



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MEDICO NACIONAL DE OCCIDENTE
SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA

TESIS

**“ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS *PNPLA3* RS738409
Y *LPIN1* RS13412852 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO”**

PARA OBTENER EL GRADO DE SUBESPECIALISTA EN:
GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. CAROLINA ELIZABETH SÁNCHEZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ CHÁVEZ

GUADALAJARA, JALISCO. FEBRERO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

GOBIERNO DE
MÉXICO



2020
LEONA VICARIO

SECRETARÍA DE SALUD
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE ENERGÍA
SECRETARÍA DE FOMENTO ECONÓMICO
SECRETARÍA DE GOBIERNO FEDERAL
SECRETARÍA DE HACIENDA Y CREDITO PÚBLICO
SECRETARÍA DE MEDICINA Y PROTECCIÓN CONSUMIDOR
SECRETARÍA DE TURISMO, CULTURA Y FOLKLORE
SECRETARÍA DE TRANSPORTES Y INFRAESTRUCTURA
SECRETARÍA DE VIVIENDA Y OBRAS PÚBLICAS

DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD

AUTORIZACIÓN

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACION EN SALUD

2019-1310-047

En virtud de haber terminado de manera satisfactoria su tesis y contar con el aval de su director de tesis para obtener el grado de especialista en:

GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA

SE AUTORIZA LA IMPRESIÓN DE TESIS DEL ALUMNO.

CAROLINA ELIZABETH SÁNCHEZ LÓPEZ

"ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS *PNPLA3* RS 738409 Y *LPIN1* RS 13412852 Y LA ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS"

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ CHÁVEZ

DIRECTOR DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD

DR. JUAN CARLOS BARRERA DE LEÓN



SECRETARÍA DE SALUD
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE ENERGÍA
SECRETARÍA DE FOMENTO ECONÓMICO
SECRETARÍA DE GOBIERNO FEDERAL
SECRETARÍA DE HACIENDA Y CREDITO PÚBLICO
SECRETARÍA DE MEDICINA Y PROTECCIÓN CONSUMIDOR
SECRETARÍA DE TURISMO, CULTURA Y FOLKLORE
SECRETARÍA DE TRANSPORTES Y INFRAESTRUCTURA
SECRETARÍA DE VIVIENDA Y OBRAS PÚBLICAS

IDENTIFICACIÓN DE LOS AUTORES

Investigador principal

Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López

Residente de segundo año de la subespecialidad Gastroenterología y Nutrición Pediátrica.

UMAE. Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional de Occidente.

Avenida Belisario Domínguez #735 Colonia Independencia Oriente. CP 44340.
Guadalajara Jalisco.

Matrícula: 97201198

Teléfono: 36683000 Extensión: 31727

Correo electrónico: carely_1@hotmail.com

Director de tesis

Dra. Elizabeth Hernández Chávez

Médico adscrito y profesora adjunta de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica.

UMAE. Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional de Occidente.

Avenida Belisario Domínguez #735 Colonia Independencia Oriente. CP 44340.
Guadalajara Jalisco.

Matrícula: 11413468

Teléfono: 36683000 Extensión: 31727

Correo electrónico: elizabethernandezchavez@hotmail.com

Director asociado

Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre

Dra. En C. Genética Humana. División de Medicina Molecular.

Centro Médico Nacional de Occidente.

Avenida Belisario Domínguez #735 Colonia Independencia Oriente. CP 44340.

Guadalajara Jalisco.

Matrícula: 311140328

Teléfono: 36683000 Extensión: 31727

Correo electrónico: lourdes.rdlr@gmail.com

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
MARCO TEÓRICO	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
JUSTIFICACIÓN	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
OBJETIVOS	17
HIPOTESIS.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
VARIABLES.....	21
DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
ASPECTOS ÉTICOS	28
RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD	30
EXPERIENCIA DEL GRUPO.....	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS.....	51

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas	Página
Tabla 1. Estado nutricional de los pacientes con hígado graso	34
Tabla 2. Correlación de Pearson entre índice cintura/talla y los niveles de transaminasas y perfil de lípidos	35
Tabla 3. Estado nutricional de los pacientes del grupo de referencia	36
Tabla 4. Comparación de niveles de transaminasas y perfil de lípidos del grupo con EHGNA y grupo de referencia	37
Tabla 5. Distribución alélica de los polimorfismos del gen <i>PNPLA3</i> en ambos grupos	41
Tabla 6. Distribución alélica de los polimorfismos del gen <i>LPIN1</i> en ambos grupos	42
Tabla 7. Asociación del rs13412851 del gen <i>LPIN1</i> con variables clínicas, antropométricas y bioquímicas en pacientes con hígado graso	43
Tabla 8. Asociación del rs13412851 del gen <i>LPIN1</i> con variables clínicas, antropométricas y bioquímicas en el grupo de referencia	44
Figuras	
Figura 1. Comparación de niveles de ALT entre grupo con EHGNA y grupo de referencia	37
Figura 2. Comparación de niveles de HDL colesterol	

entre grupo con EHGNA y grupo de referencia	38
Figura 3. Comparación de niveles de GGT entre grupo con EHGNA y grupo de referencia	38
Figura 4. Comparación de niveles de triglicéridos entre grupo con EHGNA y grupo de referencia	39
Figura 5. Distribución de los pacientes incluidos para la determinación de polimorfismos	40

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica, por sus siglas en inglés Nonalcoholic Steatohepatitis

NAFL: Hígado graso no alcohólico, por sus siglas en inglés Nonalcoholic fatty liver

EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcohólico

NASPGHAN: Sociedad norteamericana de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica, por sus siglas en inglés North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés Single Nucleotide Polymorphisms

ALT: Alanino aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

FA: Fosfatasa alcalina

DHL: Deshidrogenasa láctica

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa

FA: Fosfatasa alcalina

IMC: Índice de masa corporal

USG: Ultrasonograma

IRM: Imagen por resonancia magnética

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

VEB: Virus de Epstein Barr

CMV: Citomegalovirus

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

SMA: Anticuerpos anti-músculo liso

ANA: Anticuerpos antinucleares

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, por sus siglas en inglés Restriction fragment length polymorphism

ADN: Ácido desoxirribonucleico

IMC: Índice de masa corporal

RESUMEN

Introducción: La enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) se ha convertido en la forma más frecuente de enfermedad hepática crónica en niños y adolescentes; se define como la evidencia histológica de al menos 5% de esteatosis hepática que no es secundario a trastornos genéticos/metabólicos, infecciones, uso de medicamentos esteatogénicos, consumo de etanol o desnutrición.

Los factores hereditarios representan una gran proporción de la variabilidad interétnica e interindividual en la predisposición a la EHGNA. Un creciente cuerpo de evidencia está demostrando que la susceptibilidad genética desempeña un papel importante en el desarrollo y la evolución de la EHGNA. El papel de los polimorfismos de nucleótido único (SNP), ha sido el foco de una extensa investigación en la última década.

El gen *PNPLA3* o dominio de la fosfolipasa-patatina 3 codifica una proteína de 481 aminoácidos con actividad de triacilglicerol lipasa, que media la hidrólisis del triacilglicerol. Se expresa principalmente en la superficie de los hepatocitos y adipocitos y está regulada por la insulina a través de una cascada de señalización. El SNP *PNPLA3* rs738409 C>G se considera el componente genético principal de EHGNA, está asociado no solo con la fibrosis y EHGNA, sino también específicamente con la evolución a la cirrosis NASH.

El gen *LPIN1* codifica para una fosfatasa ácida fosfatídica altamente expresada en el tejido adiposo, enzima clave en el metabolismo de triglicéridos y fosfolípidos de membrana, se requiere para la adipogénesis y el flujo metabólico normal entre el tejido adiposo y el hígado. El polimorfismo *LPIN1* rs13412852 C>T se asoció con NASH y fibrosis en pacientes pediátricos italianos con EHGNA, encontrando que el genotipo TT estaba subrepresentado en los pacientes pediátricos, pero no en los pacientes adultos con EHGNA.

Objetivos: Determinar la asociación de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409, *LPIN1* rs13412852 en pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico. Describir las características clínico-demográficas, bioquímicas en pacientes pediátricos con EHGNA. Describir la asociación de las variantes antropométricas, los hallazgos bioquímicos, el grado de severidad y los polimorfismos *PNPLA3* rs738409, *LPIN1* rs13412852 pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico y en un grupo de referencia.

Metodología: Se realizó un estudio transversal, comparativo, analítico en el hospital de pediatría de CMNO en Guadalajara, Jalisco. Se incluyeron pacientes menores de 16 con diagnóstico de EHGNA. Para el tamaño de muestra se utilizó una fórmula para comparar dos proporciones, para un total de 45 individuos por grupo. Para el grupo de referencia se invitó a participar a pacientes pediátricos de la consulta externa del servicio de Gastroenterología del hospital de pediatría del CMNO sin hepatopatía crónica u otro trastorno orgánico de fondo.

Resultados: Se incluyeron 75 niños, de los cuales 43 cumplieron con los criterios de inclusión para el grupo de casos y 32 individuos para el grupo de referencia. Del grupo de pacientes con EHGNA, el 32.6% fueron del sexo femenino y el 67.4% del sexo masculino; la media de edad de estos pacientes fue 11 años. La media de IMC fue de 31.2 (DE \pm 5.23); dos pacientes presentaron sobrepeso, 21 pacientes se clasificaron con obesidad grado I, 10 pacientes con obesidad grado II y 10 pacientes

con obesidad grado III. Se reportó una media del índice cintura/talla de 0.61 (DE \pm 0.05).

Para el grupo de referencia se incluyeron 32 indiv; la media de edad fue de 10 años. En este grupo el sexo predominante fue el femenino en el 65.6% de los sujetos. En cuanto al estado nutricional, el 81.3% se encontraban eutróficos, el 12.5% presentaban sobrepeso y el 6.3% tenían obesidad grado I.

Solo fue posible realizar la determinación del SNP rs738409 del gen *PNPLA3* en 13 niños de los 75 de los dos grupos, por lo que no se realizó un análisis estadístico de asociación. En cuanto al rs13412852 del gen *LPIN1* la frecuencia del genotipo heterocigoto polimórfico (TT) fue del 5% en el grupo de pacientes con hígado graso, mientras que en el grupo de referencia fue del 3.6%; el genotipo homocigoto silvestre se presentó en el 62.5% de niños con hígado graso y en el 53.6% en el grupo de referencia ($p=0.608$). Se realizó asociación del polimorfismo *LPIN1* rs13412852 con las variables clínicas, antropométricas y bioquímicas de los pacientes con hígado graso mediante ANOVA de 1 factor donde únicamente se observó asociación estadísticamente significativa con el percentil de IMC.

Conclusiones: En este estudio no hubo asociación del polimorfismo *LPIN1* rs13412852 con hígado graso no alcohólico en pacientes pediátricos. La mayoría de los pacientes afectados fueron del sexo masculino en el 67.4% de los casos. El 27.9% de los pacientes con hígado graso presentaron algún grado de elevación de los niveles de ALT. La frecuencia del genotipo heterocigoto polimórfico del gen *LPIN1* rs13412852 fue del 5% en el grupo de pacientes con hígado graso, mientras que en el grupo de referencia fue del 3.6%.

MARCO TEÓRICO

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) se ha convertido en la forma más frecuente de enfermedad hepática crónica en niños y adolescentes.¹ La EHGNA se define como la evidencia histológica de al menos 5% de esteatosis hepática que no es secundario a trastornos genéticos/metabólicos, infecciones, uso de medicamentos esteatogénicos, consumo de etanol o desnutrición.²

Se conoce poco acerca de la historia natural de la enfermedad en la edad pediátrica de la EHGNA debido a que existen pocos estudios prospectivos largos, por lo que el pronóstico permanece incierto; sin embargo, la evolución de la EHGNA se encuentra bien documentada, en donde la evolución de NASH a fibrosis e incluso cirrosis puede ocurrir en la infancia.²

En un meta-análisis realizado por Anderson y colaboradores se reportó que en los estudios en población general, no se observaron diferencias en la prevalencia de la EHGNA según el método de diagnóstico. En estudios de poblaciones clínicas de niños y adolescentes obesos, las estimaciones de prevalencia fueron similares cuando la EHGNA fue diagnosticada por USG e IRM; sin embargo, estas estimaciones fueron mucho más bajas que la prevalencia informada por el único estudio clínico con biopsias de hígado, cabe mencionar que en este último solo se estudiaron pacientes con obesidad mórbida. Esto podría sugerir que, en las poblaciones clínicas de pacientes pediátricos obesos, el USG y la IRM subestiman la prevalencia de la EHGNA, lo que es esperado debido a la dificultad técnica en individuos con obesidad.^{3,4}

Varios estudios han estimado la prevalencia de la EHGNA en pacientes pediátricos, con considerable variabilidad; se ha demostrado que la incidencia más alta se encuentra en los niños hispanos de ascendencia mexicana.² En un meta-análisis realizado en 2015 por Younossi Z, et al en pacientes adultos, se estimó una prevalencia global de EHGNA en adultos de 25.24%; las tasas de prevalencia más altas se registraron en América del Sur (31%) y Oriente

Medio (32%), mientras que la prevalencia más baja se registró en África (14%).³

Un meta-análisis y revisión sistemática realizado por Anderson y colaboradores mostró que la prevalencia oscila entre el 8% en niños no obesos y el 34% en niños obesos. Además, se encontró que la prevalencia de la EHGNA es mayor en niños y adolescentes varones y se correlacionaba positivamente con el IMC; en este estudio no se demostró diferencia entre los grupos étnicos en la prevalencia de la EHGNA.⁴ Otros factores que están asociados con una prevalencia relativamente alta de la EHGNA incluyen la etnia hispana y asiática; alteración de la tolerancia a la glucosa, prediabetes o diabetes; panhipopituitarismo y apnea obstructiva del sueño.²

En México no existen estudios que reporten la prevalencia de la EHGNA en niños.

Los procesos patogénicos que conducen a la esteatosis y fibrosis son multifactoriales y complejos y no están bien definidos; se conocen determinados factores que tienen un papel crucial en el desarrollo de la esteatosis y fibrosis dentro de los cuales se incluyen genéticos, epigenéticos y ambientales.

En la teoría de "los dos pasos", el primer paso está representado por aumento de la grasa hepática, caracterizada por la acumulación de triglicéridos hepáticos y resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina desempeña un papel fundamental en la patogenia de la EHGNA a través de la lipólisis periférica y la lipogénesis de novo. Por otra parte, la dieta hipercalórica también aumentaría la síntesis de novo de ácidos grasos libres. Posteriormente, se describe el "segundo golpe", que consiste en la amplificación del daño por citoquinas inflamatorias, adipocinas, apoptosis hepatocelular y estrés oxidativo. La acumulación hepatocelular de lípidos, junto con la producción de especies reactivas de oxígeno y citoquinas proinflamatorias, causan disfunción mitocondrial por daño al ADN. El estrés

oxidativo intracelular es responsable del daño celular y perpetua la resistencia hepática a la insulina.^{5,6}

La teoría aceptada actualmente es el "modelo de varios insultos", que involucra una disfunción metabólica generalizada por la interacción de factores genéticos y ambientales, así como a cambios en la interferencia entre diferentes órganos y tejidos, incluido el tejido adiposo, páncreas, intestino e hígado. Sin embargo, la acumulación de grasa en el hígado, causada por la obesidad y la resistencia a la insulina, todavía parece representar el "primer insulto".¹

La EHGNA resulta de una acumulación de exceso de ácidos grasos libres y triglicéridos, demostrado por la esteatosis macrovesicular hepatocelular.⁵ Basado en la histología, la EHGNA abarca un espectro de enfermedades que va desde la "esteatosis simple" o hígado graso no alcohólico (NAFL) hasta la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), caracterizada daño hepatocelular en la forma de lesión balonizante e inflamación lobular mixta, se asocia con activación de pericelular - perisinusoidal fibrogénesis, evoluciona a fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular.^{7,8}

- **Tamizaje**

La guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la EHGNA de la NASPGHAN, publicada en el 2017, recomienda el cribado de EHGNA a partir de los 9 a 11 años para todos los niños obesos o con sobrepeso y alguno de los siguientes factores de riesgo: adiposidad central, resistencia a la insulina, diabetes, dislipidemia, apnea obstructiva del sueño y/o historia familiar de la EHGNA o NASH. En pacientes con mayor riesgo, como obesidad severa, panhipopituitarismo o historia familiar de EHGNA o NASH, se sugiere una edad de detección más temprana. La prueba de detección recomendada es la alanina aminotransferasa (ALT) que utiliza límites superiores normales específicos para el sexo (mujeres 22 mg/dl; hombres 26 mg/dl).⁷

- Diagnóstico

El diagnóstico de la EHGNA es de exclusión y requiere la presencia de esteatosis hepática y la exclusión de otras causas de elevación de transaminasas e infiltración grasa hepática. Se puede realizar por diferentes métodos, el estándar de oro es la biopsia hepática, sin embargo, debido a su invasividad, los riesgos de morbilidad grave, y el costo relativamente alto, se reserva para algunos pacientes.^{2,8}

Tabla 1: Diagnóstico diferencial de esteatosis hepática.⁸

Causas secundarias de hígado graso	Pruebas diagnósticas	Anormalidad
Hepatitis B, C, VEB, CMV	Serología viral para hepatitis	Serología positiva (IgG o IgM)
Enfermedad de Wilson	Ceruloplasmina en plasma	Niveles bajos
	Biopsia de hígado	Cobre elevado de peso seco
Hepatitis autoinmune	Autoanticuerpos	ANA/SMA positivo
	Inmunoglobulinas	Elevación de IgG
Deficiencia de alfa-1-antitripsina	Niveles de alfa-1-antitripsina	Niveles bajos
Hemocromatosis hereditaria	Estudios de hierro sérico	Elevación de ferritina y saturación de transferrina
Lipodistrofia y otros síndromes de resistencia a la insulina	Exploración física	Tejido adiposo subcutáneo reducido
	Insulina sérica en ayuno	Elevada
Deficiencia de lipasa ácida lisosomal	Ensayo de gota de sangre seca	Actividad reducida de la lipasa ácida lisosomal

La sospecha de la EHGNA se realiza al demostrarse en un estudio bioquímico la elevación persistente (> 3 meses) de ALT a más del doble del límite superior (mujeres 44 mg/dl; hombres 50 mg/dl), en niños con sobrepeso y obesos mayores de 10 años tiene una sensibilidad del 88% y una especificidad del 26%. La elevación de ALT, AST y GGT se asocia con peor histología.⁷

Existe controversia acerca del uso de estudios de imagen para el diagnóstico de la EHGNA. En la guía para el diagnóstico de la EHGNA de la NASPGHAN, se sugiere que el USG no es preciso para el diagnóstico de esteatosis hepática debido a su baja sensibilidad y especificidad. Aunque su realización es necesaria para descartar otras patologías hepáticas, quistes o patología de la vesícula biliar, una ecografía normal no excluye el diagnóstico de la EHGNA. La TAC, aunque es más sensible y específica para la detección de esteatosis hepática, no se recomienda para el diagnóstico por sus altos niveles de radiación. La IRM ha demostrado ser precisa para la detección y cuantificación de la esteatosis hepática en adultos y niños. Sin embargo, su uso está limitado debido a su alto costo, falta de disponibilidad, así como la falta de límites validados para determinar la EHGNA.⁷

Se necesitan estudios adicionales en niños para identificar y validar los puntos de corte que tienen precisión diagnóstica para la EHGNA.⁷

Por lo anterior la ecografía hepática es el estudio de imagen utilizado más frecuentemente debido a su disponibilidad, seguridad, no invasividad, bajo costo y es operador dependiente. Se ha descrito que la sensibilidad para detectar esteatosis es del 93% cuando el hígado tiene más de 33% de infiltración grasa; y una especificidad entre 84-95%. (9) La puntuación de esteatosis ultrasonográfica se clasifica de la siguiente manera:

- Grado 0 - esteatosis ausente: ecotextura hepática normal
- Grado 1 - esteatosis leve: leve y difuso aumento en los ecos finos del parénquima con visualización normal del diafragma y los bordes de la vena porta

- Grado 2 - esteatosis moderada: aumento moderado y difuso de los ecos finos con visualización ligeramente alterada de los bordes de la vena porta y el diafragma
- Grado 3 - esteatosis severa: eco fino con una visualización deficiente o nula de los bordes de la vena porta, el diafragma y la porción posterior del lóbulo derecho.¹⁰

La biopsia hepática es ideal para el diagnóstico definitivo y la estadificación de la EHGNA (NAFL vs NASH), ya que los marcadores séricos y las técnicas de imagen son insuficientemente validados o desarrollados; y para descartar una enfermedad comórbida como causa de la ALT elevada. Sin embargo, la biopsia de hígado conlleva riesgos significativos de morbilidad y mortalidad, lo que la convierte en una herramienta diagnóstica poco factible.⁵ Algunos de los riesgos asociados con la biopsia hepática incluyen sangrado, dolor, pérdida de bilis, formación de fístulas arteriovenosas, neumotórax y muerte.²

El estadio de la fibrosis es el principal factor determinante del pronóstico de los pacientes con EHGNA. La NASH se asocia con una progresión más rápida de la fibrosis hepática en comparación con la esteatosis simple.^{2,8}

No hay datos suficientes para determinar la historia natural de la EHGNA en pacientes pediátricos²; el carcinoma hepatocelular se observa muy raramente en niños con NASH y es probable que los pacientes que adquieren la EHGNA en edades tempranas, tengan mayor riesgo de desarrollar enfermedades hepáticas en el futuro⁵, sin embargo, esto no se encuentra bien establecido debido a la falta de datos prospectivos de historia natural, y pocos niños se someten a biopsias pareadas.²

- **Polimorfismos asociados a EHGNA**

Los factores hereditarios representan una gran proporción de la variabilidad interétnica e interindividual en la predisposición a la EHGNA. Los estudios genéticos ahora han identificado las variantes comunes específicas que

influyen en el metabolismo de la grasa hepática como determinantes importantes de la EHGNA en niños y adultos.⁸ La identificación de los pacientes con riesgo de progresión de la EHGNA sería crucial para orientar la atención médica y los recursos económicos. Un creciente cuerpo de evidencia está demostrando que la susceptibilidad genética desempeña un papel importante en el desarrollo y la evolución de la EHGNA. El papel de los polimorfismos de nucleótido único (SNP), ha sido el foco de una extensa investigación en la última década.¹¹ Los SNP son sustituciones de un solo nucleótido en el ADN que pueden resultar en la expresión alterada de un gen particular o la función alterada de la proteína expresada.¹²

El gen *PNPLA3* o dominio de la fosfolipasa-patatina 3 (patatin-like phospholipase domain-containing 3 por sus siglas en inglés) codifica una proteína de 481 aminoácidos con actividad de triacilglicerol lipasa, que media la hidrólisis del triacilglicerol. Se expresa principalmente en la superficie de los hepatocitos y adipocitos y está regulada por la insulina a través de una cascada de señalización. Se han evaluado dos SNP con respecto a la EHGNA: un cambio de C por G que conduce a sustitución de isoleucina con metionina en el codón 148 (I148M, rs738409) y un cambio de G a T que conduce a sustitución de serina con isoleucina en el codón 453 (S453I, rs6006460).¹²

El SNP *PNPLA3* rs738409 se considera el componente genético principal de la EHGNA, está asociado no solo con la fibrosis y la EHGNA, sino también específicamente con la evolución a la cirrosis NASH.¹¹

Un metaanálisis de enero de 2011 encontró una asociación con la presencia de acumulación de grasa (el homocigoto GG mostró un 73% más de contenido de grasa en lípidos en comparación con los de CC); 3.2 veces mayor riesgo de puntajes necroinflamatorios más altos, 3.5 veces mayor riesgo de NASH, y 3.2 veces mayor riesgo de desarrollar fibrosis en comparación con CC homocigotos.^{13,14}

En un estudio publicado por Rausch J, et al (2018) donde se evaluaron las variantes genómicas asociadas con el aumento de la adiposidad y la resistencia a la insulina en una población de niños hispánicos con EHGNA, se reportó que los alelos del gen *PNPLA3*, no se asoció con NASH o fibrosis hepática.¹⁵

En otro estudio realizado por Martínez L, et al (2017) se determinó la asociación en adultos mexicanos del SNP *PNPLA3* con EHGNA, se reportó que los pacientes con el alelo de riesgo homocigótico G tenía 3.81 veces más riesgo de tener NASH ($p < 0,05$) y 2.32 veces más riesgo de fibrosis ($p < 0,05$); la probabilidad de tener NASH fue mayor en homocigotos y heterocigotos portadores del alelo de riesgo (G). Se reportó además una frecuencia más alta del polimorfismo *PNPLA3* I148M en la población estudiada en México (77% vs 59%). Se concluyó que en adultos mexicanos el SNP *PNPLA3* condicionó una esteatosis hepática más grave, con mayor probabilidad de presentar esteatohepatitis, fibrosis hepática y pruebas de función hepática anormales.¹⁶

El gen *LPIN1* codifica para una fosfatasa ácida fosfatídica altamente expresada en el tejido adiposo, enzima clave en el metabolismo de triglicéridos y fosfolípidos de membrana, se requiere para la adipogénesis y el flujo metabólico normal entre el tejido adiposo y el hígado. El polimorfismo *LPIN1* rs13412852 C>T se asoció con NASH y fibrosis en pacientes pediátricos italianos con EHGNA, encontrando que el genotipo TT estaba subrepresentado en los pacientes pediátricos, pero no en los pacientes adultos con EHGNA.¹²

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EHGNA es la forma más frecuente de enfermedad hepática crónica en niños y adolescentes, se observa entre el 8% en niños no obesos y el 34% en niños obesos. La etiología de esta enfermedad potencialmente progresiva a cirrosis hepática es multifactorial, sin embargo, la genética juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Se han detectado polimorfismos involucrados en el metabolismo de lípidos, inflamación, señalización de la insulina, estrés oxidativo y fibrogénesis que se han asociado con la gravedad del daño hepático en la EHGNA. En nuestro país existen pocos estudios que sustentan la presencia y la asociación de estas variantes genéticas con esta patología en población pediátrica.

Por lo anterior, es importante conocer la asociación de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *LPIN1* rs13412852 con la enfermedad de hígado graso en niños.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de hígado graso no alcohólico es una de las principales causas de hepatopatía crónica en niños, en México se describe una alta prevalencia de esta patología por lo que es necesario entender la fisiopatología y mecanismo molecular de la enfermedad. Por lo que estudiar los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *LPIN1* rs13412852 contribuirá al conocimiento de la progresión de la enfermedad y en un futuro el desarrollo de terapias génicas.

Comprender la patología a nivel molecular, identificar tempranamente posibles complicaciones asociadas a la presencia de polimorfismos, este estudio representa, en nuestra población, un primer abordaje genético de los pacientes pediátricos con EHGNA del occidente de México.

La enfermedad por hígado graso no alcohólico es una patología de gran complejidad, su estudio debe ser multidisciplinario. En este estudio abordaremos la EHGNA desde la perspectiva genética de únicamente dos polimorfismos, cabe señalar que existe una amplia variedad de factores genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo y progresión de esta hepatopatía.

Este estudio se realizó en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente, en el servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica. Al ser un hospital de tercer nivel, se reciben pacientes del occidente de México con obesidad y diversas patologías hepáticas, además se cuenta con el equipo médico y biomédico necesario para la ejecución del proyecto.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *LPIN1* rs13412852 y la enfermedad de hígado graso no alcohólico en niños?

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

- Determinar la asociación de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409, *LPIN1* rs13412852 en pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico

- **Objetivos específicos**

- Describir las características clínico-demográficas, laboratoriales en pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico y en un grupo de referencia.
- Identificar la distribución de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409, *LPIN1* rs13412852 pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico y en un grupo de referencia.
- Describir la asociación de las variantes antropométricas, los hallazgos bioquímicos, con los polimorfismos *PNPLA3* rs738409, *LPIN1* rs13412852 pacientes pediátricos con EHGNA y en un grupo de referencia.

HIPOTESIS

La presencia de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *LPIN1* rs13412852 está asociada con hígado graso no alcohólico en pacientes pediátricos.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tipo y diseño

Transversal, comparativo.

- Universo de trabajo

Pacientes pediátricos atendidos en el servicio de gastroenterología y nutrición pediátrica.

- Lugar del estudio

Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Guadalajara, Jalisco.

- Cálculo muestral

Considerando que la prevalencia del polimorfismo *PNPLA3* I148M en la población adulta hispana varía desde el 59% al 77% en pacientes con EHGNA (Martínez 2017) y la prevalencia del polimorfismo *PNPLA3* I148M en la población adulta sana es de 55%. (proyecto genoma disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>). Se utilizó una fórmula para comparar dos proporciones, que es la siguiente.

$$n = (p_1q_1) + (p_2q_2) (k) \div (p_1-p_2)^2$$

En donde:

n = tamaño de la muestra

p1 = Grupo que posee la característica de interés – EHGNA – (63%)

p2 = Grupo que no posee la característica de interés –sano- (55%)

q1= 1 – p1

$$q_2 = 1 - q_1$$

$k = (Z_\alpha + Z_\beta)^2$: poder 80%, significancia 95%, $\alpha = 0.05$, a 2 colas.

Sustituyendo

$$n = \frac{(p_1q_1) + (p_2q_2) (k)}{(p_1 - p_2)^2}$$

$$n = \frac{(0.63 \times 0.55) + (0.63 \times 0.55) \times (7.9)}{(0.63 - 0.55)^2}$$

$$(0.63 - 0.55)^2$$

$$n = \frac{(0.3465 + 0.3465) \times (7.9)}{(0.3465)^2}$$

$$(0.3465)^2$$

$$n = \frac{0.693 \times 7.9}{0.12} = \frac{5.47}{0.12} = 45$$

Se consideró un total de 45 individuos por grupo.

- **Temporalidad**

Se realizó la captación de pacientes, recolección de datos y toma de muestras y análisis molecular en el periodo comprendido de Agosto del 2019 a Enero del 2020 y posteriormente, en Febrero del 2020 se realizó el análisis de resultados.

- **Criterios de inclusión**

- Grupo de pacientes con EHGNA:
 - Pacientes menores de 16 años de edad
 - Diagnóstico mediante método de imagen de enfermedad de hígado graso no alcohólico
- Grupo de referencia:
 - Individuos menores de 16 años que no tengan EHGNA

- Pacientes en seguimiento por el servicio de Gastroenterología y nutrición pediátrica por patologías no hepáticas
- Pacientes sin antecedentes familiares de enfermedad hepática
- Ambos grupos de estudio:
 - Seguro social vigente al momento del estudio
 - Autorización por escrito de padre o tutor de participar en el estudio
- **Criterios de exclusión (ambos grupos de estudio)**
 - Pacientes con transaminasemia o hígado graso secundaria a patología distinta a EHGNA
 - Pacientes que hayan recibido trasplante hepático
 - Pacientes que hayan recibido transfusión sanguínea en las últimas 4 semanas
 - Pacientes con dislipidemia asociada a causas hereditarias
- **Criterios de eliminación (ambos grupos)**
 - Muestras de individuos que se terminen o degraden durante el proceso de genotipificación y no sea posible tomarlos nuevamente.
 - Individuos que deseen retirarse del estudio.

VARIABLES

- **Variable dependiente**
 - EHGNA, peso, talla, IMC, índice cintura/talla, circunferencia media de brazo, AST, ALT, GGT, Colesterol, Triglicéridos

- **Variable independiente**
 - Polimorfismo del gen *PNPLA3* rs738409 C>G, Polimorfismo del gen *LPIN1* rs13412852 C>T, edad, sexo.

- **Definición de variables**
 - EHGNA: Diagnóstico de EHGNA mediante ecografía
 - Polimorfismo del gen *PNPLA3* rs738409 C>G: Presencia del alelo G del SNP rs738409
 - Polimorfismo del gen *LPIN1* rs13412852 C>T: Presencia del alelo T del SNP rs13412852
 - Edad: Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha del estudio
 - Sexo: Asignación fenotípica de un individuo, en relación con su genitalidad.
 - Peso: Magnitud física que expresa la cantidad de materia que contiene un cuerpo.
 - Talla: Medida de la estatura del cuerpo humano desde los pies hasta el techo de la bóveda del cráneo.
 - Índice de masa corporal: Resultado de la división del peso entre la talla al cuadrado.
 - Índice cintura/talla: Indicador de adiposidad abdominal, útil para la detección de riesgo metabólico en niños.
 - Circunferencia media de brazo: Indicador de estado nutricional. Expresa la reserva actual de tejido adiposo. Es la medida de la circunferencia del brazo; midiendo la parte media del brazo,

tomando como referencia la longitud existente entre el acromion y el olécranon.

- Aspartato aminotransferasa (AST): Se encuentra en altas concentraciones en las células hepáticas donde catalizan la transferencia de grupos aminos para producir ácido oxalacético. Cuando se presenta un daño en la membrana celular del hepatocito, estas enzimas que se encuentran en el citoplasma pasan al plasma, aumentando su concentración sérica
- Alanino aminotransferasa (ALT): Enzima citoplasmática cuya mayor actividad se localiza en el tejido hepático. El aumento de ALT en suero se produce como consecuencia de alteraciones hepáticas.
- Colesterol: Medida de colesterol sérico incluyendo HDL, VLDL, LDL.
- Triglicéridos: Medida de triglicéridos séricos.

Tabla 2. Operacionalización de variables

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES			
Variable	Tipo de variable	Unidad de medición	Estadística
EHGNA	Cualitativa dicotómica	Si no	Comparación de proporciones (χ^2), DE, media, porcentajes
Polimorfismo del gen <i>PNPLA3</i> rs738409 C>G	Cualitativa dicotómica	Frecuencias alélicas y genotípicas	Comparación de proporciones (χ^2),
Polimorfismo del gen <i>LPIN1</i> rs13412852 C>T	Cualitativa dicotómica	Frecuencias alélicas y genotípicas	Comparación de proporciones (χ^2), DE, media, porcentajes
Edad	Cuantitativa discreta	Años	Comparación de medias (ANOVA)
Sexo	Cualitativa dicotómica	Masculino / Femenino	DE, media, porcentajes
Peso/edad	Cuantitativa continua		DE, media, porcentajes
Talla/edad	Cuantitativa continua		DE, media, porcentajes
Índice de masa corporal	Cuantitativa continua	1. Normal 2. Sobrepeso	Comparación de medias (ANOVA), DE, media,

		3. Obesidad	porcentajes
Índice cintura/talla	Cuantitativa continua		Comparación de medias (ANOVA), DE, media, porcentajes
Aspartato aminotransferasa (AST)	Cuantitativa continua	U/L	Comparación de medias (ANOVA), DE, media, porcentajes, T de student
Alanino aminotransferasa (ALT)	Cuantitativa continua	U/L	Comparación de medias (ANOVA), DE, media, porcentajes, T de student
Gammaglutamil transpeptidasa (GGT)	Cuantitativa continua	U/L	Comparación de medias (ANOVA), DE, media, porcentajes, T de student
Colesterol	Cuantitativa continua	mg/dl	Comparación de medias (ANOVA), DE, media, porcentajes, T de student
Triglicéridos	Cuantitativa continua	mg/dl	Comparación de medias (ANOVA), DE, media, porcentajes, T de student

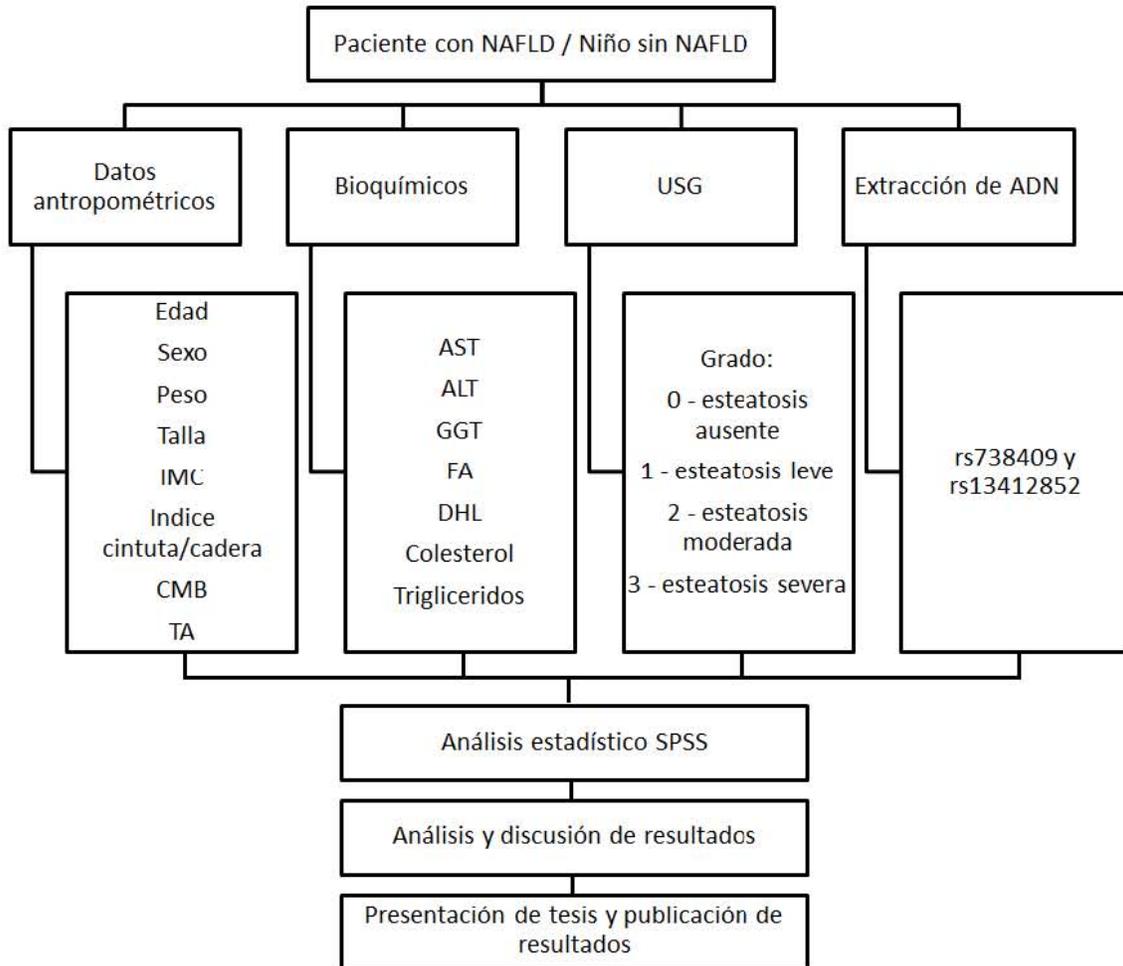
DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

1. Se abordaron a los pacientes que acudieron a consulta externa o área hospitalaria del hospital de pediatría de CMNO con el diagnóstico de EHGNA o probable EHGNA y que cumplan los criterios de selección.
2. Se otorgó información sobre el estudio al tutor para obtener el consentimiento por escrito del tutor y asentimiento del paciente para poder ingresar al protocolo.
3. Se capturaron datos generales, variables demográficas, variables clínicas y de laboratorio. Anexo 1.
4. Se obtuvieron muestras sanguíneas: se tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica en un tubo con sistema de vacío EDTA al 10% por personal capacitado del área de laboratorio del Hospital de Pediatría al momento de la toma de exámenes de laboratorio de rutina.
5. Extracción de ADN genómico mediante la técnica de Miller, posteriormente el ADN fue purificado y cuantificado para verificar su integridad y pureza, los procedimientos se describen en el Anexo 2.
6. Mediante PCR-ARMS se realizó la genotipificación de los SNP rs738409 del gen *PNPLA3* y rs13412852 del gen *LPIN1*.
7. Se incluyó un grupo de referencia con individuos pediátricos que cumplieron con los criterios de inclusión, previa aceptación de los padres para participar en el estudio mediante el uso de consentimiento informado. Se tomó una muestra sanguínea por punción venosa para realizar la determinación de los SNP rs738409 del gen *PNPLA3* y rs13412852 del gen *LPIN1* por personal capacitado del área de laboratorio del Hospital de Pediatría al momento de la toma de exámenes de laboratorio de rutina.
8. El análisis de resultados incluyó el estudio de la relación entre variables sociodemográficas, clínicas y moleculares. Se realizó utilizando el paquete Excel Microsoft Office 2010® e IBM SPSS Statistics® v21.1, tomando como límite de significancia estadística $p < 0.05$.

Paso	Procedimiento	Descripción del procedimiento	Realizado por:
1	Captación de pacientes y grupo de referencia	Identificación de los pacientes en consulta externa o área hospitalaria del hospital de pediatría de CMNO con el diagnóstico de EHGNA y que cumplan con el resto de los criterios de inclusión.	Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López Dra. Elizabeth Hernández Chávez
2	Consentimiento informado	Información acerca del estudio al paciente y tutor para obtener el consentimiento informado por escrito.	Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López Dra. Elizabeth Hernández Chávez
3	Recolección de datos clínicos y bioquímicos	En una hoja de captura se recolectarán datos generales y variables demográficas, clínicas y bioquímicas	Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López
4	Obtención de muestras sanguíneas	Se tomará una muestra de sangre periférica por punción venosa.	Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López
5	Extracción de ADN	Extracción de ADN	Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre
6	Genotipificación	Genotipificación de SNP rs738409 y rs13412852	Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre
7	Análisis de la información	Recolección de resultados y análisis de la información.	Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López Dra. Elizabeth Hernández Chávez Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre

- Aspectos de bioseguridad

Se utilizaron las medidas de bioseguridad de tipo I al efectuar los procedimientos de toma de muestra y extracción de ácidos nucleicos y procesos moleculares. No se utilizaron microorganismos o radioactividad. El uso de bata, guantes y lentes de protección fue de carácter obligatorio durante la preparación de reactivos, manipulación de muestras, montaje de reacciones y cualquier otro procedimiento que se llevó a cabo en el laboratorio. La manipulación de desechos comunes y RPBI se realizó siguiendo las normas vigentes y reglamentación de este Instituto.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Utilizando el programa IBM SPSS® v21.1 se analizaron los datos obtenidos de todos los individuos incluidos en el estudio. Mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov se determinó que los datos se distribuyeron de manera normal.

Para los datos cuya distribución fue normal se realizó el análisis de relación de variables por pruebas paramétricas (χ^2 , ANOVA, T de Student). Se tomó como significancia estadística valor de $p < 0.05$.

En las muestras de los individuos del grupo de referencia se realizó el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg para determinar que las frecuencias de los polimorfismos estén distribuidas al azar, tomando como significativos los valores con $p < 0.05$.

ASPECTOS ÉTICOS

Todos los procedimientos y actividades que se llevaron a cabo durante el desarrollo del proyecto se realizaron con apego al reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, donde se establece en el título II, capítulo I, artículo 17, fracción II que el presente proyecto se clasifica como “investigación de riesgo mínimo” ya que se obtuvieron datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran extracción de sangre por punción venosa.

A los participantes que aceptaron participar en este proyecto se les solicitó que así lo manifestaran mediante una carta de consentimiento informado (anexo 2 y 3), firmada por el tutor y el asentimiento en pacientes mayores de 7 años (anexo 4), de acuerdo con el artículo 14 de tal reglamento, así como a los títulos quinto y quinto bis, capítulos únicos, de Investigación para la Salud y El Genoma Humano, respectivamente, de la misma ley. Se veló en todo momento por la seguridad y el bienestar de los pacientes de la misma manera que se protegió la privacidad y confidencialidad de sus datos personales.

Se requirió consentimiento informado tanto para el grupo de estudio como para el grupo de referencia, asegurando el asentimiento de los pacientes mayores de 7 años en ambos grupos.

Es oportuno mencionar que el realizar un grupo de referencia, otorgó mayor validez a nuestra investigación para comprobar que los polimorfismos genéticos que se estudiaron solo se encuentran asociados a la enfermedad hepática y no así en la población general. El beneficio que obtuvieron los pacientes tanto del grupo de estudio como de referencia fue conocer los resultados de los análisis de laboratorio y de los polimorfismos realizados.

En el consentimiento quedó claro que no se afectó su atención médica en caso de que el paciente decidiera no participar en el estudio.

Además, se respetaron cabalmente los principios contenidos en el Código de Núremberg, la Declaración de Helsinki, la enmienda de Tokio, el Informe Belmont y el Código de Reglamentos Federales de México.

El personal médico realizó una entrevista con el paciente donde le dio a conocer el proyecto, le informó de los procesos que se llevarían a cabo y se resolvieron dudas del paciente, posteriormente se solicitó por escrito el consentimiento del paciente para participar en el presente estudio. La identificación de las muestras de ADN se realizó mediante la asignación de un folio consecutivo sin tomar en cuenta datos personales, dichos datos personales, así como los formatos de recolección de datos clínicos permanecieron bajo el resguardo de los investigadores involucrados en el desarrollo de este proyecto. Para efectos de publicación de resultados no se utilizarán los datos de identificación personal de los participantes en este estudio.

Siguiendo las recomendaciones de la pauta 12 del CIOMS correspondiente a la recolección, almacenamiento y uso de datos en una investigación relacionada con la salud, la base de datos utilizada para la realización del presente estudio cuenta con una clave de acceso, la cual solo es conocida por los investigadores involucrados en el estudio, y será almacenada por un periodo de 5 años para posteriormente ser destruida. No se utilizaron en la base de resultados los datos personales de los pacientes, manejando en sustitución un código de números y letras que permitió omitir la información personal y manejar el completo anonimato.

El protocolo fue sometido a revisión por el Comité Local de Investigación en Salud 1310 y el Comité de ética de la unidad de la UMAE Hospital de Ginecología del CMNO obteniendo el número de registro: **R-2019-1310-047.**

RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

- Infraestructura

Se cuenta en la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente con el personal hospitalario para evaluar a los pacientes y los datos obtenidos para la revisión y análisis de resultados.

Se cuenta con áreas adecuadas para la toma y el procesamiento de las muestras como son el Laboratorio del Hospital de Pediatría, área de consulta externa y el laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

- Recursos materiales y factibilidad

Los recursos y materiales fueron proporcionados por la UMAE Hospital de Pediatría del CMNO del IMSS, sin inferirle un costo adicional al instituto.

El equipo de cómputo y la papelería, así como los programas estadísticos para realizar el análisis de los datos, fueron proporcionados por los investigadores.

El estudio se llevó a cabo en el área del servicio de Gastroenterología y Nutrición pediátrica de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente, con domicilio en Belisario Domínguez No. 735, Colonia Independencia, Guadalajara, Jalisco. Teléfono: 36 17 00 60, extensión 31739.

Tubos con sistema de vacío y EDTA 10% fueron proporcionados por laboratorio dentro del IMSS, se necesitó un tubo y 5 ml de sangre por cada paciente.

Expediente clínico, hoja de recolección de datos, computadora, Software Microsoft Office, programa para análisis estadístico IBM SPSS Statistics® v21.1, impresora, hojas, bolígrafos, escritorio, sillas.

El material para toma de muestras y su procesamiento fue otorgado por el IMSS donde se cuenta con el equipo necesario (termociclador, equipo para electroforesis) para la identificación de los SNP incluidos en este estudio.

- **Recursos humanos**

Dra. Elizabeth Hernández (investigador principal) y Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López (R2 Gastroenterología y nutrición pediátrica) se encargaron de buscar los expedientes clínicos de los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión, así como recolección de datos, toma de muestras y llenado de hojas correspondientes. Se contó con apoyo de la Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre, Investigadora de la División de Medicina Molecular del IMSS quien apoyó con el asesoramiento metodológico y con los estudios moleculares que incluyen la detección de los polimorfismos.

- **Financiamiento**

Este trabajo no requirió financiamiento externo ya que se cuenta con el recurso necesario en la institución.

EXPERIENCIA DEL GRUPO

El servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica cuenta con amplia experiencia en el abordaje y tratamiento de hepatopatías crónicas. Los investigadores asociados cuentan con experiencia metodológica para la dirección y asesoramiento de este trabajo de investigación.

Dr. Carolina Elizabeth Sánchez López. Investigador principal: Médico Pediatra, residente de segundo año de la subespecialidad en Gastroenterología y Nutrición Pediátrica.

Dra. Elizabeth Hernández Chávez. Director de Tesis: Médico Pediatra, subespecialista en Gastroenterología Pediátrica y Maestra en Nutrición Humana, es profesor adjunto del curso de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del HP CMNO IMSS. Ha desempeñado actividades de investigación y docencia, cuenta con diversas publicaciones de artículos científicos en el área de Gastroenterología Pediátrica y ha dirigido diversas tesis de la especialidad y subespecialidad, algunas de ellas merecedoras de premios nacionales e internacionales.

Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre. Director asociado y asesor metodológico: Doctora en Genética Humana que cuenta con experiencia en el diseño de proyectos de investigación en el área de Genética Molecular, así como en el desarrollo técnico de los mismos, además cuenta con múltiples publicaciones científicas en revistas indexadas.

RESULTADOS

Se incluyeron 75 individuos, de los cuales 43 cumplieron con los criterios de inclusión para el grupo de casos y 32 pacientes para el grupo de referencia.

- Casos

De los 43 pacientes con hígado graso, 14 pacientes (32.6%) fueron del sexo femenino y 29 pacientes (67.4%) del sexo masculino; la media de edad de estos pacientes fue 11 años (DE \pm 2.3), con un mínimo de 5 años y máximo de 15 años.

Se evaluaron distintos parámetros antropométricos incluyendo puntuación Z de peso para la edad y talla para la edad en base a la OMS, se reportó una media de peso/edad de 2.41 (DE \pm 0.54) con un máximo de 3.86 y un mínimo de 1.28; y para talla/edad un Z score una media de 0.73 (DE \pm 1) con un mínimo de -0.93 y máximo de 2.72.

Se reportó una media de IMC de 31.2 (DE \pm 5.23) con una mínima de 23.1 y una máxima de 46.6. Se clasificó el estado nutricional con base en el IMC para la edad, dos pacientes (4.7%) presentaron sobrepeso, 21 pacientes (48.8%) se clasificaron con obesidad grado I, 10 pacientes (23.3%) con obesidad grado II y 10 pacientes (23.3%) con obesidad grado III. Se consideró como obesidad grado I pacientes con IMC mayor al percentil 95 para la edad, obesidad grado II pacientes con IMC >120% del percentil 95 y obesidad grado III pacientes con IMC >140% del percentil 95. (Tabla 1)

Tabla 1. Estado nutricional de los pacientes con hígado graso por sexo

Estado nutricional	Pacientes con hígado graso n=43		
	Femenino n	Masculino n	Total n (%)
Eutrófico	0	0	0
Sobrepeso	1	1	2 (4.7)
Obesidad grado I	7	14	21 (48.8)
Obesidad grado II	3	7	10 (23.3)
Obesidad grado III	3	7	10 (23.3)
Total	14	29	43

Se reportó una media del índice cintura/talla de 0.61 (DE \pm 0.05), con una mínima de 0.50 y una máxima de 0.74.

Se analizaron variables bioquímicas, donde se reporta una media de ALT de 76.1 U/l (DE \pm 103) con una mínima de 16 U/l y una máxima de 607 U/l. La media de AST fue de 47.7 U/l (DE \pm 47.6), con una mínima de 20 U/l y una máxima de 306 U/l. La media de GGT fue de 43.4 (DE \pm 30) con una mínima de 15 y una máxima de 160.

En cuanto al perfil de lípidos, se reportó una media de triglicéridos séricos presentaron una media de 164 mg/dl (DE \pm 66.7) con una mínima de 72 mg/dl y una máxima de 385 mg/dl. La media de colesterol sérico fue de 155 mg/dl (DE \pm 32.1) con una mínima de 96 mg/dl y una máxima de 245 mg/dl. El HDL colesterol se reportó una media de 36 mg/dl (DE \pm 8) con una mínima de 14 mg/dl y una máxima de 57 mg/dl.

De todos los pacientes incluidos en el grupo de EHGNA, 12 pacientes (27.9%) presentaron elevación de los niveles de ALT, tomando como valores de referencia los sugeridos por la guía de diagnóstico y manejo de la EHGNA en niños. (niños \geq 50 y niñas \geq 44).

Se realizaron asociaciones entre el índice cintura/talla y variables bioquímicas, no encontrando significancia estadística en ninguna de las variables analizadas. Tabla 2.

Tabla 2. Correlación de Pearson entre índice cintura/talla y los niveles de transaminasas y perfil de lípidos

Variables	Pacientes con hígado graso n=43	
	<i>p</i>	<i>r</i>
ALT	0.41	-0.128
AST	0.63	-0.074
GGT	0.66	-0.06
Colesterol total	0.57	0.08
HDL colesterol	0.26	-0.174
Triglicéridos	0.19	0.020

- Grupo de referencia

Se captaron 32 niños que cumplieron criterios de inclusión para grupo de referencia. De este grupo la media de edad fue de 10 años (DE \pm 2.6), con una mínima de 5 años y una máxima de 15 años. Once pacientes fueron del sexo masculino y 21 del sexo femenino que representa el 34.4% y el 65.6% respectivamente.

En cuanto al estado nutricional de este grupo, clasificado mediante el IMC para la edad por la OMS, 26 pacientes (81.3%) se encontraban eutróficos, 4 pacientes (12.5%) con sobrepeso y 2 pacientes (6.3%) con obesidad grado I (Tabla 3). Se evaluó además peso para la edad, reportándose una puntuación Z media de -0.17 (DE \pm 1) con un mínimo de -2.98, un máximo de 2.17; la media de talla para la edad mediante puntuación Z fue de -0.37 (DE \pm 1.18), con una mínima fue de -3.56 y una máxima de 1.77.

Tabla 3. Estado nutricional de los individuos del grupo de referencia

Estado nutricional	Grupo de referencia n=32		
	Femenino n	Masculino n	Total n (%)
Eutrófico	16	10	26 (81.3)
Sobrepeso	4	0	4 (12.5)
Obesidad grado I	1	1	2 (6.3)
Obesidad grado II	0	0	0
Obesidad grado III	0	0	0
Total	21	11	32

De los datos bioquímicos reportados, la media de ALT fue de 18 U/l (DE \pm 6.5) con una mínima de 11 U/l y una máxima ALT de 39 U/l. La media de AST de 28.8 U/l (DE \pm 5.4) con una mínima de 17 U/l y una máxima de 41 U/l. También se analizó la GGT donde se reportó una media de 18.9 U/l (DE \pm 9.3) con una mínima de 10 U/l y una máxima de 52 U/l.

La media de colesterol sérico fue de 163 mg/dl (DE \pm 47) con un mínimo de 89 mg/dl y un máximo de 380 mg/dl, la media de triglicéridos séricos fue de 107 mg/dl (DE \pm 45), con un mínimo de 51 mg/dl y un máximo de 210 mg/dl. La media de HDL colesterol fue de 51 mg/dl (DE \pm 12.9) con un mínimo del grupo de referencia de 34 mg/dl y un máximo de 91 mg/dl.

Se realizó comparación con T de Student de los niveles séricos de ALT, AST y GGT, así como perfil de lípidos entre ambos grupos estudiados, presentando significancia estadística los niveles de ALT, GGT, triglicéridos y HDL colesterol. Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de niveles de transaminasas y perfil de lípidos del grupo con EHGNA y grupo de referencia

Variable	Grupo con EHGNA	Grupo referencia	<i>p</i>
ALT	76.1	18	0.002
AST	47.7	28.8	0.029
GGT	43.4	19	0.00
Triglicéridos	164.7	107.8	0.00
Colesterol total	155.1	163.1	0.38
HDL colesterol	36.6	51.9	0.00

** T de Student

Figura 1. Comparación de niveles de ALT entre grupo con EHGNA y grupo de referencia.

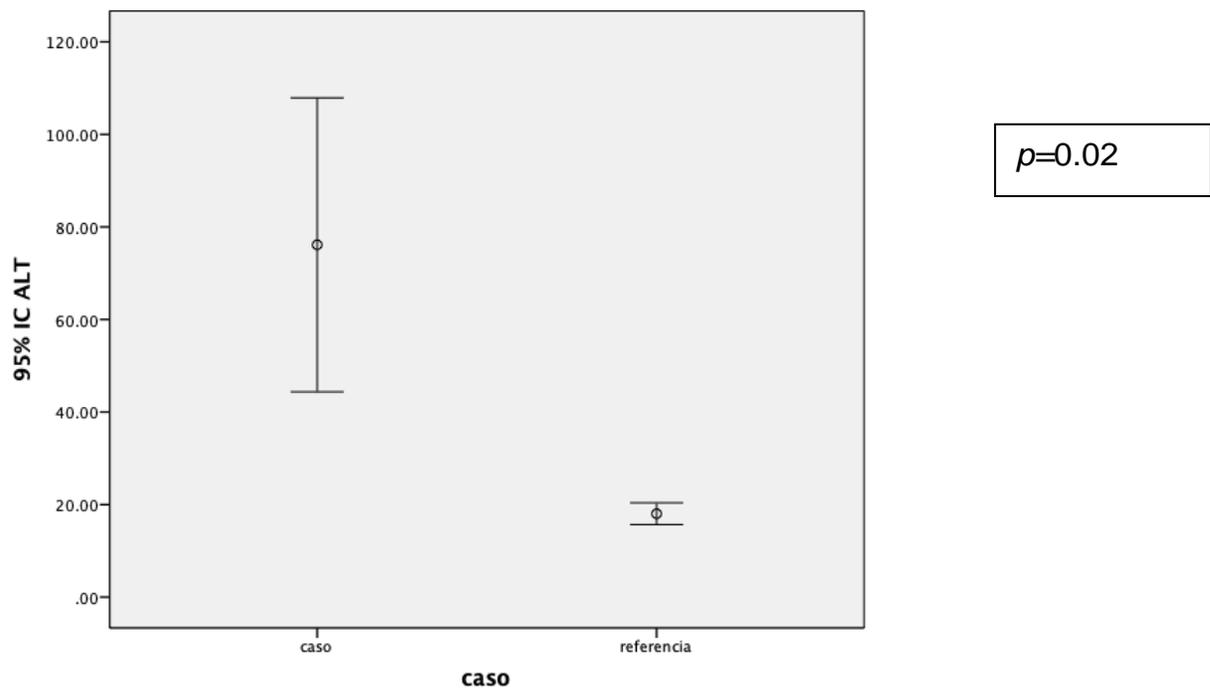


Figura 2. Comparación de niveles de HDL colesterol entre grupo con EHGNA y grupo de referencia.

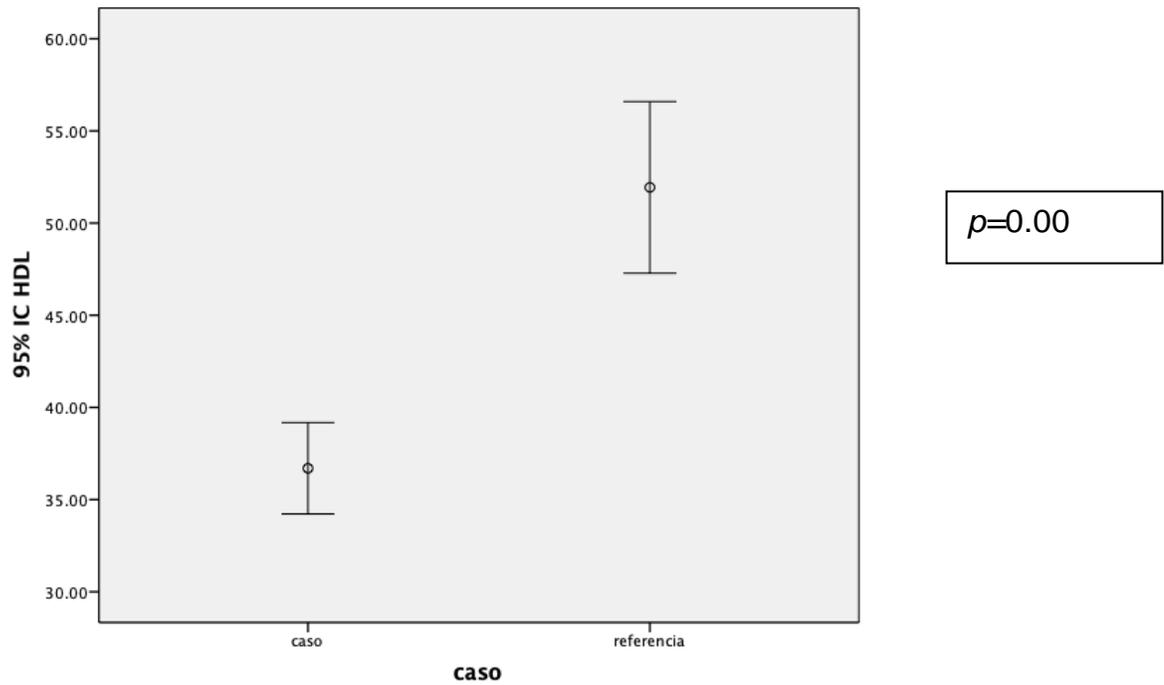


Figura 3. Comparación de niveles de GGT entre grupo con EHGNA y grupo de referencia.

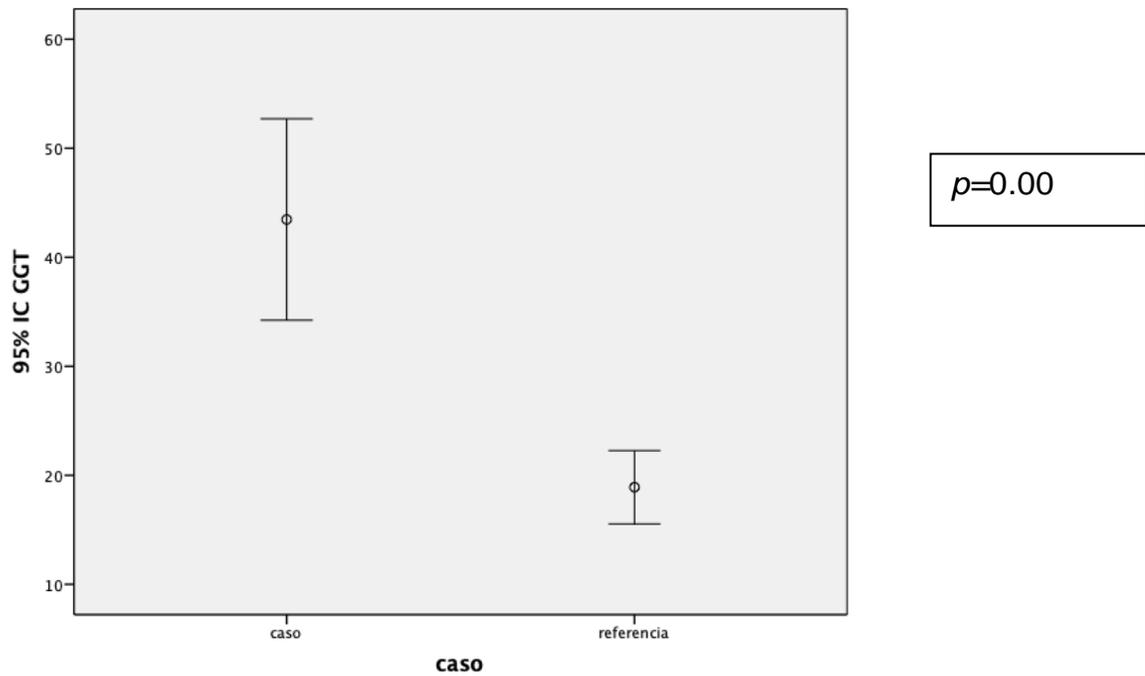
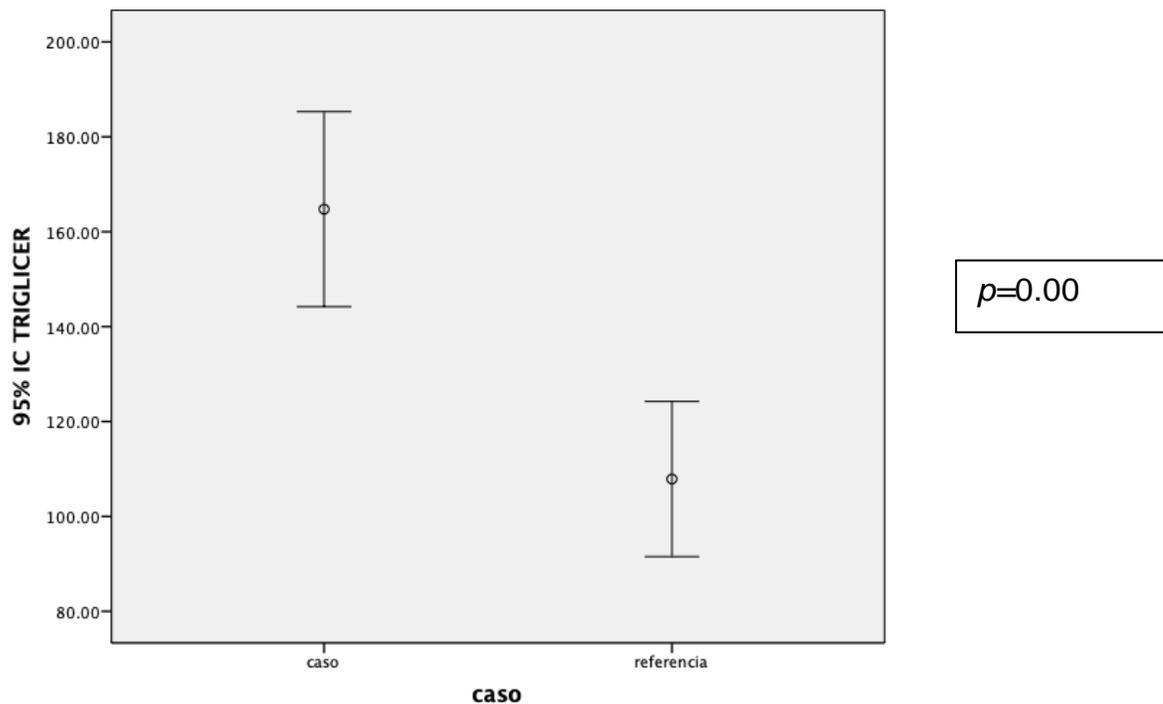


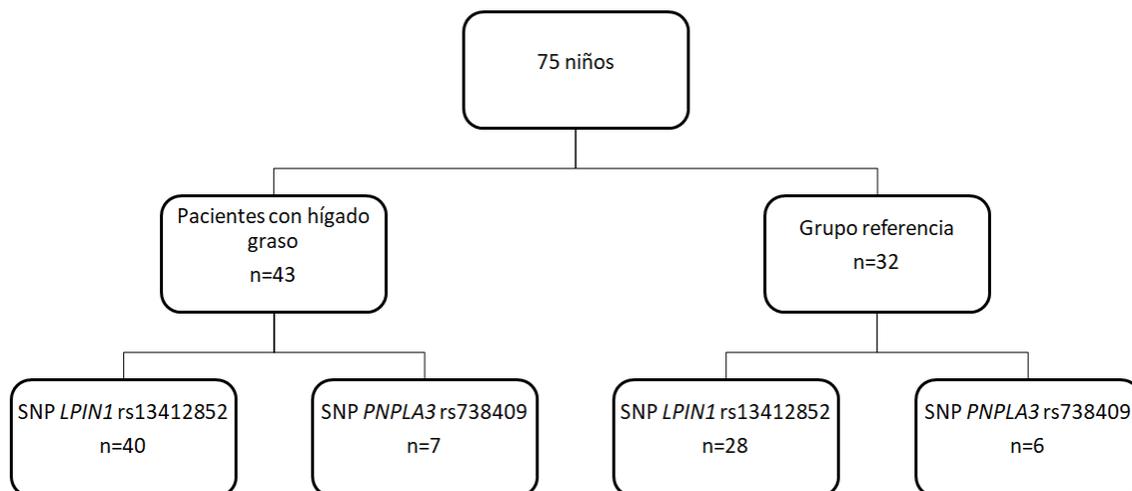
Figura 4. Comparación de niveles de triglicéridos entre grupo con EHGNA y grupo de referencia.



- Polimorfismos

De los 43 pacientes incluidos en el grupo de niños con hígado graso, solo fue posible realizar la determinación del polimorfismo rs13412852 del gen *LPIN1* en 40 pacientes. De los 32 sujetos del grupo de referencia, solo se realizó en 28 individuos. Figura 5.

Figura 5. Distribución de los niños incluidos para la determinación de polimorfismos



Con relación a la determinación del polimorfismo rs738409 del gen *PNPLA3*, solo se genotificaron siete pacientes del grupo de niños con EHGNA y en seis sujetos del grupo de referencia, por degradación de los iniciadores, por lo que solo se realizó la distribución alélica y genotípica de este polimorfismo, sin realizarse un análisis estadístico de asociación.

La distribución genotípica del gen *PNPLA3* rs738409 de ambos grupos se muestra en la Tabla 5. El 71.5% de los pacientes con hígado graso presentó el homocigoto silvestre (C/C), el 28.5% el genotipo heterocigoto (C/G) y ningún paciente presentó el homocigoto polimórfico (G/G). Del grupo de referencia un paciente presentó el homocigoto polimórfico. La frecuencia del alelo polimórfico (G) del gen *PNPLA3* rs738409 fue del 14.2% en el grupo de pacientes con hígado graso y del 41.7% en el grupo de referencia. Tabla 5.

Tabla 5. Distribución alélica y genotípica del polimorfismo rs738409 del gen *PNPLA3* en ambos grupos.

Gen <i>PNPLA3</i> rs738409	Pacientes con hígado graso n (%)	Grupo de referencia n (%)
Frecuencias genotípicas	n=7	n=6
C/C	5 (71.5)	2 (33.3)
C/G	2 (28.5)	3 (50)
G/G	0	1 (16.7)
Frecuencias alélicas	n=14	n=12
C	12 (85.8)	7 (58.3)
G	2 (14.2)	5 (41.7)

El análisis estadístico no mostró asociación del rs13412852 del gen *LPIN1* con hígado graso. ($\chi^2=0.26$, $p=0.608$)

La frecuencia del genotipo homocigoto polimórfico fue del 5% en el grupo de pacientes con hígado graso, mientras que en el grupo de referencia fue del 3.6%; el genotipo homocigoto silvestre se presentó en 25 pacientes (62.5%) de niños con hígado graso y del 53.6% en el grupo de referencia. En la Tabla 6 se muestran las frecuencias alélicas del rs13412852 del gen *LPIN1*, el alelo T se observó en el 21.3% de los pacientes con hígado graso y en el 25% de los individuos del grupo de referencia.

Las frecuencias genotípicas del rs13412852 se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0.44$) en los individuos del grupo de referencia, es decir, la distribución de frecuencias genotípicas ocurrió al azar en esta población, y no hay fenómenos de migración, selección o deriva.

Tabla 6. Distribución alélica y genotípica de lo polimorfismo rs13412852 del gen *LPIN1* en ambos grupos.

Gen <i>LPIN1</i> rs13412852	Pacientes con hígado graso n (%)	Grupo de referencia n (%)
Frecuencias genotípicas	n=40	n=28
C/C	25 (62.5)	15 (53.6)
C/T	13 (32.5)	12 (42.8)
T/T	2 (5)	1 (3.6)
Frecuencias alélicas	n=80	n=56
C	63 (78.7)	42 (75)
T	17 (21.3)	14 (25)

Se realizó el estudio de asociación del polimorfismo *LPIN1* rs13412852 con las variables clínicas, antropométricas y bioquímicas de los pacientes con hígado graso mediante ANOVA de un factor donde se observó asociación estadísticamente significativa con el percentil de IMC. Tabla 7.

Tabla 7. Asociación del rs13412851 del gen *LPIN1* con variables clínicas, antropométricas y bioquímicas en pacientes con hígado graso

Variable	Genotipo <i>LPIN1</i> rs13412851			<i>p</i>
	CC n=25	CT n=13	TT n=2	
Edad	11.6 ± 2.1	11 ± 2.5	9 ± 1.4	0.26
IMC	30.2 ± 4.1	33.2 ± 7.2	28.5 ± 0.11	0.21
IMC percentil	98.8 ± 1	59.5 ± 33.8	59 ± 11.3	0.00
Circunferencia de cintura	93 ± 8.7	96 ± 11	83.5 ± 2.1	0.20
Circunferencia de abdomen	102 ± 9.5	106.5 ± 11	92 ± 7	0.13
Circunferencia de cadera	104 ± 11.5	107.3 ± 16.2	95.7 ± 12.4	0.48
Índice cintura/talla	0.60 ± 0.04	0.63 ± 0.07	0.58 ± 0.03	0.148
ALT	81.7 ± 127.2	52.6 ± 35.8	134 ± 156.9	0.53
AST	51.6 ± 59.2	33.8 ± 9.5	69 ± 63.6	0.46
GGT	39.3 ± 25.6	53.1 ± 40	38 ± 19.8	0.42
Triglicéridos	166.5 ± 79.7	149.7 ± 32.3	188.5 ± 17.6	0.65
Colesterol total	155.5 ± 37.4	151.6 ± 25.3	144 ± 2.8	0.86
HDL colesterol	37.6 ± 8.7	33.9 ± 7.6	38.5 ± 0.7	0.41

Se realizó además asociación del polimorfismo *LPIN1* rs13412852 con las variables clínicas, antropométricas y bioquímicas de los sujetos del grupo de referencia mediante ANOVA de 1 factor donde se observó asociación estadísticamente significativa con los niveles normales de ALT. Tabla 8.

Tabla 8. Asociación del rs13412851 del gen *LPIN1* con variables clínicas, antropométricas y bioquímicas en el grupo de referencia

Variable	Genotipo <i>LPIN1</i> rs13412851			<i>p</i>
	CC n=15	CT n=12	TT n=1	
Edad	10.2 ± 2.1	10.9 ± 3.6	11	0.83
IMC	18 ± 2.2	18.4 ± 3	23.8	0.11
IMC percentil	69.7 ± 31	76.5 ± 28.4	9	0.12
ALT	15.6 ± 3.2	18.5 ± 5.6	39	0.00
AST	28 ± 4.4	27.8 ± 5.9	33	0.63
GGT	15.4 ± 3.8	22.8 ± 13.6	24	0.13
Triglicéridos	103 ± 51.5	110 ± 40.8	130	0.82
Colesterol total	153.7 ± 24.5	170 ± 71.4	166	0.71
HDL colesterol	49.8 ± 7.8	51.8 ± 14.7	38	0.5

DISCUSIÓN

La enfermedad de hígado graso no alcohólico es una causa cada vez más frecuente de enfermedad hepática crónica en niños y adolescentes debido al incremento de la incidencia de sobrepeso y obesidad en esta población.¹⁷

El mecanismo para la progresión de la esteatosis a la esteatohepatitis, sigue sin estar claro. Además existe una gran variabilidad en la respuesta de los niños con EHGNA a las intervenciones de estilo de vida, lo que sugiere que la genética es un factor modificador y que existe una interacción entre la genética y el medio ambiente en la patogénesis de esta enfermedad, por lo que la comprensión de la genética en el desarrollo y la progresión del hígado graso pediátrico ayudará a incrementar el conocimiento en el campo.¹⁸

Se han estudiado distintas variantes genéticas asociadas con el desarrollo de hígado graso, las variantes de los genes *PNPLA3* I148M y *TM6SF2* E167K son los principales determinantes de las diferencias interindividuales en la esteatosis hepática y la susceptibilidad a NASH progresiva. Ambos genes determinan la retención de grasa hepática a través de gotas de lípidos y modificaciones de lipoproteínas de muy baja densidad. *PNPLA3* afecta también directamente a las células estrelladas hepáticas y al metabolismo del retinol. Estos hallazgos sugieren que la acumulación hepatocelular de lípidos neutros es perjudicial para el hígado.¹⁹ En nuestro estudio se intentó realizar la determinación del polimorfismo *PNPLA3* rs738409 sin embargo, debido a degradación de reactivo, solo fue posible realizarlo en un pequeño porcentaje de los pacientes por lo que se descartó para el análisis estadístico.

El gen Lipin1 (*LPIN1*), una fosfatasa ácida fosfatídica que se expresa en hígado y tejido adiposo, está involucrada en la síntesis de fosfolípidos y de triglicéridos. *LPIN1* se requiere para la adipogénesis y el flujo metabólico normal entre el tejido adiposo y el hígado, donde actúa como un coactivador transcripcional inducible para regular el metabolismo de los ácidos grasos. Las variantes de *LPIN1* se han asociado con varios componentes del síndrome metabólico.¹⁹ Estudios previos sugieren que *LPIN1* está involucrado en la

patogénesis del hígado graso y en la progresión del daño hepático en NASH, y que el genotipo para el *LPIN1* rs13412852 puede contribuir, aunado a SNP del gen *PNPLA3* y factores de riesgo clínico, a aumentar el riesgo de enfermedad hepática progresiva en niños obesos con hígado graso. El posible mecanismo del daño es la disminución del flujo de ácidos grasos libres al hígado debido a la reducción de la lipólisis asociada con el alelo protector, o una reducción directa de la lipogénesis en el hígado.²⁰

En un estudio realizado por Valenti et al, donde se incluyeron 143 niños y adolescentes y 115 adultos con EHGNA confirmado por biopsia se encontró que la presencia del heterocigoto polimórfico del gen *LPIN1* rs13412852 se asoció con dislipidemia menos grave y presentaban una tendencia a una menor prevalencia de NASH y daño hepático significativamente menos grave; además pareció tener un papel protector en la progresión de la fibrosis independientemente del genotipo *PNPLA3*. En ese estudio la frecuencia del genotipo T/T del gen *LPIN1* rs13412852 en pacientes con hígado graso fue del 7% y del 15% en controles sanos ²⁰; en nuestro estudio la frecuencia fue de 5% y 3.6% respectivamente.

En el grupo de pacientes pediátricos con hígado graso, el genotipo más frecuente fue el heterocigoto (C/T) con el 48% y posteriormente el homocigoto silvestre (C/C) en el 45% ²⁰; contrastando con nuestro estudio donde el genotipo más frecuente fue el homocigoto silvestre en el 62.5% de los pacientes, y el heterocigoto (C/T) se presentó en el 32.5%

En el artículo publicado por Valenti et al. se observó que la presencia del alelo T estuvo asociado a niveles bajos de triglicéridos,²⁰ en contraste con nuestro estudio donde no se observó que hubiera asociación con los niveles de triglicéridos; no así con los niveles bajos de ALT en el grupo de referencia.

Vale la pena mencionar que en el estudio de Valenti et al, se evaluó el grado de fibrosis mediante estudio histopatológico, observando que la presencia del genotipo T/T se asoció a una menor prevalencia de NASH.²⁰

En cuanto a las variables antropométricas, la circunferencia de cintura y abdomen son muy variables en niños ya que el tamaño corporal tiene influencia en estas mediciones por lo que no son parámetros confiables para la detección de alteraciones metabólicas; es por eso que se ha propuesto el índice cintura/talla donde se incorpora la medición de la circunferencia abdominal y la corrige por la estatura, y tiene una mayor certeza para predecir factores de riesgo cardiovascular. Un valor límite de 0.50 se ha utilizado como punto de corte para identificar sobrepeso y obesidad; y este valor traduce mantener la cintura a menos de la mitad de la estatura.²¹⁻²³

En un estudio publicado por Valle-Leal, et al en el 2015 donde se evaluaron niños mexicanos en edad escolar con el objetivo de detectar riesgo metabólico con base en el índice cintura/talla, se reportó una sensibilidad del 100% para detectar hiperglucemia, una sensibilidad del 93% para detectar hipercolesterolemia y una sensibilidad del 76% para detectar hipertrigliceridemia, comparado con una sensibilidad del 56%, 70% y 59% respectivamente con el índice de masa corporal.²²

En nuestro estudio todos los pacientes con hígado graso presentaban algún grado de sobrepeso u obesidad y todos tuvieron índice cintura/talla >0.5 ; se realizaron asociaciones entre el índice cintura/talla y variables bioquímicas, no encontrando significancia estadística en ninguna de las variables analizadas.

CONCLUSIONES

- En este estudio no hubo asociación del polimorfismo *LPIN1* rs13412852 con hígado graso no alcohólico en pacientes pediátricos.
- La mayoría de los pacientes afectados fueron del sexo masculino en el 67.4% de los casos; la media de edad de estos pacientes fue 11 años.
- El 27.9% de los pacientes con hígado graso presentaron algún grado de elevación de los niveles de ALT.
- La frecuencia del genotipo homocigoto polimórfico del gen *LPIN1* rs13412852 fue del 5% en el grupo de pacientes con hígado graso, mientras que en el grupo de referencia fue del 3.6%.
- Se observó asociación estadísticamente significativa del polimorfismo *LPIN1* rs13412852 con el percentil de IMC ($p=0.001$).

BIBLIOGRAFÍA

1. Fang Yan-Lan, Chen H, Wang Chun-Lin, Liang Li. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From “two hit theory” to “multiple hit model. *World J Gastroenrol.* 2018;24(27):2974-2983.
2. Shah J, Okubote T, Alkhoury N. Overview of Updated Practice Guidelines for Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterol Hepatol.* 2018;14(7):407-414.
3. Younossi Z, Koenig A, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. *AASLD.* 2016;64(1):73-84.
4. Anderson E, Laura H, Hayley J, Higgins J, Lawlor D, Fraser A. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE.* 2015;10(10):1-14.
5. Fleet S, Lefkowitz J, Lavine J. Current Concepts in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterol Clin N Am.* 2017;46(2):217-231.
6. Cruz A, Burgueño B, Calvalho e Silva T, Millán A. Hígado graso no alcohólico en la infancia: fisiopatología, tratamiento actual y perspectivas. *Acta Pediatr Esp.* 2017;75(5-6):62-66.
7. Vos M, Abrams S, Barlow S, Caprio S, Daniels S, Kohli R, et al. NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (NASPGHAN). *JPGN.* 2017;64(2):319-334.
8. Mann J, Valenti L, Scorletti E, Byrne C, Nobili V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Semin Liver Dis.* 2018;38(1):1-13.
9. Graffigna M, Catoira N, Soutelo J, Azpelicueta A, Berg G, Perel C, et al. Diagnóstico de esteatosis hepática por métodos clínicos, bioquímicos y por imágenes. *Rev Argent Endocrinol Metab.* 2017;54(1):37-46.
10. Shannon A, Alkhoury N, Carter-Kent C, Monti L, Devito R, Lopez R. Ultrasonographic Quantitative Estimation of Hepatic Steatosis in Children With NAFLD. *JPGN.* 2011;53(2):190-195.
11. Vespasiani-Gentilucci U, Dell’Unto C, De Vincentis A, Baiocchini A, Delle M, Cecere R, et al. Combining Genetic Variants to Improve Risk Prediction for NAFLD and Its Progression to Cirrhosis: A Proof of Concept Study. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;24(43):4835-4845.

12. Mehta R, Birerdinc A, Younossi Z. Host Genetic Variants in Obesity-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis*. 2014;18(1):249-267.
13. Sookoain S, Pirola C. 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*. 2011; 53(6):1883-1894.
14. Hernaez R. Genetics factors associated with the presence and progression of nonalcoholic fatty liver disease: A narrative review. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;35(1):32-41.
15. Rausch J, Lavine J, Naga C, Guo X, Kwon S, Schwimmer J, et al. Genetic Variants Associated With Obesity and Insulin Resistance in Hispanic Boys With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;66(5): 789-796.
16. Martínez L, Larrieta E, Calva J, Kershenobich D, Torre A. The Expression of PNPLA3 Polymorphism could be the Key for Severe Liver Disease in NALFD in Hispanic Population. *Ann Hepatol*. 2017;16(6):909-915.
17. Utz M, Targa C, Lessa B, Epifiano M, Mouzaki M, Mattos A. Non-Alcoholic Fatty Lifestyle Change – a Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Hepatol*. 2018;17(3):345-354.
18. Goyal N, Schwimmer J. The Genetics of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis*. 2017;22(1):59-71.
19. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *Biomed Res Int*. 2015;1-10.
20. Valenti L, Mota B, Alisi A, Sartorelli R, Buonaiuto G, Dongiovanni P, et al. LPIN1 rs13412852 Polymorphism in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(5):588-593.
21. Padrón M, Perea A, López G. Relación cintura/estatura, una herramienta útil para detectar riesgos cardiovascular y metabólico en niños. *Acta Pediatr Mex*. 2016;37(5):297-301.
22. Valle J, Abundis L, Hernández J, Flores S. Índice cintura-estatura como indicador de riesgo metabólico en niños. *Rev Chil Pediatr*. 2016;87(3):180-185.
23. Saldívar H, Vázquez A, Barrón M. Precisión diagnóstica de indicadores antropométricos: perímetro de cintura, índice cintura-talla e índice cintura-cadera para la identificación de sobrepeso y obesidad infantil. *Acta Pediatr Mex*. 2016;37(2):79-87.

ANEXOS

Anexo 1. Hoja de recolección de datos



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL DE OCCIDENTE
HOSPITAL DE PEDIATRIA**

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

“Asociación de los polimorfismos *PNPLA3* rs738409 y *LPIN1* rs13412852 en pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico”

Número de identificación: _____ Grupo: Casos ____ Referencia ____

Datos generales

Fecha de nacimiento		Edad	
Género			

Datos antropométricos

Peso		Peso/Edad	
Talla		Talla/Edad	
IMC		IMC/Edad	
Cintura		Peso/Talla	
C. Abdominal		Cintura/Talla	
Cadera		CMB	
Estado nutricional		CMB/Edad	

Perfil bioquímico

AST		ALT	
GGT		FA	
DHL		Triglicéridos	
Colesterol		HDL	

Comorbilidades _____

Medicamentos _____

Hallazgos ecasonográficos _____

Anexo 2. Carta de consentimiento informado (Grupo casos)



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CENTRO MÉDICO NACIONAL DE OCCIDENTE

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Carta de consentimiento informado para participar en proyectos de investigación

Nombre del paciente _____

NSS _____

1. Nombre del estudio:

“Asociación de los polimorfismos *PNPLA3* RS738409 y *LPIN1* RS13412852 en pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico”

2. Lugar y fecha _____

3. Número de registro R-2019-1310-047.

4. Justificación y objetivo del estudio:

Muchas cosas pueden estar involucradas en la enfermedad del hígado graso en niños, algunas de ellas son variaciones en unas partículas llamadas genes, que hay dentro de nuestras células, que nos heredan nuestros padres y que determinan las características de todo nuestro cuerpo así como la predisposición a algunas enfermedades. Identificar algunos cambios llamados polimorfismos en algunos genes es importante para hacer investigaciones de nuevos tratamientos. Dado que su hijo padece de hígado graso, los estamos invitando a participar en esta investigación cuyo objetivo es estudiar dos de estos genes ya mencionadas en su hijo y saber si están o no involucrados en su enfermedad

5. Procedimientos

Se me ha informado que la participación de mi hija(o) es voluntaria y consistirá en lo siguiente:

- Tomar una muestra de sangre de 5 ml, que equivale aproximadamente a 2 cucharadas cafeteras de sangre, con la que se analizará si mi hija(o) presenta cambios en dos partículas que existen dentro de sus células llamadas genes que predispongan al desarrollo de hígado graso, esta muestras se tomarán al momento de los estudios de laboratorio de rutina en el seguimiento de la enfermedad. La obtención de la muestra de sangre será en la vena de su brazo, como normalmente se hace cuando va al laboratorio.
- Revisión del expediente clínico donde se tomarán los datos clínicos (peso, talla, estado nutricional), resultados de estudios de sangre y reporte de ultrasonido tomado previamente

en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de mi hija(o), siempre guardando la confidencialidad y privacidad de mi hija(o).

6. Posibles riesgos y molestias:

El procedimiento para tomar la sangre implica una leve molestia en el sitio del piquete y aunque generalmente no causa ningún problema, podría ocasionar un pequeño moretón en esa zona o una bolita que le cause molestia por unos días.

7. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:

Estoy enterada (o) que no recibiré un pago por la participación de mi hija (o) en este estudio, ni implicará algún gasto para mí. Obtendré el beneficio de conocer el resultado de los análisis realizados en la consulta subsecuente de mi hija (o).

8. Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:

Se me informó que se me notificarán los resultados del análisis de sangre que se tomen en mi hija (o); y si se encuentra alguna anomalía se me otorgará la asesoría médica correspondiente.

9. Participación o retiro:

Se me explicó que la participación de mi hija (o) en este estudio es completamente libre y voluntaria. Si decido no participar, de cualquier manera, recibiré la atención médica que suelo recibir en el IMSS.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambio de opinión, puedo abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que desee no modificará de ninguna manera los beneficios que tengo como derechohabiente del IMSS.

10. Privacidad y confidencialidad.

Se me explicó que toda la información que proporcione será de carácter estrictamente confidencial, es decir, será utilizado únicamente por los investigadores del proyecto. Para proteger la identidad de mi hija (o), los datos del expediente clínico que se tomen, así como de los análisis de sangre se le asignará un número para identificarlos; las muestras de sangre una vez analizadas se ingresarán a donde serán almacenadas, perdiendo la identidad de mi hija (o).

Se me dijo que cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se mencionarán nombres de pacientes, su identidad será protegida y ocultada.

Debido a que hay muchas cosas más por estudiar en las enfermedades del hígado, también se me pidió mi autorización para que al término de esta investigación se pueda guardar lo que sobre de la muestra de sangre, con el objetivo de ser utilizadas en futuras investigaciones. Estoy enterada(o) que, de aceptar, este material se almacenará en congelación en un lugar especial durante un periodo de 10 años. También se me explicó que, al momento del ingreso de la muestra a este lugar, se guardará con un número para su identificación y no con sus datos personales perdiéndose la identidad de la misma por lo que ya no podré recuperar dicha muestra de sangre, es decir en ningún momento se sabrá el nombre de la persona a quien corresponde la muestra de sangre. También estoy enterada(o) que, para poder utilizarlo en otros estudios relacionados, estos deben de estar registrados en los Comités de Investigación y ética correspondientes. Por lo anterior he decidido lo siguiente:

Sí autorizo que se tomen las muestras para este estudio y estudios futuros.

Sí autorizo que se tomen las muestras solo para este estudio.

No autorizo que se tomen las muestras.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable: Para cualquier duda o aclaración respecto a este proyecto usted puede hablar al teléfono 33383000 extensión 31727 con la Dra. Elizabeth Hernández Chávez que labora de lunes –viernes de las 08:00 a 14:00 hrs, en el departamento de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS,

ubicado en Belisario Domínguez #735 Colonia Independencia, CP 44340. Guadalajara, Jalisco, o bien con la Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López, residente de segundo año de Gastroenterología y Nutrición pediátrica, labora de lunes–viernes de las 7:00 a 16:00 hrs, en el departamento de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS, ubicado en Belisario Domínguez #735 Colonia Independencia, CP 44340. Guadalajara, Jalisco.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética en Investigación de la CNIC del IMSS. Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México D.F, a los Tel. 56276900-21216 ext. 21230. Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

Declaración de consentimiento informado:

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas se contestaron a mi satisfacción.

Nombre y firma del padre, tutor o representante legal.

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Nombre del testigo 1, firma y datos de contacto.

Nombre del testigo 2, firma y datos de contacto.

Anexo 3. Carta de consentimiento informado (Grupo de referencia)



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CENTRO MÉDICO NACIONAL DE OCCIDENTE

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Carta de consentimiento informado para participar en proyectos de investigación

(Grupo de referencia)

Nombre del paciente _____

NSS _____

1. Nombre del estudio:

“Asociación de los polimorfismos *PNPLA3* RS738409 y *LPIN1* RS13412852 en pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico”

2. Lugar y fecha _____

3. Número de registro R-2019-1310-047.

4. Justificación y objetivo del estudio:

Muchas cosas pueden estar involucradas en la enfermedad del hígado graso en niños, algunas de ellas son variaciones en unas partículas llamadas genes, que hay dentro de nuestras células, que nos heredan nuestros padres y que determinan las características de todo nuestro cuerpo así como la predisposición a algunas enfermedades. Identificar algunos cambios llamados polimorfismos en algunos genes es importante para el estudio de nuevos tratamientos; el objetivo de esta investigación es estudiar si estas alteraciones genéticas están o no involucradas en el desarrollo del hígado graso. De forma inicial el estudio se realiza con niños que padezcan esta enfermedad, pero también tenemos que comprobar que estas variaciones no se encuentren presentes en la población general. Por tal motivo estamos invitándolos a participar en este estudio como parte de un grupo de pacientes llamados “comparativos o de referencia”.

5. Procedimientos

Se me ha informado que la participación de mi hija(o) es voluntaria y consistirá en lo siguiente:

- Tomar una muestra de sangre de 5 ml, que equivale aproximadamente a 2 cucharadas cafeteras de sangre, con la que se analizará si mi hija(o) presenta cambios en dos partículas que existen dentro de sus células llamadas genes que predispongan al desarrollo de hígado graso, estas muestras se tomarán al momento de los estudios de

laboratorio de rutina en el seguimiento de la enfermedad. La obtención de la muestra de sangre será en la vena de su brazo, como normalmente se hace cuando va al laboratorio.

- Revisión del expediente clínico donde se tomarán los datos clínicos (peso, talla, estado nutricional), resultados de estudios de sangre y reporte de ultrasonido tomado previamente en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de mi hija(o), siempre guardando la confidencialidad y privacidad de mi hija(o).

6. Posibles riesgos y molestias:

El procedimiento para tomar la sangre implica una leve molestia en el sitio del piquete y aunque generalmente no causa ningún problema, podría ocasionar un pequeño moretón en esa zona o una bolita que le cause molestia por unos días.

7. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:

Estoy enterada (o) que no recibiré una un pago por la participación de mi hija (o) en este estudio, ni implicará algún gasto para mí. Obtendré el beneficio de conocer el resultado de los análisis realizados en la consulta subsecuente de mi hija (o).

8. Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:

Se me informó que se me notificarán los resultados del análisis de sangre que se tomen en mi hija (o); y si se encuentra alguna anomalía se me otorgará la asesoría médica correspondiente.

9. Participación o retiro:

Se me explicó que la participación de mi hija (o) en este estudio es completamente libre y voluntaria. Si decido no participar, de cualquier manera, recibiré la atención médica que suelo recibir en el IMSS.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambio de opinión, puedo abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que desee no modificará de ninguna manera los beneficios que tengo como derechohabiente del IMSS.

10. Privacidad y confidencialidad.

Se me explicó que toda la información que proporcione será de carácter estrictamente confidencial, es decir, será utilizado únicamente por los investigadores del proyecto. Para proteger la identidad de mi hija (o), los datos del expediente clínico que se tomen, así como de los análisis de sangre se le asignará un número para identificarlos; las muestras de sangre una vez analizadas se ingresarán a donde serán almacenadas, perdiendo la identidad de mi hija (o). También se me explicó que se me proporcionará la información para el bienestar de mi hija (o) (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley.

Se me dijo que cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se mencionarán nombres de pacientes, su identidad será protegida y ocultada.

Debido a que hay muchas cosas más por estudiar en las enfermedades del hígado, también se me pidió mi autorización para que al término de esta investigación se pueda guardar lo que sobre de la muestra de sangre, con el objetivo de ser utilizadas en futuras investigaciones. Estoy enterada(o) que, de aceptar, este material se almacenará en congelación en un lugar especial durante un periodo de 10 años. También se me explicó que, al momento del ingreso de la muestra a este lugar, se guardará con un número para su identificación y no con sus datos personales perdiéndose la identidad de la misma por lo que ya no podré recuperar dicha muestra de sangre, es decir en ningún momento se sabrá el nombre de la persona a quien corresponde la muestra de sangre. También estoy enterada(o) que, para poder utilizarlo en otros estudios relacionados, estos deben de estar registrados en los Comités de Investigación y ética correspondientes. Por lo anterior he decidido lo siguiente:

Sí autorizo que se tomen las muestras para este estudio y estudios futuros.

Sí autorizo que se tomen las muestras solo para este estudio.

No autorizo que se tomen las muestras.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable: Para cualquier duda o aclaración respecto a este proyecto usted puede hablar al teléfono 33383000 extensión 31727 con la Dra. Elizabeth Hernández Chávez que labora de lunes –viernes de las 08:00 a 14:00 hrs, en el departamento de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS, ubicado en Belisario Domínguez #735 Colonia Independencia, CP 44340. Guadalajara, Jalisco, o bien con la Dra. Carolina Elizabeth Sánchez López, residente de segundo año de Gastroenterología y Nutrición pediátrica, labora de lunes–viernes de las 7:00 a 16:00 hrs, en el departamento de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS, ubicado en Belisario Domínguez #735 Colonia Independencia, CP 44340. Guadalajara, Jalisco.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a:

Comisión de Ética en Investigación de la CNIC del IMSS. Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México D.F, a los Tel. 56276900-21216 ext. 21230. Correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

Declaración de consentimiento informado:

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas se contestaron a mi satisfacción.

Nombre y firma del padre, tutor o representante legal.

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Nombre del testigo 1, firma y datos de contacto.

Nombre del testigo 2, firma y datos de contacto.

Anexo 4. Carta de asentimiento en menores de edad



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CENTRO MÉDICO NACIONAL DE OCCIDENTE

CARTA DE ASENTIMIENTO EN MENORES DE EDAD (8 A 17 AÑOS)

Nombre del paciente _____

NSS _____

Nombre del estudio: “Asociación de los polimorfismos *PNPLA3* RS738409 y *LPIN1* RS13412852 en pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico”

Número de registro institucional R-2019-1310-047.

El objetivo de este estudio es identificar algunos cambios en tus genes llamados polimorfismos y estudiar si estas alteraciones están o no involucradas en el desarrollo del hígado graso.

Hola, mi nombre es Carolina Elizabeth Sánchez López y trabajo en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Actualmente estamos realizando un estudio para conocer acerca de algunos genes que pueden estar afectando tu hígado y para ello queremos pedirte que nos apoyes.

Tu participación en el estudio consistiría en permitirnos tomarte una pequeña muestra de sangre, con la que se analizará si presenta cambios en dos partículas que existen dentro de sus células llamadas genes que predispongan al desarrollo de hígado graso, estas muestras se tomarán al momento de los estudios de laboratorio de rutina en el seguimiento de la enfermedad. La obtención de la muestra de sangre será en la vena de su brazo, como normalmente se hace cuando va al laboratorio. Además te realizaremos unas mediciones de tu cuerpo muy sencillas y un ultrasonido de tu hígado el cual no es doloroso.

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tu papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que, si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema.

Esta información será confidencial. Esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas o resultados sin que tú lo autorices, solo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio. (Si se proporcionará información a los padres, favor de mencionarlo en la carta)

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una (x) en el cuadrito de abajo que dice "Sí quiero participar" y escribe tu nombre. Si no quieres participar, déjalo en blanco.

Si quiero participar

Nombre: _____

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento: _____

Fecha: _____

Anexo 5. Carta de Confidencialidad



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CENTRO MÉDICO NACIONAL DE OCCIDENTE

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Guadalajara, Jalisco a 22 de Mayo del 2019

La C. Elizabeth Hernández Chávez, investigador responsable, y la C Carolina Elizabeth Sánchez López, tesista del proyecto titulado “Asociación de los polimorfismos *PNPLA3* RS738409 y *LPIN1* RS13412852 en pacientes pediátricos con hígado graso no alcohólico”, con domicilio ubicado en Av. Belisario Domínguez No. 735, Colonia Independencia. C. P 44340. Guadalajara, Jalisco; a 3 de julio del 2019, me comprometo a resguardar, mantener la confidencialidad y no hacer mal uso de los documentos, expedientes, reportes, estudios, actas, resoluciones, oficios, correspondencia, acuerdos, directivas, directrices, circulares, contratos, convenios, instructivos, notas, memorandos, archivos físicos y/o electrónicos, estadísticas o bien, cualquier otro registro o información que documente el ejercicio de las facultades para la evaluación de los protocolos de investigación, a que tenga acceso en mi carácter investigador responsable, así como a no difundir, distribuir o comercializar con los datos personales contenidos en los sistemas de información, desarrollados en el ejercicio de mis funciones como investigador responsable.

Estando en conocimiento de que en caso de no dar cumplimiento se estará acorde a la sanciones civiles, penales o administrativas que procedan de conformidad con lo dispuesto en la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental, la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares y el Código Penal del Estado de Jalisco, a la Ley Federal de

Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, y demás disposiciones aplicables en la materia.

Acepto

Nombre y Firma

Anexo 6. Extracción de ADN

Se obtendrán 5 mL de sangre periférica en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante. La muestra de sangre se transfiere a un tubo de plástico de 50 mL (Nalgene) y se agregan 20 mL de solución de lisis de eritrocitos 10:1; se mantiene en reposo durante 10 min como mínimo, a 4° C; transcurrido este tiempo se agita y se centrifuga por 20 min/5000 rpm. El sobrenadante se descarta y se repite la lisis de eritrocitos dos veces más, o hasta que el botón de leucocitos se observe blanco. El botón de leucocitos se resuspende en 3 mL de solución de lisis de leucocitos, se agita fuertemente y se añaden 200 µL de SDS 10% y 500 µl de proteinasa K; se incuba a 37° C durante 24 horas. Se agregan 1 ml de solución saturada de NaCl 6 M y se agita vigorosamente durante 15 s; se centrifuga durante 20 min/5000 rpm. El sobrenadante se recupera y se transfiere a un tubo de plástico de 15 ml; el sedimento se descarta. Se adicionan dos volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcla suavemente hasta precipitar el ADN. Una vez que se observa el ADN se transfiere a un tubo de 1.5 ml (Eppendorf) y se lava con 1 ml de etanol absoluto; se centrifuga durante 5 min/5000 rpm, el sobrenadante se descarta y se repite este procedimiento dos veces más utilizando etanol 70%. Se deja secar la muestra de ADN a temperatura ambiente y se disuelve en 200 µL de buffer TE a 37° C.

Cuantificación de ADN por espectrofotometría

La cantidad y calidad del ADN obtenido de la extracción se cuantifica utilizando una celda de cuarzo de 3 mm de espesor se agregan 1000 µL de agua inyectable y 5 µL del ADN genómico total. Se leen las absorbancias a 260 nm y a 280 nm.

La concentración de ADN se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$[ADN] = Abs\ 260\ nm \times FD \times 50\ ng$$

Donde, FD= Factor de dilución:

$$FD = \frac{H_2O + ADN}{ADN}$$

La calidad del ADN, se determinará por la relación ADN-proteínas, la cual se obtiene dividiendo los valores de absorbancia a 260 nm / 280 nm. Se considerará que la pureza de las muestras era aceptable cuando la relación DO 260/280nm es mayor de 1.7.

$$Pureza = \frac{DO\ 260\ nm}{DO\ 280\ nm}$$

Verificación de la integridad del ADN mediante electroforesis en agarosa

Se pesan en la balanza analítica 0.030 g de Agarosa y se funden con 30 mL de Buffer TBE 0.5X (Tris base 0.89 M, EDTA 0.0025 M, ácido bórico 0.89 M), se agregan 30 µL de SyberSafe en la cámara de electroforesis y se vierte la agarosa. Una vez gelificado se añade buffer TBE 0.5X a la cámara hasta cubrir el gel. El gel se carga con 5 µl de ADN genómico mezclado con 1 µl de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%). La electroforesis se corre a 100 Volts durante 40 min aproximadamente; posteriormente se observa el corrimiento de ADN a través de un transiluminador de luz ultravioleta.

Genotipificación por PCR-RFLP

La reacción en cadena de la polimerasa es una alternativa para generar cantidades ilimitadas de secuencias de ADN de interés. Esta metodología involucra una serie de ciclos de temperatura que permiten la desnaturalización del ADN, seguido del alineamiento de los iniciadores a sus secuencias complementarias, y finalmente la extensión de una nueva cadena de ADN sintetizada por la enzima Taq ADN polimerasa termoestable. Es requisito indispensable conocer la secuencia de una parte de la región de ADN que se quiere amplificar para el diseño de los iniciadores que serán utilizados. Los ciclos

repetidos de desnaturalización, hibridación y síntesis enzimática de DNA dan como resultado una amplificación exponencial. Se utilizará el siguiente esquema de reacción:

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 10 μL
Buffer PCR	10X	1X	1.0 μL
MgCl ₂	50 mM	2 Mm	1.0 μL
dNTPs	10 mM	200 μM	0.5 μL
Iniciador F	10 μM	1 μM	1.0 μL
Iniciador R	10 μM	1 μM	1.0 μL
Taq Polimerasa	1 U/ μL		0.1 μL
ADN		100 ng/ μL	1 μL
H ₂ O			4.4 μL

La técnica RFLP (restriction fragment length polymorphism) permite la identificación de secuencias de ADN, las enzimas de restricción reconocen e hidrolizan secuencias de doble cadena específicas de entre cuatro y seis nucleótidos de longitud, generalmente palíndromes. Existe un gran número de enzimas de restricción, son aisladas de bacterias y cada enzima reconoce un sitio en específico llamado sitio de reconocimiento.

Para la genotipificación se utilizarán las enzimas BtsCI para rs738409 y BstUI para rs13412852 empleando el siguiente esquema de reacción:

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 15 μL
Buffer	10X	1X	1.5 μL
Enzima	3 U/ μL		0.5 μL
ADN producto de PCR			5 μL
H ₂ O			9 μL

Los productos de las digestiones se verificarán en electroforesis en agarosa al 2%.

Anexo 7. Cronograma de actividades

Actividad	Octubre – Diciembre 2018	Enero - Marzo 2019	Abril - Junio 2019	Julio – Septiembre 2019	Octubre – Diciembre 2019	Enero – Marzo 2020
Revisión bibliográfica						
Realización del protocolo						
Presentación del protocolo al comité						
Recolección de datos y toma de muestras						
Análisis molecular						
Análisis de resultados						
Redacción del documento de tesis						



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud **1310**.
HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA, CENTRO MEDICO NACIONAL OCCIDENTE LIC. IGNACIO GARCIA
TELLEZ, GUADALAJARA, JALISCO

Registro COFEPRIS 17 CI 14 039 020
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 14 CEI 011 2017082

FECHA **Lunes, 26 de agosto de 2019**

M.C. Elizabeth Hernández Chávez

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS PNPLA3 RS738409 Y LPIN1 RS13412852 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**:

Número de Registro Institucional

R-2019-1310-047

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE


Dr. CARLOS EDUARDO PÉREZ AVILA
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 1310

Imprimir

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL