polimorfismo rs37972 del gen GLCCI1, se asoció con marcada atenuación de la respuesta al tratamiento con glucocorticoides y está en completo desequilibrio de ligamiento (es decir, perfectamente correlacionado) con el polimorfismo funcional rs37973, que regula a la baja la expresión de GLCCI1 y un efecto aumentado por glucocorticoides exógenos.²⁹

Desde que fue descrita la presencia del gen GLCCI1 en células de timoma,²⁸ se han evaluado sus funciones en diversas patologías, de León Rendón y

colaboradores, estudiaron la expresión de GLCCI1 en pacientes mexicanos en mucosa intestinal de pacientes con colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI), observando incremento en la expresión del gen GLCCI1 en mucosa colónica de pacientes con CUCI activa esteroides dependientes en comparación con los pacientes con CUCI activa ($p=0,02$) y en remisión ($p=0,05$) sin uso de esteroides,

describiendo que el gen GLCCI1 pudiese estar involucrado en el mecanismo de acción de los glucocorticoides a nivel intestinal en los pacientes con CUCI.³³

Otro estudio, demostró que los polimorfismos rs37972 y rs37973 del gen GLCCI1, tienen una asociación significativa entre la variante y la respuesta clínica a los glucocorticoides inhalados en pacientes con asma; los pacientes con el alelo silvestre tuvieron mejor respuesta a tratamiento que aquellos pacientes homocigotos para el alelo mutante ($p= 0.0007$).²⁹ Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró asociación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP del gen GLCCI1 y la respuesta a tratamiento con esteroides en pacientes con hepatitis alcohólica por alcohol en tratamiento con esteroides.

En la Universidad de los Angeles Meffert y colaboradores informaron que una variante en el gen que contiene el dominio de la fosfolipasa patatin-like 3 (PNPLA3) no solo afecta la susceptibilidad a la enfermedad hepática sino también la mortalidad después de los episodios de hepatitis alcohólica severa.³⁴

En otros estudios se pretende incluir dentro de las escalas pronósticas ya utilizadas la suma de expresión génica como herramientas de predicción de supervivencia. Como en el trabajo realizado por Franchimont y colaboradores estudiaron 123 genes involucrados en una ruta molecular que se asocia con las vías de respuesta al estrés inflamatorio y oxidativo con mal pronóstico, así como con asociación de la proliferación celular de células estrelladas hepáticas. Con esto diseñaron un sistema de predicción uniendo este perfil genético al modelo conocido de MELD (gs-MELD). El puntaje gs-MELD también discriminó entre pacientes con una mala supervivencia a los 180 días (34% sobrevivió) y una buena supervivencia a los 180 días (84% sobrevivió) ($p < .001$), el área bajo la curva para el puntaje fue de 0.86 (intervalo de confianza del 95% 0.73– 0.99) para la supervivencia a los 90 días y 0.83 (intervalo de confianza del 95% 0.71–0.96) para supervivencia a los 180 días.³⁵

En el seguimiento de nuestros pacientes con HA grave en tratamiento con esteroides, observamos que los pacientes con los genotipos homocigotos CC rs370972, TT rs370972 y AA rs37973, presentaron un menor riesgo de mortalidad temprana (28 días). Así mismo, identificamos una asociación entre los genotipos

heterocigotos AG rs370973 y CT rs370972 y la mortalidad de los pacientes a la 24 semanas de seguimiento. Lo anterior, nos hace considerar que aunque estos polimorfismos no influyen en la respuesta al tratamiento con esteroides en los pacientes con HA grave pudieran estar relacionados con la alta mortalidad que presenta este grupo de pacientes en nuestra población, ya que se observa una menor presencia de los genotipos de protección para mortalidad temprana y una mayor presencia de los genotipos para mortalidad tardía.

Para nuestro conocimiento no existen estudios a nivel mundial que asocien los polimorfismos del gen GLCCI1 con las características clínicas, respuesta a tratamiento y mortalidad en pacientes con hepatitis aguda por alcohol.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Sólo analizamos dos SNP del gen GLCCI1. Se necesitarán más estudios que repliquen nuestros resultados y que pudieran incluir un mayor número de pacientes. Dada la variabilidad genética de las poblaciones, este estudio tendrá validez únicamente para la población mestiza mexicana.

12.0 Conclusiones

Los polimorfismos rs370972 y rs37973 del gen GLCCI1 no predicen la respuesta a tratamiento con esteroides en pacientes mestizos-mexicanos con HA. Sin embargo, algunos genotipos de estos polimorfismos estudiados impactan en la mortalidad temprana y tardía de los pacientes mestizos-mexicanos con HA.

13.0 Referencias Bibliográficas

1. Bouchery. Economic cost of excessive alcohol consumption in the U.S. Am J Prev Med. 2011; 41(516-44).
2. Salud Sd. Principales causas de mortalidad en México. Direccion General de Estadistica e informática SSA. 1995; 195(69).
3. Narro Robles G GAjLCMBR. La Mortalidad por cirrosis hepática en México, Características epidemiológicas relevantes. REv Gastroenterol Mex. 1993 58; 330(378).
4. S. L. Clinical Characteristics and mortality of hospitalized hepatitis patients in the United States. J Clin Gastroenterol. 2011 45; 714(719).
5. live EAotSo. EASL Clinical Guidelines Management of alcohol liver disease. J Hepatol. 2012 57; 399(0).
6. Maneerat Chayanupatkul SL. Alcoholic hepatitis A comprehensive review of pathogenesis and treatment. World J Gastroenterol. 2014 May 28; 20(6279-6228).
7. S ORD. Alcoholic liver disease. Hepatology. 2010 51; 307(328).
8. Baraona E LC. Effects of ethanol on lipid metabolism. Journal Lipid REsearch. 1979 20; 289(315).
9. al. Me. Alcoholic Hepatitis a comprehensive of pathogenesis and treatment. World J Gastroenterol. 2014 May ; 20)(20) (6279: 6286).
10. PD. F. Alcohol use in adults. N Engl J Med. 2013 Jun; 368 (365).
11. Cohen SM AJ. The diagnosis and management of alcoholic hepatitis. Aliment Pharmacol Therapy. 2009 30; 3(0).
12. Mookerjee RP LCSRea. The role of liver biopsy in the diagnosis and prognosis of patients with acute deterioration of alcoholic cirrhosis. J hepatol. 2011 55; 1103(11).
13. Tannapfel A DHea. Histopathological diagnosis of non alcoholic fatty liver disease. Virchows Arch. 2011 458; 511(23).
14. Elphick DA DAa. Spectrum of liver histology in presumed decompensated alcoholic liver disease. Am J Gastroenterol. 2007 102; 708 (788).

15. Chedid A MCea. Significance of megamitochondria in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*. 1986 90; 1858(64).
16. al. CVIe. Puntuaciones de pronóstico de la cirrosis. *Gastroenterol Hepatol*. 2008 31 (7); 439(46).
17. JK MWCB. Corticosteroid Therapy of Alocholic Hepatitis. *Gastroenterology*. 1978 August; 193(199).
18. Jamil DLH. MELD Accurately Predicts Mortality in Patients with Alcoholic Hepatitis Winston. *Hepatology*. 2005 41; 353(358).
19. DJ FEE. Analysis of factors predictive of mortality in alcoholic hepatitis and derivation and validationof the Glasgow alcooholic hepatitis score. *Gut*. 2005 54; 1174(1179).
20. Bataller Ramon DMJ. A New Scoring System for Prognostic Stratification of Patients with Alcoholic Hepatitis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2008 Jun; 103(2747-2756).
21. Nguyen-Khac E. Thevenot T PM. Glucocorticoids plus N-Acetylcysteine in severe alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*. 2011 365; 17(81).
22. Christensen RHSE. Systemic review: Glucocorticoids for alcoholic hepatitis, Meta-analyses and trial sequential analyses of randomized trials.. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2008 August; 234(768).
23. Singh S MMCAea. Comparative Effectiveness of Pharmacological Interventios for Severe Alocholic Hepatitis A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2015 Oct ; 149 (4)(958-70).
24. Nguyen-Khan TTea. Glucocorticoids plus N acetylcistin in patients with severe Alcoholic hepatitis. *New England Journal of Medicine*. 2011 November; 11(365:19).
25. Robert L.Carithers FHMe. Methylprednisolone Therapy in Patients with Severe Alcoholic Hepatitis. *American College Of Physicians*. 1989 Nov; 23.
26. Louvet A SNMAea. The Lille Model: A new tool for Therapeutic Strategy in Patients with Severe Alcoholic Hepatitis Treat with Steroids. *Hepatology*. 2007; 45.
27. Mathurin P OJMTea. Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis:meta-analysis of individual patient data. *Gut*. 2011 Feb; 60(2)(255-60).
28. Chapman MS ADKUMR. Trnscripitonal control of steroid-regulated apoptosis in murine thymoma cell.. *Mod Endocrinol*. 1996 Oct; 10(967-78).
29. Tantisira KG LSJHMMAea. Genowide association between GLCCI1 and response to

glucocorticoide therapy in asthma. *N Engl J Med*. 2011 365; 1173(83).

30. al MJMGACWe. Predicting Inhaled Corticosteroid Response in Asthman with Two Associated SNPs. *Pharmacogenomics J*. 2016 February; 306(311).

31. Jinjuvadia R, Liangpunsakul S, Translational Research and Evolving Alcoholic Hepatitis Treatment Consortium. Trends in Alcoholic Hepatitis-related Hospitalizations, Financial Burden, and Mortality in the United States. *J Clin Gastroenterol* 2015; 49:506.

32. Loza AJM, Iglesias MTR, Diaz IP, et al. Association of alcohol-metabolizing genes with alcoholism in a Mexican Indian (Otomi) population. *Alcohol* 2006;39:73-79. doi: 10.1016/j.alcohol.2006.07.001.

33. (de-León-Rendon JL, Fonseca-Camarillo G, Peredo-Escárcega A, López-Gómez JG, Je Yamamoto-Furusho JK. Expresión génica de GLCCI1 en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática. *Rev Gastroenterol Mex* 2012;77(Supl 3):43-44).

34. Peter J. Meffert, Katja D. Repp, Henry Völzke et. alt. The PNPLA3 SNP rs738409:G allele is associated with increased liver disease-associated mortality but reduced overall mortality in a population-based cohort. *Journal of Hepatology* April 2018 Volume 68, Issue 4, Pages 858–860. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.038>

35. Deltenre P, Hoshida Y, Franchimont D. et. Alt. Combination of Gene Expression Signature and Model for End-Stage Liver Disease Score Predicts Survival of Patients With Severe Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology*. 2018 Mar;154(4):965-975. doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.048. Epub 2017 Nov 20.

14.0 Anexos

1. Carta de consentimiento informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: "Determinación de Polimorfismos rs37972 y rs37973 del Gen GLCCI1 en Pacientes Mexicanos con Hepatitis Alcohólica en Tratamiento con Esteroides"

58

La participación en nuestro estudio consta en que su familiar aporte una muestra de sangre (8 mililitros, aproximadamente una cucharada sopera), esta muestra se obtendrá mediante una punción en su vena, procedimiento que NO implica riesgos ni complicaciones hacia su persona salvo dolor o hinchazón en el sitio de la punción, o bien, que se forme un moretón en esta zona, mismas que resolverán en un periodo máximo de 7 días.

La toma de la muestra de sangre se hará una sola vez. La información que necesitemos acerca de su padecimiento desde que le realizaron el diagnóstico hasta el momento de la toma de la muestra de sangre la tomaremos directamente de su expediente clínico.

Este estudio no le beneficiará a usted directamente en este momento pero sin lugar a duda podría ser muy útil para que en un futuro no muy lejano detectáramos por qué los pacientes con hepatitis alcohólica no responden al tratamiento médico y así poder darles el tratamiento adecuado, evitando así que muchos pacientes mueran por esta razón.

La manera en que usted puede participar en nuestro estudio es que done una muestra de sangre en la que se estudiarán algunos cambios en su composición genética que pudieran estar relacionados con que usted tenga o no tenga una adecuada respuesta al tratamiento médico (prednisona) que está recibiendo por su enfermedad (hepatitis alcohólica). A estos cambios, nosotros les llamamos *polimorfismos* de un gen (los polimorfismos que estudiaremos son rs37972 y rs37973 del gen GLCCI1) y el que estén presentes o ausentes puede hacer que una persona responda adecuadamente o que no responda al tratamiento médico (con prednisona).

La participación en este estudio es voluntaria y no tiene costo alguno. Tanto la participación como la información del paciente serán manejadas con absoluta confidencialidad y en ningún momento serán utilizadas para fines distintos a los que se describen en este estudio. Usted (o sus familiares) podrán hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento, así como finalizar su participación en el mismo cuando así se decida sin que pierda los beneficios que le son otorgados como paciente de nuestra Institución ni ser penalizado. En caso de dudas puede contactar a:

Dra. María del Carmen Dubón Peniche

Presidente Comité de Ética en Investigación

Tel. 27892000 Ext. 1330

Dra. María de Fátima Higuera de la Tijera

Investigador Principal

Teléfono: 278920007, extensión 0047.

Celular: (55) 38948639

Correo electrónico: fatimahiguera@yahoo.com.mx

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: "Determinación de Polimorfismos rs37972 y rs37973 del Gen GLCCI1 en Pacientes Mexicanos con Hepatitis Alcohólica en Tratamiento con Esteroides"

De acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki, con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos Capítulo I. Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14, y en apego a los protocolos de la Dirección de Investigación del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"...

59

A mí, _____, se me ha propuesto que participe en el proyecto de investigación titulado: "Determinación de Polimorfismos rs37972 y rs37973 del Gen GLCCI1 en Pacientes Mexicanos con Hepatitis Alcohólica en Tratamiento con Esteroides"

Por este medio acepto mi participación en el estudio y he comprendido que mi participación es de manera voluntaria y consta en aportar una muestra de sangre que será utilizada para realizar una prueba genética (determinación de polimorfismos), procedimiento que implica riesgos mínimos o nulos hacia su persona (dolor e inflamación en el sitio de la punción). Se me ha explicado que estas complicaciones habitualmente se resuelven espontáneamente sin necesidad de tratamiento médico, sin embargo, ningún procedimiento está absolutamente exento de riesgos importantes. De cualquier forma, si ocurriera una complicación, se me hizo saber que todos los medios técnicos de esta Institución están disponibles para intentar solucionarla.

Se me ha brindado información clara y precisa de lo que implica la participación en este protocolo, de manera verbal y escrita.

El estudio es gratuito y entiendo que no se realizará el pago de ningún estudio que concierne a este protocolo.

Reconozco que la información que se provea en el curso de esta investigación será estrictamente confidencial y no será utilizada para ningún otro propósito fuera de los establecidos en este estudio sin previo consentimiento.

Se han atendido todas las dudas respecto a este proyecto de investigación y se me ha informado que tendremos respuesta a cualquier interrogante que surja durante este estudio. Asimismo, podré retirarme del mismo cuando así lo decida sin perder los beneficios que me son otorgados como paciente de esta Institución ni ser penalizado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: "Determinación de Polimorfismos rs37972 y rs37973 del Gen GLCCI1 en Pacientes Mexicanos con Hepatitis Alcohólica en Tratamiento con Esteroides"

Con lugar y fecha _____, habiendo leído y comprendido lo anterior y, una vez resueltas todas las dudas que surgieron respecto a este proyecto de investigación, se calzan nombres y firmas de conformidad:

Dra. María de Fátima Higuera de la Tijera

Iniciales y firma del paciente

Investigador Principal

ó familiar responsable

Testigo 1

Nombre: _____

Domicilio: _____

Parentesco: _____

Firma: _____

Testigo 2

Nombre: _____

Domicilio: _____

Parentesco: _____

Firma: _____

2. Hoja de recolección de datos



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
GASTROENTEROLOGIA



"Determinación de Polimorfismos rs37972 y rs37973 del Gen GLO1 en Pacientes Mexicanos con Hepatitis Alcohólica en Tratamiento con Esteroides"

| | | | | | | | | | |
|--------|-----------------|------|------------|----------|-----|------------|--|--|--|
| NOMBRE | | | | | | | | | |
| + | | | | | | | | | |
| ECU | Género M - F | Edad | Lugar Nac. | Teléfono | AHF | COMORBIDOS | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|----|------|-----|------|------|-------|---------|-------|---------|-----|--------|-----|
| HB | LEU | LIN | NEU | PLAQ | UREA | GLUCOSA | CREA | NA | K | CL | P |
| CA | MG | COL | TRIG | BT | BI | BD | ALB | ALT | AST | FA | GGT |
| TP | TTPA | INR | PCR | VSG | PROCA | ANTIVHC | HBSGB | VHA IGM | EGO | SEG BT | |

| | | | | | | | | |
|-------------------|----------|------------|------------|------------|---------|---------|------|---------|
| CEL CITOLOGICO | CULT LIQ | UROCULTIVO | HEMOCLTIVO | CHILD PUGH | MELD NA | MAUDREY | ABIC | GLASSOW |
|-------------------|----------|------------|------------|------------|---------|---------|------|---------|

| | | | | | |
|-----|------------|--------|--------------------|----------------|-----------------------------------|
| LBA | HEMORRAGIA | SEPSIS | SI HEPATORRENAL | LILLE (7 DIAS) | RESPUESTA : 0=No 1= Si (<0.45) |
|-----|------------|--------|--------------------|----------------|-----------------------------------|

ACOTACIONES: 0= NO 1=SI

3. Carta de autorización comité de ética Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

Of. No. HGM-DG-DI-440-2018

Ciudad de México, a 24 de septiembre de 2018.

DRA. MARÍA DE FÁTIMA HIGUERA DE LA TIJERA
Servicio de Gastroenterología
Presente

Estimada Dra. Higuera:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que la última versión del protocolo titulado: **"DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS RS37972 Y RS37973 DEL GEN GLC7H EN PACIENTES MEXICANOS CON HEPATITIS ALCOHÓLICA EN TRATAMIENTO CON ESTEROIDES"** con clave de registro DI/18/107/03/075, fue presentado a los Comités de Ética en Investigación y Comité de Investigación, quienes dictaminaron su **A P R O B A C I Ó N**. Por lo tanto, puede dar inicio a su investigación.

"A la Vanguardia en el Cuidado de la Vida"
Atentamente
Director de Investigación


DR. SERGIO AGUSTIN ISLAS ANDRADE

SALA/adg*

 **DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN**
Calle Aguirre 280
P.O. Box 7-070

Dr. Sergio Islas Andrade
Calle Aguirre 280
P.O. Box 7-070

Tel: 56 23 3004 3042
Fax: 56 23 3004 3200
E-mail: sisl@hgm.gob.mx



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.