



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE
ADIPONECTINA, LEPTINA, RECEPTOR 1 DE LEPTINA Y
RECEPTOR 2 DE ADIPONECTINA EN PACIENTES SIN
ESTEATOSIS, CON ESTEATOSIS Y CON ESTEATOHEPATITIS
NO ALCOHÓLICA

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

PAOLA VIRIDIANA LÉON MIMILA

Bajo la Dirección de:

Dr. AARÓN DOMÍNGUEZ LÓPEZ



Pachuca, Hgo., Julio del 2008



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Determinación de la Expresión Génica de Adiponectina, Leptina, Receptor 2 de Adiponectina y Receptor 1 de Leptina en Pacientes sin Esteatosis, con Esteatosis Simple y con Esteatohepatitis No Alcohólica"

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta la Pasante

C. Paola Viridiana León Mimila

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo., 04 de Junio del 2008
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE DEL JURADO	M EN N.H. AMANDA PEÑA IRECTA
SECRETARIO DE JURADO	DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
1er. VOCAL DEL JURADO	QFB. ZURISSADAI BETANZOS PALMEROS
2º VOCAL DEL JURADO	DR. AARÓN DOMÍNGUEZ LÓPEZ
3er. VOCAL DEL JURADO	DR. JOSÉ ANTONIO MORALES GONZÁLES
SUPLENTE	DR. HUGO NÁJERA PEÑA
SUPLENTE	DR. JUAN BERNARDO FLORES REPPER



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del departamento de Gastroenterología del instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo la dirección, supervisión y tutoría del Doctor Aarón Domínguez López y la colaboración y asesoría del M. C. Fausto Sánchez Muñoz.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por haberme permitido llegar hasta este momento de mi vida, por todas las bendiciones y sobre todo por guiarme a lo largo de mi vida.

Gracias a mis papis, Lina y Matías por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones, ni medida, gracias por su ejemplo, sus consejos, su confianza, su complicidad y sobre todo gracias por ser lo mejor que me ha pasado en la vida.

Gracias a ti nena, es genial compartir la vida contigo, creo que al querer ser tu ejemplo siempre termino aprendiendo cosas de ti, eres mi persona favorita y el mejor regalo que me ha dado la vida.

Gracias al doctor Aarón por haberme dado la oportunidad de cumplir una de mis tantas inquietudes, por sus enseñanzas y por haberme permitido conocer un mundo nuevo de posibilidades.

Gracias a Fausto, por soportarme, por sus consejos, enseñanzas y por su apoyo para que el proyecto se llevara a cabo de la mejor manera.

Gracias a Saris, por sus muy atinados consejos, apoyo y por compartir sus conocimientos.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, Ros, Eli, Gaby, Marco, Naye y Sony por haber hecho divertido el día a día, por su apoyo, por las platicas, por su amistad y por compartir la experiencia de la estancia en el laboratorio.

Y finalmente gracias a la persona que me enseñó a ver la vida desde una perspectiva diferente, gracias por estar presente, por impulsarme y enseñarme algo nuevo cada día, pero sobretodo por todos los momentos inolvidables que me ha permitido vivir a su lado, Te quiero niño.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Antecedentes	3
2. Marco teórico	4
2.1. Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)	4
2.1.1. Definición	4
2.1.2. Clasificación	4
2.1.3. Prevalencia	4
2.1.4. Factores de riesgo	5
2.1.4.1. Obesidad	5
2.1.4.2. Diabetes tipo 2 (DT2)	6
2.1.5. Histología	6
2.1.6. Historia natural	9
2.1.7. Fisiopatología	10
2.1.7.1. Primer golpe. Resistencia a la insulina	10
2.1.7.2. Segundo golpe. Estrés oxidativo	11
2.1.8. Diagnóstico	12
2.1.9. Tratamiento	13
2.1.9.1. Tratamiento nutricional	13
2.1.9.2. Tratamiento farmacológico	14
2.2. Adipocitocinas.	14
2.2.1. Adiponectina	14
2.2.1.1. Estructura	15
2.2.1.2. Síntesis	16
2.2.1.3. Gen de adiponectina (ACRP 30)	17
2.2.1.4. Niveles de adiponectina	18
2.2.1.5. Receptores de adiponectina	19
2.2.1.6. Mecanismos de acción	21
2.2.1.7. Adiponectina y enfermedades hepáticas	21

2.2.2. Leptina	22
2.2.2.1. Estructura	23
2.2.2.2. Gen de leptina (LEP/OB)	23
2.2.2.3. Niveles de leptina	24
2.2.2.4. Efectos fisiológicos	24
2.2.2.5. Leptina y metabolismo de lípidos y glúcidos	26
2.2.2.6. Leptina y enfermedades hepáticas	27
2.2.2.7. Receptor de leptina	28
3. Problema de investigación	30
4. Justificación	31
5. Objetivos	32
5.1. Objetivo general	32
5.2. Objetivos específicos	32
6. Hipótesis	33
7. Materiales y métodos	34
7.1. Sujetos de estudio	35
7.2. Reactivos	37
7.3. Materiales	39
7.4. Equipo	40
7.5. Métodos	40
8. Resultados	47
9. Discusión	57
10. Conclusiones	62
11. Bibliografía	63
12. Anexos	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes de la EHNA	3
Tabla 2. Principales características histológicas de la EHNA	6
Tabla 3. Grados y etapas de las lesiones histológicas en la EHNA	8
Tabla 4. Valores anormales de las pruebas diagnósticas para la EHNA	12
Tabla 5. Escala de METAVIR para la evaluación histológica de biopsias hepáticas	36
Tabla 6. Características demográficas, antropométricas y serológicas de los pacientes incluidos en el estudio	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de esteatosis perilobulillar	7
Figura 2. Historia natural de la EHNA	9
Figura 3. Fisiopatología de la EHNA	11
Figura 4. Estructura de la adiponectina	16
Figura 5. Estructura del gen que codifica para la adiponectina	17
Figura 6. Modelo de la estructura de la adiponectina	18
Figura 7. Estructura del receptor 2 de adiponectina	20
Figura 8. Estructura del gen del receptor 2 de adiponectina	21
Figura 9. Estructura del gen de leptina	23
Figura 10. Mecanismo de acción de leptina	26
Figura 11. Estructura del gen que codifica para el receptor de leptina	29
Figura 12. Diagrama metodológico	34
Figura 13. Fotografía de las bandas de ARN de biopsias de tejido hepático	47
Figura 14. Curvas de amplificación (Adiponectina)	49
Figura 15. Curvas de amplificación (Leptina)	50
Figura 16. Curvas de amplificación (B-actina)	51
Figura 17. Gráfica de expresión relativa del ARNm de LEPR/B-actina en relación con el índice de masa corporal (IMC)	54

Figura 18. Gráfica de expresión relativa del ARNm de LEPR/B-actina en relación al IMC por grupos	55
Figura 19. Gráfica de la expresión relativa del ARNm de LEPR/B-actina en relación con el grado de fibrosis hepática	56

RESUMEN

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) ha sido asociada con obesidad abdominal, hipertensión y diabetes. La resistencia a la insulina se considera mecanismo clave en la patogénesis de la EHNA. Numerosas sustancias están relacionadas con la presencia de resistencia a la insulina, entre ellas la leptina y adiponectina. La leptina es una hormona capaz de controlar la ingesta de alimentos y la expansión de la energía, sus niveles correlacionan con el Índice de masa corporal (IMC). La adiponectina es una proteína con efectos antiinflamatorios, sus niveles correlacionan negativamente con el IMC y resistencia a la insulina. Se determinó la expresión génica del ARNm de Leptina, Adiponectina, Receptor 1 de Leptina (LepR) y Receptor 2 de Adiponectina (AdipoR2) en sujetos con y sin esteatosis y con EHNA. Se obtuvieron 32 biopsias, divididas en 3 grupos: sin esteatosis (n=7), esteatosis (n=15) y EHNA (n=10). Se determinó la expresión del ARNm de Leptina, Adiponectina, LepR y AdipoR2 por transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real usando como gen de referencia B-actina. En sangre, se determinaron los niveles de leptina, adiponectina, insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol así como también se determinó el IMC y el índice de homeostasis (HOMA). La expresión del ARNm de leptina fue detectada en 1 muestra y de adiponectina en 4 del total de biopsias. Se encontró una correlación inversa entre la expresión de ARNm de LepR y el IMC ($p=0.013$, coef. 0.465); Los niveles de expresión del ARNm de LepR fueron más altos en el grupo de fibrosis grado 2 (n=12) en relación al grupo de fibrosis grado 0 (n=9) (0.7 ± 0.39 vs 0.38 ± 0.25 , $p=0.034$). Los niveles de aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), glucosa, insulina e índice HOMA fueron más altos en los grupos de EHNA en comparación con los otros grupos ($p=0.001$, 0.006, 0.019, 0.024, 0.032). En nuestra población la leptina y adiponectina no juegan un papel en la patogénesis y progresión de la esteatosis a EHNA. El IMC y su influencia sobre la expresión del receptor de leptina pueden tener un papel importante en la patogénesis de la fibrosis hepática en pacientes con EHNA. Los valores de AST, ALT, glucosa, insulina y el índice HOMA pueden servir como predictores de la progresión a esteatosis y EHNA.

Palabras claves: esteatohepatitis no alcohólica, esteatosis, obesidad, adiponectina, leptina.

ABSTRACT

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) has been associated with abdominal obesity, hypertension and diabetes. Insulin resistance has been implicated as a key mechanism in the pathogenesis of NASH. Numerous substances are related to insulin resistance, including leptin and adiponectin. Leptin is a hormone capable of controlling food intake and energy expansion, levels correlated with Body Mass Index (BMI). Adiponectin is a protein with anti-inflammatory effects, levels negatively correlated with BMI and insulin resistance. The gene expression of the mRNA leptin, adiponectin, Leptin Receptor 1 (lepR) and Adiponectin Receptor 2 (AdipoR2) in subjects with and without steatosis and NASH were determined. 32 biopsies were obtained, and divided into 3 groups: no steatosis (n=7), steatosis (n=15) and NASH (n=10). mRNA expression of leptin, adiponectin, lepR and adipoR2 were determined by reverse transcription (RT) and real-time polymerase chain reaction (PCR) using as a reference gene β -actin. In blood levels of leptin, adiponectin, insulin, glucose, triglycerides, cholesterol, and were determined BMI and homeostasis Index (HOMA). mRNA expression of leptin was detected in 1 sample and adiponectin in 4 of the total number of biopsies. There was an inverse correlation between the mRNA expression of lepR and BMI ($p = 0,013$, coef. 0,465); levels of mRNA expression of lepR were highest in the fibrosis group grade 2 (n=12) compared with fibrosis group grade 0 (n=9) ($0.7 \pm .39$ vs. 0.38 ± 0.25 , $p = 0.034$). Levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose, insulin and HOMA index were higher in the NASH group compared with others groups ($p = 0,001$, $0,006$, $0,019$, $0,024$, $0,032$). In our population leptin and adiponectin did not play a role in the pathogenesis and progression of steatosis to NASH. The BMI and its influence on the leptin receptor expression may play an important role in the pathogenesis of hepatic fibrosis in patients with NASH. The values of AST, ALT, glucose, insulin and HOMA index may serve as predictors of progression to steatosis and NASH.

Keywords: non-alcoholic steatohepatitis, steatosis, obesity, adiponectin, leptin.

1. ANTECEDENTES DE LA EHNA.

En 1980, Ludwig y col. acuñaron el término esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) para describir un patrón morfológico de daño hepático en 20 pacientes evaluados en la Clínica Mayo sobre un periodo de 10 años. Los pacientes presentaban evidencia histopatológica de hepatitis alcohólica en biopsia hepática en ausencia de una historia de abuso de alcohol, presentándose predominantemente en personas con obesidad, del género femenino, con Diabetes Tipo 2 (DT2) (Reid, 2001). Sin embargo, los primeros reportes formales de esta enfermedad datan de hace más de 30 años (Tabla 1) (Álvarez-Martínez y Pérez-Campos, 2002).

Tabla 1. Antecedentes de la EHNA.

Años	Avances en la EHNA
1950	Observación de cirrosis en diabéticos
1970	Daño hepático similar al originado por alcohol en derivación yeyuno-ileal.
1979 / 80	Acuñan el termino EHNA (8 artículos / año) Pequeñas series en pacientes EHNA como entidad benigna
1994	Espectro ampliado de la EHNA
1996	Inducción del citocromo P 2E1 (CYP2E1) en modelos animales Endotoxinas inducen inflamación en hígados con esteatosis.
1998	Inducción de CYP2E1 en humanos. Primer conferencia sobre EHNA Resistencia a la insulina como piedra angular
1998	Diversos modelos animales Primeros ensayos clínicos
2002	60 artículos al año Primeras conferencias en foros internacionales EHNA como parte del síndrome metabólico
2005	Efecto protector de la adiponectina

Tomado de: Chávez, T.N.C. y col., 2007.

2. MARCO TEORICO

2.1. Esteatohepatitis no alcohólica

2.1.1. Definición

La esteatohepatitis no alcohólica es una enfermedad hepática metabólica crónica, en la cual, la acumulación de grasa (esteatosis) está asociada con inflamación lobular, daño al hepatocito y/o fibrosis hepática, puede evolucionar a cirrosis, insuficiencia hepática e incluso a hepatocarcinoma, y se presenta en pacientes que no tienen una historia de consumo de alcohol (Farell y col., 2005; Méndez-Sánchez y col., 2004). Esta enfermedad ha recibido distintas denominaciones incluyendo hepatitis grasa, enfermedad de Laënnec no alcohólica, hepatitis diabética, hepatopatía parecida a la alcohólica, y finalmente EHNA (Méndez-Sánchez y col., 2004a).

2.1.2. Clasificación

Primaria: Es la forma más común de la enfermedad. Es la derivada de alteraciones metabólicas como la obesidad o DT2 (Farell y col., 2005).

Secundarias: Aparece en personas con derivación yeyuno-ileal, nutrición parenteral, desnutrición, bulimia o enfermedad de Wilson; incluso se ha asociado con el virus de la hepatitis C así como con la ingestión prolongada de algunos fármacos (Reid, 2001; Farell y col., 2005).

2.1.3. Prevalencia

La enfermedad de hígado graso no alcohólico es un problema común y ha sido hoy en día reportado en todos los continentes, excepto en la Antártida. La verdadera prevalencia de EHNA no ha sido bien establecida (Mc Cullough, 2002). Sin embargo, estudios en la población general, detectados con ultrasonido o tomografía computarizada sugieren una prevalencia de entre el 2.8 y el 25% de la población general (Méndez-Sánchez y col., 2004b).

La EHNA es diagnosticada histológicamente en el 7-11% de los pacientes que son sometidos a biopsia hepática en Estados Unidos y Canadá, pero es encontrada solo en el 1.2% de pacientes sometidos a biopsia hepática en Japón (Reid, 2001).

En cuanto a la prevalencia en la población mexicana, en un estudio retrospectivo de 2,963 biopsias de hígado procesadas durante 10 años en el instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) y publicado en 1994, De la Mora reportó 16 casos de EHNA, por lo que concluyó que la enfermedad era infrecuente en su institución, reportando sólo 0.53% de prevalencia de la enfermedad (De la Mora y col., 1994). Sin embargo, en un estudio realizado en derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en el estado de Hidalgo, se encontró prevalencia de EHNA de 18.5% en diabéticos y de 7.1% en no diabéticos, con prevalencia global de la muestra de 10.3% (Bernal-Reyes y col., 2000).

2.1.4. Factores de riesgo

Existen factores de riesgo que se encuentran relacionados con el desarrollo de EHNA, los mas importantes so: la obesidad, DT2 y las hiperlipidemias (Muñoz-Espinosa y col., 2002).

2.1.4.1. Obesidad

A pesar de que la obesidad se encuentra fuertemente asociada a la EHNA no se observa en el 100% de los casos. En diversas cohortes de pacientes obesos la prevalencia de EHNA varía de un 39 a 95%. Los hábitos alimentarios son un factor importante en el desarrollo de la enfermedad, de ellos, los que se asocian con más frecuencia en pacientes con EHNA es el porcentaje de energía total y el porcentaje de grasa ingerida total, este último es seis veces más alto en pacientes con EHNA. De igual manera tienen un consumo más alto de colesterol al día y un consumo menor de grasa poliinsaturada y fibra (Méndez-Sánchez y col., 2004b).

La obesidad y el consumo de alcohol están asociados con el mismo espectro a las enfermedades hepáticas; las alteraciones patológicas y su historia natural similares

sugieren que pueden estar involucrados mecanismos patogénicos comunes (Álvarez-Martínez y Pérez-Campos, 2002). Las alteraciones del metabolismo de los lípidos que predisponen al acúmulo de ácidos grasos en el hígado, consisten en un incremento en la captación hepática de ácidos grasos secundario a un aumento en su movilización desde los adipocitos periféricos, como resultado de la resistencia a la insulina (Chitturi y Farrel, 2001).

2.1.4.2. Diabetes tipo 2

La EHNA ocurre con mayor frecuencia en pacientes con diabetes, principalmente aquellos con DT2 considerándose un factor independiente de riesgo de muerte por enfermedad hepática y como predictor independiente de fibrosis hepática. Puesto que también se ha descrito en obesos un mecanismo patogénico común entre esta entidad y la DT2, puede ser que la resistencia a la insulina sea lo que favorece una acumulación excesiva de ácidos grasos libres a nivel hepático y que sea lo que predispone a un estrés oxidativo intrahepático por estimulación de la lipoperoxidación, además del efecto estimulante de la beta oxidación mitocondrial (Álvarez-Martínez y Pérez-Campos, 2002).

2.1.5. Histología

La EHNA es indistinguible histológicamente de la hepatitis alcohólica. La mayoría de las características histológicas de EHNA están agrupadas en la Tabla 2. La excesiva heterogeneidad histológica para establecer el diagnóstico de EHNA se debe a las significantes discrepancias clínicas y patológicas (Mc Cullough, 2002).

Tabla 2. Principales características histológicas de la EHNA.

Esteatosis macrovesicular	Fibrosis perisinusoidal o periportal.
Inflamación del parénquima.	Cuerpos de Mallory.
Necrosis hepática.	Núcleo glucogenado.
Balonamiento y degeneración hepática.	Lipogranulomas.
	Manchas hepáticas.

Tomado de: Reid, E.A. y col., 2001.

Los cambios en la grasa característicos de la EHNA pueden afectar los lóbulos hepáticos de forma difusa o primaria en las zonas centrales causando acumulo de lípidos en los hepatocitos que desplazan al núcleo a la periferia, además se produce necrosis e infiltrado inflamatorio (cuerpos hialinos de Mallory) (Figura 1).

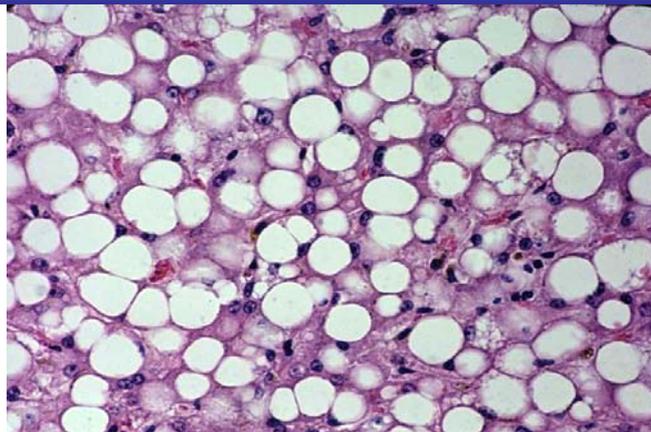


Figura 1. Esteatosis con distribución perilobulillar. Técnica de: Van Gieson 400x. Tomado de: Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari" de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

El grado de esteatosis se correlaciona con el Índice de Masa Corporal (IMC), y es generalmente más severo en EHNA que en hepatitis alcohólica (Tabla 3). La inflamación lobular de grados diversos se encuentra presente en todos los casos y puede consistir en linfocitos, células mononucleares y neutrófilos. El balonamiento de los hepatocitos y/o necrosis hepática de diversos grados está presente frecuentemente y es requisito para el establecer el diagnóstico de EHNA (Mc Cullough, 2002; Pichardo-Baena y col., 2004).

Los cuerpos de Mallory, pueden ser pequeños, dispersos y han sido descritos en 10% de los casos de EHNA, estos pueden ser prominentes en EHNA severa. La fibrosis pericelular, perisinusoidal y periportal ha sido descrita en 37-84% de pacientes con EHNA. La fibrosis muestra más prevalencia en la zona 3, y es más prevalente en niños que en adultos. La cirrosis es encontrada en una biopsia inicial en 7-16% de los pacientes con EHNA (Mc Cullough, 2002).

Tabla 3. Grados y etapas de las lesiones histológicas en la EHNA.

<p>Grados de esteatosis</p>	<p><i>Grado 1: <33% de hepatocitos afectados.</i></p> <p><i>Grado 2: 33% a 66% de hepatocitos afectados.</i></p> <p><i>Grado 3: >66% de hepatocitos afectados.</i></p>
<p>Grados para la esteatohepatitis.</p>	<p>Grado 1, Ligera.</p> <p><u>Esteatosis:</u> Predominantemente macrovesicular, involucra 66% de los lóbulos.</p> <p><u>Balonamiento:</u> ocasionalmente observado; zona 3 del lobulillo hepático.</p> <p><u>Inflamación lobular:</u> dispersa e inflamación aguda ligera.</p> <p><u>Inflamación portal:</u> nada o ligera.</p> <p>Grado 2, Moderada.</p> <p><u>Esteatosis:</u> cualquier grado, mezcla de grasa micro y macrovesicular.</p> <p><u>Balonamiento:</u> presente en la zona 3 de hepatocitos.</p> <p><u>Inflamación lobular:</u> células polimorfonucleares pueden asociarse a hepatocitos en balón, fibrosis pericelular, puede llegar a verse inflamación crónica ligera.</p> <p><u>Inflamación portal:</u> ligera a moderada.</p> <p>Grado 3, severa.</p> <p><u>Esteatosis:</u> típicamente involucra > al 66% de los hepatocitos.</p> <p><u>Balonamiento:</u> presente en la zona 3 de forma marcada.</p> <p><u>Inflamación lobular:</u> inflamación crónica y aguda dispersa, células polimorfonucleares concentradas en la zona 3 y fibrosis perisinosoidal.</p> <p><u>Inflamación portal:</u> ligera a moderada.</p>
<p>Etapas para fibrosis</p>	<p>Etapa 1: zona 3 perivenular, perisinosoidal o fibrosis pericelular, focal o extensiva.</p> <p>Etapa 2: igual que etapa 2, con fibrosis periportal, focal o extensiva.</p> <p>Etapa 3: puentes de fibrosis, focal o extensiva.</p> <p>Etapa 4: cirrosis.</p>

Tomado de: Martínez-López y col., 2005.

2.1.6. Historia natural

A pesar que la EHNA es no progresiva y por lo general tiene un pronóstico benigno, se han descrito modelos epidemiológicos donde aproximadamente 70 a 90% de los pacientes con obesidad tienen esteatosis hepática, 10 a 20% presentan esteatohepatitis y 3 a 5% desarrollan cirrosis (Farell y Larter, 2006; Chávez-Tapia y Uribe, 2007).

La EHNA es una entidad que en estadios de esteatosis sin inflamación o fibrosis parece tener una evolución favorable, pero al haber fibrosis establecida un porcentaje significativo puede progresar a cirrosis (Figura 2). Una vez ocurrida la cirrosis hepática los pacientes tienen todas las complicaciones y mortalidad de los pacientes con cirrosis por otras etiologías, incluyendo carcinoma hepatocelular. El curso clínico suele ser silente y llevar a la detección tardía de dicha neoplasia (Farell y Larter, 2006; Liou y Kowdley, 2006).

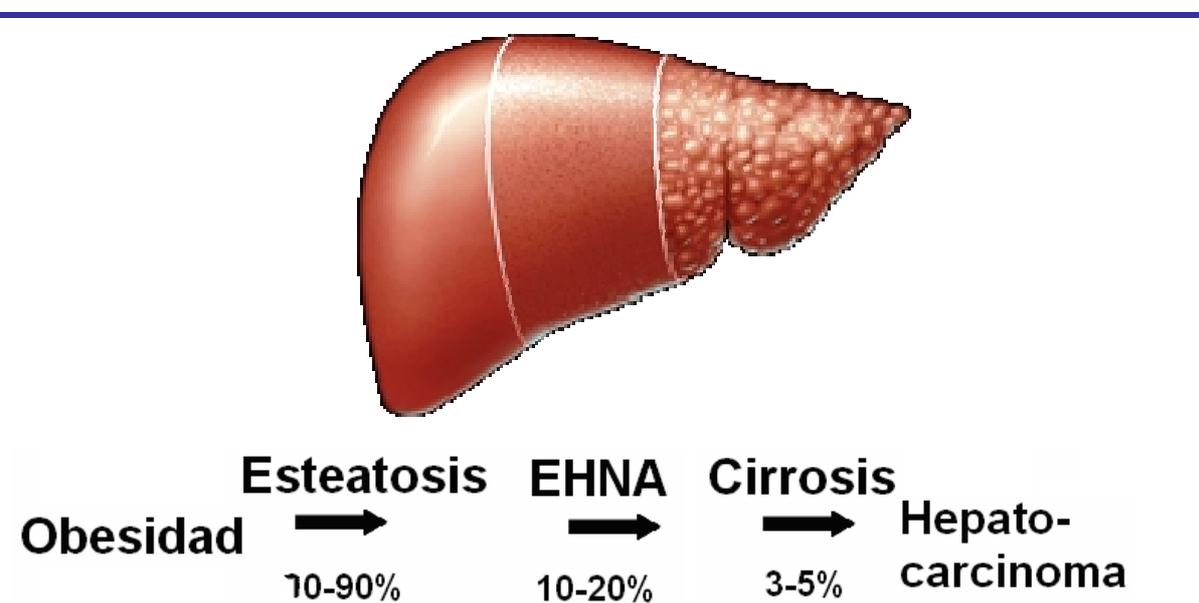


Figura 2. Historia natural de la EHNA. El curso maligno de la enfermedad comienza con esteatosis hasta su progresión a cirrosis pasando por estadios de fibrosis hepática.

Modificado de: Méndez-Sánchez y col., 2007.

2.1.7. Fisiopatología

La infiltración grasa del hígado surge como respuesta a una gran variedad de estímulos nocivos que incluyen hipoxia, toxinas, inflamación sistémica, neoplasias malignas, ayuno, deficiencias nutricionales, y diversas alteraciones metabólicas (Méndez-Sánchez y col., 2004). El modelo actual para describir la patogénesis de la EHNA es llamado también la hipótesis de los dos golpes, el cual fue propuesto por primera vez por Day y James. (Kowdley, V.K., y col. 2006; Day, C.P. y James, O.F. 1998)

2.1.7.1. Primer golpe. Resistencia a la insulina

El mecanismo de la resistencia a la insulina es desconocido, aunque se conocen posibles intermediarios tales como el aumento de la concentración de ácidos grasos que inhibe la captación periférica de glucosa, y la inducción del péptido inhibidor Kappa Cinasa Beta (IKKB). Este péptido activa al factor nuclear Kappa Beta (NF- κ B), el cual, a su vez promueve la transcripción de una variedad de citocinas, entre las cuales, la más importante es el factor de necrosis tumoral alpha (TNF α). Estas citocinas además de jugar un papel fundamental en el componente inflamatorio de EHNA, inhiben la fosforilación y la activación del receptor para insulina IRS-1, además de inhibir la expresión del transportador para glucosa GLUT4. A su vez, el TNF α activa al IKKB, creándose un círculo vicioso (Figura 3) (Méndez-Sánchez y col., 2004b).

Al existir entonces resistencia a la insulina hay por un lado una mayor cantidad de ácidos grasos libres circulantes y dentro del hepatocito. La hiperinsulinemia es resultado del proceso que va a estimular la glucólisis, aumentando la Acetil CoA y contribuyendo aún más a la cantidad de ácidos grasos libres disponibles intracelularmente. Existe entonces una mayor concentración de ácidos grasos intracelulares, inevitablemente se estimula la síntesis de triglicéridos dentro del hepatocito. Existe además una disminución en la síntesis de apolipoproteína B 100, que facilita la exportación de los triglicéridos como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Como resultado de todo este proceso, se genera un acúmulo de vacuolas de

triglicéridos dentro del hepatocito produciéndose la esteatosis macrovesicular. A toda esta secuencia de eventos cuya resultante es la esteatosis hepática, se le suele denominar el primer golpe, ya que es la primera condición que tiene que darse para que se produzca el segundo golpe, que determinará la producción de especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y génesis del proceso inflamatorio de EHNA (fig. 3) (Méndez-Sánchez y col., 2004b).

2.1.7.2. Segundo golpe. Estrés oxidativo

El aumento intracelular de ácidos grasos es en si mismo un factor que induce la actividad del citócromo P-450 2E-1 y P450 4^a, que generan especies reactivas de oxígeno con potencial citotóxico. Dos de los productos de esta oxidación por rutas alternas son el 4-hidroxinonenal y el malonaldehído, productos altamente tóxicos a nivel intracelular actúan junto con la interleucina 8 como quimioatrayentes para polimorfonucleares, así mismo, estimulan al factor de crecimiento Beta que a su vez es un potente inductor de la transformación fenotípica de células esteladas, las cuales pasan de un estado pasivo almacenador de vitamina A, a un estado miofibroblástico capaz de producir colágeno y por tanto fibrosis. Estos compuestos producen daño al citoesqueleto del hepatocito perdiendo su forma cuboidal y produciendo un balonamiento y agregados intracelulares que constituyen los cuerpos hialinos de Mallory (Tagle, 2003).

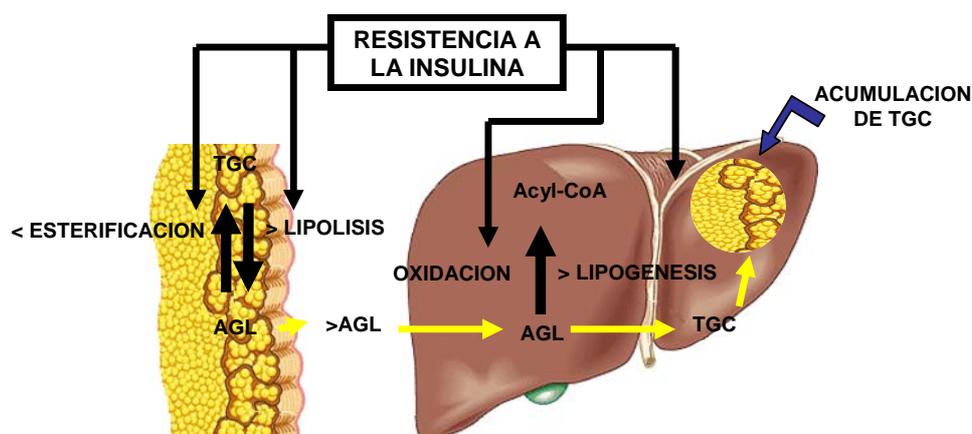


Figura 3. Fisiopatología de la EHNA. Modificado de: Adams y col., 2005

2.1.8. Diagnóstico

Los estudios requeridos para establecer el diagnóstico de EHNA y diferenciarla de otras patologías son los siguientes:

Pruebas de enzimas del hígado (aminotransferasas): Determinación de AST (aspartato aminotransferasa) y ALT (alanino aminotransferasas) en suero (Méndez-Sánchez y col., 2004a).

Mediciones antropométricas: peso, talla (usadas para calcular el IMC), circunferencia de cintura y cadera (Méndez-Sánchez y col., 2004a).

Estudios de imagen: radiografía, ultrasonidos, tomografía axial computarizada (TAC), resonancia magnética nuclear (Méndez-Sánchez y col., 2004a).

Biopsia de hígado: es la única forma de confirmar el diagnóstico EHNA y distinguirla de otras patologías hepáticas (Méndez-Sánchez y col., 2004a).

Tabla 4. Valores anormales de las pruebas diagnósticas para EHNA.

<i>Prueba diagnóstica</i>	<i>Valor anormal</i>
Aminotrasferasas	Elevación de 2 a 4 veces de las ALT y AST. Relación AST/ALT <1.
Mediciones antropométricas	IMC > 25 kg/m ² .
Estudios de imagen	Ultrasonografía: incremento de la ecogenicidad. Tomografía: aumento de la radiolucencia comparado con el riñón.
Biopsia hepática	Degeneración grasa macrovesicular de moderada a severa con inflamación, la cual puede ser lobular o portal, con o sin cuerpos hialinos de Mallory, fibrosis y/o cirrosis.
Otras	Consumo de alcohol mayor a 30 g/semana en mujeres y mayor a 40 g/semana en hombres. Presentar anticuerpos positivos contra el virus de la hepatitis B y hepatitis C.

Contenido tomado de: Martínez-López y col., 2001.

2.1.9. Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad está enfocado principalmente a modificar o eliminar los factores comúnmente asociados con la enfermedad, dentro de estos se incluyen la disminución de peso, el control glucémico adecuado, el tratamiento de las dislipidemias y la interrupción del consumo de fármacos potencialmente hepatotóxicos (Tagle, 2003).

2.1.9.1. Tratamiento nutricional

Reducción de peso

Las guías para la pérdida de peso generadas por el panel de expertos del National Heart, Lung and Blood Institute y el National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, recomiendan una pérdida gradual de peso del 10% (0.5 a 1 kg / semana) con respecto del peso basal en 6 meses para conseguir modificaciones en las variables bioquímicas, mejoramiento de la sensibilidad a la insulina y cambios histopatológicos en los pacientes con EHNA; lo cual, se logra por medio de las modificaciones en la dieta, actividad física, terapia de comportamiento, farmacoterapia y cirugía; la recomendación de una modalidad de tratamiento debe ser individualizada, considerando el IMC y la presencia de factores de riesgo así como enfermedades concomitantes (Angulo, 2004).

Suplementos nutricionales

Vitamina E es un potente antioxidante que disminuye el daño hepático reduciendo las endotoxinas estimuladas por lipopolisacáridos, inhibiendo la activación de NFκB y la producción de TNF y bloqueando la activación de las células hepáticas esteladas (Cave y col., 2007).

S-Adenosilmetionina disminuye la peroxidación lipídica, así como también la evidencia histológica de daño hepático manteniendo la permeabilidad mitocondrial. Reduce la inflamación debido a que inhibe citocinas proinflamatorias como TNF y aumentar citocinas antiinflamatorias como IL-10 después de la estimulación con lipopolisacáridos (Cave y col., 2007).

Betaina protege a las células del estrés y del daño hepático reduciendo la cantidad y concentración de grasa en el hígado ya que facilita la conversión de homocisteína a metionina (Cave y col., 2007).

Zinc protege contra daño hepático inducido por toxinas iniciando la inhibición de la producción de TNF y reduciendo el estrés oxidativo (Cave y col., 2007).

2.1.9.2. Tratamiento farmacológico

El uso de agentes sensibilizadores a la acción de la insulina es una de las estrategias que fisiopatológicamente parece ser más eficaz. El uso de tiazolodinedionas en estudios piloto de un año de duración muestran resultados positivos con una adecuada tolerancia al tratamiento (Angulo., 2004).

El uso de rosiglitazona ha mostrado disminución de los niveles de enzimas hepáticas, que va de forma paralela a la disminución de la resistencia a la insulina. Otro de los sensibilizadores a la insulina es la metformina, la cual en modelos animales ha ocasionado disminución de la hepatomegalía y el grado de esteatosis, así como normalización de los niveles de aminotransferasas (Angulo., 2004).

2.2. Adipocitocinas

El tejido adiposo funciona como un órgano endocrino capaz de participar en la regulación del metabolismo mediante la secreción por los adipocitos de moléculas conocidas como citocinas o adipocitocinas; entre las que destacan la leptina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI 1), la resistina y la adiponectina (Lozano, 2002; Tsochatzis y col., 2006).

2.2.1. Adiponectina

La adiponectina es una proteína, miembro de las adipocitocinas, de 30 kDa, que se sintetiza exclusivamente en el tejido adiposo blanco y es producida durante la diferenciación del adiposito (Sitio del laboratorio de nutrición., 2007). La adiponectina

fue identificada inicialmente a mediados de 1990 por cuatro grupos independientes (Kadowaki y Yamauchi., 2005).

- Scherer, y col. y Hu, y col. 1995. clonaron la adiponectina, llamada Acrp 30 o Adipo Q, respectivamente a través de la clonación de genes expresados durante la diferenciación del adiposito (Hironori y Tontonoz., 2007).
- Maeda, y col. 1996. clonaron adiponectina, llamada apM1 como uno de los genes más abundantemente expresados por los adipocitos (Hironori y Tontonoz., 2007).
- Nakano, y col. 1996. purificaron adiponectina a partir de plasma humano como una proteína ligada a la gelatina, GBP28 (Hironori y Tontonoz., 2007).

2.2.1.1. Estructura

En base a su estructura la adiponectina pertenece a la familia de proteínas de complemento 1q, que consisten de un dominio globular carboxilo terminal y un dominio colágeno amino terminal (Hironori y Tontonoz., 2007; Meier y col., 2004). La adiponectina es una proteína de 247 aminoácidos, con una masa molecular de 30 kDa y 4 dominios: una secuencia amino terminal seguida de un dominio variable de 28 aminoácidos, un dominio colágeno formado por 22 tripletas de glicina por tirosina y finalmente un dominio globular carboxilo terminal (Figura 4). Esta estructura primaria es similar al factor de complemento globular C1q. Sin embargo, su estructura cristalográfica se asemeja al factor de necrosis tumoral - α (TNF- α) (Meier y col., 2004; Sitio de laboratorio de nutrición., 2007).

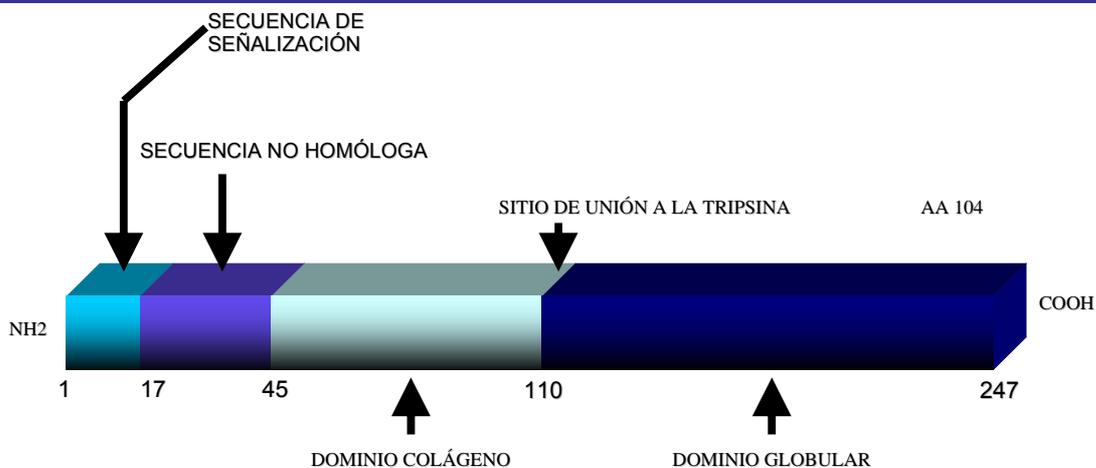


Figura 4. Estructura de la adiponectina: proteína formada por una secuencia amino terminal, seguida de un dominio variable de 28 aminoácidos, un dominio colágeno formado por 22 tripletas de glicina por tirosina y un dominio globular carboxilo termina. Modificado de: Meier y col., 2004.

2.2.1.2. Síntesis

La adiponectina es inducida durante la diferenciación del adipocito, y su secreción se encuentra estimulada por la insulina (Yamauchi y col., 2003). La síntesis y secreción de adiponectina se encuentra regulada por diversos mecanismos. Los adipocitos secretan hormonas sensibilizadoras de la insulina como: adiponectina, leptina, y otras hormonas como péptidos. La hipertrofia de adipocitos, inducida por una dieta alta en grasas, causa disminución en la producción y secreción de hormonas sensibilizadoras de insulina e incremento en hormonas promotoras de resistencia a la insulina, iniciando la resistencia a la insulina en obesidad. La reducción en la actividad de PPAR-g, miembro de la familia de receptores nucleares, confiere protección contra la obesidad y diabetes tipo 2 inducida por una dieta alta en grasas. La adiponectina disminuye la síntesis de lípidos y la producción de glucosa en el hígado y causa disminución en las concentraciones de glucosa y ácidos grasos en la sangre. Además, la producción de triglicéridos se encuentra disminuida y la oxidación de ácidos grasos y disipación de energía en el músculo se encuentran incrementados (Meier y Gressner, 2004).

La insulina incrementa la síntesis de adiponectina en tejido adiposo blanco. La síntesis y secreción de adiponectina se encuentra disminuida en presencia de exceso calórico, presumiblemente asociado con deficiencia o resistencia a la leptina. La proteína puede también incrementar la sensibilidad de los hepatocitos a la insulina, ya sea a través de acción directa o indirectamente disminuyendo las concentraciones de lípidos circulantes vía acción en músculo. Por tanto, la administración de adiponectina puede mejorar la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa y puede corregir la hiperglicemia asociada con obesidad (Saltiel, 2001).

2.2.1.3. Gen de adiponectina (ACRP 30)

El gen que codifica para adiponectina se encuentra en el cromosoma 3 en la posición 3q27; esta formado por 3 exones y 2 intrones (Figura 5) y esta regulado principalmente por PPAR γ , CEBP y ADD1, factores de transcripción claves en la adipogénesis (Sitio de laboratorio de nutrición., 2007).

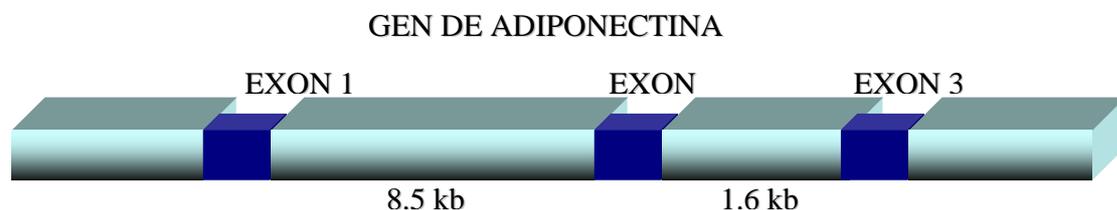


Figura 5. Estructura del gen que codifica para la adiponectina; conformado por 3 exones separados por dos intrones de 8.5 y 1.6 kb respectivamente.

Tomado de: Musir, M.M. Universidad de Barcelona, 2004

La proteína circula en el plasma como estructura trimérica, hexamérica y polimérica. La adiponectina monomérica no se encuentra en la circulación sanguínea y parece confinada al adipocito. Circula en el plasma en concentraciones entre 5 a 30 μ g/ml. En ausencia del dominio colágeno, la adiponectina trimeriza, pero no forma grandes estructuras. (Figura 6) (Kadowaky y Yamauchi, 2005).

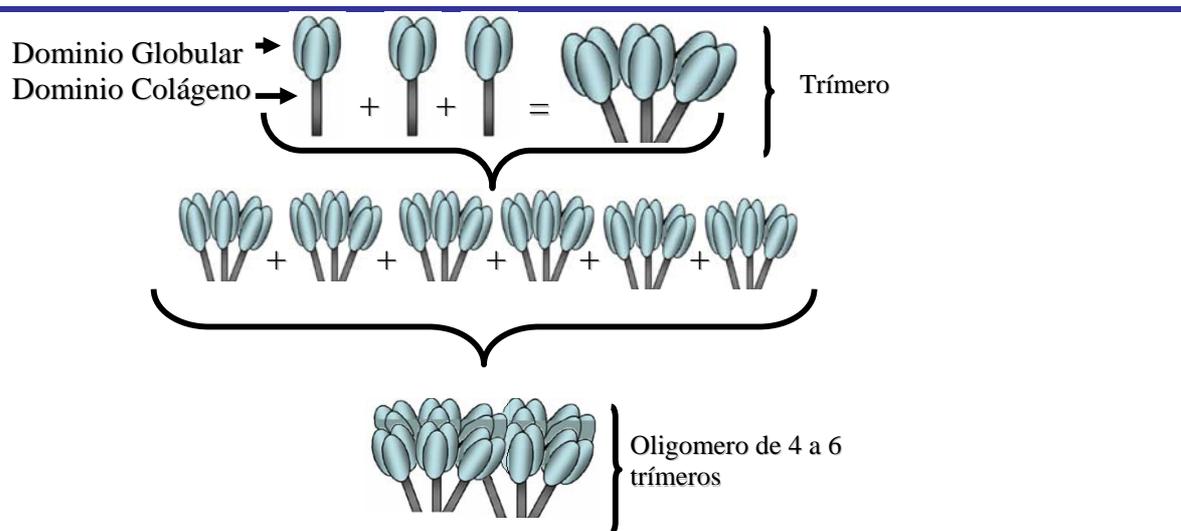


Figura 6. Modelo de la estructura de la adiponectina, tres monómeros forman un trímero unidos por sus dominios globulares, cuatro a seis trímeros unidos por sus dominios colágenos forman la gran molécula que circula en el plasma.

Tomado de: Revisión de adiponectina, Sitio de laboratorio de nutrición, 2003.

Los fragmentos de adiponectina globular son generados por ruptura proteolítica por la enzima leucocito elastasa secretada por monocitos activados y/o neutrófilos (Waki y col., 2005). La formación de oligómeros de adiponectina depende de la formación de uniones disulfuro mediada por la cisteína-39 (Pajvani y col., 2003). Así mismo, la hidroxilación y glucosilación de las cuatro lisinas en el dominio colágeno de adiponectina han demostrado mejorar la biodisponibilidad de concentraciones inferiores a las concentraciones fisiológicas de insulina para inhibir la gluconeogénesis en hepatocitos (Wang y col., 2002).

2.2.1.4. Niveles de adiponectina

Su concentración en suero es del orden de 5 a 10 mg/mL. (10 a 30 nM). La expresión del ARNm y los niveles plasmáticos de la proteína están significativamente reducidos tanto en ratones como en seres humanos obesos y diabéticos (Sitio de laboratorio de nutrición., 2007).

Existe una fuerte correlación negativa entre los niveles de adiponectina en el plasma y el IMC. Así mismo, una dieta alta en grasa induce hipoadectinemia, mientras que la

reducción de peso en personas obesas produce incremento en los niveles de adiponectina (Sitio de laboratorio de nutrición., 2007).

Aunque, la adiponectina es secretada solamente en el tejido adiposo, sus niveles circulantes son más bajos en sujetos obesos que en no obesos. Esto contrasta con la mayoría de las adipocitocinas cuyos niveles están aumentados en la obesidad en proporción directa con el aumento de masa corporal (Sitio de laboratorio de nutrición., 2007).

También, se han encontrado niveles bajos de adiponectina en pacientes hipertensos y en sujetos diabéticos y particularmente bajos en individuos con cardiopatía coronaria. La incidencia de muerte por enfermedad cardiovascular es mayor en pacientes con falla renal y con niveles bajos de adiponectina (Sitio de laboratorio de nutrición., 2007).

Los niveles plasmáticos son menores en hombres que en mujeres. La hipoadectinemia que se presenta en las dislipidemias puede acelerar los cambios ateroscleróticos observados en el síndrome metabólico (Sitio de laboratorio de nutrición., 2007).

2.2.1.5. Receptores de adiponectina

El ARN de los receptores de adiponectina fue aislado de ADNc de músculo esquelético humano por exploración de la unión a la adiponectina globular. El ADNc analizado codifica una proteína designada como AdipoR1 humano. Esta proteína se encuentra altamente conservada en el hombre (especialmente en 7 dominios transmembranales) (Kadowaki y Yamauchi., 2005).

Al momento se han encontrado dos isoformas del receptor de adiponectina AdipoR1 y adipoR2 (el cual tiene 67% de identidad en aminoácidos). AdipoR1 es expresado ubicuamente y es más abundantemente expresado en músculo esquelético, mientras que adipoR2 es más abundantemente expresado en tejido hepático (Figura 7). Se ha reportado que los receptores de adiponectina fueron expresados en células beta

pancreáticas, y que los ácidos grasos pueden regular sus niveles de expresión (Kadowaki y Yamauchi., 2005).

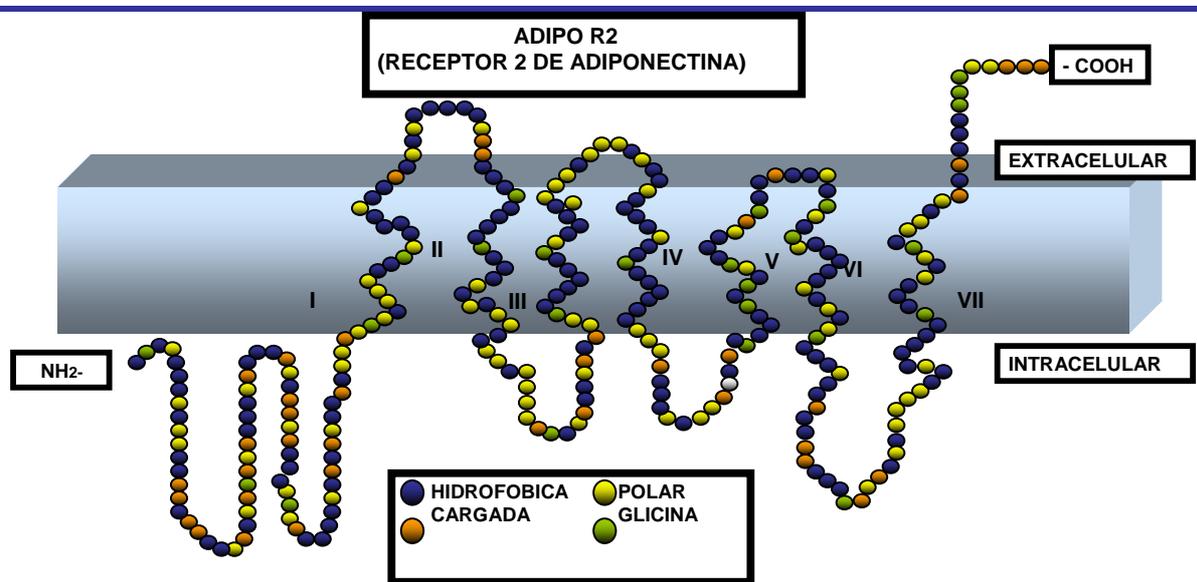


Figura 7. Estructura del receptor 2 de adiponectina (AdipoR2) es mas abundantemente expresado en hígado de ratón.

Modificado de: Kadowaki, T y Yamauchi, T., 2005.

AdipoR1 y AdipoR2 parecen ser proteínas integrales de membranas; la cadena N Terminal es interna, y la C Terminal es externa, lo cual es opuesto a la topología de otros receptores acoplados a la proteína G. Adipo R1 y AdipoR2 pueden formar homo y heterodimeros (Kadowaki y Yamauchi., 2005).

AdipoR1 es un receptor para adiponectina globular, mientras que AdipoR2 es un receptor para la forma completa de la adiponectina. La supresión de AdipoR1 con RNA de interferencia reduce el incremento en la oxidación de ácidos grasos por la adiponectina globular, en tanto que la supresión de AdipoR2 reduce el incremento en la oxidación de ácidos grasos por la forma completa de la adiponectina (Figura 8) (Kadowaki y Yamauchi., 2005).

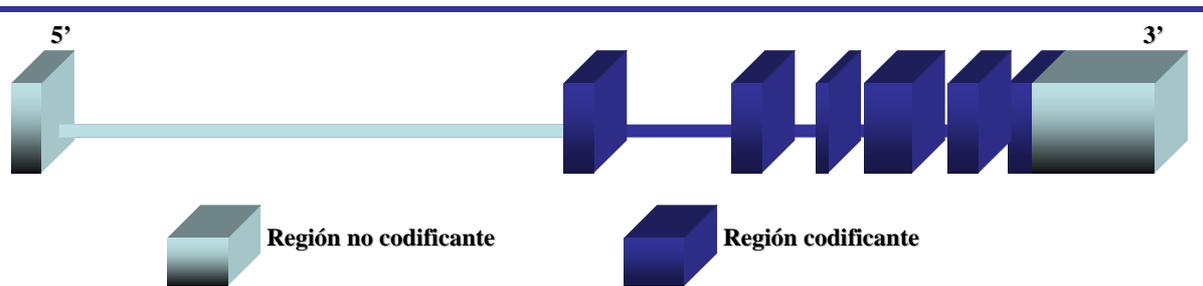


Figura 8. Estructura del gen de receptor 2 de adiponectina; conformado por 2 exones y 5 intrones.

Tomado de: Kadowaki y Yamauchi., 2005.

2.2.1.6. Mecanismos de acción

La adiponectina actúa directamente por medio de la unión con sus receptores transmembranales: AdipoR1 el cual es predominantemente expresado en músculo esquelético y muestra afinidad por la adiponectina globular y AdipoR2 el cual es predominantemente expresado en el hígado y muestra afinidad por la forma completa de adiponectina (Yamauchi y col., 2003).

Otro mecanismo de acción es a través de la activación de AMP cinasa y PPAR- α en hígado y músculo esquelético, el cual resulta en la estimulación de la oxidación de ácidos grasos y disminución del contenido de triglicéridos en músculo esquelético e hígado (Yamauchi y col., 2002)

La adiponectina administrada a roedores ha demostrado que incrementa la fosforilación por tirosina del receptor de la insulina provocando un aumento de la sensibilidad a la insulina. Tales estudios han sido validados en humanos (Oh y col., 2007).

2.2.1.7. Adiponectina y enfermedades hepáticas.

La adiponectina posee un papel hepatoprotector debido a que hay datos que sugieren que la adiponectina se acumula fuera de la matriz extracelular de los hepatocitos y actúa como una hormona antiinflamatoria participando en el proceso de reparación del daño hepático. La adiponectina también disminuye la fibrosis hepática por medio de la

expresión de ambos tipos de receptores de adiponectina en las células estelares hepáticas. Así, se sugirió que la adiponectina se une a las células estelares hepáticas y afecta sus funciones, debido a que inhibe la proliferación y migración de células estelares hepáticas en cultivo y disminuye la expresión génica de TGF β 1. En un modelo de daño hepático agudo inducido por endotoxinas en ratones obesos KK-Ay, la adiponectina previno el daño hepático inhibiendo la síntesis y/o la liberación de TNF- α . La adiponectina también disminuyó la esteatosis, hepatomegalia, ALT anormales, y las células T mediando el proceso inflamatorio hepático en ratones, lo cual, corrobora su efecto hepatoprotector. Finalmente, la inducción de adiponectina fue asociada con el efecto protector de la grasa saturada previene el desarrollo enfermedad de hígado graso alcohólico en ratones (Tsochatzis y col., 2006).

2.2.2. Leptina

En 1950, Ingalls y col. fueron los primeros en describir la mutación ob, una mutación autosómica recesiva que causa incremento en la ingesta de comida, obesidad profunda y DT2. Diversos estudios experimentales predijeron que los ratones knockout ob/ob fueron deficientes en un factor circulante que regula la ingesta de alimento y metabolismo. Sin embargo, 10 años antes, el grupo de Friedman identificó por clonación posicional el gen ob (Friedman y Halaas, 1998; Lozano., 2002).

La leptina es una hormona que fue descubierta en 1994, recientemente ha sido objeto de numerosos estudios. Su nombre deriva de la palabra griega “leptos” que significa “delgado”. Se produce casi en su totalidad en el tejido adiposo blanco por el gen LEP, aunque también se secreta en menor cantidad en las células del epitelio, estómago y placenta, esta es secretada a la circulación sanguínea por donde viaja hasta el cerebro y otros tejidos (Baratta, 2002; 4to. Congreso Virtual de Cardiología., 2007). Sus efectos son mediados por receptores (ob-R), localizados principalmente en el hipotálamo. Se conocen hasta el momento seis isoformas del receptor (Paracchini y col., 2005).

2.2.2.1. Estructura

La leptina es una proteína conformada por 167 aminoácidos con un péptido señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de que la leptina pase al torrente circulatorio. Esta proteína madura de 146 aminoácidos con un peso molecular de 16 kDa. Presenta una estructura terciaria. La estructura de la leptina consiste en un complejo de cuatro hélices, similar a las citocinas. Además, contiene una unión disulfuro entre cadenas necesaria para desarrollar su función biológica. La leptina humana presenta una homología del 84% con la proteína de ratón y del 83% con la leptina de rata (Paracchini y col., 2005; Howard Hughes Medical Institute., 2007). La leptina es un importante señalizador en la regulación del tejido adiposo y peso corporal, funciona por inhibición del apetito y estimulación del gasto de energía. Los defectos en la producción de leptina causan obesidad severa. La leptina también juega un papel en diferentes partes del cuerpo, tales como los órganos reproductores masculino y femenino, las glándulas mamarias, densidad mineral ósea, el sistema inmune, el intestino, el riñón, el hígado y el pulmón (Fantuzzi y Faggioni., 2000).

2.2.2.2. Gen de leptina (LEP/Ob)

El gen LEP codifica para la leptina ha sido localizado en los humanos en el cromosoma 7q31.3 (Figura 9) y consiste de tres exones separados por dos intrones. La sobreexpresión del gen humano LEP ha sido encontrada en el tejido adiposo subcutáneo de personas obesas (Paracchini y col., 2005).

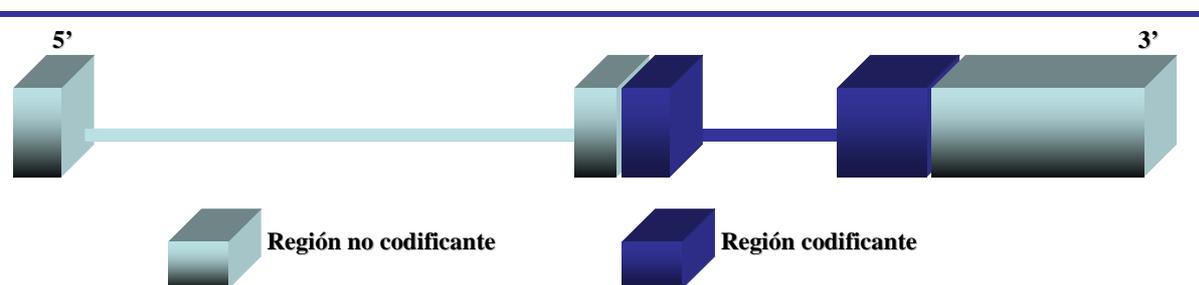


Figura 9. Estructura del gen de leptina conformado por 2 intrones y dos exones.

Modificado de: Gong y col. 1996.

2.2.2.3. Niveles de leptina

La leptina es producida en muchos sitios, pero la cantidad de grasa corporal es la principal determinante de los niveles circulantes de esta hormona (Fantuzzi y Faggioni., 2000). Los niveles séricos de leptina en personas con peso normal oscilan en el rango de 1-15 mg/mL, aunque en individuos con un índice de masa corporal (IMC) superior a 30 se pueden encontrar valores de 30 mg/mL o incluso superiores. La eliminación de la leptina es rápida, posee una vida media de unos 25 minutos en el caso de la endógena y de 90 minutos aproximadamente en el caso de la exógena. Este tipo de eliminación lleva a pensar que existe una secreción continuada de proteína por las células adiposas. La eliminación se produce, en gran parte, a nivel renal. Después de su producción, la leptina es secretada en el flujo sanguíneo, donde circula unida a las proteínas y es transportada al cerebro donde estimula o inhibe la liberación de varios neurotransmisores (4° Congreso de Cardiología., 2007).

Los niveles de leptina han sido encontrados elevados en pacientes obesos. La incapacidad de los niveles elevados de leptina para la modificación del estado de obesidad de las personas puede estar relacionado con “resistencia a la leptina” (la incapacidad de la leptina para entrar a la célula) (Paracchini y col., 2005).

La leptina presenta un ritmo de secreción circadiano relacionado, entre otros, con la pauta de ingesta, aumentando a lo largo del día en humanos (de hábitos diurnos) y reduciéndose en el caso de roedores (de hábitos nocturnos). La secreción es pulsátil y está modulada por la insulina y otras hormonas. No se conoce exactamente el mecanismo responsable del valor máximo de leptina a lo largo del día en los humanos, aunque parece estar modulado por el régimen de horas de luz/oscuridad, la ingesta y las horas de sueño del individuo (Paracchini y col., 2005).

2.2.2.4. Efectos fisiológicos

Regulación del balance energético

Fisiológicamente, la leptina disminuye el apetito y regula el gasto energético a través de la activación del sistema nervioso simpático (SNS) hacia el tejido adiposo pardo,

reduciendo así la masa del tejido adiposo y el peso corporal (Figura 10). Sin embargo, esta activación simpática mediada por leptina no es selectiva, y estudios en animales demuestran que otros órganos cardiovasculares como el riñón, el corazón, las glándulas suprarrenales y la vasculatura, son también afectados (4to. Congreso Virtual de Cardiología., 2007; Paracchini y col., 2005).

En los roedores, particularmente, en los ratones ob/ob, la administración central y periférica de leptina provoca una pérdida de apetito y una disminución del peso corporal mediada por una reducción del depósito de grasa, principalmente (Howard Hughes Medical Institute., 2007).

No se conoce con exactitud el mecanismo responsable, aunque diversos trabajos sugieren la posibilidad de que la leptina ejerza este efecto a nivel cerebral a través de mediadores como el neuropéptido Y, la hormona estimulante de los melanocitos (αMSH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) o la colecistoquinina (CCK) entre otros. Actualmente, este campo de los neurotransmisores y neuropéptidos con papel orexigénico y anorexigénico tales como la hormona alfa-melanocitoestimuladora, la cual, actúa en el receptor melanocortina-4, cocaína, el regulador de la transcripción de anfetaminas y la hormona liberadora de corticotropina. La leptina también afecta directamente el metabolismo y la función de diversos tejidos como los adipocitos, músculo esquelético, ovarios, corteza adrenal, y células β del páncreas (Fantuzzi y Faggioni., 2000).

Diversos autores han descrito que en situaciones de balance energético positivo se observa un aumento de los niveles de leptina, sin originarse cambios en el acumulo de tejido adiposo, lo que provoca un incremento del consumo de oxígeno tisular así como de la termogénesis y también un aumento de la tasa metabólica. La leptina parece intervenir, por tanto, en la homeostasis energética evitando un incremento excesivo del porcentaje de grasa. Del mismo modo, un balance de energía negativo se acompaña de una reducción del nivel de leptina, sin una modificación inicial del depósito de grasa. En este

sentido, la pérdida de peso observada tras la administración de leptina en ratones ob/ob puede ser atribuible a la unión de estos dos efectos: un descenso de la ingesta junto a un paralelo aumento del gasto energético (Fantuzzi y Faggioni., 2000).

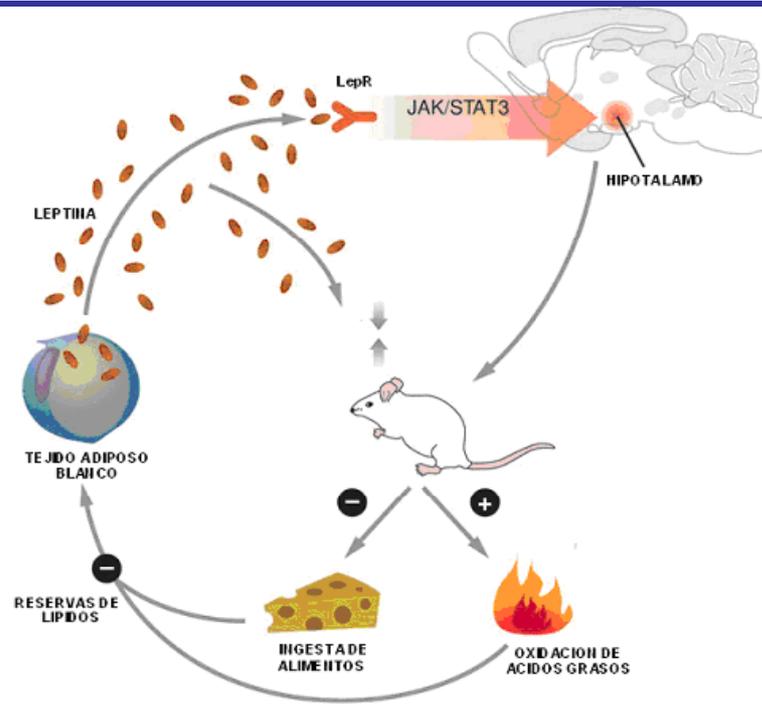


Figura 10. Mecanismo de acción de la leptina.

Tomado de: Waki, H. y col., 2007.

2.2.2.5. Leptina y metabolismo de lípidos y glúcidos

A nivel del metabolismo de la glucosa, la administración de leptina exógena normaliza la hiperglucemia y la hiperinsulinemia observada en los modelos animales de obesidad genética. Entre los mecanismos implicados, la leptina inhibe la secreción de insulina por las células β -pancreáticas, estimula la utilización de glucosa, particularmente mediante la captación desde el músculo esquelético y promueve el transporte de glucosa a través del intestino delgado (Howard Hughes Medical Institute., 2007).

Sobre el metabolismo lipídico, estimula la lipólisis en el adipocito, tanto *in vivo* como *in vitro*, provoca una modificación del reparto lipídico en el tejido muscular, estimula la

termogénesis en el tejido adiposo marrón y es capaz de aumentar la síntesis de ácidos grasos en el hígado (Howard Hughes Medical Institute., 2007).

Otros efectos

La leptina estimula la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas y de la angiogénesis (Poordad., 2004).

La leptina interviene en la modulación de la respuesta inmune y la actividad fagocítica de los macrófagos, la proliferación de monocitos y linfocitos T, así como la liberación de algunas citocinas inflamatorias (Poordad., 2004).

La expresión local de la proteína ob a nivel gástrico aparece como un factor de saciedad, mientras que a nivel intestinal podría intervenir controlando la absorción de nutrientes y la motilidad del intestino (Poordad., 2004).

Se ha observado que esta hormona estimula la actividad del SNC a nivel del hipotálamo, glándulas adrenales, riñón y musculatura esquelética. Este hecho sugiere un aumento del gasto energético, una regulación del sistema cardiovascular y de la función renal a través del SNC que podría estar relacionada con las alteraciones que ocurren en situaciones de obesidad (Poordad., 2004).

La leptina parece estar también implicada en el desarrollo cerebral, como sugiere el hecho de que en ratones ob/ob y db/db presenten un menor peso cerebral, defectos estructurales de las neuronas o mielinización inadecuada (Poordad., 2004).

2.2.2.6. Leptina y enfermedades hepáticas.

Las células hepáticas esteladas juegan un papel central en la fibrogénesis hepática, expresan la forma larga del receptor para la leptina el cual se encuentra aumentado durante la producción de fibrosis. Se encontró que las células estelares hepáticas activadas producen leptina, mientras que la leptina se encontró que

sobreregula citocinas profibrogénicas en células estelares hepáticas activadas en humanos. Estudios en ratas a las que se les administraron inyecciones de leptina con hepatotoxinas incrementaron la expresión de procolágeno 1, TGF β 1, y actina muscular, un marcador de células estelares hepáticas activadas y eventualmente la producción de fibrosis. Además, se observó un dramático incremento en los niveles séricos de TNF- γ después de las inyecciones de leptina, sugiriendo que la leptina puede aumentar la inflamación y subsecuentemente la fibrogénesis. Las células sinusoidales y las células Kupffer fueron identificadas como los blancos principales de la acción profibrogénica de la leptina. Por otro lado las ratas resistentes a la leptina o deficientes de leptina mostraron respuestas fibrogénicas significativamente reducidas. De acuerdo con estos datos, se ha sugerido un efecto directo de la leptina sobre las células estelares hepáticas y es considerada como mediador de la fibrosis hepática, además, de tener efectos que no pueden ser solamente atribuidos a la inducción de TNF- α (Tsochatzis y col., 2006).

2.2.2.7. Receptor de leptina

La señalización de la leptina se encuentra mediada por el receptor de leptina (OB-R), un miembro de la familia de receptores de hematopoyetinas que se encuentra fuertemente relacionado a la transducción de señales de subunidades de receptores de citocinas tipo IL-6. En humanos y roedores, han sido detectadas dos formas predominantes de receptor de leptina. Ambas isoformas tienen idénticos dominios extracelulares y afinidad de unión a ligandos, pero difieren en los dominios intracelulares lo cual representa productos del corte y empalme alternativo. La forma corta del receptor de leptina (OB-Rs) tiene un dominio citoplasmático de 34 aminoácidos y se encuentra en los órganos principales. Sin embargo carece de actividad normal de unión a ligandos, OB-Rs ha sido descrito ser incapaz de llevar a cabo la señalización de la leptina. En contraste la forma larga (OB-RI) contiene un dominio citoplasmático de 302 aminoácidos. Es expresado primariamente en el núcleo específico del hipotálamo y es considerado ser la isoforma del receptor competente

para llevar a cabo la señalización (Tartaglia y col., 1995; Wang y col., 1997; Hileman y col., 2002).

La RT-PCR y análisis de protección de ARN han revelado que diversos órganos periféricos, incluyendo el hígado tienen niveles detectables de ARNm que codifican la forma larga del receptor de leptina (Figura 11). La cantidad relativa de sus niveles va de 2 a 11% (hígado 5%) del total de la señal de ARNm de OB-R. Diversos reportes han sugerido que la leptina puede inducir una respuesta biológica en células derivadas de tejidos periféricos (Wang y col., 1997)

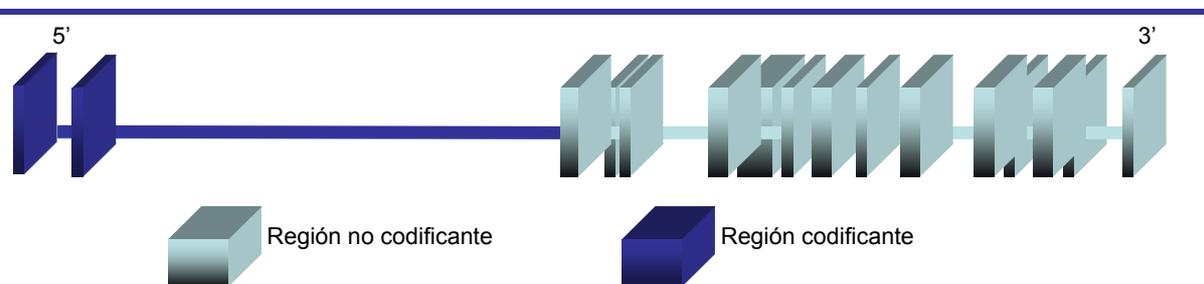


Figura 11. Estructura del gen que codifica para la forma larga del receptor de leptina. Se encuentra conformado por 2 exones.

Tomado de Entrez, Pubmed.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACION

La EHNA es una de las enfermedades gastrointestinales que ha incrementado considerablemente su prevalencia, a consecuencia del aumento en la incidencia de obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas. Se considera que en el futuro será una causa importante de la presencia de enfermedades crónicas del hígado, particularmente cuando se estima que para el año 2010 habrá entre 8 y 14 millones de mexicanos con obesidad (Chávez y col., 2007).

Dada la elevada frecuencia de esteatosis hepática en sujetos obesos, hay un marcado interés en el papel de las adipocitocinas en el desarrollo de esteatosis y EHNA, así como en el desarrollo de necroinflamación y fibrosis debido a que de acuerdo a datos experimentales, reducidos niveles de adiponectina y elevados niveles de leptina se encuentran asociados con resistencia a la leptina, lo cual es usualmente observado en pacientes obesos con o sin síndrome metabólico y puede tener alguna implicación en acumulación de grasa en el hígado así como el aumento de la inflamación hepática (Tsochatzis y col., 2006).

Así mismo, la mayoría de los casos diagnosticados como cirrosis criptogénica, aproximadamente 70% se atribuyen a la EHNA. Sin embargo, hoy en día el desarrollo de cirrosis parece ser menos importante de lo que se pensaba inicialmente debido a que la causa principal de muerte en estos pacientes es la derivada de las complicaciones cardiovasculares y metabólicas asociadas a la obesidad, debido a que los pacientes con EHNA tienen cerca de 8 veces más riesgo de morir por enfermedades cardiovasculares y relacionadas con la resistencia a la insulina que aquellos con infección crónica por el virus de hepatitis C (Muñoz-Espinosa y col., 2002).

4. JUSTIFICACION

La esteatohepatitis no alcohólica es una enfermedad metabólica progresiva y una de las principales consecuencias de la creciente epidemia de obesidad. Se encuentra en un espectro que va de la esteatosis hepática a la cirrosis. Considerando que, la esteatosis simple puede evolucionar a EHNA y la EHNA es reconocida como una enfermedad potencialmente progresiva que puede causar cirrosis y desencadenar en carcinoma hepatocelular (Farell y Larter, 2006).

Los probables mecanismos involucrados en el desarrollo y progresión de la esteatosis a EHNA, incluyen alteraciones en el metabolismo de lípidos, producción de especies reactivas de oxígeno, aumento en la peroxidación de lípidos hepáticos, células estelares hepáticas activadas, y un patrón anormal en la producción de citóquinas entre las cuales se encuentran la leptina y adiponectina (Méndez-Sánchez y col., 2004a).

Por tanto es necesario establecer una relación entre la expresión de diversas adipocitocinas en las diferentes etapas del desarrollo de la EHNA debido a que a la fecha no se dispone de indicadores o marcadores moleculares de la progresión de la enfermedad y su relación con parámetros clínicos a través de los cuales se pueda inferir el curso de la enfermedad; así mismo no se dispone de un tratamiento más eficaz que la reducción de peso en este tipo de pacientes, en esta investigación ponemos especial atención a la leptina y adiponectina, ya que en diversos estudios se ha demostrado que los niveles de adiponectina se encuentran disminuidos significativamente en pacientes con obesidad así como con enfermedades asociadas a la presencia de EHNA; también se ha identificado a la leptina como un regulador clave de la inflamación y el desarrollo de fibrogénesis hepática en pacientes con esteatosis; A pesar de los estudios realizados el papel de estas citóquinas en el desarrollo EHNA, aun permanece controversial. Por lo anterior es necesario analizar si existe relación entre la expresión de este gen y los parámetros relacionados con el síndrome metabólico, de igual manera analizar si la expresión tiene un valor pronóstico de la progresión de la enfermedad, de tal forma que permitirá tener más elementos

diagnósticos que ayuden a la búsqueda de nuevos tratamientos con respecto a blancos terapéuticos que puedan ser identificados.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar los niveles de expresión del ARNm de los genes Adiponectina, Leptina, Receptor 2 de Adiponectina (AdipoR2) y Receptor 1 de Leptina (LepR) en biopsias hepáticas de pacientes con EHNA, con esteatosis simple y sin esteatosis.

5.2. Objetivos específicos

Estandarizar los métodos de extracción, cuantificación y valoración de ARN.

Valorar los niveles de expresión de los genes leptina, adiponectina y B-actina en tejido de expresión normal (tejido adiposo).

Determinar los niveles de expresión de los genes Adiponectina y Leptina en biopsias hepáticas de pacientes con EHNA, con esteatosis simple y sin esteatosis.

Comparar los niveles de expresión de los genes Adiponectina y Leptina entre pacientes con EHNA así como con esteatosis simple y sin esteatosis.

Determinar los niveles de expresión de LEPR y AdipoR2 en pacientes con EHNA así como con esteatosis simple y sin esteatosis.

Comparar los niveles de expresión de los genes Adiponectina y Leptina entre pacientes con EHNA así como con esteatosis simple y sin esteatosis.

Correlacionar los niveles de expresión de LepR y AdipoR2 con variables bioquímicas (insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL) y antropométricas (IMC), así como con el grado de fibrosis hepática.

6. HIPOTESIS

Hipótesis alterna

Los niveles de expresión de leptina y adiponectina y sus receptores son diferentes en los pacientes con EHNA en comparación con los pacientes sin y con esteatosis simple.

Hipótesis nula

Los niveles de expresión de leptina y adiponectina y sus receptores no son diferentes en los pacientes con EHNA en comparación con los pacientes con esteatosis simple.

7. MATERIALES Y METODOS

Diagrama metodológico

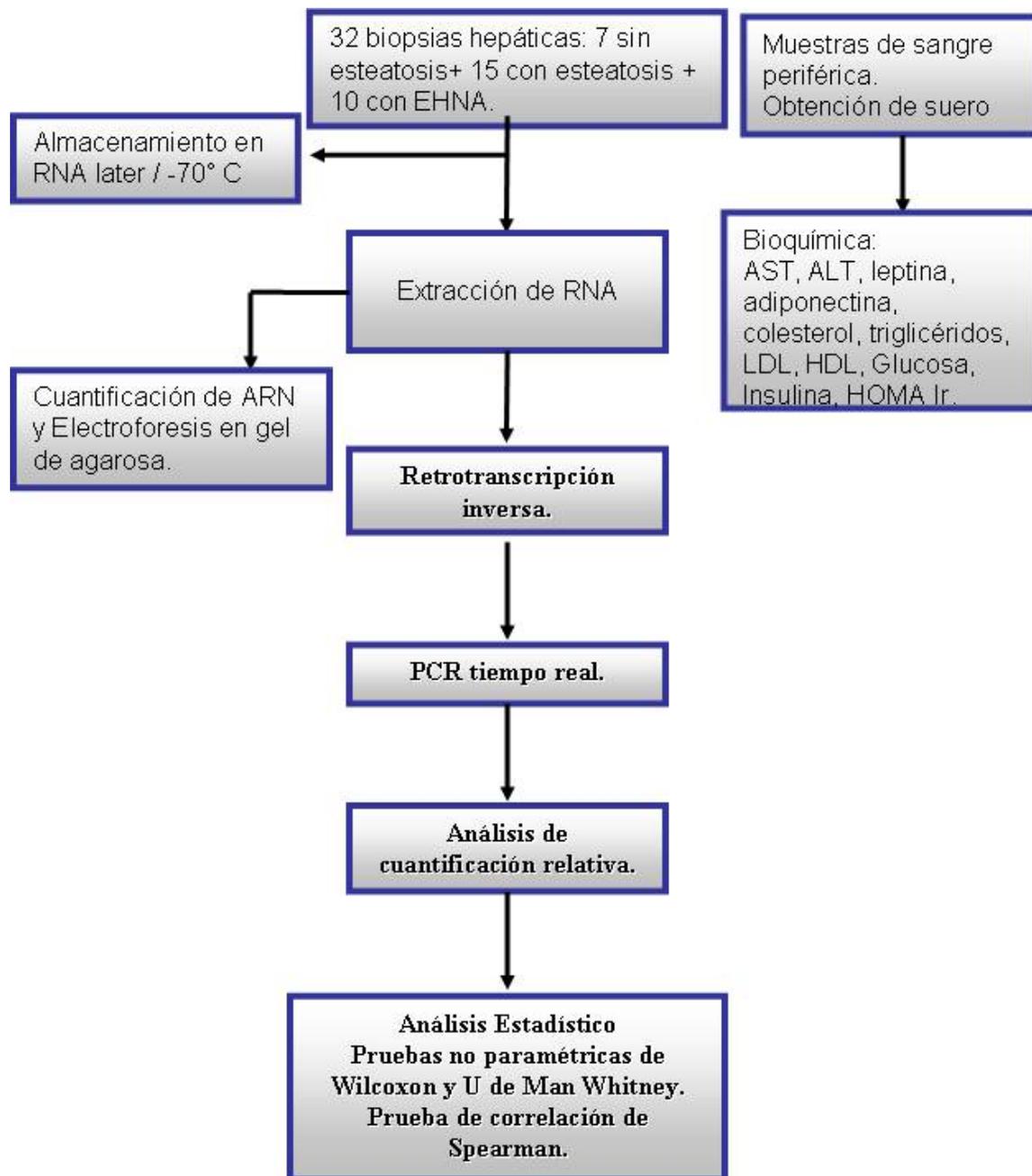


Figura 12. Diagrama metodológico de los procedimientos realizados.

7.1. Sujetos de estudio

El protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Investigaciones Biomédicas en Humanos del INCMNSZ, según lo establecido en la Ley general de Salud en Materia de Investigación en Salud, así mismo, con base en esta los pacientes incluidos en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado (Ver Anexo) para la utilización de la biopsia hepática, debido a que el estudio representa un tipo de investigación con riesgo mayor que el mínimo. Se incluyeron 32 biopsias hepáticas de sujetos que fueron canalizados a interconsulta en el departamento de Gastroenterología en el INCMNSZ por sospecha de alteración hepática. El protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética del INCMNSZ. Los pacientes fueron sometidos a evaluación médica por un médico especializado en gastroenterología, además se realizaron evaluaciones antropométricas (peso y talla), bioquímicas (determinación de AST, ALT, glucosa, insulina, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, así como leptina y adiponectina sérica) y ultrasonido para establecer un diagnóstico previo a la toma de la biopsia. Una vez establecido el diagnóstico por parte del médico, se procedió a establecer el diagnóstico histopatológico confirmatorio por medio de una biopsia, la cual se considera estándar de oro para el establecimiento del mismo. Los pacientes fueron sometidos a una angiografía transyugular en la sala de Angiografía del INCMNSZ para la obtención de la biopsia.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con sospecha de alteración hepática por EHNA de origen primario sin diagnóstico histopatológico confirmatorio.
- Pacientes con registro en el INCMNSZ.
- Edad > 25 años.
- Cualquier género.

Criterios de exclusión:

- Presentar serología positiva para VHC o VHB.
- Tener un consumo de alcohol mayor a 40 g / día para hombres y de 30 g / día para mujeres.

- Pacientes con diagnóstico de EHNA de origen secundario u otras enfermedades hepáticas en base a los siguientes criterios:
 - Presentar serología positiva para anticuerpos antinucleares, antimitocondriales y antimusculo liso.
 - Recibir nutrición parenteral.
 - Consumo prolongado de fármacos hepatotóxicos.
 - Niveles anormales de ceruloplasmina sérica, cobre sérico y urinario.

Criterios de eliminación:

- Muestra de tejido hepático insuficiente para realizar el estudio.

Las biopsias fueron divididas de acuerdo a características histopatológicas (por un medico hepatopatólogo) en tres grupos: sin esteatosis (n=7), esteatosis simple (n=15) y EHNA (n=10) en base a la siguientes características: sin esteatosis (<5% de hepatocitos afectados), esteatosis (5-29% de hepatocitos afectados), esteatohepatitis (>30% de hepatocitos afectados). También fue evaluado el grado de fibrosis y de actividad histológica en base a la escala o algoritmo de METAVIR utilizada para la evaluación semicuantitativa del daño en tejido hepático como se muestra en la Tabla 5 (Bedossa, P. y Poynard, T., 1996).

Tabla 5. Escala de METAVIR para la evaluación histológica de biopsias hepáticas.

CARACTERISTICA	CODIGO
ACTIVIDAD HISTOLÓGICA	
Sin actividad	A0
Actividad media	A1
Actividad moderada	A2
Actividad severa	A3
FIBROSIS	
Sin fibrosis	F0
Fibrosis portal sin septos	F1

Fibrosis portal con septos raros	F2
Septos numerosos sin cirrosis	F3
Cirrosis	F4

Contenido tomado de: Bedossa, P. y Poynard, T., Hepatology. 1996.

7.2. Reactivos

Extracción de ARN:

- Solución de estabilización de ARN (RNA later, Ambion[®])

Reactivos para extracción de ARN de tejido (High Pure RNA Tissue Kit de Roche[®]):

- Solución amortiguadora intermediaria de rompimiento de células (Lysis/Binding Buffer, Roche[®]) (guanidina-HCl 4.5 M, fosfato de sodio 100mM, pH 6.6)
- ADNasa para eliminacion de contaminacion por ADN (DNase I, Roche[®]) (Dnasa 10 kU)
- Solución amortiguadora para incubación de ADNasa (DNase Incubation Buffer, Roche[®]) (NaCl 1M, Tris-HCl 20 mM, MnCl₂ 10 mM, pH 7.0)
- Solución amortiguadora de lavado I (Wash Buffer I, Roche[®]) (5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl y 20 mL de etanol absoluto, pH 6.6)
- Solución amortiguadora de lavado II (Wash Buffer II, Roche[®]) (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM y 40 mL de etanol absoluto, pH7.5)
- Solución amortiguadora de elusión para recuperación de ARN (Elution Buffer, Roche[®]) (Agua doble destilada, estéril, libre de nucleasas y ARNasa)
- Agua DEPC (Dietil Pirocarbonato)
- Etanol absoluto (Sigma[®])

Cuantificación de ARN:

- Agua DEPC (dietilpirocarbonato)

Valoración del ARN:

- Agarosa grado analítico (Promega[®])
- ácido 3-N-monofolino-propanesulfónico (MOPS) al 1% y 10%

- Bromuro de Etidio (10 mg/dL)
- Colorante de carga o solución de arrastre (azul de bromofenol-xilecianol y glicerol 40%)
- Marcador de peso molecular de 100 pb (B-actina) (Promega®)

Transcripción Reversa:

Reactivos para la reacción de Trascricción Reversa

- Enzima Transcriptasa Reversa (20 U/μL) (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche®) (fosfato de potasio 200 mM, ditioneitol 2 mM, 0.2 % Triton X-100 [v/v], 50% glicerol [v/v], pH 7.2)
- Solución Amortiguadora para Transcriptasa Reversa 5x (Transcriptor RT Reaction Buffer, Roche®) (Tris/HCl 250 mM, KCl 150 mM, MgCl₂ 40 mM, pH 8.5)
- Inhibidor de ARNasas (40 U/μL) (Protector RNase Inhibidor, Roche®) (Hepes-KOH 20 mM, KCl 50 mM, ditioneitol 8mM, 50% de glicerol [v/v], pH7.6)
- Mezcla de Dexoxirribonucleotidos (Deoxynucleotide mix, Roche®) [10 mM adenina trifosfato (ATPd), citosina trifosfato (CTPd), guanina trifosfato (GTPd), timina trifosfato (TTPd)].
- Iniciador de Trascricción de Deoxitimina (oligo DT) (50μM) (Anchored-oligo (dT) Primer, Roche®)
- Iniciadores aleatorios (600 μM)
- Agua grado PCR (Water PCR-grade, Roche®).

PCR-Tiempo Real:

Reactivos de reacción para PCR-Tiempo Real compatible con sondas de hibridación.

- Mezcla Maestra de Reacción (5x) (Master Mix Reaction, Roche®) (Taq ADN polimerasa, Solución amortiguadora de reacción, MgCl₂ y mezcla de deoxirribonucleotidos (con UTPd)
- H₂O grado PCR (Water, PCR grade, Roche®)
- Enzima uracil-N-glicosilasa 100 μM

- Sondas TaqMan de la librería universal del genoma humano (0.1 μ M) # 25 (leptina), #85 (Adiponectina), #68 (Receptor de leptina), #14 (Receptor de adiponectina), #64 (B-actina). (Universal Probe Library, Roche[®])
- Iniciadores (1 μ M) (Invitrogen Custom Primers[®]) para leptina (sentido: ttgtcaccaggatcaatgaca antisentido: gtccaaaccggtgactttct), Adiponectina (sentido: agagatggcaccctggt antisentido: caccgatgtctcccttagga), LepR (sentido: gaaagcactttgcaattgagg antisentido: tgggatgaatagatggaatatcag) AdipoR2 (sentido: gggcattgcagccattat antisentido: aggcccaaaaacactctg) B-actina (sentido: ccaaccgcgagaagatga antisentido: ccagaggcgtacagggatag).

7.3. Material de plástico y vidrio

- Pipetas de 0.2 μ L, 2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L (Gilson[®]).
- Puntas para micropipetas de polipropileno (Axygen[®])
- Tubos de polipropileno o crioviales (Corning[®] Incorporated)
- Microtubos Eppendorf de polipropileno de 1.5 mL, 0.6 mL (Axygen[®])
- Tubos con filtro de polipropileno con 2 barreras de fibra de vidrio flexible, con capacidad en la parte superior de 700 μ L (Roche[®])
- Tubos colectores de polipropileno de 2 mL (Roche[®])
- Celdillas de cuarzo
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL (PYREX[®])
- Probeta graduada de 100, 200, 500 y 1000 mL.
- Vasos de precipitado
- Capilares LigtCycler 20 μ L (Roche[®])
- Block frio de 2 a 8 °C LigthCycler Centrifuge Adaptors (Roche[®])
- Dispositivo para taponar capilares (Roche[®])
- Carrusel LigthCycler de 20 μ L (Roche[®])
- Liberador de capilares (Roche[®])

7.4. Equipos

- Ultracongelador de -70°C marca Frilatic®, No. B3-0318
- Refrigerador 4°C /Congelador -20°C marca América®, No. B-B-02661
- Vortex Maxi Mix II (Barnstead Termolyne® Tipo 37600)
- Homogenizador y Fuente de poder (Politron®, Kinematica AG PT1300D)
- Microcentrifuga refrigerada (Sigma® 1-15).
- Microcentrífuga MiniSpin de Eppendorf®
- Espectrofotómetro de luz uv de espectro visible Lambda modelo E2201 (Perkin Elmer®)
- Computadora (HP®)
- Bascula analítica (Ohaus®)
- Horno de microondas (General Electric®)
- Cámara de electrofóresis horizontal de 35 mL (Gibco® BRL 58, Life Technologies)
- Fuente de Poder (Bio Rad® 3000)
- Fotodocuemntador (UVP® Mod. TM-E, de 115V, 50 Hz y 1.20 Amps)
- Cámara de documentación de electroforesis y programa de análisis 120 (Kodac® 290)
- Termociclador convencional (Perkin Elmer® 9600).
- Termociclador tiempo real Lightcycler 2.0 (Roche®).
- Computadora portátil Inspiron 600mb (DELL®)

7.5. Métodos

1. Extracción de ARN-total a partir de tejido hepático (biopsia hepática) por el método de isotiocianato de guanidina.
2. Cuantificación de ARN
3. Valoración del ARN
4. Síntesis de ADNc, por transcripción reversa.
5. Cuantificación relativa de Leptina/B-actina, Adiponectina/B-actina, LepR/B-actina, AdipoR2/B-actina por PCR-Tiempo Real con sondas TaqMan.

1. Extracción de ARNm

Posterior a la toma de la biopsia se almacenó a -70°C en 1 mL de solución de estabilización (RNA later) de ARN hasta su procesamiento. El total de la biopsia obtenida fue procesada para la obtención de ARNm, la extracción de ARNm se realizó utilizando el kit para extracción de tejido High Pure RNA Tissue kit (Roche[®]) siguiendo las instrucciones del proveedor.

El principio físico del kit se basa en hacer pasar a través de una membrana contenida en columnas plásticas, las células previamente obtenidas por desnaturalización de la muestra. El ARN atrapado en la membrana es sometido a una serie de lavadas con el fin de eliminar restos de proteínas e impurezas y finalmente el ARN obtenido es eluido en agua estéril.

Para someter la biopsia al procedimiento de extracción se colocó en un tubo de polipropileno estéril de 1.5 mL y se adicionaron 500 μL de agua DEPC para eliminar los restos de la solución de estabilización de ARN. Posteriormente la biopsia se colocó en un tubo nuevo de polipropileno de 1.5 mL y se agregaron 400 μL de solución amortiguadora de lisis, se homogenizó a una velocidad de 14,000 rpm y se centrifugó a una velocidad 12000 rpm por 2 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo estéril de polipropileno. Posteriormente se agregaron 200 μL de etanol absoluto frío y se homogenizó en el vortex por 1 min. Se ensambló el tubo con filtro dentro del tubo colector y se transfirió la muestra a la columna de separación. Se centrifugó una segunda vez a 13000 rpm por 30 segundos y se desechó el contenido del tubo colector. En un tubo nuevo de 600 μL se realizó la preparación de la ADNasa en donde se colocaron 90 μL de solución amortiguadora de incubación para ADNasa más 10 μL de ADNasa, se mezcló perfectamente y la mezcla se agregó al centro de la columna. Se incubó 15 minutos a una temperatura de 15 a 20°C . Posteriormente se agregaron a la columna 500 μL de solución amortiguadora de lavado I, se centrifugó a 8000 g por 15 segundos y se eliminó el contenido del tubo colector. A continuación se adicionaron 300 μL de solución amortiguadora de lavado II y se centrifugó a 13000 g por 2 min, se

desecho el tubo colector y el tubo con filtro se colocó en un tubo nuevo eppendorf estéril de polipropileno de 1.5 mL. Finalmente se adicionaron 50 µL de solución amortiguadora para elución y se centrifugó a 8000 g por 1 minuto. Una vez obtenido el ARN es almacenado a – 70 °C hasta su procesamiento.

2. Cuantificación de ARNm

Para realizar la cuantificación del ARN obtenido y determinar su grado de pureza (en base a el contenido de proteína), en un tubo eppendorf se colocaron 498 µL de agua DEPC mas 2 µL de muestra del ARN (dil. 1:250), y la mezcla fue transferida en una celdilla de cuarzo. Posteriormente se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260, 240 y 280 nm para determinar la concentración y la pureza de la muestra por medio de la siguiente formula:

Concentración ARN = absorbancia a 260 nm X 0.04 X dilución (250) = ARN mg/mL.

Pureza:

Exeso de proteina = D.O. a 260 nm / D.O. a 240 nm = ó > 2

Exeso de fenol = D.O. a 260 nm / D.O. a 280 nm = ó > 2

3. Valoración del ARN

La integridad del ARN se determinó por medio de una electroforesis horizontal en un gel de agarosa la cual se basa en el desplazamiento de moléculas de ARN a través de una matriz porosa formada por la agarosa polimerizada, siendo el tamaño del poro determinado por la concentración de esta en una solución de sales. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfato migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro (Maniatis y col., 1989).

El gel fue preparado al 2%, en un matraz erlenmeyer se colocaron 35 mL de amortiguador MOPS (ácido 3-N-monofolino-propanesulfónico) al 10% mas 0.7 g de

agarosa, se calentó en un microondas por 1 min. Se enfrió a una temperatura ambiente para agregar 2 μL de bromuro de etidio y se mezcló. Posteriormente la mezcla se vació al molde con el peine previamente colocado de atrás hacia delante, una vez solidificado el gel se retiró el peine con cuidado para no fracturar el gel y se llenó la cámara con amortiguador MOPS 1%. Se procedió a preparar las cargas con: 3 μL de muestra de ARN más 1 μL de colorante de carga (azul de bromofenol, xilencianol y glicerol 40%) y 1 μL de amortiguador MOPS 1% y se colocó en el fondo de cada pozo simultáneamente se corrieron las muestras con un marcador de peso molecular de 100 Pb, la mezcla del marcador se realizó con: 1 μL de marcador de 100 Pb, 2 μL de colorante y 3 μL de amortiguador MOPS una vez colocadas todas las muestras la cámara se tapó y se colocaron los electrodos, los cuales se conectaron a la cámara programada a una velocidad de 70 V por 45 min. Finalmente el gel se observó a través de un transiluminador con luz ultravioleta; la radiación UV es absorbida por el ARN y emitida al bromuro de etidio que a su vez remite la radiación a 590 nm de espectro visible, y finalmente se obtuvo una impresión fotográfica.

4. Síntesis de ADNc (Transcripción Reversa)

La transcripción reversa es una reacción que consiste en la síntesis de ADN monocatenario o complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN monocatenario catalizada por la enzima transcriptasa reversa.

Para llevar a cabo esta reacción se utilizarán alrededor de 100 ng de ARNm de cada muestra así como el kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Syntesis Kit (Roche[®]), siguiendo las instrucciones del proveedor.

La transcripción reversa se realizó en 2 fases:

Fase 1. Preparación de la mezcla maestra.

- a) 2 μL de Iniciadores de la Transcripción de Deoxitimina (oligo DT).
- b) 3 μL de agua grado PCR
- c) 8 μL de la muestra de ARN

Los componentes de la mezcla se colocaron en un tubo de polipropileno de 600 μL . La reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización a 55°C por 30 minutos en un termociclador convencional. Una vez terminada la incubación se colocó inmediatamente en hielo para evitar su renaturalización y se adicionó lo siguiente para obtener una reacción con un volumen final de 20 μL :

Fase 2.

- a) 4 μL de Solución amortiguadora para la reacción de la Transcriptasa Reversa.
- b) 0.5 μL de Inhibidor de ARNasas.
- c) 2 μL de Dexoxirribonucleotidos.
- d) 0.05 μL de Enzima Transcriptasa Reversa.

La mezcla se sometió a un ciclo de síntesis de ADNc a 50°C por 60 minutos con un paso final de inactivación y desnaturalización de la enzima a 85°C por 5 minutos. El ADNc resultante se cuantificó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260 nm a partir de una dilución de 1:250 y finalmente se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

5. Cuantificación relativa de Leptina/B-actina, Adiponectina/B-actina, LepR/B-actina, AdipoR2/B-actina por PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan.

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que consiste en la replicación de hebras de ADN, empleando ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las polimerasas para que vuelvan a duplicarlas con lo cual se obtiene un gran número de copias de ADN. Los ciclos empleados en cada reacción son:

La expresión del ARNm de Leptina, Adiponectina, LepR y AdipoR2 fue estimada por cuantificación del ADNc de Leptina, Adiponectina, LepR, AdipoR2 y B-actina por medio del método de la reacción en cadena de la polimerasa tiempo real (PCR) expresado como la proporción del ADNc de Leptina/B-actina, Adiponectina/B-actina, LepR/B-actina, AdipoR2/B-actina, respectivamente.

Para la generación de la curva estándar, se prepararon diluciones seriales de ADNc de tejido adiposo humano (Leptina, Adiponectina, LepR, AdipoR2 y B-actina) a diferentes concentraciones 1:1, 1:10, 1:100.

Para cada reacción se utilizaron 2.5 µL de cada ADNc resultante de la reverso transcripción para una reacción final de 10 µL, conteniendo 2 µL de la mezcla maestra de reacción, 0.2 µL de cada oligonucleótido iniciador (sentido y antisentido), 0.1 µL de la sonda TaqMan de hibridación específica de la librería universal, y por último 5.1 µL de agua grado PCR.

Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95°C (pre-incubación), seguido de 45 ciclos de 10s a 95°C, 40s a 60°C, 1s a 72°C (amplificación) y finalmente un ciclo de 30 s a 40°C (enfriamiento).

Los oligonucleótidos iniciadores así como las sondas de la librería universal fueron diseñados en la dirección electrónica de Roche Applied Science. Universal Probe Library. Los oligonucleótidos iniciadores incluidos fueron Leptina: sentido: ttgtcaccaggatcaatgaca antisentido: gtccaaaccggtgactttct; Adiponectina: sentido: agagatggcaccctggt antisentido: caccgatgtctcccttagga; LepR: sentido: gaaagcactttgcaattgagg antisentido: tgggatgaatagatggaatcag; AdipoR2: sentido: gggcattgcagccattat antisentido: aggcccaaaaacactcctg; B-actina: sentido: ccaaccgcgagaagatga antisentido: ccagaggcgtacagggatag.

Determinación de leptina sérica.

La determinación de leptina en suero se realizó a partir de sangre periférica de los pacientes por medio del kit de Elisa Cat. No. EZHL-80SK de Linco Research siguiendo las instrucciones del proveedor.

Determinación de adiponectina sérica

La determinación de adiponectina en el suero se realizó a partir de sangre periférica de los pacientes por medio del kit de Elisa Cat. No. EZHADP-61K de Linco Research siguiendo las instrucciones del proveedor.

Análisis de laboratorio

Las muestras de sangre fueron colectadas de los pacientes y el grupo control antes del procedimiento. Se determinaron los niveles de aspartato y alanina transaminasa, colesterol sérico, Lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos, glucosa. Insulina.

El índice de Homeostasis (HOMA) fue usado para estimar la resistencia a la insulina (IR).

$$\text{HOMA IR (\%)} = \frac{\text{Glucosa en sangre en ayunas (mg/dL)}}{18} \times \frac{\text{insulina en ayunas (\mu U/mL)}}{22.5}$$

Se calculó el índice de masa corporal (IMC) en base al peso (kg) dividido entre la altura al cuadrado (m^2). Todos los participantes y los pacientes con IMC de más de 30 se consideraron con obesidad de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Análisis Estadístico.

Las diferencias entre los grupos fueron calculadas usando las pruebas no paramétricas de Wilcoxon, U de Mann Whitney. La significancia estadística fue inferida para los valores p menor a 0.05. Los coeficientes de correlación fueron calculados usando el método de Spearman para variables no paramétricas. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS for Windows versión 15.0.

8. RESULTADOS

Cuantificación.

El ARN se sometió a una lectura en espectrofotómetro para determinar la pureza y concentración de la muestra, se obtuvo una pureza promedio de 1.85 la cual se considero aceptable para realizar el estudio, tomando como valor de referencia aceptable de 1.6 a 2.0 y la concentración o rendimiento promedio de ARN fue de 400 a 800 ng/ μ L.

Electroforesis.

La integridad del ARN de las biopsias se analizó en un gel de agarosa al 1.5%. Las bandas obtenidas se muestran en la Figura 13, mostrando la bandas bien definidas tanto la correspondiente a la 28s y como la correspondiente a la 18s.

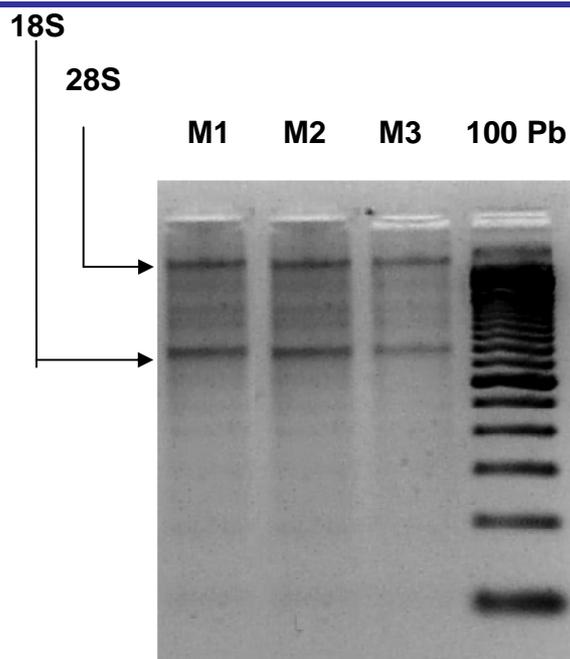


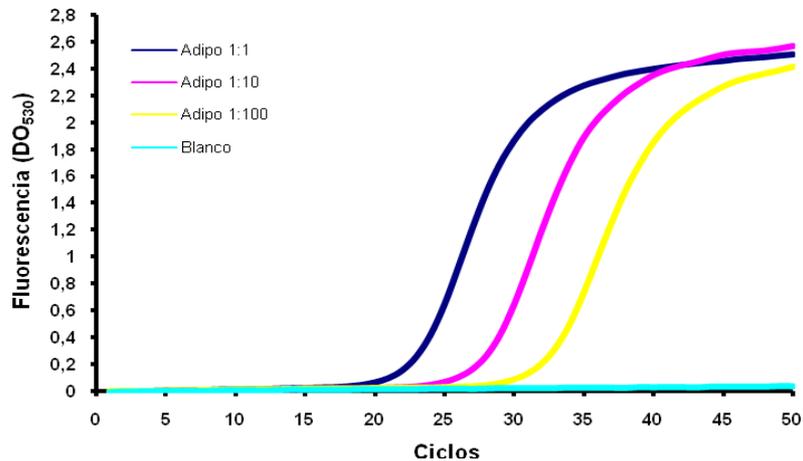
Figura 13. Fotografía de bandas de ARN de biopsias de tejido hepático. Las muestras se extrajeron por medio del kit high pure tissue kit de Roche, analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se muestra la integridad de la banda 18S y 28S de 3 muestras de tejido hepático de pacientes con EHNA junto con el marcador de peso molecular de 100pb.

Estandarización del ensayo

Para corroborar que las concentraciones tanto de los iniciadores, de la muestra y de la sonda fueran las correctas el ensayo de PCR tiempo real fue sometido a estandarización con el objetivo de establecer una curva patrón para cada gen por medio del método de la curva estándar. La curva se construye al graficar el logaritmo de la concentración del gen buscado en función de un punto de cruce calculado al inicio de la fase exponencial. Los genes contemplados para el análisis fueron: adiponectina (Figura 14), leptina (Figura 15), B-actina (Figura 16), así como del receptor de leptina y receptor 2 de adiponectina; las reacciones se realizaron a partir de diluciones seriales de ADNc de tejido de expresión conocida para los genes de estudio que para este caso fue tejido adiposo a tres diferentes concentraciones (concentrado, 1:10, 1:100 y el control negativo). Las diluciones seriales representan el rango para la detección del ARN, con bajo volumen de muestra 0.02-2 μ L de ADNc de tejido hepático. La detección de la amplificación se realizó con sondas TaqMan en combinación con los oligonucleotidos específicos para cada gen por PCR en Tiempo Real, la amplificación se obtuvo en un rango en ciclos de 20 a 32. Con una eficiencia de amplificación óptima, mayor a 1.8 y con un error de regresión lineal aceptable menor a 0.05 (Figura 14). Una vez obtenidas las curvas de amplificación para las diluciones seriales el programa calculó la curva de calibración y la eficiencia obtenidas para tres de los cinco genes contemplados en el estudio.

ADIPONECTINA

Curvas de amplificación (Adiponectina)



Curva estándar

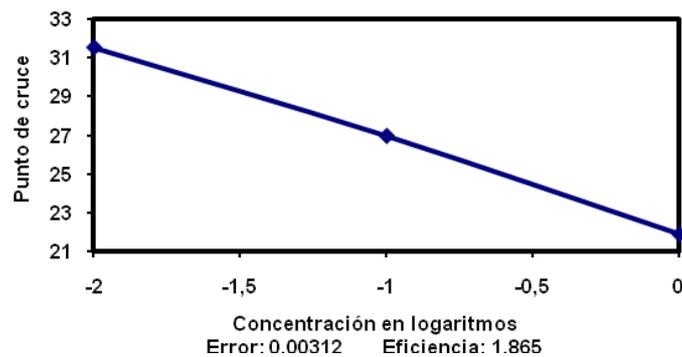
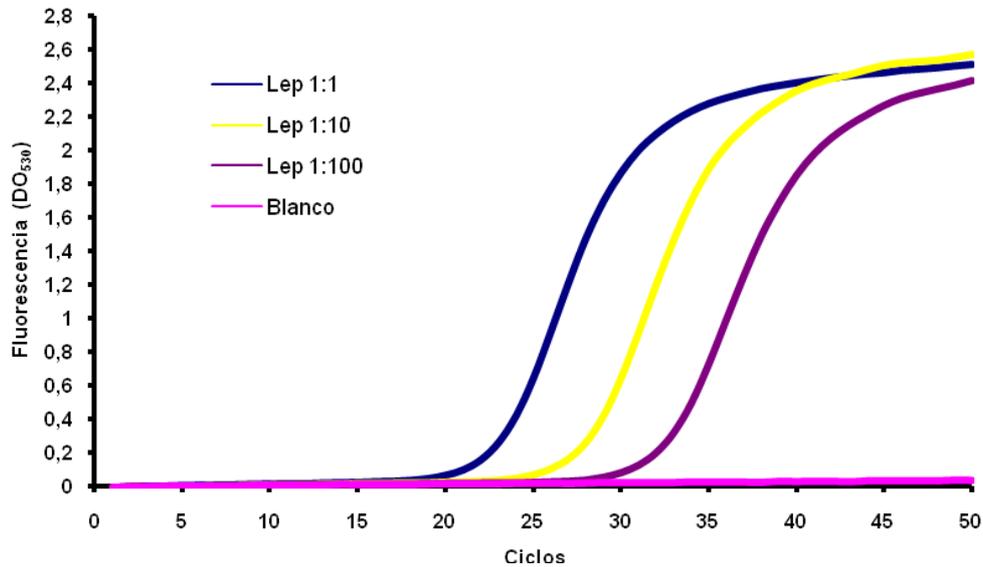


Figura 14. Curva de calibración de la expresión Adiponectina en muestras de tejido adiposo a 3 diferentes concentraciones: 1) 1:1 o concentrada, 2) Dilución 1:10, 3) Dilución 1:100 y el negativo, a 50 ciclos de amplificación por medio de la reacción de PCR en relación a la fluorescencia emitida a 580 nm. En la segunda figura se muestra la curva de calibración en donde se observa la recta de regresión lineal de los 3 puntos de las diferentes concentraciones de la muestra en logaritmos en relación a el punto de cruce del inicio de la amplificación, así mismo, se muestra el valor del error de la recta y la eficiencia de la amplificación.

LEPTINA

Curvas de amplificación (Leptina)



Curva estándar

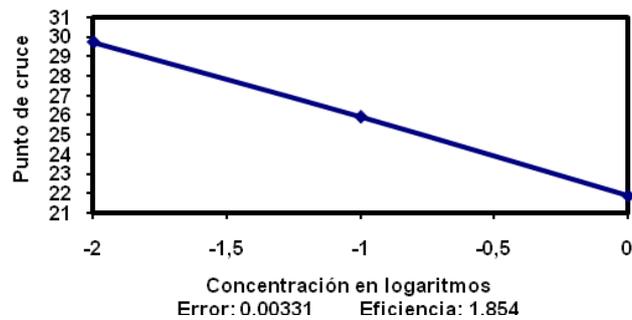
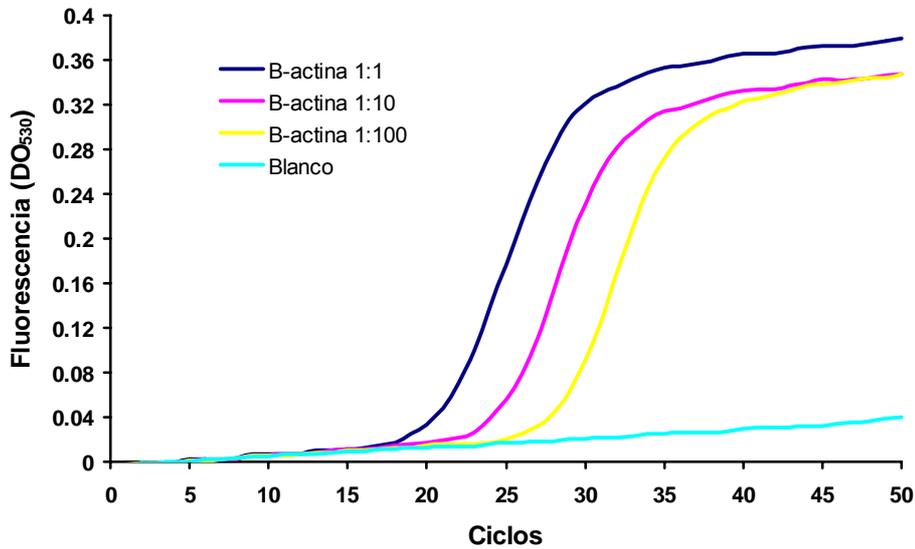


Figura 15. Curva de calibración de la expresión Leptina en muestras de tejido adiposo a 3 diferentes concentraciones: 1) 1:1 o concentrada, 2) Dilución 1:10, 3) Dilución 1:100 y el negativo, a 50 ciclos de amplificación por medio de la reacción de PCR en relación a la fluorescencia emitida a 580 nm. En la segunda figura se muestra la curva de calibración en donde se observa la recta de regresión lineal de los 3 puntos de las diferentes concentraciones de la muestra en logaritmos en relación a el punto de cruce del inicio de la amplificación, así mismo, se muestra el valor del error de la recta y la eficiencia de amplificación obtenida.

B-ACTINA

Curvas de amplificación (B-actina)



Curva estándar

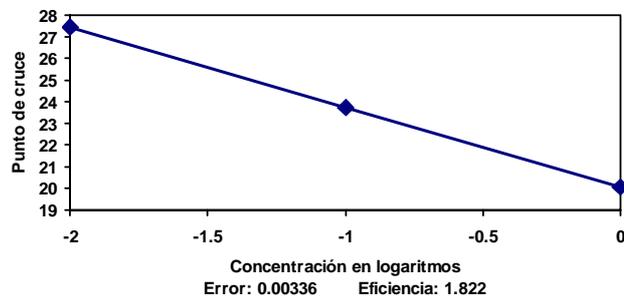


Figura 16. Curva de calibración de la expresión B-actina (Gen constitutivo) en muestras de tejido adiposo a 3 diferentes concentraciones: 1) 1:1 o concentrada, 2) Dilución 1:10, 3) Dilución 1:100 y el negativo, a 50 ciclos de amplificación por medio de la reacción de PCR en relación a la fluorescencia emitida a 580 nm. En la segunda figura se muestra la curva de calibración en donde se observa la recta de regresión lineal de los 3 puntos de las diferentes concentraciones de la muestra en logaritmos en relación a el punto de cruce del inicio de la amplificación, así mismo, se muestra el valor del error de la recta y la eficiencia de la amplificación.

Características del grupo de estudio.

El grupo de estudio (n=32) se dividió para el análisis de los resultados de acuerdo al diagnóstico histopatológico (por un médico hepatopatólogo) en tres grupos: sin esteatosis (n=7), esteatosis simple (n=15) y EHNA (n=10) para determinar diferencias entre la expresión de ARN de Leptina, Adiponectina, LepR y AdipoR2, en diferentes estadios del desarrollo y de la historia natural de la EHNA, así mismo para establecer los factores, variables, parámetros y características clínicas asociadas con la progresión de esteatosis a EHNA, se determinaron diferencias entre los grupos respecto a las variables contempladas. Los niveles de expresión de LepR y AdipoR2, así como las características clínicas, demográficas, antropométricas y serológicas de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 6, en la que se observan los valores promedio +/- desviaciones estándar.

TABLA 6. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, ANTROPOMÉTRICAS Y SEROLÓGICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

	<i>S/ESTEATOSIS</i> (n=7)	<i>ESTEATOSIS</i> (n=15)	<i>EHNA (n=10)</i>	<i>P</i>
EDAD	53.3±13.5	51.1±11.6	52.9±10.7	NS
IMC	27.5±4.8	26.4±5.1	28±4.6	NS
AST	34.1±12	54.4±36	87.5±30	0.001
ALT	37.4±10.8	62.4±35.5	98.5±46.4	0.005
GLUCOSA	82.1±6.3	96.4±32.3	104.6±26.3	0.019
TGC	113.9±45.3	151.4±57.4	161.9±102.5	NS
COL	191.1±23.4	169.6±41.9	175±54.6	NS
HDL	38.6±12.1	36.4±10.3	39.5±8.7	NS
LDL	128.9±24.4	101.9±31.9	107±24.3	NS
INSULINA	8.2±5.5	9.4±6.6	20.8±15.9	0.024
HOMA	1.71±1.23	2.14±1.55	5.01±2.98	0.032
LEPTINA	14.5±13.6	15±11.3	20.9±12	NS
ADIPONECTINA	11±3.9	12.5±7.9	14.7±10.6	NS
LEPR (ARNm)	0.124±0.07	0.123±0.06	0.120±0.06	NS (0.068)
ADIPOR2 (ARNm)	0.081±0.04	0.064±0.02	0.070±0.05	NS

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en relación a la edad, niveles de colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL. En cuanto al de IMC, niveles de triglicéridos, leptina y adiponectina sérica se encontraron niveles ligeramente más elevados en el grupo de EHNA en comparación con el grupo de esteatosis y sin esteatosis, sin embargo, tales diferencias no alcanzaron significancia estadística. Los valores de AST (87.5 ± 30 vs 54.4 ± 36); (87.5 ± 30 vs 34.1 ± 12) y ALT (98.5 ± 46.4 vs 62.4 ± 35.5); (98.5 ± 46.4 vs 37.4 ± 10.8) fueron significativamente más altos en pacientes con esteatohepatitis en relación a los pacientes con esteatosis o sin esteatosis simple ($p < 0.005$). Así mismo, también se encontraron valores significativamente más altos de Glucosa (104.6 ± 26.3 vs 96.4 ± 32.3); (104.6 ± 26.3 vs 82.1 ± 6.3), Insulina (20.8 ± 15.9 vs 9.4 ± 6.6); (20.8 ± 15.9 vs 8.2 ± 5.5) y el Índice de homeostasis (Homa IR) (5.01 ± 2.98 vs 2.14 ± 1.55); (5.01 ± 2.98 vs 1.71 ± 1.23), ($p < 0.05$) en tales pacientes (Tabla 6).

Expresión relativa de Leptina/B-actina, Adiponectina/B-actina, LepR/B-actina, AdipoR2/B-actina en el grupo de estudio.

El análisis cuantitativo por PCR en tiempo Real de la expresión relativa de leptina, adiponectina, LepR y AdipoR2 en las biopsias de tejido hepático en relación al gen de referencia B-actina demostró que, solo en un paciente del total de pacientes incluidos en el estudio se detectó la expresión del ARNm de leptina y 4 pacientes del total de pacientes incluidos en el estudio se detectó expresión del ARNm de Adiponectina. La expresión de los receptores fue analizada de acuerdo a los grupos clasificados con base en el diagnóstico histológico. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión del ARNm del receptor para adiponectina entre los grupos analizados. Se encontró una tendencia de mayor expresión del ARN del receptor de leptina en el grupo sin esteatosis en comparación con el grupo de EHNA (0.124 ± 0.07 vs 0.120 ± 0.06), sin embargo, no alcanzó significancia estadística ($p < 0.068$) (Tabla 6).

EXPRESION DE LEPR E IMC

Se realizó un análisis de correlación univariado de la expresión de los receptores de leptina y adiponectina en relación a los parámetros bioquímicos y antropométricos contemplados para el estudio. Se encontró una correlación negativa ($p=0.03$, $r=-0.85$) de la expresión del receptor 1 de leptina respecto al IMC, es decir la disminución en los niveles de ARNm del receptor de leptina está en relación con el incremento en el IMC (Figura 15).

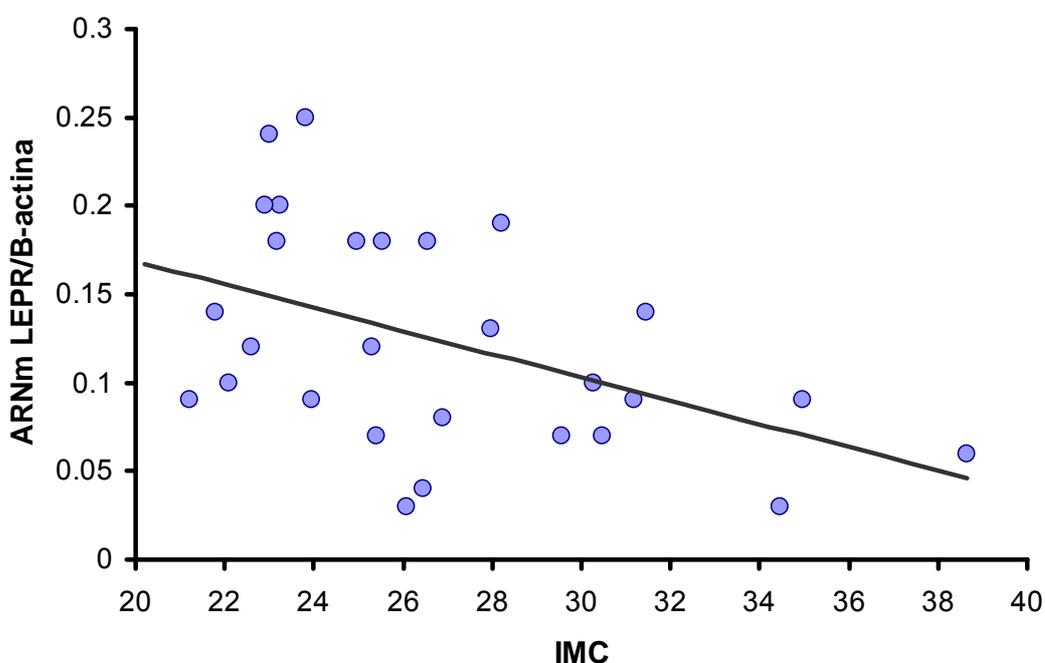


Fig 15. Grafica de expresión relativa del ARNm de LEPR/B-actina y en relación con el índice de masa corporal (IMC). La expresión de LEPR fue determinada en tejido hepático de los pacientes incluidos en el estudio por RT-PCR en tiempo real. Las cantidades de ARN fueron normalizadas en relación al gen de referencia B-actina. El IMC se diagnosticó antes de la toma de la biopsia. Correlación negativa ($r=-0.85$; $p=0.013$). Prueba de correlación de Spearman ($n=32$).

EXPRESION DE LEPR E IMC (Agrupado)

Se realizó un análisis de la expresión relativa del ARNm del receptor de leptina en relación al IMC por grupos: Normal (IMC de 20 a 24.9), Sobrepeso (IMC de 25 a 29.9) y Obesidad (IMC de 30 a 34.9), encontrando una expresión significativamente más alta del receptor de leptina en el grupo de peso normal respecto al grupo de obesidad ($p=0.034$). Sin embargo, la diferencia no fue significativa entre el grupo de IMC normal contra el grupo de sobrepeso ($p=0.24$), ni entre el grupo de sobrepeso contra obesidad ($p=0.33$).

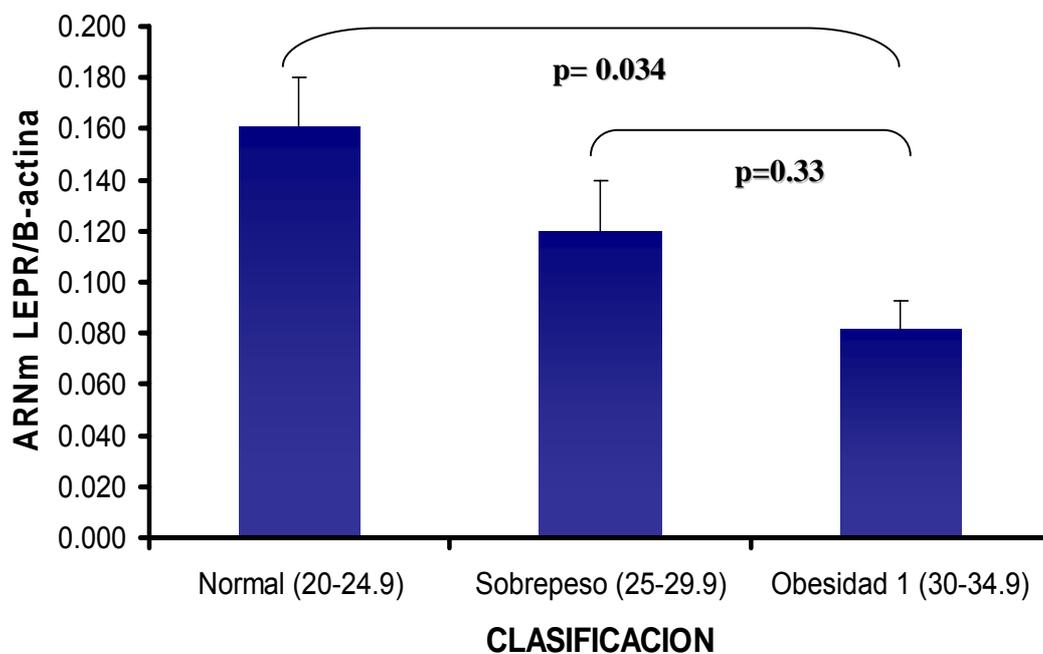


Fig 16. Grafica de expresión relativa del ARNm de LEPR/B-actina en relación al IMC por grupos.

La expresión de LEPR fue determinada en tejido hepático de los pacientes incluidos en el estudio por RT-PCR en tiempo real. Las cantidades de ARN fueron normalizadas en relación al gen de referencia B-actina. Las barras muestran el conjunto de pacientes perteneciente a cada grupo de estudio según el diagnóstico nutricional en base al IMC. Prueba de rangos de Wilcoxon ($n=32$).

EXPRESION DELEPR / FIBROSIS

Se realizo un análisis de la expresión de los receptores de leptina en función al grado de fibrosis en base al diagnóstico histopatológico de la biopsia basado en la escala de METAVIR previamente descrita. Se encontraron niveles de expresión del ARN del receptor de leptina significativamente más altos en el grupo de fibrosis grado 2 (n=11) en relación con el grupo de fibrosis grado 0 (n=9)(p=0.034). Sin embargo, la diferencia no fue significativa entre el grupo de fibrosis grado 0 contra el grupo de fibrosis grado 1 (n=11) (p=0.06) ni en el grupo de fibrosis grado 1 contra el grupo de fibrosis grado 2 (p=0.5).

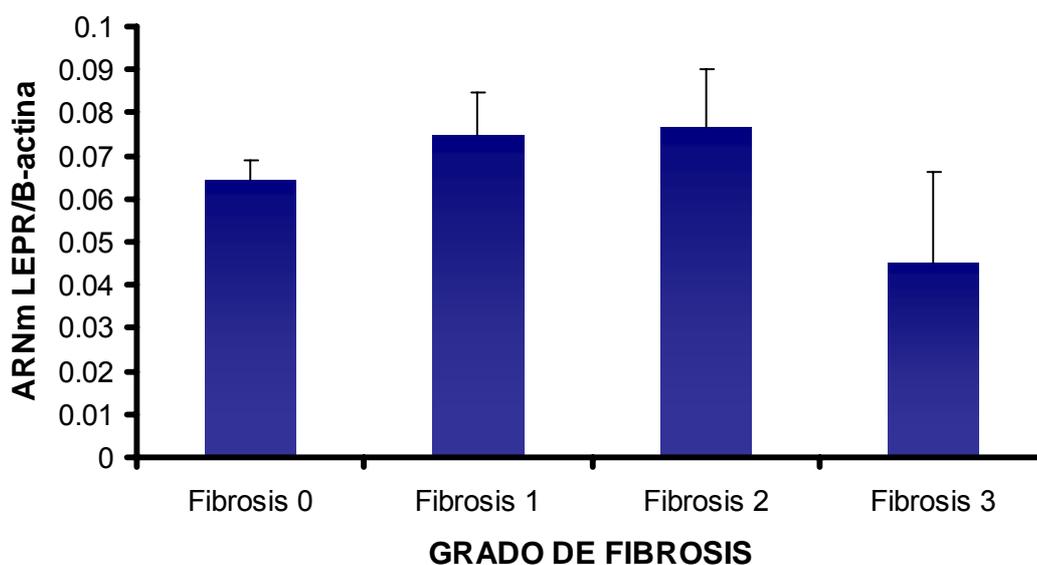


Fig 17. Grafica de la expresión relativa del ARNm de LEPR/B-actina en relación con el grado de fibrosis hepática. La expresión de LEPR fue determinada en tejido hepático de los pacientes incluidos en el estudio por RT-PCR en tiempo real. Las cantidades de ARN fueron normalizadas en relación al gen de referencia B-actina. El grado de fibrosis fue clasificado en base a la escala del METAVIR (grado 1, 2, 3 ó 4). Prueba de U de Mann Whitney para comparar la expresión relativa del receptor de leptina contra los grados de fibrosis.

9. DISCUSION

La esteatohepatitis no alcohólica ha sido fuertemente asociada con el desarrollo de obesidad abdominal, hipertensión y diabetes tipo 2. La resistencia a la insulina es uno de los mecanismos clave que ha sido implicado en la patogénesis de la EHNA. Otros factores bioquímicos liberados principalmente por los adipocitos, también contribuyen a la resistencia a la insulina periférica; entre las cuales se encuentran citocinas proinflamatorias tales como la interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral α , así como la leptina, resistina y adiponectina (Kadowaki y Yamauchi, 2005).

En este estudio se busco establecer los niveles de expresión del ARNm de leptina, adiponectina, así como sus receptores LepR y AdipoR2 en tejido hepático de pacientes con EHNA, así como, con y sin esteatosis a fin de determinar su papel en la patogénesis y la progresión de la enfermedad.

La adiponectina es una proteína sintetizada por los adipocitos, tiene propiedades antiinflamatorias, mejora la resistencia a la insulina hepática y disminuye la acumulación de lípidos (Hu y col., 1995). Se ha reportado recientemente que la adiponectina posee propiedades hepatoprotectoras (Ikejima y col., 2007). En el presente estudio la expresión del ARNm de adiponectina en el tejido hepático de los pacientes incluidos, excepto en 3 muestras, fue nula lo que sugiere que en estos pacientes la actividad proteica de la adiponectina podría estar ausente por la baja tasa de traducción del gen en el tejido hepático, este resultado es concordante con los hallazgos de estudios previos como el publicado por Vuppalanchi y col., 2005, en el cual evaluaron el papel de la adiponectina en la patogénesis de la EHNA en 35 biopsias de sujetos: sanos (n=11), esteatosis (n=12) y EHNA (n=12), en los cuales no detectaron expresión de ARNm del gen de adiponectina en ninguna de las muestras incluidas en el estudio. Sin embargo, a diferencia del estudio mencionado anteriormente, en un estudio publicado recientemente detectaron sobreexpresión del ARNm de adiponectina en pacientes con EHNA comparados con pacientes con histología hepática normal (Uribe y col., 2008).

La actividad de la adiponectina se encuentra mediada por la expresión de sus receptores: AdipoR1, el cual se expresa principalmente en el tejido muscular y por AdipoR2 el cual se expresa abundantemente en el tejido hepático (Kaser y col., 2005). En nuestro estudio en la cuantificación de la expresión relativa de AdipoR2/B-actina, se encontró ligeramente disminuido en pacientes con EHNA comparado con los pacientes sin esteatosis, por tanto se sugiere que un segundo mecanismo que pudiera limitar la acción de la adiponectina en tejido hepático de pacientes con EHNA sería la baja expresión de su receptor y por tanto sus efectos en tejido hepático se encuentran disminuidos, lo cual es importante debido a que AdipoR2 tiene alta afinidad por ambas formas de adiponectina por lo cual se inhibe el efecto de la adiponectina. Sin embargo, los hallazgos a este respecto difieren de los obtenidos en el estudio realizado por Kaser, S. y col. en el 2005 en donde encontraron aumento de la expresión de ARNm de AdipoR2 en sujetos con esteatosis comparados con los sujetos con EHNA.

En nuestra población encontramos niveles séricos más altos de adiponectina en pacientes con esteatohepatitis en comparación con los pacientes con o sin esteatosis, sin embargo, las diferencias encontradas no fueron significativas. En base a estos resultados se sugiere que el efecto de la adiponectina en sujetos con EHNA podría estar disminuido debido a la baja expresión de su receptor en el hepatocito y por tanto la inhibición de la captación de la adiponectina globular que es la que circula por vía periférica. Los hallazgos anteriores difieren de los derivados del estudio publicado por Hui y col, 2004 en donde encontraron niveles de adiponectina sérica más bajos en pacientes con EHNA que en sujetos con esteatosis.

La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo la cual produce una señal de saciedad y promueve la liberación de energía, así mismo se ha asociado con la progresión de esteatosis a fibrosis hepática (Ikejima y col., 2007). En la cuantificación relativa de la expresión del ARNm de leptina/B-actina en tejido hepático solo fue detectado en una muestra de las biopsias incluidas en el estudio, por lo que se puede

sugerir que en esta población la expresión génica de la leptina al igual que la adiponectina se encuentra limitada o ausente en el tejido hepático.

La leptina ejerce su actividad a través de su receptor que se encuentra localizado principalmente en el hipotálamo (Friedman y Halaas, 1998). Los niveles de expresión relativa del ARNm de lepR fueron más altos en pacientes con esteatohepatitis en comparación con los pacientes con o sin esteatosis, por tanto la ausencia en el ARNm de leptina y el aumento en su receptor pueden inhibir su función probablemente por deficiencia de la producción de la proteína en tejido hepático.

Se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de ARNm de LepR en sujetos con fibrosis grado 2 en comparación con los sujetos sin fibrosis por lo tanto, se puede sugerir que la leptina podría estar asociada con la progresión de la fibrosis en pacientes con EHNA.

Por otra parte, en pacientes con EHNA, encontramos niveles significativamente más elevados de leptina sérica al compararlos contra sujetos con o sin esteatosis, en consecuencia podemos pensar que se está presentando un fenómeno de resistencia a la leptina en pacientes con EHNA, incluso los niveles de leptina sérica se puede sugerir como factores pronósticos independientes de la esteatosis hepática en nuestra población de estudio, lo cual apoya a los estudios realizados por Chitturi y col, 2002 y Chalasani y col, 2003. Otro factor que pueden contribuir al incremento en los niveles séricos de leptina en pacientes con EHNA es la hiperinsulinemia ya que en el estudio publicado por Wauters y col, 2000 determinaron que la hiperinsulinemia crónica se encuentra en asociación directa con la hiperleptinemia persistente, en nuestra población de estudio los niveles séricos de leptina fueron significativamente más elevados en pacientes con EHNA que en sujetos con y sin esteatosis.

El valor del IMC fue ligeramente más alto en el grupo de EHNA que en los otros grupos, sin embargo, las diferencias no fueron significativas, además la mayoría de los

pacientes incluidos en el estudio mostraron un IMC menor a 30 con diagnóstico de sobrepeso, por lo que en nuestra población la obesidad no fue considerado un factor determinante en el desarrollo o en la progresión de esteatosis a EHNA. Aunque, el IMC correlaciono negativamente con la expresión de LepR por lo que se puede pensar que la leptina puede tener un mejor efecto a nivel hepático en sujetos delgados en comparación con sujetos con sobrepeso u obesidad. Así mismo, se encontraron niveles mas altos de este receptor en pacientes con un grado de Fibrosis intermedio en comparación con aquellos que no tienen fibrosis, por lo que la leptina podría estar involucrada en la diferenciación de las células esteladas en el proceso de producción de fibrosis como ha sido reportado en estudios recientes (Ikejima, K y col., 2007).

En cuanto a los niveles de ALT también se encontraron valores más elevados que los normales en pacientes con EHNA y esteatosis tomando como valor de referencia normal aquel menor a 40 UI/L y en los pacientes sin esteatosis tales valores se encontraron dentro de rangos normales. Así mismo los niveles de AST se encontraron significativamente más elevados y arriba de los rangos normales establecidos (<40 UI/L) en pacientes con EHNA y esteatosis, encontrándose dentro de los rangos normales aquellos pacientes sin esteatosis, por lo cual se puede pensar que los niveles de AST y ALT podrían ser utilizados como indicadores del grado de esteatosis y de la progresión de esteatosis a EHNA.

Los niveles de glucosa se encontraron dentro de los niveles normales en los pacientes con y sin esteatosis de acuerdo a los niveles establecidos por la norma oficial mexicana para la prevención, tratamiento control de la diabetes 015-SSA2-1994, la cual en su ultima modificación establece que se consideran niveles de glucosa normales aquellos menores a 100 mg/dL, sin embargo, en los pacientes con EHNA, se encontraron niveles ligeramente más elevados que los rangos normales establecidos. Se encontraron niveles más altos de insulina e índice HOMA se puede sugerir que pueden ser utilizados como marcadores independientes de la esteatohepatitis de

origen no alcohólico por lo cual se puede sugerir que el grado de resistencia a la insulina es factor clave en el desarrollo de la enfermedad.

El perfil de lípidos en los pacientes con esteatosis y sin esteatosis mostró que solamente los niveles de triglicéridos más elevados en pacientes con esteatosis y EHNA que los recomendables por la norma oficial mexicana NOM-037-SSA2-2002 para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias, en pacientes sin esteatosis tales valores se encontraron dentro de los niveles recomendables. Mientras que los niveles de colesterol total, LDL y HDL se encontraron dentro de los niveles recomendables de acuerdo a la norma mencionada anteriormente.

Se encontró una correlación negativa entre la expresión de ARNm de LepR y el IMC, lo cual es consistente con el estudio realizado por Laimer y col. (2002) en el que determinaron que la pérdida gradual de peso corporal está asociado a un incremento en los niveles de ARNm de LepR, por tanto se puede sugerir que en pacientes con EHNA el índice de masa corporal juega un papel fundamental en el mecanismo de acción de la leptina modulando su actividad a través del aumento en la expresión de su receptor.

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que en nuestra población de estudio no hay expresión de leptina y adiponectina en tejido hepático de sujetos tanto sin, como con esteatosis y EHNA.

La progresión de EHNA no esta asociada con la expresión de leptina y adiponectina por lo que no pueden ser considerados marcadores de expresión génica asociados a EHNA.

No hay diferencias en la expresión de los receptores de adiponectina y leptina en tejido hepático de sujetos sin esteatosis, esteatosis y EHNA.

El IMC puede influir en los niveles de expresión del receptor de leptina lo cual puede tener un papel importante en la patogénesis y severidad de la fibrosis hepática en pacientes con EHNA y podría ser un indicador de la severidad de la enfermedad o daño hepático en EHNA.

Hay marcadores bioquímicos como los niveles de AST, ALT, glucosa, insulina así como el índice HOMA que pueden tener utilidad importante como indicadores de la progresión de esteatosis a EHNA.

PERSPECTIVAS

Estudiar marcadores moleculares asociados a los parámetros bioquímicos relacionados con la resistencia a la insulina para la identificación de huellas genéticas asociadas al desarrollo de EHNA.

11. Bibliografía

- Ambion, The RNA Company. RNA later® Tissue Collection: RNA Stabilization.
Dirección: http://www.ambion.com/techlib/prot/bp_7020.pdf
Actualización: 2007 Acceso: 20/07/07
- Adams, L. A., Angulo, P., Lindor, K. D. 2005. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*. 172(7): 899-905.
- Álvarez-Martínez, H., Pérez-Campos, E. 2002. Esteatohepatitis no alcohólica. *Rev Gastroenterol Mex*. 67(2): 118-125.
- Angulo, H. P. 2004. Enfermedad por hígado graso no alcohólico. En: Nutrición y gastroenterología. 1ra Edición. (ed) Milke, P. y Carmona, R. Masson Doyma, México. pp: 143-152.
- Baratta, M. 2002. Leptin from a signal of adiposity to a hormone mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit*. 8: RA282-RA292.
- Bedossa, P y Poynard T., for the French METAVIR cooperative study Group. 1996. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 24: 289-293.
- Bernal-Reyes, R., Saenz-Labra, A., Bernardo-Escudero, R. 2000. Prevalencia de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Estudio comparativo con diabéticos. *Rev Gastroeneterol Méx*. 65(2): 58-62.
- Cave, M., Deaciuc, I., Méndez, C., Song, Z., Joshi-Barve, S., Barve, S., McClain, C. 2007. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J of Nut Biochem*. 18: 184-195.
- Chalasani, N., Crabb, D.W., Cummings, O.W. 2003. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 98: 2771-2776.
- Chávez, T. N. C., Méndez, S. N., Uribe, E. M. y Uribe, R. M. H. 2007. Esteatohepatitis y esteatosis hepática no alcohólica: una causa común de consulta en medicina interna y gastroenterología. En: Controversias actuales en gastroenterología y hepatología. 1ra. Edición. (ed) Sánchez, A. J. F., Torre, D. A.,

López, M. E. y Uribe, E. M. Fundación Mexicana para la Salud A. C., México. pp: 157 – 168.

- Chávez-Tapia, N.C. Y Uribe, E.M. 2007. Preguntas controversiales de la esteatohepatitis no alcohólica. En: Nuevas fronteras en gastroenterología hepatología y endoscopia gastrointestinal. 1ra Edición. (ed) Valdovinos, D. M. A., Valdovinos, A. M. A., Castro, N. G., Uribe, E. M. Masson Doyma, México. pp: 245-256.
- Chitturi, S. y Farrell, G. C. 2001. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 21: 27-41.
- Chitturi, S., Farrell, G., Frost, L. 2002. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: A manifestation of lipotoxicity?. *Hepatology.* 36: 403-409.
- Cuarto Congreso Virtual de Cardiología. Dirección:<http://www.unav.es/investigacion/investigadores/memoria01-02>. Acceso: 30/05/07.
- Day, C. P., James, O. F. 1998. Steatohepatitis: A tale of two hits?. *Gastroenterology.* 114: 842-845.
- De la mora, G., Olivera, M., De la Cerda, R., Arista, J., Kershenobich, D., Uribe, M. 1994. Non-alcoholic fatty liver: 10 years experience at the Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. *Rev Invest Clin.* 46(2): 85-92.
- Fantuzzi, G. y Faggioni, R. 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology.* 60: 437-446.
- Farrell, C. G. y Larter, Z. C. 2006. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Steatosis to Cirrosis. *Hepatology.* 43(2): 99-111.
- Farrell, C. G., George, J., Hall, P. y Mc Cullough, J. A. 2005. Overview: an introduction to NASH and related fatty liver disorders. En: Fatty liver disease NASH and related disorders. 1st Edition. (ed) G. C. Farrell, J. George, P. M. Hall y A. J. Mc Cullough. Blackwell Publishing, Ohio, USA. pp: 1-12.
- Friedman, J.M, Halaas, J.L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 22: 773-770.

- Hileman, S.M., Pierroz, D.D., Masuzaki, H., Bjorback, C., El-Haschimi, K., Banks, W.A. 2002. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology*. 143: 775-783.
- Hironori, W. y Tontonoz, P. 2007. Endocrine Functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2: 31-56.
- Howard Hughes Medical Institute.
Dirección: <http://www.hhmi.org/news/friedman2-esp.html>.
Actualización: 2007 Acceso: 25/05/07.
- Hu, E., Liang, P., Spiengelman, B.M. 1995. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 3;271 (18) :10697-703.
- Hui, J.M., Hodge, A., Farrel, G.C. 2004. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?. *Hepatology*. 40: 46-54.
- Ikejima, K., Okumura, K., Kon, K., Takei, Y., Sato, M. 2007. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 22 (1):S87-92.
- Kadowaki, T. y Yamauchi, T. 2005. Adiponectin and Adiponectin Receptors. *EDRV*. 26(3): 439-451.
- Kaser, S., Moschen, A., Cayon, A., Kaser, A., Crespo, J., Pons-Romero, F., Ebenbichler, C.F., Patsch, J.R., Tilg, H. 2005. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 54: 117-121.
- Kowdley, K. V. 2006. Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 40(1): S11-S16.
- Laimer, M., Ebenbichler, C.F., Kaser, S., Sandhofer, A., Weiss, H., Nehoda, H., Aigner, F., Patsch, J.R., 2002. Weight loss increases soluble leptin receptor levels and the soluble receptor bound fraction of leptin. *Obes Res*. 10(7): 597-601.
- Lozano, C. O. 2002. Adipocitoquinas. *Revista de endocrinología y nutrición*. 10(3): 147.150.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Matsubara, K. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor,

- apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 16;221(2): 286-289.
- Martínez- López, E., Domínguez-Rosales, J.A., Hernández-Nazara, Z.H., Panduro Cerda, A. 2005. La hepatología molecular, un enfoque multidisciplinario. Esteatohepatitis no alcohólica. *Investigación en Salud.* 2: 1-8.
 - Mc Cullough, J. A. 2002. Update on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Gastroenterol.* 34(3):225-262.
 - Meier, U., Gressner, A.M. 2004. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem.* 50 (9): 1511-1525.
 - Méndez-Sánchez, N., Chávez-Tapia, N.C., Uribe, M. 2004b. Obesidad y esteatohepatitis no alcohólica. *Gac Méd Méx.* 140 (2): s67-s72.
 - Muñoz-Espinosa, E. L., Claudio-Espiricueta, J.G., Maya-Treviño, K.A., Rodríguez-López, M.G. 2002. Factores de riesgo para la esteatohepatitis no alcohólica. *Medicina Universitaria.* 4(16): 143-147.
 - Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miurna, N.H., Mazda, T., Tomita, M. 1996. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem.* 120(4): 803-12.
 - Oh, K. D., Ciaraldi, T., Henry, R.R. 2007. Adiponectin in health and disease. *Diabetes, obesity and metabolism.* 9: 282-289.
 - Organización Mundial de la Salud.
Dirección: <http://www.who.int/es/>
Actualización: 2007 Acceso: 25/07/07.
 - Pajvani, U.B., Du, X., Combs, T.P., Berg, A.H., Rajala, M.W., Schulthess, T., Engel, J., Brownlee, M., Scherer, P.E. 2003. Structure-function studies of the adipocyte secreted hormone Acrp30/Adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem.* 278: 9073-9085.
 - Paracchini, V., Pedotti, P., Taioli, E. 2005. Genetics of leptin and obesity: A Huge review. *Am. J. Epidemiol.* 162(2): 101-114.

- Pichardo-Baena, R., Paz-Gómez, F.J., Estrada-Villaseñor, E.G. 2004. Obesidad y esteatohepatitis: Aspectos histológicos. *Gac. Med. Méx.* 140(2): S33-S40.
- Poordad, F. F. 2004. The role of leptin in NAFLD Contender or pretender. *J Clin Gastroenterol.* 38 (10): 841-843.
- Reid, E., A. 2001. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* 121: 710-723.
- Roche Applied Science. Universal Probe Library.
Dirección: <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>
Actualización: 25/08/07 Acceso: 25/08/07
- Rodríguez, H. H., Jacobo, K. J. S. y Gonzáles, J. L. 2003. Esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica. En: Conceptos actuales en hepatología. 1ra. Edición. (ed) Méndez S. N. y Uribe M. Masson Doyma, México. pp: 289 – 298.
- Saltiel, A.R. 2001. You are what you secrete. *Nat Med.* 7: 887-888
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 10;270(45): 26746-26749.
- Secretaria de Salud
Dirección: <http://portal.salud.gob.mx>
Actualización: 2007 Acceso: 22/11/2007.
- Sitio del laboratorio de nutrición.
Dirección: <http://www.Labnutricion.cl/adiponectina.htm>.
Actualización: 2007 Acceso: 25/05/2007.
- Tagle. 2003. Hígado graso no alcohólico. *Rev Gastroentero Mex.* 23: 49-57.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, W., Culpepper, J., Devos, R. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. *Cell.* 83: 1263-1271.
- Tsochatzis, E., Papatheodoridis, G.V., Archimandritis, A.J. 2006. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J of Gastroenterol.* 101: 2629-2640.
- Uribe, M., Zamora-Valdez, D., Moreno-Portillo, M., Bermejo-Martínez, L., Pichardo-Baena, R., Baptista-Gonzales, H.A., Ponciano-Rodríguez, G., Uribe, M.H., Medina-

- Santillan R., Méndez-Sánchez, N. 2008. Hepatic expression of ghrelin and adiponectin and their receptors in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 7(1):67-71.
- Vuppalanchi, R., Marri, S., Kolwankar, D., Considine, R.V., Chalasani, N. 2005. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol.* 39 (3): 237-242.
 - Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Kita, S., Ito, Y., Hada, Y., Uchida, S., Tsuchida, A., Takekawa, S., Kadowaki, T. 2005. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology.* 146: 790-796.
 - Wang, Y., Kuropatwinski, K.K., White, W.D., Hawley, S.T., Hawley, G.R., Tartaglia, A.L., Baumann, H. 1997. Leptin Receptor Action in Hepatic Cells. *JBC.* 272(26): 16216-16223.
 - Wang, Y., Xu, A., Knight, C., Xu, L.Y., Cooper, G.L., 2002. Hydroxylation and Glicoxylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem.* 277: 19521-19529.
 - Wauters, M., Considine, R., Lofgren, A., Van Broeckhoven, C., Van der Auwera, J.C., De Leeuw, I., Van Gaal, L. 2000. Associations of leptin with body fat distribution and metabolic parameters in non-insulin-dependent diabetic patients: no effect of apolipoprotein E polymorphism. *Metabolism.* 49(6): 724-730.
 - Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 8(11): 1288-1295.
 - Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate anti-diabetic metabolic effects. *Nature.* 423: 762-769.
 - Yamauchi, T., Hara, K., Kubota, N. 2003. Dual roles of adiponectin/Acrp3 in vivo as an anti-diabetic and antiatherogenic adipokine. *Endocr Metabol Disord.* 3(4): 243-254.

12. Anexos:

ANEXO 1. Diseño de los iniciadores.

LEPTINA

Acceso: ENST00000308868.2|ENSG00000174697.2

LEP_HUMAN Uniprot/SWISSPROT Leptin precursor (Obesity factor) (Obese protein) (Roche Applied Science. Universal Probe library., 2007)

Utilizar la sonda de la librería: #25

Código	ID de la sonda	Primer	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
cat. no. 04688678001)	#68	Izquierda	21	170 - 190	59	43	gaaagcactttgcaattgagg
		Derecha	20	221 – 240	59	60	gtccaaccggtgactttct

Amplicon (71 nt)
**ttgtcaccaggatcaatgacattcacacacgcagtcagtcctccaacagaaagtcaccgg
ttggac**

gtaggaatcgagcgcagcgggtgcaaggccaagaagcccacctggaaggaaaatgcattggggaaccctgtg
cggattctgtggcttggccctatctttctatgtccaagctgtgccatcaaaaagtccaagatgacacaaaaccctcat
caagacaattgtcaccaggatcaatgacattcacacacgcagtcagtcctccaacagaaagtcaccggtt
ggacttcattcctgggctccacccatctgaccttccaagatggaccagacactggcagtcctaccaacagatctca
ccagtatgcctccagaaacgtgatccaaatatccaacgacctggagaacctccgggatcttctcacgtgctggccttctc
taagagctgccactggcctgggcccagtgccctggagacctggacagcctggggggtgctctggaagctcaggctact
ccacagaggtggtggccctgagcaggctgaggggtctctgaggacatgctgtggcagctggacctcagccctgggt
gctgaggcctgaaggtcacttctctgcaaggactacgttaaggaaggaactctggctccaggtatctccaggattga
agagcattgcatggacacccttatccaggactctgtcaattccctgactccttaagccactctccaaggcataagac
cctaagcctcctttgcttgaaccaaagatatatacacaggatcctattctcaccaggaagggggtccaccagcaaag
agtgggctgcatctgggattcccaccaaggtctcagccatcaacaagagttgtctgtcccctctgacctatctcccctc
actgaatgcctcaatgtgaccaggggtgattcagagagggcagaggggtaggcagagcctttggatgaccagaacaa
ggttccctctgagaattccaaggagttccatgaagaccatccacacacgcaggaactccagcaacacaagctgga

agcacatgtttatttattctgcattttattctggatggattgaagcaaagcaccagcttctccaggctctttggggtcagccag
ggccaggggtctccctggagtgacagttccaatcccatagatgggtctggctgagctgaaccattttgagtgactcgagg
gttgggttcatctgagcaagagctggcaaaggtggctctccagttagttctctcgtaactggtttcatttctactgtgactgatg
tacatcacagtgtttgcaatgggtttgcccctgagtgatctccaaggaccaggtattttaaaaagattgtttgtcaagtgtca
tatgtaggtgtctgcacccaggggtggggaatgtttgggcagaaaggagaaggatctagaatgtgttttctgaataacattt
gtgtgggtgggtctttggaaggagtgagatcattttcttctctgcaattgcttaggatgttttcatgaaaatagctctttcagg
ggggttgtagggcctggccaggcacccttgagagaagtttctggccctggctgaccccaagagcctggagaagct
gatgctttgctcaaatccatccagaataaaacgcaaagggctgaaagccatttgtggggcagtggaagctctggctttc
tccgactgctagggagtggtctttcctatcatggagtgacggtcccacactggtgactgcatcttcagagcaggggtcctt
gggtgaccctctgaatggtccagggtgatcacactctgggtttattacatggcagtgcttctatttggggcttgcagccaa
attgtagtcttctgtctgattggctcacccaagcaaggccaaaattacccaaaaatctgggggggttttactccagtggtgaag
aaaactccttagcaggtggtcctgagacctgacaagcactgctaggcgagtgccaggactccccaggccaggccacc
aggatggcccttcccactggaggtcacattcaggaagatgaaagaggaggtttggggtctgccaccatcctgctgctgtgt
tttgctatcacacagtgggtgggtgatctgtccaaggaaactgaaatcaaagcagttaactttaagactgagcacctgcttc
atgctcagccctgactggtgctataggctggagaagctcaccaataaacattaagattgaggcctgcctcagggatctt
gcattcccagtggtcaaaccgcactcacccatgtgccaaggtgggtatttaccacagcagctgaacagccaaatgcat
gggtgcagttgacagcaggtgggaaatggtatgagctgaggggggcccgtgcccagggggcccacagggaaaccctgctg
cactttgtaacatgtttacttttcagggcactttagcttctattatagccacatccctttgaaacaagataactgagaatttaaaa
ataagaaaatacataagaccataacagccaacaggtggcaggaccaggactatagcccaggctcctctgatacccaga
gcattacgtgagccaggtaatgagggactggaaccaggagaccgagcgcttctggaaaagaggagtttcgaggta
gagttgaaggaggtgagggatgtgaattgcctgcagagagaagcctgtttgttgaaggttgggtgtgagatgcag
aggtaaaagtgtgagcagtgagttacagcgagaggcagagaaagaagagacaggagggcaagggccatgctgaa
gggacctgaagggtaagaagtttgatattaaggagttgaagtagcaagttctagagaagaggctgggtgctgtggc
caggggtgagagctgctctggaaaatgtgaccagatcctcacaaccacctaatacaggctgaggtgtcttaagcctttgct
cacaaaacctggcacaatggctaattcccagagtgtaaacttctaagtataaatggtgtctgttttgaacttaaaaaa
aaaaaaaaaagtttggccgggtgcggtggctcacgcctgtaatcccagcactttgggaggccaaggtggggggatcac
aaggtcactagatggcgagcatcctggccaacatggtgaaacccctctactaaaaacacaaaagtttagctgagcgt
gggtggcgggcccctgtagtcccagccactcgggaggtgagacaggagaatcgcttaacctgggaggcggagagt
acagtgagccaagatcgcgccactgcactccggcctgatgacagagcgagattccgtcttaaaaaaaaaaaaaaaaaa
agtttgttttaaaaaaatctaaataaaataactttgccccctg.

ADIPONECTINA

Acceso: ENST00000320741.1|ENSG00000181092.1

ADIPO_HUMAN Uniprot/SWISSPROT Adiponectin precursor (Adipocyte, C1q and collagen domain-containing protein) (30 kDa adipocyte complement-related protein) (Adipocyte complement-related 30 kDa. protein) (ACRP30) (Adipose most abundant gene transcript 1) (apM-1) (Gelatin-binding protein).
(Roche Applied Science. Universal Probe Library., 2007)

Utilizar la sonda de la librería: #85

Código	ID de la sonda	Primer	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
cat. no. 04686985001	#68	Izquierda	22	55 - 76	59	50	ggttctgattccataccagagg
		Derecha	21	107 - 127	59	52	cgggcagagctaatagcagta

Amplicon (73 nt)

**ggttctgattccataccagaggggctcaggatgctgttctgaggctgttct
actgctattagctctgccg**

aggctgttgaggctgggccatctcctcctcacttccattctgactgcagctctg**ggttctgattccataccagaggggctc**
aggatgctgttctgaggctgttctactgctattagctctgccggtcatgaccaggaaaccacgactcaagggc
ccggagtctgctcccctgcccaagggggcctgcacaggttggatggcgggcatcccagggcatccgggccataatg
gggccccaggccgtgatggcagagatggcaccctgggagaagggtagaaaaggagatccaggcttatttggtccta
aggagacatcgggtgaaaccggagtaccggggctgaaggctcccaggcttccgggaatccaaggcaggaaag
gagaacctggagaaggctctatgtataccgctcagcattcagtggtgaggattggagacttacgttactatccccaacatgc
ccattcgtttaccaagatcttctacaatcagcaaaaccactatgatggctccactggtaaattccactgcaacattcctggg
ctgtactactttgcctaccacatcacagtctatatgaaggatgtgaaggctcagcctctcaagaaggacaaggctatgctctt
cacctatgatcagtagcaggaaaataatgtggaccaggcctccggctctgtctctgcatctggagggtggcgaccaa
gtctggctccagggtgatggggaaggagagcgtaatggactctatgctgataatgacaatgactccacctcagcaggctt
cttcttaccatgacaccaactgatcaccactaactcagagcctcctccaggccaacagccccaagtcaattaaagg
ctttagtagcggtaggaagttgattattatgttggaggcctttagatattattcattcatttactcatttattcattcattc
cgagtaactttaaaaaatcatatgctatgttccagctcctggggagcttcacaaacatgaccagataactgactagaaa
gaagtagttgacagtgctattttgtgccactgtctcctgatgctcatatcaatcctataaggcacagggacaagcattct
cctgttttacagattgtatcctgaggctgagagagtttaagtgaatgtctaaggctcacacagtattaagtacagtgctagaa

atcaaaccagagctgtggactttgtcactagactgtgccctttatagaggtacatgttctctttggagtggtgtaggtgtct
gttcccacctcacctgagagccattgaatttgccttctcatgaattaaaacctcccccaagcagagcttctcagagaaa
gtggttctatgatgacgtcctgtcttgaaggactactactcaatggcccctgcactacttacttcttacctatgtccctct
catgcctttccctccaacggggaaagccaactccatcttaagtgccgaactcatccctgttctcaaggccacctggcca
ggagcttctctgatgtgatatccactttttttttgagatggagctcactctgtcaccaggctggagtacagtacacgac
ctcggctcactgcagcctcttctcctgggtccaagcaattatgtgcctcagcctcccagtagctgagactcaggtgcat
tccaccacacatggctaattttgtattttagtagaaatggggttcgtcatgttgccaggctggtctcgaactcctggcctag
gtgatccaccgctcgacctccaaagtgtgggattacaggcatgagccaccatgccagctgatctcactttttattt
tgccatggatgagagctcctgggtgtgaggaacacctcccaccaggctagaggcaactgccaggaaggactgtgctc
cgtcacctctaaatccctgcagatccttgataaatgcctcatgaagaccaatcttgaatcccatatctaccagaattaa
ctccattccagctctgcatgtaatcagtttatccacagaaacattttcatttaggaaatccctggtttaagtatcaatcctgtt
cagctggacaatatgaatctttccactgaagttaggatgactgtgattttcagaacacgtccagaattttcatcaagaag
gtagcttgagcctgaaatgcaaaacctatggaggaattctgaagccattgtctccttgagtaccaacagggctcagggaa
gactgggcctcctgaattattattgttcttaagaattacaggtgaggtagttgatggtggtaaacttctcaggagacaa
taactccagtgatgttctcaaagatttagcaaaaacagagtaaatagcattctctatcaatataaaattaaaaaactatc
ttttgcttacagtttaattctgaacaattctctcttatatgtgtattgctaatacattaaggtattttttccacataaaagcttgt
cttttgttgttgttgttttaagatggagttccctctgttgccaggctagagtgagtgccatgatctcggcttactgcaacct
ttgctcccagggtcaagcgattcttctgcctcagcctcccagtagctgggaccacaggtgcctaccaccatgccaggct
aattttgtatttttagtaaagacagggttcccatattggccaggctggtctcgaactcctgacctgtgatctgccgcctcc
attttgttatttttgagaaagatagatatgaggttagagagggatgaagaggtgagagtaagcctgtgttagtcaga
actctgtgtgtgaatgtcattcacaacagaaaacccaaaatattatgcaactactgtaagcaagaaaaataaggaa
aaatggaaacatttattcctttgcataatagaaattaccagagttgttctgtcttttagataaggttgaaccaagctcaaaac
aatcaagaccctttctgtatgtccttctgttctgcctfccgagtgtaggctttaccctcaggtgctacacagtatagttctagg
gttccctcccgatataaaaagactgtggcctgccagctctcgtatcccaagccacaccatctggctaaatggacatc
atgtttctggatgcccagagagaggaagctctttccagatgcccagcaagtgtaacctgtcatctcattg
ctctggctgagttgtgtcctgttctgaccaatcactgagtcaggaggatgaaatattcatattgacttaattgcagcttaagtt
aggggtatgtagaggtatttccctaaagcaaaattgggacactgttatcagaaataggagagtgatgatagatgcaaa
ataatacctgtccacaacaaactttaatgtgtgtttgagctttcatgagttcccagagagacatagctggaaaattcctat
tgattttctctaaaattcaacaagtagctaaagtctggctatgtctcacagctctcacatctggtgggggtgggctcctacaga
acacgctttcacagttaccctaaactctctggggcagggttattcctttgtggaaccagaggcacagagagagtgcaactga

atacagtctggctaaaaggagacttaaattattcatctgttatgtggagtcattatthaagaatctattcaggaattataact
ataaggtccatcttttatatgttctgcctgaagtgtagaagattcacctctgggtcccaaaaaggcagtttcagatggttca
ctgcaattgcagtggtcatgaatgttggaatgtcttgctgtgccaacagccaaactcaacgacactctccttatgtgttg
aaaatcacatctgggtggagtaatctccagtcacctctaattgcagttcagccataaatatggggaagcctgatccaccatt
aggttgcatatggaaatcacagatgatggaatthaagatttctgggtccagcccaccattgggtaccatttccacttcaatat
caagtgaatattcagagaattctacaacagttatcagagaagctgacaagattgtctcagctacatccctgctagtagac
agtatacttctgggtcttctgatgaggttcaggtgaggggcaagagactggatggcccaggaatctggagtgactggag
tactcctctgtctttaccacacaagatgtcatatactttccacctaataattctgacaagtggtgggtctaattgtttctttcactgc
atctataagaaggaaaacaagattgtccctcaaaagagattgtttgggtgatgaattagctgagaaaattcctcaaagc
cagtatgatgttgtagtgatcatgttagcaaagttactttttcaatctgaatgaaaccaaacctcgaggaaagttacctat
gatgcagtgactgctgcaatgaacatgaatgccatcatcgctatgctgaattatgtgattgatgcaatatcaatatctcat
gtgaaactgatgggtacttaactaaaatgacttgcagatggtcaaccagtacaatccagtcacttgcggaagcactttg
caattgaggtatcataggagcagcctttactgttctgatattccatctattcatcccatatctgagcccaaagattgcta
ttgacagatgatggttttatgaatgcattttccagccaatcttctattatctggctacacaatgtggattaggatcaatcactc
tctaggtcacttgactctccaccaacatgtgtccttctgattctgtgggtgaagccactgcctccatccagtgtaagcaga
aattactataaacattggattattgaaaatcttgggaaaagccagctttccagagaataacctcaattccagattcgcta
tggttaagtggaaaagaagtacaatggaagatgtatgaggtttatgatgcaaaatcaaaatctgtcagctctccagttcca
gactgtgtgcagctatgtgttcaggtgcgctgtaagaggctagatggactgggatattggagtaattggagcaatccag
cctacacagttgtcatggatataaaagttcctatgagaggacctgaatgtggagaataaattaatggagatactatgaaaa
ggagaaaaatgtcactttactttggaagcccctgatgaaaaatgactcattgtgcagtggtcagagatatgtgataaacat
catacttctgcaatggaacatggtcagaagatgtgggaaatcacacgaaattcactttcctgtggacagagcaagcac
atactgttacggttctggccatcaattcaattggtgcttctgttgcaaatthtaatttaacctttcatggcctatgagcaaagtaa
atatcgtgcagtcactcagtgcttatccttaacagcagttgtgtgattgtttcctggatactatcaccagtgattacaagcta
atgtattttatttgagtggaaaaatcttaatgaagatggtgaaataaaatggcttagaatcttctcatctgtaagaagtatta
tatccatgatctttatccccattgagaagtaccagttcagctttacccaatatttatggaaggagtgggaaaaaccaaaga
taattaatagttcactcaagatgatattgaaaaacaccagagtgatgcaggtttatatgtaattgtgccagtaattatttctct
tccatctattgcttgaacattattaatcacaccaaagaatgaaaaagctattttggaagatgtccgaacccaaga
attgttctgggcacaaggacttaatctcagaagagaacggacattctttgaagtctaatacatgatcactacagatgaacc
caatgtgccaactccaacagctatagagtattagaagattttacattttgaagaaggggagcaaatctaaaaaaat
cagttgaacttctgagagtaacatatggtggattatgttgattagaacttaaaatagatgtgtaaatgtgggtcaaaatgta

gattgagtcagttggatgtgtgattaatfttcaaactcatctaaagtttaaaagtagtattcatgatttctggcttttgatttgcata
 attcctggtcataaaacattaagaaaattatggctgttgctgtcattacatatctattaaatgtcatcaaatatgtagtagacaa
 tgctgtaattaggtgaactctaaaactgcaacatctgacaaatagctttaaatacaatgattataagtatggaatcagtg
 aaaatatttagttgtatftttatgtccaaactttccatttttagattcctttatagacacgtcagcctaaaaatcagcctattcgggt
 gttctttgaatatctcctggcattttgtatctaactttgttcaatctgggaatttcagtttcaatatccttgaaaatggcttaagtga
 taactccgtttcagttaaaaggaagcccgaagttgtttgtgctgcccacaggacagtgaggagttacagttcatalcagg
 atgaccctacatacccagggtcagattgacgggaccagaagggaaacatcgacttctaaccagcttctgtttaattatgac
 ctaaactaatttacttccactgaaccatccaagacctctggcagggcagggaaatgggcagtgatgcaaaaaaggag
 actctttggagctttatgaatagttcatggtgaggacagaacttttactttcagacagactgcttgctagttttatgaattcag
 cacacgaattatgctgctgtcacaftcaaaccacacacgactatgtttaatgaactcagtttcaaatftattatata
 gcgtatataatgatataatggatcccttatatttagatttaactcgtagttttattgaaagtagaaaagaactctacaaaaacgg
 gaagaatgtgtctttctcccttctgacttctaataaggtgcttgaatgtaaaatctaagtatgaaattatgaaaggacattc
 ttaattactgccactcaacacatatttaatatgtgccagattattctaaaatcttaaaaaaagatgcatatagtgaaatfttt
 aatggatatacttttaataaagttttataactcactgacaaaacatatttcaatagtatatgagtagatgagatttctatcaattat
 gagtgaatattctatctgaatgattggaaggcattacagttttgctttcaacagttactgagtagacatttttagcatgaa
 atatatcaaacacatcattgaaggacatatgtaacttgactatggttatggttttttgtatgtattcctgttttcatattgatagc
 atctaattctttgacaatcttaatatgtaggtcatttaaatfttaagacagttcagtgcatatataagtagaagccttaagaaaa
 aagaaaatgagcaagcaaatattgaaagaatgtataaacatagatttcttcagaaaaaaaaaacaggcatagga
 acagtttctctcatatattatgattatgaataataggaaagttgtattaatcagttttgtcattatgcagtttttaacctaca
 taagtctattccattattatatttgcgcttgccatatttattcctttatgcttttaactaactaactaactaactaactaacta
 tgctaaataaattgtattgtatggaatattgcttgcattatgaagaacagctgggtataaccattttcaagtaataaatctg
 aattctattagtttaaaaattgtaaaattcaagttaatgacgtgtatgatataagctgaacacattttctatagcccttaattt
 agttgtgtaattttcaaggtgatgatcaacagctttttttttgcatftttttcaatgtgtttacattgtatgaattgagctttttg
 cccacagattctgattgtgattgtttggcaggatttttctttgtgatataatcacttctataaaaaatgatgtacaaaaaa.

RECEPTOR 2 DE ADIPONECTINA

Acceso: NM_024551.2

Homo sapiens adiponectin receptor 2 (ADIPOR2), mRNA.

Utilizar la sonda de la librería: #14

Código	ID de la	Primer	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
--------	----------	--------	----------	----------	----	-----	-----------

sonda

cat. no. 04685130001)	#14	Izquierda	18	965 - 982	59	50	gggcattgcagccattat
		Derecha	19	1033- 1051	60	53	aggcccaaaaacactcctg

Amplicon (87 nt)
gggcattgcagccattatagctctcccagtgaggacatgtttgccaccctc
agtatcggggagtaagagcaggagtgttttggcct

cgcgggcggcggcagcggcggcggctacaccgggcttgccccctccctcctccgttccccctcctccccctcccctca
gcggtggctccaagaagtccgagacacgcggatcaactactatcctgaaggtccattctccaagaagaggggac
agaaagacagatctatttgaagaaaggcttgggtatcccatgaacgagccaacagaaaaccgattggggtgcagcag
gactccagagccagatataaggctcagaaaaggcaccactggatggtacacgaagaggtgataatgacagccac
caaggagatttgagcccattttagaggcatctgttctatctcccatcataaaaaagctctgaggaacatgaatacagt
atgaagctcctcaggaagatgagggctttatgggcatgtcccctctctacaagccatcatgctatggaaaaatggaa
gaattgtttgaaggtatgggaaggtcgggtggcagtgatccctcatgatgtactaccagactggctcaaggataatgact
tcctcttgcatggacaccggcctcctatgccttcttccgggctgttttaagagcattttcagaatacacacagaaacaggc
aacatttgacacatctcttaggtgtgtattcttctgtgctggggatcttttatatgtttcgcccaaatatctcctttgtggccc
tctgcaagagaaggtggtctttgatttttcttaggagccattctctgccttcttttcatggctctccacacagtctactgcc
actcagagggggtctctcggctcttctctaaactggattactctggtattgctctctgattatgggaagttttgtccttggtttat
tattcttctactgtaatccacaacctgcttcatctacttgattgtcatctgtgtgctgggcattgcagccattatagctccca
gtgggacatgtttgccaccctcagtatcggggagtaagagcaggagtgttttggcctaggcctgagtggaat
cattcctaccttgactatgtcatctcggaggggtccttaaggccgccaccatagggcagataggctgggtgatgctgatg
gccagcctctacatcacaggagctgccctgtatgctgccggatccccgaacgcttttccctggcaaatgtgacatctggt
ttactctcatcagctgtttcatatctttgtggtgctggagctttgttcaactccatggtgtctcaaacctccaggagttcgttca
tgatcggcgggggctgcagtgaagaggatgcactgtgatacctaccagtctccagggactatgacctaaaccagggc
ctcggcacttgccggcctccctgctggctactgatgccagtaccagaggagcccaaaaactttgacagcctcgtgggct
ttgtgacggcccaggggctctgctggtacatgactgagaagagaaaaacaaaaataatcatacctcaaaggatgga
gtgcatcaattgggagaaaaaggagacatagcccaaacctggcttattcttgggatctactgattgcgggctctgcaaga
cccttgcaaacctggcttctgatccatataatattttagaagatggcgaacagtttagctggtggttcttcttcccttt
ctctctctatgacaataatacaaaccaatttaagtgaacatttatatccgataaggggtgggagtgatgatttaaatgctctt
tgggagaacaaagaaatgaataagatttctaactgtttaaataagactttatataaatgtttaaacaataggggtaa
gggagggaggagaaatgtatagaatgaaacatgcaagtaccacacactgtttgaatgtgacaaaaagtgactgta

ggatcaggtgatagccccggaatgtacagtgtcttggtgcaccaagatgccttctaaaggctgacatacctggaccctaa
tggggcagagagtatagccctagcccagtggtgacatgaccactcccttgggaggcctgaggtagaggggagtggtat
gtgtttctcagtggaagcagcacatgagtggtgacaggatgtagataaaggctctagtaggggtgcattgtcattgag
agactgacacactcctagcagctggtaaaggggtgctggaggccatggaggagctctagaacattagcatgggctga
tctgattactcctggcatcccgtcactttatgggaagtctattagagggatgggacagtttccatatacctgctgtggagct
ctggaacactctctaaattccctctattaaaaatcactgccctaactacacttctccttgagggaatagaaatggaccttct
ctgacatagttctggcatgggagccagccacaaatgagattctgacgtgtccaggttctcctgagctcatctacatagatt
ggtagaccctccttggattaggaagatgagtttacctctggtacactgtcttgtaagcctggatgtgacagacacctc
ggctctcctgaataagaaagccagcagaactctaaagccagttgtagtacggagttgtcagcactcactgaacctcact
ttacagggataagagtgggtgtggcattttaaatacaatggatgttattgccaggagtgaggtacaagacgatggctcatg
tcacaggcctacctgatacgggtgcagagaaagtgggggaaaggatctgggtcatggaattctgatcttggccatagg
tgaaccacaaaatagtgtcgcagcttaggttactgtcatcaaagacttgggatgactccattatatacctggggtgtgggt
attagaactaaataggggtcctgagcatggggactggcgtcctcagtaggtgttgggaatatgggaagggctcctatt
tattcaatagagtttctcagttatttctcccttgccttgaatctccagcaaaaggtgggatctaggaagaaagaatcca
gtgtagaagttgagaagaactgaacgttttgggtctggataaggtcactgtcctaggtgctaggtggaccgagcaaaaga
ctcagtgatgaactggtgcagtgctgacagaataaagaacagtattaatcccttgagaaagcatagtccagcagga
cagtgggcatttggacagaagcccacttagtttcttgggagcaacagcacgtatcagaagccagactgtctctcgggtcat
gcacttgggatacagcgtataggtgcagccctgtcacaacaccaacagaagtagcagcctctgggtgcagtcaccac
accccaaagctggaaggatctggttcaacatagcacaacccttaggaaaaatgaaattaacatcactgatgtgtaatc
cagtaaaatctcccttttccgggtgtgtatgtgggcatgtgccatttctatgtgtgtctacgtgcagctcactaccaacagc
ctcatgtgcacttgacctgacagtgtcgtgagaactctaccaggtggcgctgaatgccttactctcagcagtcagag
gcttgctgtctgtgcagattttaaatttcttttggccctaggctggttgggacctctacagctcattcttccattaaatagt
ggccttttccagttttcccttccctttataaattatgctaaagccacaaagcacattttggggatcatagaaggttgggg
ttccagaaaggcatctgtgtgatggtccattgatgtgggatttccctacttctgtattctcagtttctaataaaaagaaccaa
atgaaatatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa.

B-ACTINA

Acceso: NM_001101.2

Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA.

Utilizar la sonda de la librería: #64

Código	ID de la sonda	Primer	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
cat. no. 04688678001)	#68	Izquierda	18	414 - 431	60	56	gaaagcactttgcaattgagg
		Derecha	20	491 - 510	59	60	tgggatgaatagatggaatatcag

Amplicon (97 nt)
Ccaaccgcgagaagatgaccagatcatgtttgagaccttcaacacccagccatgtacgttgctatccaggctgtgctatccctgtacgcctctgg

cgcgctccgccccgagcacagagcctcgcccttgccgatccgcccggccacacccgcccagctcaccatgga
tgatgatatcgccgctcgtcgtcgacaacggctccggcatgtgcaaggccggcttcgcgggcgacgatgcccccg
ggcgtcttcccctccatcggtggggcgcccaggcaccagggcgtgatggtgggcatgggtcagaaggattcctatgtg
ggcgacgaggcccagagcaagagaggcatcctcaccctgaagtacccatcgagcacggcatcgccaactggg
acgacatggagaaaatctggcaccacaccttctacaatgagctcgtgtggctcccaggagcaccctgtgctgac
cgaggccccctgaacccaagg**ccaaccgcgagaagatgaccagatcatgtttgagaccttcaacacccca**
gcatgtacgttgctatccaggctgtgctatccctgtacgcctctggccgtaccactggcatcgtgatggactccggt
gacggggtcaccacactgtgccatctacgaggggtatgccctccccatgccatcctgctctggacctggctggccg
ggacctgactgactacctatgaagatcctcaccgagcgcggctacagcttaccaccacggccgagcgggaaatcgt
gctgacattaaggagaagctgtgctacgtcgccctggacttcgagcaagagatggccacggctgctccagctcctccc
tggaagagctacgagctgctgacggccaggctatcaccattggcaatgagcggttccgctgccctgaggcactcttc
cagccttcttctgggatggagtctgtggcatccacgaaactacctcaactccatcatgaagtgtgacgtggacatcc
gcaaagacctgtacccaacacagtgtgctgtggcggcaccaccatgtaccctggcattgccgacaggatgcagaagg
agatcactgccctggcaccagcacaatgaagatcaagatcattgctcctcctgagcgaagtactccgtgtggatcggc
ggctccatcctggcctcgtgtccacctccagcagatgtggatcagcaagcaggagatgacgagtcggccccctccat
cgtccaccgcaaatgctttaggggactatgacttagttgcttacaccccttctgacaaaacctaactgcgagaaaa
caagatgagattggcatggcttattgtttttgtttgtttggttttttttttttggctgactcaggatttaaaaactggaacg
gtgaagggtacagcagtcggttgagcgcagatcccccaagttcacaatgtggccgaggactttgattgcattgtgt
tttttaatagtcatccaatatgagatgattgttacaggaagtccctggcatcctaaaagccacccacttctctaaagg
agaatggcccagtcctcctccaagtccacacaggggaggatagcattgcttctgttaaattatgtaatgcaaaatttttt
aatcttcgccttaatactttttattttttttgaatgatgagccttcgtgcccccttccccctttgtccccaacttgagat
gtatgaaggctttgtctccctgggagtggtggaggcagccagggttacctgtacactgacttgagaccagttgaata
aaagtgcacaccta.

ANEXO 2.



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

México DF., a _____, _____ de 200__.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado " Determinación de la expresión génica de adiponectina y leptina en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica ".

Registrado ante el Comité de Ética del INCMNSZ.

El objetivo del estudio es Determinar los niveles de expresión de los genes adiponectina y leptina en biopsias hepáticas de pacientes con Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), para determinar el papel de las adipocitocinas en la fisiopatología de la EHNA, así como para tratar de conocer la causa, pronóstico y evolución de la enfermedad bajo programas de investigación para tratamiento terapéutico..

Se me ha explicado que mi participación consistirá en la extracción de una biopsia hepática por medio de angiografía transyugular al igual que 10mL de sangre periférica. La muestra será obtenida a la par de una muestra similar para confirmar el diagnostico clínico de EHNA.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otra asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento (en caso de que el proyecto modifique o interfiera con el tratamiento habitual del paciente el investigador se comprometerá a dar información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento).

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el INCMNSZ.

Nombre y firma del paciente

Dr. Francisco Sánchez Ávila.
Dr. Aarón Domínguez López.
Dpto. de Gastroenterología, INCMNSZ.

Testigos



Dirección: Vasco de Quiroga 15, Colonia Tlalpan, C.P.14000. México D.F., México
Teléfonos: +(52 55) 5487 0900 +(52) 5573 0611 Fax: (52) 5655 1076
Correo-e: innsz@quetzal.innsz.mx



INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA
Descripción del procedimiento.

BIOPSIA HEPÁTICA

La biopsia hepática es el procedimiento médico necesario para la obtención de una pequeña muestra de tejido hepático para su examen directo al microscopio. Si bien los exámenes de sangre y la apreciación clínica entregan bastante información, la biopsia hepática entrega un nivel de certeza muy superior para la toma de decisiones clínicas.

Biopsia hepática vía transyugular: A través de un catéter insertado a través de la vena yugular derecha se accede a la vena suprahepática y se obtiene una muestra de tejido hepático. Esta vía tiene la ventaja de tener menor riesgo de sangrado.

El objetivo de realizar la biopsia hepática es:

Conocer el grado de lesión hepática (esteatosis, fibrosis y actividad histológica).

Establecer el diagnóstico confirmatorio de esteatohepatitis no alcohólica en el paciente con alteración bioquímica crónica de las pruebas hepáticas y sanguíneas (fosfatasa alcalina (>150 UI/L), albumina (>5.4 g/dL), bilirrubina (>2 mg/dL), tiempo de protrombina (>14 seg), ferritina serica (hombre>300 ng/mL; mujer>150 ng/mL), aspartato aminotransferasa (>40 UI/L), alanino aminotransferasa (>40 UI/L)) y cuyo diagnóstico no se ha confirmado mediante otros estudios (analíticos, radiológicos y/o endoscópicos).

Conocer la naturaleza de la lesión intrahepática, no definida con otros estudios.

Preparación:

El paciente debe permanecer en ayunas 24 horas posteriores a la realización del estudio.

Control analítico conformado por un hemograma y un estudio de coagulación para disminuir el riesgo de hemorragia.

Si esta en tratamiento con antiagregantes, anticoagulantes o antiinflamatorios, es importante suspenderlos unos días antes a la realización de la misma.

Molestias durante el examen

Se presenta una sensación dolorosa con el pinchazo de la aguja de anestesia y cuando se inyecta el anestésico. La aguja de la biopsia se puede sentir como una presión profunda y un dolor sordo, que algunas veces se siente en el hombro.

Procedimiento

Habitualmente la biopsia hepática se realiza bajo régimen de ingreso de 24 horas. La biopsia se realiza en sala de angiografía del INCMNSZ. La piel de abdomen y tórax es desinfectada. Se coloca anestesia local. Bajo control ecográfico se localiza la vena yugular derecha y se punciona. Una vez que la aguja está bien colocada, se pasa una guía metálica dentro de la luz de la vena en dirección de las cavidades cardíacas. Se retira la aguja y se introduce el introductor 8 French. Bajo control radiológico, la vaina de plástica se inserta hasta llegar a la aurícula derecha y se posiciona en la VCI suprahepática.

La posición del orificio de la vena suprahepática es localizado por medio de la inyección de algún producto de contraste. La vaina se introduce dentro de la vena. Se introduce la aguja metálica. Una vez juntas (vaina y aguja) se hace un movimiento de 180 grados y se retira de 2 a 3 cm. Luego se introduce la aguja, 1 a 2 cm dentro del parénquima hepático y los fragmentos son aspirados por una jeringa colocada en la extremidad de la vaina, en la mano del operador.

Es posible medir la presión de la vena suprahepática, y calcular el gradiente porto-cavo. El seguimiento posterior al procedimiento es el mismo que para la biopsia percutánea.



Cuidados posteriores:

El paciente puede sentir dolor leve a moderado después del procedimiento, tanto en el costado derecho como en el hombro derecho, lo cual es manejado con analgésicos.

Tras la realización de la biopsia hepática el paciente deberá permanecer en reposo y apoyado sobre la zona de la biopsia para hacer compresión local las 4 ó 6 primeras horas, que por otra parte son las horas de mayor riesgo de sangrado. Durante estas horas debe controlarse periódicamente la tensión arterial y la frecuencia cardíaca. Pasadas estas primeras horas el paciente debe permanecer encamado hasta completar 24 horas, pasadas las cuáles puede ser dado de alta y poder realizar vida normal.

Riesgos y complicaciones del procedimiento:

La biopsia hepática conlleva el riesgo de presentar complicaciones, a pesar de una buena técnica de realización y respetar las contraindicaciones.

Las complicaciones menores incluyen el dolor y el síncope vasovagal. Son las más frecuentes y fácilmente controlables

Las complicaciones mayores son menos frecuentes e incluyen:

Hemorragia. Es la complicación grave más frecuente, oscilando entre el 1,7% y el 0,062%.

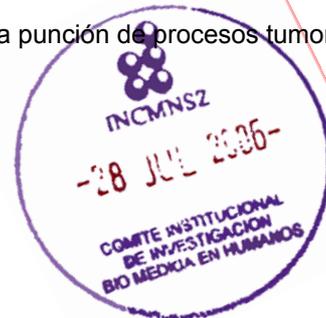
Punción de otros órganos. Es la segunda complicación en orden de frecuencia. La punción del pulmón, expresada por un neumotórax, ocurre con una frecuencia entre 0,55% y 0,35%. Se ha descrito también la punción de otros órganos como riñón, colon y excepcionalmente páncreas, glándulas suprarrenales e intestino delgado. La mayoría de las punciones de estos órganos son completamente asintomáticas.

Peritonitis biliar. Su frecuencia es de 0,22% y es debida a la punción de un conducto biliar intrahepático, de la vía biliar extrahepática o de la vesícula biliar.

Fístulas arteriovenosas. Se producen por la punción que alcanza ramas de arteria hepática y ramas venosas. Suelen ser asintomáticas y tienden a cerrarse con el tiempo.

Infección. La bacteriemia secundaria es relativamente frecuente, sobre todo en pacientes con colangitis, siendo mucho más raro la aparición de una sepsis.

Diseminación tumoral. Muy poco frecuente, y siempre secundaria a la punción de procesos tumorales.



ANEXO 3.

GLOSARIO

Adipocito: Células redondeadas del tejido adiposo que almacenan una gran cantidad de grasa en forma de triglicéridos.

Adipocítocinas: Proteínas bioactivas producidas y secretadas por el tejido adiposo.

ADN: Ácido desoxirribunocleico, molécula polimérica formada por la combinación de cuatro tipos distintos de bases o nucleótidos denominados: timina, adenina, citosina y guanina; posee una estructura lineal como hebra o cadena, que contiene la información genética.

ALT: Alanina transaminasa. Enzima involucrada en el metabolismo del aminoácido alanina. Se encuentra en mayor concentración en el hígado y se libera al torrente sanguíneo como resultado de un daño agudo al hígado.

ARN: Acido ribonucleico.

ARNm: Molécula de ARN que porta la información genética desde el gen hasta los ribosomas, en los cuales se lleva a cabo la traducción de proteínas.

AST: Aspartato transaminasa. Enzima que cataliza la degradación del ácido aspártico en ácido fumarico y amonio transfiriendo un grupo amino del ácido aspártico a otra molécula.

Biopsia: Extirpación de un pequeño fragmento de tejido vivo de un órgano u otra parte del cuerpo para su examen microscópico a fin de conservar o establecer un diagnóstico, estimar un pronóstico o seguir la evolución de una enfermedad.

Carcinoma hepatocelular: Tumor maligno del hígado.

Cirrosis: Enfermedad degenerativa crónica del hígado en la que los lóbulos se convierten en tejido fibroso, el parenquima se degenera y se produce una infiltración grasa. La mayoría de las funciones hepáticas se deterioran entre ellas la gluconeogénesis, la detoxificación de fármacos y alcohol, el metabolismo de la bilirrubina, la absorción de vitaminas, las funciones gastrointestinales y el metabolismo

de las hormonas. El flujo sanguíneo a través del hígado queda obstruido, provocando una presión retrograda que da lugar hipertensión portal y varices esofágicas. La evolución conduce al coma hepático, a la hemorragia gastrointestinal y la insuficiencia renal.

Cromosoma: Segmento de ADN del genoma de un organismo con lo necesario para replicarse de una generación a otra y repartirse en dos células hijas. Los cromosomas están formados por la cromatina. Los seres humanos tiene 46 cromosomas; en el núcleo de cada célula hay 23 pares de cromosomas. La otra parte del ADN que contienen las células humanas se encuentra en las mitocondrias, las cuales tienen genes importantes en su propia hebra de ADN denominada en ocasiones el cromosoma número 47. Los genes del cuerpo están contenidos dentro de esos 46 cromosomas nucleares y en el cromosoma mitocondrial. Dos de estos cromosomas, el X y el Y, determinan el sexo y se denominan cromosomas sexuales. Las mujeres tienen 2 cromosomas X, y los hombres, un cromosoma X y uno Y. Los 44 cromosomas restantes se denominan cromosomas autosómicos.

Diabetes: Trastorno complejo del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas debido fundamentalmente a una falta relativa o absoluta de secreción de insulina por parte de las células beta del páncreas. Se caracteriza por poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia, hiperglucemia y glucosuria.

Dominio: Porción de una proteína con función o característica estructural propia. También se aplica a regiones de los cromosomas o cromatina con cierta autonomía funcional o estructural.

Esteatosis: Acumulación anormal de grasa, mayoritariamente en forma de triglicéridos, en el citoplasma de células parenquimatosas como los hepatocitos. Hay 2 tipos de esteatosis: esteatosis microvesicular que consiste en un daño celular agudo, en el que las células aparecen al microscopio con vacuolas pequeñas intracitoplasmáticas sin desplazamiento del núcleo y esteatosis macrovesicular en la cual el citoplasma está ocupado por una sola gran vacuola, que desplaza al citoplasma y el núcleo hacia la periferia.

Exón: Porción del ADN que codifica ARNm maduro. Estas son las regiones de un gen que contribuyen al ARN transcrito primario, que, después del proceso de corte y empalme, forma las especies maduras del ARNm, las cuales codifican las secuencias de los polipéptidos.

Expresión génica: Proceso en que la información codificada por un gen se convierte en las estructuras constituyentes y funcionales de la célula. Un gen se expresa tanto si se transcribe a ARN como producto final, como en el caso de los ARNr o ARNt, y después se traduce a proteína.

Factor de transcripción: Proteínas que participan en el inicio de la transcripción de genes de eucariotas que se unen al ADN para guiar y activar la polimerasa.

Fibrosis: Proliferación de tejido conectivo fibroso que cubre o sustituye el músculo liso o a otros tejidos normales.

Gen: Segmento de ADN con información para sintetizar una proteína o, más específicamente, un polipéptido. De forma más amplia, es un segmento de ADN con información para formar un ácido ribonucleico, ARN.

Glucocorticoides: Hormona esteroidea adrenocortical que aumenta la gluconeogenesis, ejerce un efecto antiinflamatorio o influye en un gran número de funciones corporales. La más importante de las tres hormonas glucocorticoides es el cortisol, la corticosterona es menos activa y la cortisona es totalmente inactiva hasta que se convierte en cortisol. Los glucocorticoides favorecen la liberación de aminoácidos de los músculos, movilizan los ácidos grasos almacenados en tejido adiposo y aumentan la capacidad de los músculos esqueléticos para mantener las concentraciones y evitar la fatiga. Estabilizan las membranas mitocondriales y lisosómicas, aumentan la producción de trifosfato de adenosina (ATP), promueven la formación de enzimas hepáticas claves y disminuyen la producción de anticuerpos y el número de eosinófilos circulantes. La secreción de glucocorticoides es estimulada por la hormona adenocorticotrópica de la hipófisis anterior.

Hepatitis: Trastorno inflamatorio del hígado caracterizado por ictericia, hepatomegalia, anorexia, molestias gástricas y abdominales, trastornos de la función hepática y producción de heces de color claro y orina oscura. Puede deberse a infección bacteriana o vírica, infestación parasitaria, transfusión de sangre incompatible y acción del alcohol o determinados fármacos o toxinas. Puede tener una evolución breve y leve o grave y fulminante.

Hepatocito: Célula del parénquima hepático que realiza todas las funciones del hígado.

Hígado: Es el órgano de mayor tamaño y complejidad en el organismo. Tiene más de 500 funciones. Se divide en cuatro lóbulos, contiene hasta 100 mil lobulillos y recibe dos tipos de irrigación sanguínea; la arteria hepática suministra sangre oxigenada, y la vena porta, sangre con sustancias nutritivas procedente del estómago y los intestinos. En cualquier momento el hígado contiene aproximadamente medio litro de sangre, lo que corresponde a más o menos a un 13% de la sangre circulante total del organismo. Algunas de las funciones más importantes realizadas por el hígado son la producción de bilis por los hepatocitos, la secreción de glucosa, proteínas, vitaminas y la mayoría de los demás compuestos utilizados por el organismo, el procesamiento de la hemoglobina para reutilizar su contenido ferrico y la conversión de amonio tóxico en urea. La bilis producida en el hígado se almacena en la vesícula, que se encuentra comunicada con el mismo por el conducto hepático y a través de numerosos vasos sanguíneos. Se encuentra situado en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal y ocupa casi todo el hipocondrio derecho y la mayor parte del epigastrio.

Hipotálamo: Región del diencefalo que constituye el suelo y parte de la pared lateral del tercer ventrículo. Activa, controla e integra el sistema nervioso autónomo periférico, los procesos endocrinos y múltiples funciones somáticas, como la temperatura corporal, el sueño y el apetito.

Homología: En términos evolutivos significa que se tiene origen común. En términos de biología molecular, los genes homólogos son los que se derivan de un gen ancestral común y que evolucionaron por divergencia de la secuencia original.

Hormona: Sustancia química compleja producida en determinadas células u órganos del cuerpo que desencadena o regula la actividad de otro órgano o grupo de células. Las hormonas producidas por las glándulas endocrinas son transportadas hasta el órgano diana por el torrente sanguíneo. La secreción hormonal esta regulada por neurotransmisores y por un mecanismo de retroacción que consiste en la disminución de la secreción hormonal estimulante cuando la actividad del órgano es excesiva.

Inflamación: Respuesta defensiva del organismo frente a un agente irritante o infeccioso. Puede ser aguda o crónica. Los signos cardinales son rubor, tumor, calor y dolor, junto con trastorno o impotencia funcional. El proceso se inicia como pequeño aumento de la permeabilidad vascular. En un segundo estadio la permeabilidad vascular aumenta más, produciéndose exudación de líquido, agrupamiento de leucocitos a lo largo de las paredes vasculares, fagocitosis de microorganismos, deposito de fibrina en el vaso, destrucción del detritus por los macrófagos, y finalmente migración de fibroblastos a la zona y desarrollo de células normales.

Intrón: Secuencia de ADN que se transcribe, pero que se elimina o escinde del transcrito primario en su proceso de maduración a ARNm y que por tanto no tiene información codificante para una proteína o un péptido. Sin embargo, en algunos casos contiene información regulatoria.

Kb: kilobase; múltiplo de la unidad de longitud del ADN equivalente a 1,000 bases.

Necrosis: Muerte de una porción de tejido consecutiva a enfermedad o lesión. En la necrosis por coagulación se forman trombos que bloquean el flujo sanguíneo, produciéndose la necrosis en los tejidos dístales al trombo.

Neoplasia: Crecimiento anormal de tejidos nuevos, benigno o maligno.

Neurotransmisor: Sustancia química que modifica o provoca impulsos nerviosos en una sinapsis. Son liberados por la estructura presináptica saltando hasta la neurona postsináptica.

Nucleótido: Moléculas que constituyen los eslabones de los ácidos nucleicos. Cada nucleótido tiene un azúcar (distintos en el ADN – desoxirribosa y en el ARN – ribosa),

un grupo fosfato y una base nitrogenada. Hay cuatro tipos de nucleótidos en el ADN, según las bases que contengan: adenina (A), guanina (G), timina (T), y citosina (C). En el ARN, en vez de timina hay uracilo (U).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; amplificación exponencial in vitro de moléculas de ADN a través de múltiples ciclos de desnaturalización, hibridación de oligonucleótidos y síntesis de ADN.

Región promotora: Secuencias de bases de ADN a la cual se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

Replicación: Síntesis de dos cadenas de ADN nuevas a partir de una molécula de ADN en que se utiliza como molde cada una de sus hebras.

Transcripción: Lectura del mensaje codificado por el ADN que produce la síntesis de una cadena de ARN mensajero, ribosomal o de transferencia. Este proceso requiere señales regulatorias que permitan el inicio (promotores) y el fin de la transcripción (terminadores).

Traducción: Proceso en el cual la secuencia nucleotídica del ARNm que contiene el mensaje genético determina el orden de los aminoácidos, de acuerdo con el código genético, para la formación de la cadena polipeptídica.

Transaminasas: Enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino desde un alfa-aminoácido a un alfa cetoácido, utilizando fosfato de pirodoxal y piridoxamina como coenzimas. La transaminasa glutámicooxalacética está presente normalmente en la sangre y diversos tejidos, especialmente corazón e hígado; se libera por lesión celular y la elevación de su nivel en sangre es indicativa de hepatopatía o infarto de miocardio. La transaminasa glutámico-piruvica es un constituyente normal del suero y diversos tejidos, especialmente hígado; también se libera por lesión tisular y está muy elevada en pacientes con hepatopatía.