



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**POLIMORFISMO DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA Y SU ASOCIACIÓN CON
COMORBILIDADES DE LA OBESIDAD EN POBLACIÓN MEXICANA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

WENDY ANGÉLICA OCAMPO ARCOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. ROSALINDA POSADAS SÁNCHEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA TERESA VILLARREAL MOLINA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**POLIMORFISMO DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA Y SU ASOCIACIÓN CON
COMORBILIDADES DE LA OBESIDAD EN POBLACIÓN MEXICANA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

WENDY ANGÉLICA OCAMPO ARCOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. ROSALINDA POSADAS SÁNCHEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA TERESA VILLARREAL MOLINA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2014

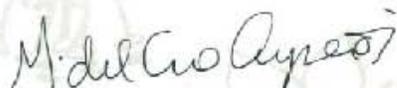
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de junio de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **OCAMPO ARCOS WENDY ANGÉLICA** con número de cuenta **98277300**, con la tesis titulada **"POLIMORFISMO DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA Y SU ASOCIACIÓN CON COMORBILIDADES DE LA OBESIDAD EN POBLACIÓN MEXICANA"**, realizada bajo la dirección de la **M. EN C. ROSALINDA POSADAS SÁNCHEZ**:

Presidente: DRA. VICTORIA CHAGOYA HAZAS
Vocal: DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ
Secretario: DRA. MARÍA TERESA VILLARREAL MOLINA
Suplente: MED. ESP. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI
Suplente: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de septiembre de 2014



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS.

Al posgrado en ciencias biológicas, UNAM

Al apoyo recibido por parte de CONACYT, Proyecto no. SALUD-2010-2-15037

Al comité tutor conformado por M en C. Rosalinda Posadas Sánchez, Dra. María Teresa Villarreal Molina y el Dr. Gilberto Vargas Alarcón por todos los comentarios y el tiempo dedicado para la revisión de este escrito.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL:

Dios: Gracias por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida, no fue fácil pero lo logre con tu ayuda, los momentos en lo que quería abandonar este sueño, siempre estuviste ahí para impulsarme a no desertar.

Mis Padres: Gracias por permitirme ser una persona independiente y desarrollarme libremente tanto en la vida laboral como en lo personal.

Familia Ocampo Manríquez: Muchas gracias por todo el apoyo de cada uno de los integrantes de esta familia. Las risas de los pequeños (Ian y Mildred) que me liberaban del estrés. Y las pláticas con Bety y Soco que también me ayudaban a decidir lo mejor para mí.

Rosalinda Posadas: Muchas gracias por aceptar ser mi tutora una vez más y enseñarme este mundo de la investigación, por siempre creer en mí y escucharme. Sin tu apoyo y asesoría este sueño no se estaría concluyendo. Todo lo que aprendí durante todo el tiempo que fuiste mi tutora es algo que nunca olvidare. Gracias por permitirme crecer en ámbitos laborales y personales.

Dr. Carlos Posadas: Gracias por todos los consejos y regaños, que me permitieron crecer académicamente.

Brenda: Gracias por todos los momentos en los que me apoyaste, ya sea escuchándome o dando tu opinión, en los momentos en que más lo necesitaba. Muchas gracias por esas tardes de plática que nos permitían a las dos liberarnos un poco del estrés del trabajo.

Mis amigas de toda la vida; Carla, Moni, Maya, Ceci, Esme: Debo agradecerles por estar ahí siempre que las necesitaba, a pesar de que ya no nos vemos tanto. Eso es la verdadera amistad. En esta etapa de la maestría, hubo momentos muy difíciles pero ustedes siempre estuvieron ahí para darme unas palabras de aliento y sin ese apoyo el concluir este sueño hubiera sido muy difícil.

Viri, Ale y Fabi. Muchas gracias, porque sin ustedes el ingreso a la maestría hubiera sido más frustrante y estresante de lo que fue. Niñas las quiero mucho y les agradezco la forma en que me ayudaron para que yo pudiera iniciar este sueño.

Nancy: Muchas gracias por todas las asesorías que me diste para aprender a hacer análisis y también por todo el tiempo que me escuchaste cuando necesitaba platicar, sin lugar a dudas sin toda tu ayuda este trabajo hubiera sido más difícil.

Carlos: Gracias por haber estado conmigo, al inicio de este proceso y durante la crisis existencial que tuve a la mitad de la maestría. Gracias por decirme que yo podía y que era una persona muy capaz. A pesar de lo mal que ha estado nuestra relación, estos momentos positivos de verdad me ayudaron mucho.

Jannine: Gracias amiga por todas las formas en las que me has ayudado (muchas por cierto), te quiero mucho “Jaime” y sabes que todo el *mobbing* que te hacia era por tu bien jajajajajajajajaja. Janinita muchas gracias, por estar conmigo en esta etapa de la maestría, tú sabes que pase una etapa difícil y el tiempo que me dedicaste fue increíble. Espero que sigan muchos años de amistad, eres una gran persona.

Nely: Mi secretaria bilingüe con computación (*Instituto Fleming* jajajajaja), tengo tanto que agradecerte que no se ni por dónde empezar. Muchas gracias por tantos artículos traducidos, tantos textos mal redactados que me corregiste, tantas dudas que me resolviste y hasta apoyo económico. También debo agradecerte por brindarme tu amistad y por estar conmigo cuando atravesé la etapa difícil de los 30, jajajajajaja. Esos momentos en los que decíamos tantos tonterías y nos volvíamos más “cultas” (los puercos no sudan) me hicieron muy feliz, a pesar del bullying (decías que no respire cuando nació jajajajajajajajaja).

Rene: Chamaquito, a pesar de que tuvimos un inicio un poco tormentoso ahora eres una persona que estimo mucho. Gracias por aguantarme y brindarme tu amistad y obviamente gracias por todos los favores que me hiciste a lo largo de este sueño. Eres una gran persona rene y tendrás mucho éxito en tu vida (*no me olvides*).

Ilse: Roomiecinta, gracias por todo el tiempo que me hiciste reír con tanta tontería que platicábamos y por escucharme cuando lo único que quería era matar a todos jajajajajaja. Estos dos años que duró la maestría, me permitieron conocerte más y aunque eres una persona muy difícil, te estimo mucho.

Maru: Gracias por todos los consejos que me diste, a pesar del poco tiempo que llevamos tratándonos te quiero mucho.

Departamento de Endocrinología: Gracias por permitirme ser parte de este grupo de trabajo, y conocer gente como ustedes con todos sus defectos y virtudes. Los años en este departamento no los cambiaría por nada. Todo lo que aprendí ahí tanto laboral como personal me permitió crecer en muchos aspectos.

Y por último y no menos importante a la **UNAM**, por dejarme ser parte de su comunidad una vez más.

DEDICATORIA:

Dedico este trabajo a Dios por permitirme llegar hasta este momento, y a mis padres por dejarme seguir mis sueños.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
4. Antecedentes	
4.1. Obesidad	
✓ Prevalencia.....	7
✓ Consecuencias metabólicas.....	7
4.2. Esteatosis hepática	
✓ Definición y prevalencia.....	8
✓ Diagnóstico.....	8
✓ Patogénesis.....	8
4.3. Lipasa Hepática	
✓ Estructura, función, síntesis y regulación.....	10
✓ Polimorfismos en el gen de la lipasa hepática.....	12
✓ Asociación del polimorfismo C-514T y comorbilidades de la obesidad.....	14
✓ Interacción del polimorfismo C-514T y dieta.....	16
5. Planteamiento del problema.....	18
6. Justificación.....	19
7. Hipótesis.....	20
8. Objetivos	

8.1. Objetivo general.....	20
8.2. Objetivos específicos.....	20
8.3. Objetivos secundarios.....	20
9. Metodología	
9.1. Población de estudio.....	21
9.2. Análisis de la dieta.....	22
9.3. Antropometría.....	22
9.4. Análisis bioquímico.....	22
9.5. Análisis genético.....	23
9.6. Estudio de tomografía axial computada.....	24
9.7. Definición de variables.....	24
9.8. Análisis estadístico.....	25
10. Resultados.....	26
11. Discusión.....	34
12. Conclusiones.....	40
13. Bibliografía.....	41

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS	Pagina
Figura 1. Organización genómica del gen de la lipasa hepática.....	11
Figura 2. Polimorfismos del gen de la lipasa hepática.....	13
Figura 3. Desequilibrio de unión del polimorfismo C-514T.....	27
Figura 4. Concentraciones de TG y tamaño de LDL en función del genotipo y consumo de macronutrientes.....	32
Figura 5. Concentraciones de insulina y HOMA-RI en función del genotipo y consumo de grasa saturada	33

TABLAS

Tabla 1. Asociación del Polimorfismo C-514T y comorbilidades de la obesidad.....	15
Tabla 2. Interacción del Polimorfismo C-514T con dieta.....	17
Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos.....	26
Tabla 4. Características clínicas de la población.....	27
Tabla 5. Características metabólicas de la población.....	28
Tabla 6. Depósitos de grasa abdominal según el genotipo de la LH.....	29
Tabla 7. Asociación del Polimorfismo C-514T con el hígado graso.....	20
Tabla 8. Asociación del Polimorfismo C-514T con comorbilidades de la obesidad.....	30
Tabla 9. Asociación del Polimorfismo C-514T con parámetros metabólicos.....	31

ABREVIATURAS:

AGL: Ácidos grasos libres

ALT: Alanina aminotransferasa

ALP: Fosfatasa alcalina

ApoA1: Apolipoproteína A1

ApoB: Apolipoproteína B

AST: Aspartato aminotransferasa

CAC: Calcio arterial coronario

C-HDL: Colesterol de la lipoproteína de alta densidad

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

ECV: Enfermedad cardiovascular

EHNA: Esteatosis hepática no alcohólica

FRC: Factores de riesgo cardiovascular

GAT: Grasa abdominal total

GAV: Grasa abdominal visceral

GAS: Grasa abdominal subcutánea

GGT: Gama glutamiltranspeptidasa

HOMA-RI: Modelo de homeostasis de resistencia a la insulina

IAH:B: Índice de atenuación hígado: bazo

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

IL6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LH: Lipasa hepática

RI: Resistencia a la insulina

RITA: Resistencia a la insulina del tejido adiposo

TC: Tomografía computada multicorte

TG: Triglicéridos

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

SM: Síndrome metabólico

VLDL. Lipoproteínas de muy baja densidad

1. RESUMEN

Antecedentes: La esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) es una condición observada frecuentemente en los individuos con exceso de peso. Sin embargo, no todas las personas con obesidad o sobrepeso presentan EHNA, lo que sugiere la participación de otros factores dentro de los cuales destacan los genéticos. La lipasa hepática (LH) es una enzima capaz de convertir lipoproteínas de densidad intermedia en lipoproteínas de baja densidad. El gen de la LH tiene un polimorfismo funcional en la posición C-514T (o C-480T) del promotor capaz de disminuir la transcripción de esta enzima. Estudios previos han mostrado además que el alelo T se asocia con disminución en la actividad de la LH, aumento en las concentraciones del colesterol de la lipoproteína de alta densidad (C-HDL) y de la apolipoproteína A1 (apoA1), así como con un mayor contenido de grasa hepática y menor sensibilidad a la insulina.

Objetivo: Investigar si el polimorfismo C-514T del gen de la LH confiere susceptibilidad para la presencia de EHNA en población mexicana, resistencia a la insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y calcio arterial coronario (CAC). Investigar las posibles interacciones de la variante -514T con el contenido calórico y los macronutrientes de la dieta.

Metodología: Se estudiaron 1468 participantes del grupo control del estudio GEA (54±9 años y 49% hombres). A todos los participantes se les aplicaron cuestionarios estandarizados para obtener información sobre historia familiar y personal de enfermedad cardiovascular, hábitos dietéticos, actividad física, consumo de alcohol, uso de medicamentos y suplementos vitamínicos. Se realizaron mediciones de variables bioquímicas y antropométricas, se calculó el índice de masa corporal (IMC). Por medio de una tomografía axial computada se cuantificó la grasa abdominal total (GAT), la grasa abdominal subcutánea, la grasa abdominal visceral (GAV), el CAC y se identificó la presencia de hígado graso, definido como el índice de atenuación hígado:bazo <1.0. Los polimorfismos rs1800588 (-514C/T), rs1077834 y rs2070945, fueron genotipados usando sondas Taqman. Se buscaron asociaciones de este polimorfismo con la presencia de hígado

graso y otros parámetros metabólicos utilizando modelos de regresión logística y lineales generalizados.

Resultados: La prevalencia de hígado graso en la población de estudio fue de 33%. La frecuencia de los alelos de riesgo (RAF) de los polimorfismos rs1800588, rs1077834 y rs2070945 fue de: T=0.57, C=0.56 y A=0.57, respectivamente. La distribución de los genotipos del polimorfismo C-514T fue similar en sujetos con y sin hígado graso. El genotipo TT se asoció con concentraciones mayores de triglicéridos, apoA1 y menor tamaño de las LDL. No se encontró asociación del polimorfismo C-514T con la presencia de EHNA (RM 0.97 [0.76-1.23] $p_{dom}=0.79$). Los homocigotos TT tuvieron mayor riesgo (40%) de presentar DM2, hipertrigliceridemia, CAC y menor riesgo (20%) de presentar hipoalfalipoproteinemia ($p_{dom}<0.05$, para todas las variables).

Conclusiones: En población adulta mexicana, el polimorfismo C-514T del gen de la LH no se asoció con la presencia de hígado graso ni con resistencia a la insulina. Sin embargo, este polimorfismo se asoció con la presencia de DM2. Además, este trabajo describe por primera vez la asociación del polimorfismo C-514T del gen de la LH con la presencia de CAC, hallazgo que apoya el estudio de este polimorfismo para determinar su posible utilidad como marcador genético de susceptibilidad en el desarrollo de enfermedad cardiovascular en nuestra población.

2. ABSTRACT

Background: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is frequently observed in individuals with excess body weight. However, an uncertain number of obese do not have NAFLD suggesting the involvement of genetic factors. Hepatic lipase (HL) is an enzyme lipolytic capable of converting into intermediate density lipoproteins, low density lipoproteins. The HL gene promoter polymorphism C-514T is a common genetic variant that decreases the transcription of the enzyme. The C-514T polymorphism is associated with low activity of LH, higher HDL-C and apolipoprotein A1 (apoA1) levels, increased hepatic fat contents and reduced insulin sensitivity.

Objective: To investigate whether the LH gene C-514T polymorphism confers susceptibility to the presence of NAFLD, insulin resistance (IR), type 2 diabetes (T2D) and coronary artery calcium (CAC) in the Mexican population, examining its possible interaction and to seek possible gene-diet interactions analyzing total calorie intake and the proportion of macronutrients.

Methods: A total of 1468 subjects were included in the study (mean age 54 ± 9 , 49% male). All participants answer questionnaires to obtain standardized information on family and personal history of cardiovascular disease, dietary habits, physical activity, alcohol consumption, use of medications and vitamin supplements. Measurements of biochemical and anthropometric variables were performed, BMI was calculated. Through a CAT scan was quantified total abdominal fat (TAF), abdominal visceral fat (AVF), CAC and the presence of fatty liver, defined as the rate of liver: spleen attenuation was < 1.0 . Polymorphisms rs1800588, rs1077834 and rs2070945-514C/T, were genotyped using Taqman probes.

Results: In the study population the prevalence of NAFLD was 33%. The risk allele frequencies (RAF) for polymorphisms rs1800588, rs1077834, and rs2070945 were T=0.57, C=0.56, A= 0.57, respectively. Distribution of C-514T genotypes was similar in subjects with and without fatty liver. The carriers of the T allele showed increased higher levels of triglycerides, apoA1, and smaller LDL. The C-514T polymorphism was not associated with NAFLD in the Mexican population (OR

0.97 (0.76-1.23) $P_{\text{Dom}} = 0.79$). However, the risk of developing T2D, hypertirglyceridemia, and (CAC) increased approximately 40% while the risk of having hyopalhalipoproteinemia decreased approximately 20% in TT homozygotes ($P_{\text{Dom}} < 0.05$).

Conclusions: In Mexican population, the C- 514T LH polymorphism was not associated with the presence of NAFLD. However, there was indeed an association between the presence of this polymorphism and development of CAC, pointing out the necessity to keep studying the C-514T LH polymorphism to determine its utility as a marker to identify individuals with increased susceptibility to develop cardiovascular disease marker.

3. INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular (ECV) ateroesclerosa y sus complicaciones son la primera causa de muerte en hombres y mujeres mexicanos¹. El exceso de peso (sobrepeso y obesidad) es un factor de riesgo cardiovascular (FRC) establecido y la prevalencia en nuestro país es una de las más altas en el mundo². Los estudios que han analizado diferentes depósitos de grasa mediante tomografía computada han mostrado que más que la adiposidad general (obesidad), es el exceso de grasa abdominal visceral (GAV) la que confiere mayor riesgo para el desarrollo de anormalidades metabólicas y aterosclerosis. El exceso de GAV se asocia con la presencia de varios FRC que incluyen inflamación, resistencia a la insulina (RI), hiperinsulinemia, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa y dislipidemia^{3,4}. La presencia de esteatosis hepática (EH) se asocia positivamente con la obesidad general y, en mayor medida, con el exceso de GAV⁵. Tanto la EH como la GAV aumentada tienen prevalencias altas y crecientes como consecuencia de la epidemia mundial de obesidad, predominan en el sexo masculino, aumentan con la edad y tienen marcadas diferencias étnicas^{6,7}. Algunos estudios han mostrado que no es la GAV aumentada, sino la presencia de EH la condición que se asocia con las alteraciones en el metabolismo de glucosa, lípidos e insulina^{8,9}. En la EH es frecuente que exista un ambiente pro-inflamatorio crónico, los pacientes suelen cursar con elevación de proteínas inflamatorias como las interleucinas (IL) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Se ha sugerido que la EH tiene una participación directa en la etiopatogenia del proceso ateroscleroso^{10,11,12}. Una forma útil, no invasiva y ampliamente validada para estudiar la aterosclerosis coronaria, es la determinación de calcio arterial coronario (CAC) mediante tomografía computada multicorte (TC)^{13,14}. Además de medir el CAC, la TC permite en un mismo estudio cuantificar la GAV¹⁵ e identificar la presencia de esteatosis hepática, definida como el índice de atenuación hígado:bazo (IAH:B) inferior a 1.0¹⁶. La cantidad de triglicéridos (TG) que puede contener el hígado varía desde menos del 1% hasta más del 50% de su peso total¹⁷. Sin embargo, se desconocen los factores que determinan la variación interindividual en el contenido de grasa hepática y que pueden favorecer el desarrollo de EH. El

presente proyecto se enfocó en el estudio de variaciones del gen de la lipasa hepática (LH), que en otras poblaciones se ha encontrado asociado al desarrollo de anormalidades metabólicas (dislipidemia¹⁸, resistencia a la insulina¹⁹) y a la presencia de aterosclerosis subclínica, evaluada por la presencia de CAC²⁰. La LH es una enzima lipolítica sintetizada principalmente por el hígado. El gen de la LH tiene un polimorfismo funcional en la posición C-514T (o C-480T) del promotor que afecta la transcripción de la enzima²¹. Este polimorfismo es común, con frecuencias alélicas que varían de 20% en blancos americanos, 35% en coreanos, chinos e hispanos, hasta 50% en negros^{21,22,23,24,25,26}. Estudios previos han mostrado que el alelo T se asocia con baja actividad de la LH^{21,27,28}, aumento en las concentraciones del colesterol de la lipoproteína de alta densidad (C-HDL) y de apolipoproteína A1 (apoA1)^{21,18}, mayor contenido de grasa hepática y menor sensibilidad a la insulina¹⁹. Estudios que han investigado la interacción entre el polimorfismo de la LH y la dieta, han mostrado asociación entre las concentraciones elevadas de C-HDL y mayor ingesta de grasa saturada en varones portadores del alelo T.^{29,30} En otro estudio, el consumo elevado de grasa total y saturada se asoció positivamente con incremento en la actividad de la LH, además esta asociación entre la actividad enzimática y el consumo de grasa saturada fue modulada por la presencia del polimorfismo y se mantuvo después de ajustar por edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), insulina, ingesta de carbohidratos y proteínas. Solo los portadores del alelo T se ven afectados por el consumo elevado de grasa saturada con aumento en la actividad de la LH ($p_{\text{interacción}}=0.04$)³¹

4. ANTECEDENTES

4.1. OBESIDAD

✓ **Prevalencia**

En México la obesidad es un importante problema de salud pública. El aumento en las prevalencias de sobrepeso y obesidad en México se encuentran entre los más rápidos documentados en el plano mundial. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012³² (ENSANUT 2012) reportó que del año 1988 a 2012, el sobrepeso en mujeres de 20 a 49 años de edad, se incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2%. En el último periodo de evaluación (de 2006 a 2012), la prevalencia de exceso de peso en adultos ha mostrado una reducción en la velocidad de aumento, pasando de casi 2% anual en el periodo 2000-2006, a menos del 0.35% anual. A pesar de esta reducción, la ENSANUT 2012, mostró que en nuestro país la prevalencia de exceso de peso es del 70%, y la de la obesidad abdominal es de 73.9%. Ambas anormalidades son mayores en las mujeres en comparación con los hombres (73.0% vs 69.4% y 82.8% vs 64.5%, respectivamente)³². Los factores ambientales como malos hábitos dietarios, estilo de vida sedentario, influencias socioeconómicas, así como desórdenes genéticos que impactan la secreción hormonal y el metabolismo en general, dan como resultado la ganancia de peso y, por ende, aumento de la prevalencia de DM2, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) y ECV, todas ellas comorbilidades de la obesidad.

✓ **Consecuencias metabólicas de la obesidad**

En la obesidad, el tejido adiposo puede inflamarse y dar lugar tanto al aumento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias,³³ tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleucina 6 (IL6), así como a la disminución de la producción de adiponectina, hormona con efecto antiinflamatorio, que protege del efecto deletéreo de la resistencia a la insulina.

El aumento de grasa visceral se ha asociado tanto con resistencia a la insulina como con esteatosis hepática,³⁴ debido al incremento en las concentraciones de ácidos grasos libres en

circulación sistémica, este es uno de los mecanismos más estudiados y aceptados que ha tratado de explicar esta asociación. El elevado flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado, da como resultado hiperinsulinemia sistémica, así como la inhibición de la supresión de la gluconeogenesis hepática por acción de insulina. La obesidad central en presencia de resistencia a la insulina y aumento de ácidos grasos libres, se asocia con mayor actividad de la lipasa hepática, provocando una mayor hidrólisis de TG de las partículas de HDL y LDL lo que da lugar a la formación de partículas más pequeñas y densas³⁴. Existe considerable evidencia de que estas partículas son más aterogénicas y aumentan el riesgo de ECV³⁵.

4.2. ESTEATOSIS HEPÁTICA

✓ Definición y prevalencia.

La EHNA, definida como la acumulación de grasa en el hígado mayor al 5% de su peso en ausencia de consumo excesivo de alcohol (menos de 20g/día)³⁶, tiene una prevalencia cercana al 30% en población adulta, aumenta con la edad, es más común en población hispana, en el género masculino, en sujetos obesos (75%) y en aquellos con DM2 (34-74%).

✓ Diagnóstico

La biopsia hepática es el estándar de oro para el diagnóstico de hígado graso; sin embargo es un método invasivo y costoso. El ultrasonido, la imagen de resonancia magnética (IRM) y la tomografía computada (TC) son métodos no invasivos que permiten evaluar la presencia de grasa hepática³⁷.

El ultrasonido permite detectar esteatosis moderada a grave, cuando la grasa en la biopsia hepática supera el 33%.³⁸ La IRM es el mejor método no invasivo que permite detectar pequeñas cantidades de infiltración de grasa >5.56% con una sensibilidad de 72.7%- 88.5% y especificidad de 92.0%- 95.7%, pero a un costo elevado³⁸.

La tomografía computada es un método validado para medir el CAC¹⁴, cuantificar la GAV¹⁵ e identificar la presencia de esteatosis cuando la grasa hepática excede el 30%¹⁶; tiene sensibilidad

de 46.1-72.0% y especificidad del 88.1%-94.6%³⁸. Las ventajas de esta técnica es el empleo del bazo como referencia debido a que es un órgano cuya atenuación no se afecta por la presencia de grasa, tiene mayor especificidad que el ultrasonido (69.6%-85.2%) y es una técnica no invasiva. La TC identifica la infiltración de grasa en el hígado como la disminución de la atenuación del tejido hepático; el grado de disminución de la atenuación está relacionado con el grado de infiltración de grasa en el hígado: 1.6 Unidades Hounsfield (HU) por cada miligramo de triglicéridos depositado por gramo de tejido hepático³⁹. En este estudio la esteatosis hepática se definió como el índice de atenuación hígado: bazo <1 ¹⁶.

✓ **Patogénesis**

El hígado graso puede existir como esteatosis simple o progresar a estados inflamatorios más complejos y agresivos como esteatohepatitis no alcohólica, en la cual de la infiltración de grasa se acompaña de intensa actividad necro-inflamatoria y puede progresar a fibrosis y cirrosis hepática y eventualmente a insuficiencia hepática y cáncer hepatocelular⁴⁰. Aproximadamente del 3-5% de los pacientes con EHNA presentan esteatohepatitis y de estos el 20 % progresan a cirrosis. El cáncer hepático se llega a presentar en el 2.8% de los pacientes con cirrosis.

La teoría más aceptada para el desarrollo de enfermedad de hígado graso es la hipótesis de los “dos golpes”⁴⁰. La resistencia a la insulina produce aumento de lipólisis periférica, ocasiona incremento de ácidos grasos libres, que al ser captados por el hepatocito aumentan los niveles de triglicéridos (primer golpe). Este incremento de los ácidos grasos libres en el hepatocito, desencadena mecanismos de stress oxidativo tales como aumento de hierro, activación de citocromo P450, aumento de beta oxidación mitocondrial, estimulación de la lipooxigenasa y factor de necrosis tumoral. Este incremento del stress oxidativo, lleva a la activación de factores proinflamatorios y de necrosis celular (segundo golpe).

Sin embargo, se ha observado que no todos los sujetos con exceso de peso desarrollan hígado graso o alguna otra comorbilidad asociada, lo que sugiere la participación de factores genéticos. Uno de los genes candidatos es el gen de la lipasa hepática (LH).

4.3. LIPASA HEPÁTICA

✓ Estructura, función, síntesis y regulación

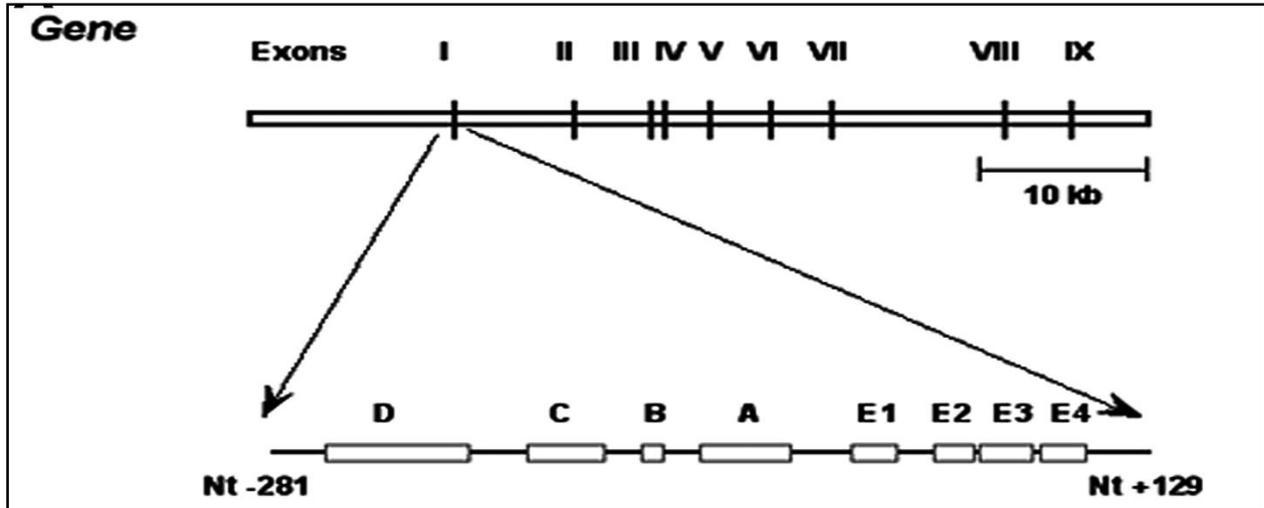
La lipasa hepática (LH) es una enzima lipolítica sintetizada por los hepatocitos y localizada en la superficie de los capilares sinusoidales⁴¹. En humanos, la enzima se encuentra unida a proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie de los hepatocitos y también en las células endoteliales sinusoidales⁴². Tiene actividad de fosfolipasa A1 y acilglicerol hidrolasa, esta actividad contribuye al remodelamiento de lipoproteínas de baja (LDL) y de alta densidad (HDL), dando como resultado partículas pequeñas y densas. Además de su actividad lipolítica, interacciona con proteoglicanos de superficie, el receptor “basurero” (SR-B1) y la proteína parecida al receptor de LDL como ligando, en la promoción de la captación hepática de lipoproteínas incluyendo partículas ricas en triglicéridos, partículas LDL y HDL⁴². Las partículas que contienen apoA-I/apoA-II son el sustrato preferido de la LH. Se ha observado que la sobreexpresión de apoA-I humana en ratones incrementa la tasa catabólica de HDL⁴¹.

El gen de la lipasa hepática (Figura 1) se localiza en el cromosoma 15 (q21.3) en humanos y en el cromosoma 9 en ratones. Tiene una longitud de 60 kb y está formado por ocho intrones y nueve exones. Se han descrito dos sitios de inicio de la transcripción, 43 y 77 nucleótidos río-arriba del codón de inicio de la traducción. La región 5'-flanking de la lipasa hepática se extiende entre los nucleótidos -1550 y +129.⁴¹

La proteína humana consiste de 499 aminoácidos, que incluye un péptido líder de 22 residuos, por lo que la proteína secretada contiene solamente 477 residuos; la secuencia de aminoácidos revela

la presencia de varios dominios funcionales; por ejemplo, dos segmentos hidrofóbicos de 10 aminoácidos involucrados en la interacción con lípidos⁴¹.

Figura 1: Organización genómica del gen de la lipasa hepática⁴¹



En la región promotora del gen de la lipasa hepática de rata, se han identificado varios elementos regulatorios nativos, tales como elementos de respuesta a colesterol (SRE), estrógenos, hormonas tiroideas, glucocorticoides y AMPc, lo que permite definir patrones potencialmente involucrados en la regulación de la expresión de la enzima. En el humano, además existe otro posible motivo cercano a la caja-E (Figura 1), que responde a glucosa y/o insulina.⁴¹

Evidencia experimental sugiere que la lipasa hepática se regula en función de la demanda de colesterol, así como por varias proteínas involucradas en la homeostasis de esteroides. Estudios clínicos han demostrado que la actividad de la lipasa hepática está regulada por el estado hormonal. Los estrógenos, nativos o alquilados (etinilestradiol), disminuyen la actividad de la lipasa hepática; mientras que los prostágenos con propiedades androgénicas (norgestrel) o esteroides anabólicos (estanozolol, oxonandrolona), la incrementan. Además, se ha demostrado que la insulina regula la transcripción de la lipasa hepática, la actividad de la LH se asoció positivamente con los niveles de insulina⁴¹. Por ejemplo, en sujetos normoglicémicos o diabéticos tipo 2, los

niveles elevados de insulina se asocian con mayor actividad de la LH y concentraciones bajas de C-HDL₂. En la diabetes tipo 1 se observa lo mismo, ya que la actividad de la LH postheparina mostró reducción del 50% y aumento después de la administración de insulina⁴¹.

La heparina es otro importante regulador de la actividad de la enzima; estimula la actividad de la LH tanto in vivo como en cultivo celular, puede estabilizar a la enzima y evita la re-endocitosis y la degradación secundaria; además, estimula la transcripción y secreción de la enzima madura⁴¹.

El tipo de dieta y algunos fármacos también regulan la actividad de la LH. Las dietas enriquecidas en colesterol reducen tanto la actividad de la LH (aproximadamente 30%) como la expresión del RNAm⁴¹. Entre los fármacos que regulan la actividad de la LH se encuentran los fibratos y las estatinas; los primeros aumentan la actividad de la LH en sujetos normolipidémicos e hipertriglicéridémicos, mientras que las estatinas disminuyen la actividad de la LH en pacientes dislipidémicos⁴¹.

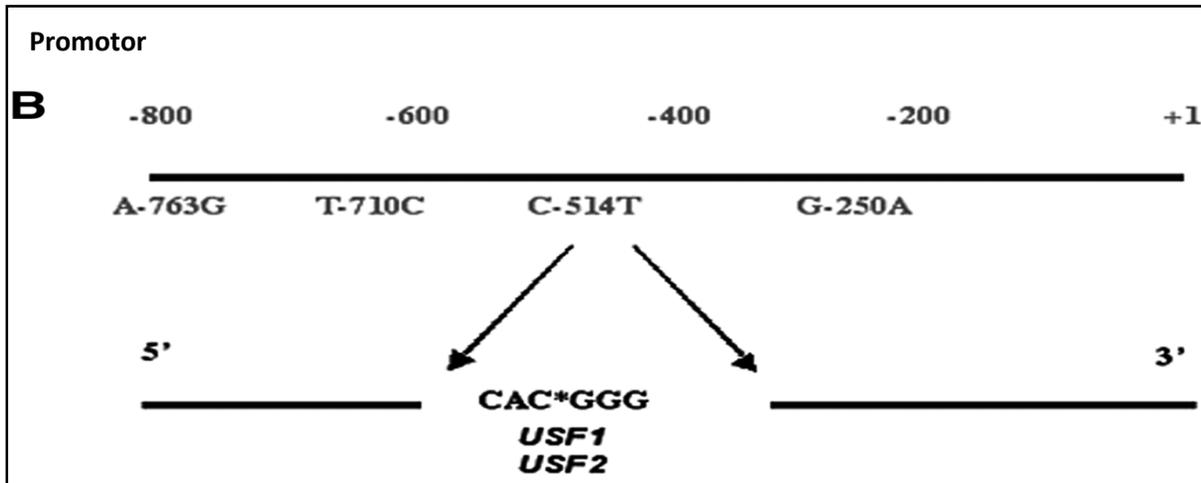
✓ **Polimorfismos en el promotor del gen de la lipasa hepática**

La actividad de la LH tiene marcadas diferencias étnicas y es mayor en hombres. Se estima que el 30-45% de la variabilidad en la actividad de la lipasa hepática está determinada genéticamente.⁴² El promotor del gen de la lipasa hepática contiene 4 sitios polimórficos G-250A, C-514T, T-710C, A-763G^{41,42,43} (Figura 2), con respecto al sitio de inicio de la transcripción, asociados con actividad de la LH. En poblaciones caucásicas, el polimorfismo C-514T, también llamado C-480T, se encuentra en completo desequilibrio de unión con los polimorfismos G-250A, T-710C, A-763G. La frecuencia del alelo menor de la variante -514T, varía entre 0.15-0.21 en Caucásicos, 0.45-0.53 en Afroamericanos y 0.47 en Japoneses e Hispanos.

La sustitución C-514T reduce la actividad transcripcional del promotor de la lipasa hepática. El sitio -514 es el centro de la secuencia CAC*GGG, un análogo del motivo característico CACGTG de una caja-E, al cual pueden unirse los factores estimuladores USF1/ 2, que participan en la

regulación del metabolismo de la glucosa y de lípidos en el hígado.⁴² La sustitución de C-514T modifica la secuencia análoga de la caja-E y modula la respuesta inducida por la insulina.

Figura 2: Polimorfismos del gen de la lipasa hepática⁴¹



La variante -514T se ha asociado con disminución de alrededor del 30 al 40 % de la actividad de la lipasa hepática, así como con un perfil de lípidos favorable que se caracteriza por presencia de partículas LDL grandes, menos densas y con incremento en las concentraciones del colesterol de HDL₂⁴². Sin embargo, se ha reportado que las lipoproteínas están enriquecidas en triglicéridos, y que la presencia de la variante se asocia con resistencia a la insulina e hiperinsulinemia^{42,43}

✓ **Interacción del polimorfismo C-514T con comorbilidades de la obesidad**

El 50% de la variación total en la actividad de la lipasa hepática está dada por el efecto combinado de obesidad visceral (14.4%), género (14.2 %), y polimorfismos en el promotor del gen LH (10.9%)⁴². La obesidad modifica la asociación entre el polimorfismo -514T y las concentraciones de colesterol de HDL⁴⁴. El efecto benéfico del aumento en la concentración de C-HDL solo se observa en sujetos portadores del alelo T con peso normal. Nie et.al⁴⁴ reportaron un efecto aditivo del IMC y el polimorfismo C-514T en la actividad de la LH. La presencia de sobrepeso, obesidad general y obesidad visceral anuló el efecto benéfico sobre las concentraciones de C-HDL.

La tabla 1 muestra los numerosos estudios que han evaluado la asociación del polimorfismo C-514T con la obesidad central o la grasa visceral, la presencia de diabetes, hígado graso, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular tanto la forma clínica como la subclínica y si esta asociación tiene efecto sobre el metabolismo de los lípidos o la enfermedad cardiovascular. Existen otros factores que debilitan la asociación entre los niveles de lípidos plasmáticos y el polimorfismo C-514T, uno de ellos es la presencia de diabetes (Tabla 1).

En sujetos con hígado graso se ha demostrado no solo el aumento en la actividad de la lipasa hepática, además se ha reportado que la actividad de la enzima correlaciona significativamente con la severidad de la esteatosis.⁴⁵ Sin embargo, la asociación del polimorfismo con el contenido de grasa hepática o la presencia de hígado graso no ha sido consistente (Tabla 1).

Tabla 1. Asociación del polimorfismo C-514T con comorbilidades de la obesidad

Autor	Descripción del estudio	Resultado	Conclusión
St-Pierre et al ⁴⁶	Población caucásica Hombres, 41 años n=235 SNP: C-514T	↑C-HDL solo en los homocigotos TT con baja adiposidad visceral en comparación con los portadores del alelo C	La obesidad anula el efecto benéfico sobre las concentraciones de C-HDL
Carr et al ²⁸	Mujeres premenopáusicas, caucásicas, ↑Grasa intrahepática. SNP: G-250A	No se observó incremento en la actividad de la LH, en los portadores del alelo A con grasa intrahepática elevada.	La presencia del polimorfismo atenúa el aumento en la actividad de la LH.
Tan et al ²²	Población China, ambos sexos. Casos y controles n= 203 Diabéticos n= 205 Controles SNP: C-514T	↑C-HDL, solo en los controles con el genotipo TT.	La diabetes anula el efecto benéfico sobre las concentraciones de C-HDL.
Stefan et al ¹⁹	Población caucásica, Hombres, n= 1076 Normoglucémicos e Intolerantes a la glucosa SNP: C-514T	↑ contenido de grasa hepática y menor sensibilidad a la insulina en los portadores del alelo T.	El alelo T confiere mayor susceptibilidad para resistencia a la insulina
Zhan et al ⁴⁷	Población japonesa Hombres Sujetos con y sin hígado graso. SNP: C-514T	La prevalencia del alelo T fue menor en los sujetos con hígado graso.	El alelo T se asocia a menor susceptibilidad de HG.
Zhan et al ⁴⁸	Población caucásica Diabéticos Obesos y delgados SNP: C-514T	El alelo T en los obesos se asoció a mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Y menor riesgo cardiovascular en los delgados.	El IMC, modula el efecto del polimorfismo sobre el riesgo cardiovascular.
Hokanson ²⁰	Población Caucásica Diabéticos tipo 1 Sujetos con y sin CAC SNP: C-514T	El alelo T fue más prevalente en los diabéticos con CAC, además de ↓C-HDL y ↑TG	La variante -514T puede identificar a sujetos con mayor riesgo de ECV

✓ **Interacción del polimorfismo C-514T con dieta**

Los datos sobre la posible interacción entre el polimorfismo C-514T y la dieta para modular las concentraciones de lípidos, son controversiales. Se ha descrito que el polimorfismo C-514T se asocia con el metabolismo de lípidos dependiendo de la cantidad y tipo de grasa consumida. La tabla 2 resume los hallazgos de estos estudios, se ha observado interacción del polimorfismo con la ingesta de ácidos grasos saturados y ácidos grasos mono insaturados sobre las concentraciones de C-HDL, pero esta no ha sido consistente, mientras algunos estudios reportan aumento en C-HDL otros observaron disminución.

Los estudios que han evaluado la asociación del consumo elevado de grasa total y grasa saturada con la actividad de la LH son contradictorios. Mientras algunos han reportado que las dietas altas en grasa total (46%) se asocian con incremento en la actividad de la enzima, otros estudios de intervención han reportado que la ingesta excesiva de grasa saturada se asocia con disminución en la actividad de la enzima, aunque en estos estudios no se evaluó el genotipo.

Tabla 2. Interacción del polimorfismo C-514T con dieta

Autor	Descripción del estudio	Resultado	Conclusión
Ordovas et al ⁴⁹	Población caucásica n= 1020 hombres n= 1110 mujeres Edad: 20-79 años Estudio Framingham	El alelo T se asoció con aumento en las concentraciones y tamaño de C-HDL solamente en sujetos con un consumo menor de 30% de grasa del total de la ingesta calórica	El consumo elevado de grasa en los portadores del alelo T, disminuye C-HDL
Zhang et al, ³⁰	780 hombres caucásicos con diabetes tipo 2 y edad promedio de 60 años. Estudio de seguimiento para profesionales de la salud (HPFS por sus siglas en ingles),	El alelo T se asoció con concentraciones elevadas de C-HDL en hombres sin sobrepeso cuando la ingesta de grasa saturada fue ≥30%.	El consumo elevado de grasa en los portadores del alelo T, aumenta C-HDL
Nettleton et al ⁵⁰	Cohorte formada por caucásicos y afroamericanos Ambos sexos N=1200	Interacción positiva entre la ingesta de grasa y el polimorfismo C-514T sobre las concentraciones de C-HDL solo en la población Afroamericana.	EL aumento de las concentraciones de C-HDL al consumo elevado de grasa es dependiente de la raza.
Tai et al ⁵¹	Población multiétnica asiática (chinos, malayos, indios) de ambos sexos N=1324 Chinos N= 471 Malayos N= 375 Hindus	Mostró que los homocigotos TT tienen altas concentraciones de triglicéridos solo cuando la ingesta de grasa es mayor al 30% de la ingesta total. Esta interacción solo se observó en población hindu y fue independiente de la edad, genero grupo étnico, IMC, consumo de alcohol, tabaco y la ingesta total de energía.	La asociación con el aumento de TG se modifica por el consumo de grasa y por la etnia.
Griett Boss ³¹ Et al.	En una muestra de sujetos del estudio Hoorn N= 211 hombres N= 218 mujeres Edad: 60–87	Existe interacción entre el polimorfismo -514C/T y el consumo de grasa total sobre la actividad de la enzima después de ajustar por edad, género, consumo de carbohidratos, insulina e índice de masa corporal. La ingesta de grasa se asoció positivamente con la actividad de la LH en sujetos con los genotipos CT y TT y de manera negativa en los sujetos CC.	El consumo elevado de grasa en los portadores del alelo T aumenta la actividad de la LH

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las anormalidades metabólicas asociadas al exceso de peso y de grasa en hígado son importantes factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), EH y ECV. La EH, RI y DM2 son condiciones de etiopatogenia multifactorial, frecuentemente observadas en los individuos con sobrepeso y obesidad sin embargo, no todas las personas con obesidad o sobrepeso las presentan, lo que sugiere la participación de factores genéticos, como se ha mostrado en otros países. Los hallazgos de esos estudios no son aplicables a la población mexicana, debido a que presenta características distintivas a las de otras poblaciones. Estas consideraciones fundamentaron el interés e importancia para realizar el presente estudio e identificar la posible asociación del polimorfismo de la LH en la susceptibilidad para la presencia de EH, RI, DM2 y calcio arterial coronario en nuestra población.

6. JUSTIFICACIÓN

Todos los estudios que han evaluado la asociación del polimorfismo C-514T con las diferentes comorbilidades de la obesidad se han realizado en población caucásica, asiática y solo uno en población hispana residentes de Perú. En México, no existen estudios que hayan evaluado la asociación del polimorfismo C-514T de la LH con EH y aterosclerosis subclínica, evaluada por la presencia de calcio arterial coronario. Debido a que nuestro país ha sufrido cambios importantes en el estilo de vida, que han dado como resultado un incremento de la obesidad; este polimorfismo podría ser un marcador genético para evaluar la susceptibilidad para el desarrollo de las comorbilidades asociadas a la obesidad.

7. HIPÓTESIS

La variante C-514T del gen de la LH se asocia con la presencia de alteraciones metabólicas relacionadas con el exceso de peso tales como la resistencia a la insulina, esteatosis hepática y diabetes mellitus tipo 2 y por tanto, puede ser un marcador de susceptibilidad para estos padecimientos en población mexicana.

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GENERAL

Investigar en población mexicana, si el polimorfismo del gen de la LH (C-514T) confiere susceptibilidad para la presencia de EH, RI y DM2, todas ellas comorbilidades de la obesidad.

8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Conocer la frecuencia alélica de la variante -514T del gen de la lipasa hepática, en población mexicana.
- ✓ Evaluar si el polimorfismo -514C/T se encuentra en desequilibrio de unión con los polimorfismos -250G/A, -710T/C, -763A/G en población mexicana.
- ✓ Determinar la prevalencia de esteatosis hepática en población mexicana.
- ✓ Establecer la asociación de la variante -514T con la presencia de esteatosis hepática.
- ✓ Analizar si existe asociación de la variante -514T con los diferentes parámetros clínicos y metabólicos en población mexicana.

8.3. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- ✓ Demostrar la posible asociación de la variante -514T con la presencia de CAC.
- ✓ Investigar las posibles interacciones de la variante -514T con el contenido calórico y de macronutrientes de la dieta sobre los parámetros metabólicos.

9. METODOLOGÍA

9.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio GEA fue diseñado en Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” para identificar y analizar las bases genómicas que predisponen a la enfermedad arterial coronaria (EAC), y examinar la relación de factores de riesgo tradicionales y emergentes con la aterosclerosis establecida y la forma subclínica de la enfermedad en población mexicana. El estudio incluyó 1200 pacientes con EAC prematura y 1500 individuos control sin manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular, de ambos géneros con edad de 30 a 75 años. Los pacientes con EAC prematura (edad al diagnóstico <55 años en hombres y <65 años en mujer) fueron seleccionados de la consulta externa y de los pacientes que acuden al departamento de Hemodinámica del INCICH. Los criterios de no inclusión fueron evento cardiovascular agudo tres meses previos al estudio, presencia de insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad hepática, renal u oncológica, distiroidismo no tratado y tratamiento con corticosteroides. Los participantes del grupo control fueron seleccionados de la población que acude con fines de donación al Banco de Sangre del INCICH y mediante invitación por medios escritos. Se incluyeron individuos sin historia personal ni familiar, en primer grado, de EAC prematura. Los participantes con historia de trastornos hepáticos, renales y oncológicos así como con problemas tiroideos sin tratamiento o tratamiento con corticosteroides no fueron seleccionados. En ambos grupos fue requisito que el participante y sus dos generaciones previas fueran mestizos (españoles-amerindios) y hubieran nacido en México. Se incluyó solo un miembro por familia que, después de conocer las características del estudio, aceptara participar mediante la firma de un consentimiento informado. El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Bioética de la Institución.

El presente trabajo incluyó a 1468 participantes del grupo control del estudio GEA, a todos los participantes se les aplicaron cuestionarios estandarizados para obtener información demográfica, nivel de escolaridad, ingreso económico, historia familiar y personal de enfermedad

cardiovascular, hábitos dietarios, actividad física, consumo de alcohol, uso de medicamentos y suplementos vitamínicos.

9.2. ANÁLISIS DE LA DIETA

La dieta habitual durante el año previo, se evaluó utilizando un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, diseñado y validado por el Instituto Nacional de Salud Pública⁵². Las kilocalorías, los gramos de grasa, proteína e hidratos de carbono contenidos en los alimentos se obtuvieron con el programa Sistema de Evaluación de Hábitos Nutricionales y Consumo de Nutrientes (SNUT).⁵³

9.3. ANTROPOMETRÍA

El peso se midió en una báscula calibrada y la talla utilizando un estadímetro de pared SECA 222 (Hamburgo, Alemania). El IMC se calculó con la fórmula (kg) / talla (m²). La circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio, en el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la última costilla y la cresta iliaca. La tensión arterial se midió en posición sedente, después de por lo menos 10 minutos de reposo, utilizando un esfigmomanómetro digital Welch Allyn, series 52000 (Shaneateles Falls, N.Y. EUA), y el promedio de las dos últimas de tres mediciones consecutivas se utilizó para el análisis.

9.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Después de ayuno de 12 horas y 15 minutos de reposo en posición sedente, se colectaron 45 mL de sangre venosa en tubos con y sin EDTA. El plasma y el suero fueron separados en alícuotas. A las alícuotas de plasma se añadieron inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 KIU/ml, Benzamidina 1mM), todas las alícuotas se conservaron a -70°C. Las determinaciones de colesterol total, TG y glucosa en plasma, se realizaron en muestras frescas con un autoanalizador Hitachi 902 (Hitachi LTD Tokio, Japan), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) se

determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania)⁵⁴. El colesterol de las lipoproteína de baja densidad (C-LDL) se calculó mediante la fórmula de Friedwald modificada por De Long⁵⁵. La precisión y la exactitud de las determinaciones de lípidos son evaluadas periódicamente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC por sus siglas en inglés). La alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), gamma glutamiltransferasa (GGT), ácido úrico, creatinina, apolipoproteína B (apoB), apoA1 y ácidos grasos libres (AGL) se determinaron en suero con el autoanalizador Hitachi 902. La proteína C reactiva se cuantificó por inmunonefelometría (BN Pro Spec Nephelometer, Dade Behring Marburg GmbH, Ge). La concentración de adiponectina se determinó por inmunoensayo (Quantikine.ELISA, R&D Minneapolis, USA). Las concentraciones de insulina en suero se determinaron por radioinmunoanálisis (Millipore Cat#HI-14K, Billerica, MA). Se estimó la resistencia a la insulina empleando el método del modelo de Homeostasis (HOMA-IR)⁵⁶. Se estimó el tamaño de las partículas de HDL⁵⁷) y LDL⁵⁸. Se determinó la resistencia a la insulina del tejido adiposo (RITA)⁵⁹.

9.5. ANÁLISIS GENÉTICO

El aislamiento de ADN se realizó por medio de extracción salina⁶⁰. Los DNA genómicos se almacenaron a -70°C hasta su uso. Los polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP por sus siglas en inglés), G250A (rs2070895), C-514T (rs1800588), T-710C (rs1077834) fueron genotipados usando ensayos de genotipificación 5' exonucleasa TaqMan, en un equipo de PCR en tiempo real ABI PRISM 7900 Sequence Detection System acorde a instrucciones de manufactura (Applied Biosystem Foster City, CA, USA). Los resultados se analizaron usando un software de discriminación alélica que permite definir los distintos alelos. La estimación del desequilibrio de unión y la construcción de los haplotipos de las variantes polimórficas, se determinó utilizando el programa Haploview versión 4.1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA).

9.6. ESTUDIO DE TOMOGRAFÍA AXIAL COMPUTADA

Se utilizó un tomógrafo con multidetector de 64 canales (Somatom Sensation; 64, Forcheim Alemania), las imágenes tomográficas fueron interpretadas por radiólogos experimentados. Se determinó y cuantificó la atenuación del hígado y del bazo en un solo corte tomográfico de 3 mm a nivel de T11-T12 ó T12-L1. Durante el análisis de las imágenes, se marcaron 3 regiones de interés de 1 cm² en ambos lóbulos hepáticos y en el parénquima del bazo. Para medir la grasa abdominal se realizó un solo corte tomográfico a nivel del espacio intervertebral L4-L5. El área de GAV y GAS, fueron separadas mediante un trazo manual siguiendo la pared muscular abdominal. Se cuantificó la GAT y la GAV en cm² y la GAS se calculó restando el área de GAV a GAT. La cuantificación del CAC se realizó con el algoritmo desarrollado por Agatston y colaboradores¹³, el software emplea un umbral de atenuación de -130 Unidades Hounsfield (UH) en un mínimo de 3 pixeles contiguos para la identificación de la placa calcificada. Se consideró aterosclerosis subclínica cuando CAC>1.

9.7. DEFINICIÓN DE VARIABLES

Las dislipidemias se definieron de acuerdo a los siguientes puntos de corte: hipercolesterolemia: C-LDL \geq 130mg/dL, hipertrigliceridemia: TG \geq 150mg/dL, hipoalfalipoproteinemia; C-HDL<40mg/dL en hombres y <50mg/dL en mujeres, y/o el consumo de fármacos reguladores de lípidos. La hipertensión arterial se definió con cifras de tensión arterial sistólica y/o diastólica \geq 140/90mmHg y/o uso de medicamentos antihipertensivos. El sobrepeso fue definido como IMC de 25-29.9 Kg/m², la obesidad como IMC \geq 30Kg/m² y obesidad abdominal como circunferencia de cintura mayor a 90 cm en hombres y 80 cm en mujeres⁶¹. La glucosa en ayuno de 100 a 125mg/dL se consideró como glucemia de ayuno alterada, mientras que los valores de glucosa \geq 126mg/dL ó tratamiento con hipoglucemiantes se usaron para definir la presencia de DM2. El síndrome metabólico (SM) se definió con base en los criterios del NECP-ATPIII⁶² excepto para el corte de obesidad central⁶¹. La resistencia a la insulina se consideró cuando el HOMA-RI fue \geq 75 (3.58

en mujeres, 3.12 en hombres), se consideró GAV aumentada cuando el valor fue ≥ 75 ($\geq 121.75\text{cm}^2$ en mujeres, $\geq 153.3\text{cm}^2$ en hombres). Esos puntos de corte fueron obtenidos de 101 hombres y 180 mujeres del estudio GEA, sin obesidad y con valores normales de lípidos, glucosa y tensión arterial.

9.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos se obtuvo por conteo directo, se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de chi cuadrada. Las variables continuas se expresan como medias \pm DE para variables paramétricas y como medianas (rango intercuartil) para las variables no paramétricas. Las prevalencias se analizaron con la prueba de chi cuadrada y la comparación entre los grupos por genotipo se analizó con la prueba de U de Mann Whitney o t de Student. Los modelos de herencia dominante (TT vs CT+CC), recesivo (CT+ TT vs CC) y aditivo (TT vs CT vs CC) se construyeron en base a la frecuencia del alelo menor que en el caso de nuestra población es el alelo menor es C (43%). Sin embargo para poder comparar nuestros resultados con otras poblaciones donde el alelo T es el de menor frecuencia y el de riesgo, en los análisis de regresión logística la categoría de referencia fue CT+CC y de esta manera indicar que T es el alelo de riesgo. La asociación del polimorfismo con las diferentes comorbilidades en tres modelos de herencia: dominante, aditivo y recesivo, se realizó mediante un análisis de regresión logística ajustada por edad, IMC y género. La asociación del genotipo con los diferentes parámetros clínicos y metabólicos se evaluó utilizando los modelos lineales generalizados, las variables dependientes con distribución asimétrica fueron transformadas. La influencia de las covariables en la comparación de las medias se controló por análisis de covarianza (ANCOVA). El análisis de regresión lineal multivariado se utilizó para encontrar la interacción entre el consumo de macronutrientes y el polimorfismo. Se utilizó el paquete estadístico SPSS (versión 15; SPSS, Chicago, IL). Diferencias con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

10. RESULTADOS

La población estudiada incluyó a 1468 sujetos (49% hombres); con edad promedio de 54±9 años. En población total, la prevalencia de obesidad fue del 30%, obesidad central 82.1%, EH 33%, diabetes 13.4%, hiperinsulinemia 58.8%, RI 62.9%, GAV elevada 57.6%, HTA 9.9% y SM 43.8%. Se observó una mayor prevalencia de EH en hombres en comparación con las mujeres (36.4% vs 30.0% respectivamente, $p=0.006$). Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos (Tabla 3) no desvían el equilibrio de Hardy Weinberg ($p=0.065$).

Tal como ha sido reportado en otras poblaciones el polimorfismo rs1800588 se encontró en fuerte desequilibrio de unión con los polimorfismos rs1077834 y rs2070895. (Figura 4).

Tabla 3. Frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos

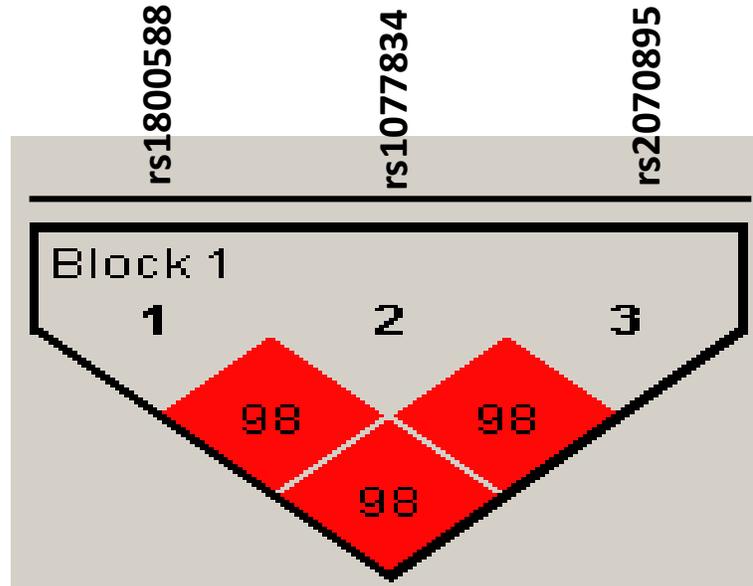
	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica
C-514T rs1800588	CC= 19.7 CT= 47.3 TT= 32.9	C=0.43 T=0.57
T-710C rs1077834	TT= 16.7 TC=42.7 CC=28.7	T=0.44 C=0.56
G250A rs2070895	GG=17.0 GA=42.5 AA=28.6	G=0.43 A=0.57

Las características clínicas de los sujetos estudiados de acuerdo al genotipo y analizadas bajo un modelo dominante, se muestran en la tabla 4. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables.

Las características metabólicas de la población en función del genotipo se muestran en la tabla 5. Se observa que los portadores del alelo de riesgo T en su forma homocigota tienen concentraciones de triglicéridos y apoA1 mas altos, mayor índice TG/C-HDL y menor tamaño de LDL menor en comparación con los portadores del alelo C, todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Únicamente en el caso de la diabetes, la prevalencia fue

significativamente más alta en los portadores TT en comparación con los CT+CC (15.0% vs 12.1%, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en el resto de las variables.

Figura 3. Gráfica de disequilibrio de unión de tres polimorfismos en el gen de la LH.



El color rojo indica fuerte disequilibrio de unión. Los números dentro del rombo muestran el coeficiente de disequilibrio de unión $D \times 100$.

Tabla 4. Características clínicas de la población según el genotipo de la LH

Variable	TT (n=492)	CT+CC (n=976)	P_{dom}
Hombres n (%)	246 (50)	485 (49.6)	0.779
Edad (años)	52 (46-59)	54 (47-60)	0.097
IMC (kg/m ²)	28.2 (25.8-31.1)	27.8 (25.4-30.7)	0.099
CC (cm)	95.0 (87.0-102.1)	94.5 (86.8-102)	0.367
TAS (mmHg)	115 (106-126)	114 (105-126)	0.367
TAD (mmHg)	71 (66-78)	72 (66-78)	0.866

Los valores se muestran como n (%) o mediana [rango intercuartil]. Abreviaturas; IMC: índice de masa corporal, CC: circunferencia de cintura, TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica

Tabla 5. Características metabólicas de la población de acuerdo al genotipo

Variable	TT (n=492)	CT+CC (n=976)	P _{dom}
C-Total (mg/dl)	193 (168-216)	191 (167-211)	0.256
C-HDL (mg/dl)	45 (37-55)	44 (36-53)	0.228
C-LDL (mg/dl)	117 (97-138)	118 (97-138)	0.566
C-noHDL (mg/dl)	144 (123-170)	144 (122-167)	0.392
TG (mg/dl)	161 (119-220)	144 (107-196)	0.0002
Tamaño HDL	0.34 ±0.08	0.34 ±0.08	0.259
Tamaño LDL	1.19 (1.06-1.3)	1.22 (1.09-1.40)	0.003
apoB (mg/dl)	96 (80-115)	94 (76-115)	0.127
apoA1 (mg/dl)	137 (118-158)	133 (113-154)	0.015
Índice apoB/apoA1	0.71 (0.55-0.88)	0.72 (0.55-0.90)	0.787
CT/C-HDL	4.3 (3.4-5.3)	4.3 (3.5-5.2)	0.681
C-LDL/C-HDL	2.6 (1.9-3.3)	2.7 (2.1-3.4)	0.141
TG/C-HDL	3.6 (2.2-5.4)	3.2 (2.1-5.1)	0.046
ALT (U/L)	24 (18-34)	24 (18-33)	0.417
AST (U/L)	25 (20-30)	25 (21-30)	0.680
GGT (U/L)	28 (19-43)	27 (18-42)	0.444
Glucosa (mg/dl)	91 (85-100)	90 (84-99)	0.101
AGL (meq/L)	0.57 (0.44-0.70)	0.56 (0.43-0.70)	0.555
RITA	9.4 (6.3-14.3)	9.6 (6.1-14.1)	0.775
HOMA-RI	3.9 (2.7-6.1)	3.9 (2.7-5.7)	0.432
PCRas (mg/L)	1.4 (0.8-3.3)	1.6 (0.8-3.1)	0.763
Adiponectina (µg/ml)	8.1 (4.8-12.8)	8.1 (5.1-12.3)	0.938
Obesidad (%)	32.5	29.7	0.199
Ob. Central (%)	81.9	82.2	0.909
Diabetes (%)	15.9	12.1	0.045
Hiperinsulinemia (%)	57.2	59.6	0.386
RI (%)	63.5	62.6	0.714
GAV (%)	57.1	57.8	0.805
HG (%)	33.5	33	0.834
HTA (%)	10	9.8	0.940
SM (%)	45.3	43	0.403

Los valores se muestran como media ± DE ó mediana (rango intercuartil). Abreviaturas: C-total: colesterol total, C-HDL: colesterol de las lipoproteínas de alta densidad, C-LDL: colesterol de las lipoproteínas de baja densidad, C-noHDL: colesterol de no HDL, TG: triglicéridos, apoB: apolipoproteína B, apoA1: apolipoproteína A1, ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa, GGT: gamma glutamil traspeptidasa, AGL: ácidos grasos libres, RITA. Resistencia a la insulina del tejido adiposo, HOMA: modelo de homeóstasis para evaluar resistencia a la insulina, PCRas: Proteína C-reactiva de alta sensibilidad. Ob central; obesidad central, HI; hiperinsulinemia, RI; resistencia a la insulina, EH; esteatosis hepática; HTA; hipertensión arterial, SM; síndrome metabólico.

El análisis de los depósitos de grasa abdominal en función del polimorfismo C-514T se muestra en la Tabla 6. La cantidad de GAT, GAV y GAS fue similar en los grupos estudiados.

Tabla 6. Depósitos de grasa abdominal según el genotipo de la LH

Variable	TT (n=492)	CT+CC (n=976)	P _{dom}
Grasa total (cm ²)	440 (357-543)	434 (348-533)	0.358
Grasa visceral (cm ²)	150 (111-193)	149 (109-192)	0.701
Grasa subcutánea (cm ²)	287 (221-357)	278 (208-359)	0.369

La asociación del polimorfismo C-514T con hígado graso se analizó bajo todos los modelos de herencia (aditivo, dominante y recesivo) mediante un análisis de regresión logística ajustado por edad, género e IMC. No se observó asociación del polimorfismo C-514T con la presencia de hígado graso (Tabla 7) bajo ningún modelo.

Tabla 7. Asociación del polimorfismo C-514T con el hígado graso

Modelo	Genotipo	OR (95% CI)	P*
Aditivo	T/T	1.0	0.72
	C/T	0.93 (0.72-1.21)	
	C/C	1.05 (0.76-1.46)	
Dominante	T/T	1.00	0.79
	C/T-C/C	0.97 (0.76-1.23)	
Recesivo	T/T-C/T	1.00	0.53
	C/C	1.1 (0.82-1.47)	

*Ajustado por género, edad e IMC

La asociación del alelo de riesgo T con DM2, HTA, hipertrigliceridemia (HTG), hipoalfalipoproteinemia (HA), SM, RI, GAV elevada y CAC se analizó bajo los tres modelos de herencia mediante análisis de regresión logística ajustado por género, IMC y edad. La asociación fue significativa solo en el modelo dominante (Tabla 8). Los portadores del genotipo TT tienen

alrededor de 40% más riesgo de presentar DM2, HTG, y CAC >1 y 20% menos riesgo de presentar HA en comparación con los portadores del alelo C, independiente del IMC, género y edad. La asociación entre el alelo de riesgo y CAC permaneció aún después de ajustar por C-HDL, TG, insulina, tensión arterial diastólica y presencia de diabetes CAC >1 [RM 1.44 (1.07–1.93 $p_{dom}=0.015$]. No se observó asociación con la HTA, RI y SM.

Tabla 8. Asociación del polimorfismo C-514T con comorbilidades de la obesidad

Variable dependiente	RM (95% CI)	P_{dom}^*
Diabetes mellitus tipo 2	1.42(1.04-1.97)	0.029
Hipertensión arterial	1.20(0.93-1.54)	0.154
Hipertrigliceridemia	1.36 (1.09-1.71)	0.006
Hipoalfalipoproteinemia	0.78 (0.63-0.98)	0.036
Resistencia a la insulina	0.97 (0.75-1.26)	0.834
Grasa visceral elevada	0.89 (0.68-1.17)	0.437
Síndrome metabólico	1.05 (0.83-1.33)	0.637
Calcio arterial coronario >1	1.44 (1.08-1.92)	0.012

Modelo dominante TT vs CT+CC. *ajustado por edad, género e IMC. Resistencia a la insulina evaluado por: HOMA>p75; GAV elevada: GAV>p75.

Para comprobar si existe asociación del polimorfismo C-514T con los parámetros clínicos y metabólicos evaluados en población mexicana, se realizó un análisis de regresión lineal utilizando los modelos lineales generalizados ajustados por edad, género e IMC. (Tabla 9). Se observó asociación independiente y positiva del alelo de riesgo T con las concentraciones de triglicéridos, apoA1 y negativa con el tamaño estimado de LDL. La asociación con C-HDL fue marginal.

Tabla 9. Asociación de la variante -514T con parámetros metabólicos

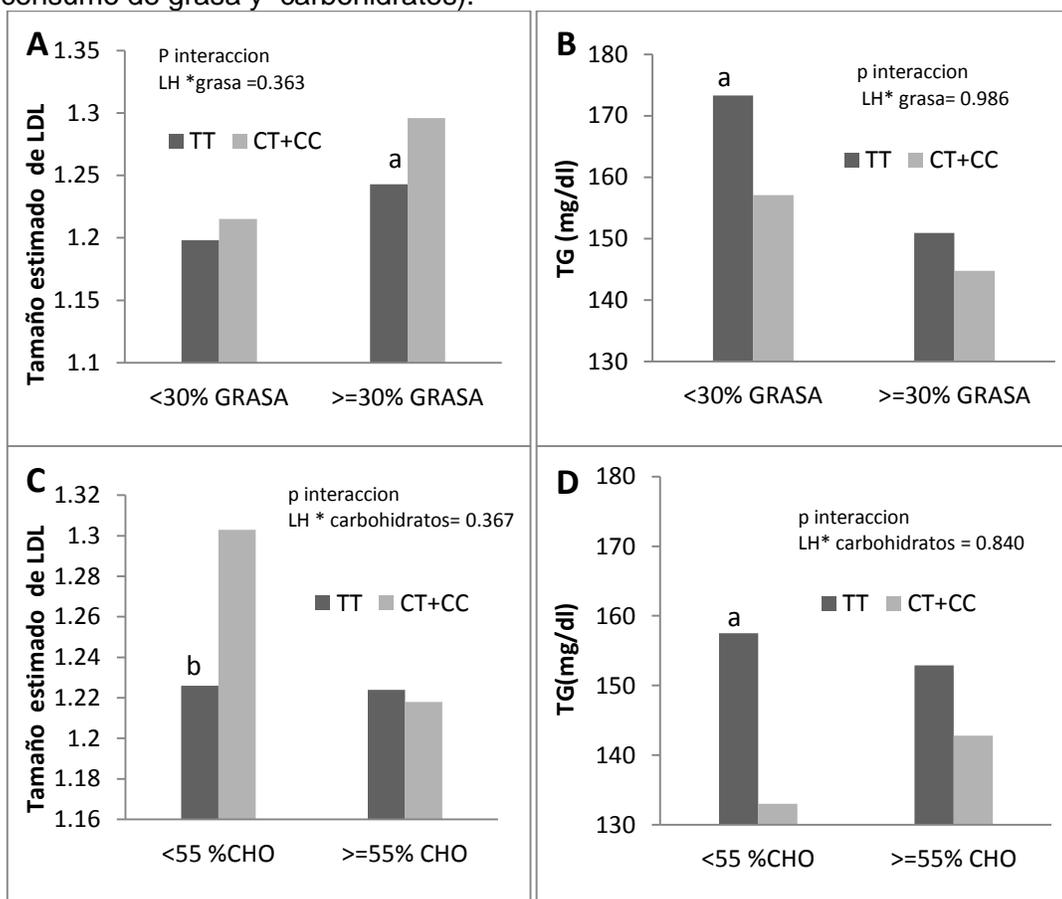
Variable dependiente	β (IC95%)	P_{dom}^*
apoA1	0.030 (0.004-0.057)	0.025
C-HDL	0.026 (-0.002-0.053)	0.066
Tamaño de LDL	-0.040 (-0.074-0.009)	0.011
Triglicéridos	0.068 (0.015-0.121)	0.012

*Ajustado por edad, género e IMC. Modelo dominante TT vs CT+CC, ApoA1, Triglicéridos y C-HDL fueron transformados logarítmicamente.

Numerosos estudios han evaluado la interacción entre el polimorfismo y la dieta sobre los lípidos, principalmente la interacción entre el polimorfismo y la grasa en las concentraciones de C-HDL, TG así como en el tamaño y distribución de las partículas de HDL. Sin embargo no se ha evaluado en población mexicana si otro macronutriente por ejemplo carbohidratos interacciona con el polimorfismo para afectar las concentraciones de los lípidos, insulina, PCR, adiponectina, índices HOMA-RI, RITA, ApoB/apoA1 y los tamaños de las partículas de LDL y HDL. En este estudio se evaluó la interacción de la variante -514T con el consumo de grasa y carbohidratos en las variables metabólicas mencionadas anteriormente. Se dividió a la población por consumo elevado de grasa total ($\geq 30\%$) ya que a este punto de corte se han reportado interacciones en otras poblaciones y poder evaluar si al menos en los lípidos se observaba lo reportado en otros estudios. Se evaluaron las diferencias en los parámetros metabólicos según el genotipo; únicamente se encontró diferencia estadísticamente significativa en TG y el tamaño de LDL (Figura 4). En comparación con los portadores del alelo C, cuando existe una ingesta mayor al 30% de grasa total, los homocigotos TT tienen menor tamaño de LDL (Figura 4 panel A). Por otro lado, cuando consumen menos del 30% de grasa, tienen mayores concentraciones de TG (figura 4, panel B). Respecto al consumo de carbohidratos, se dividió a la población por consumo elevado de carbohidratos ($\geq 55\%$), al igual que en el consumo elevado de grasa se observaron diferencias estadísticamente significativas solamente en tamaño estimado de LDL y las

concentraciones de TG. Los homocigotos TT que consumen <55% de carbohidratos, tienen menor tamaño de LDL y mayores concentraciones de TG respecto a los portadores del alelo C (Figura 4, panel C y D). En los otros parámetros metabólicos evaluados no se observaron diferencias significativas. No se observaron interacciones significativas entre el polimorfismo y el consumo de carbohidratos o grasa total en los parámetros metabólicos evaluados. (Figura 4).

Figura 4. Concentraciones de TG y tamaño estimado de LDL de acuerdo al genotipo según el consumo de grasa y carbohidratos).

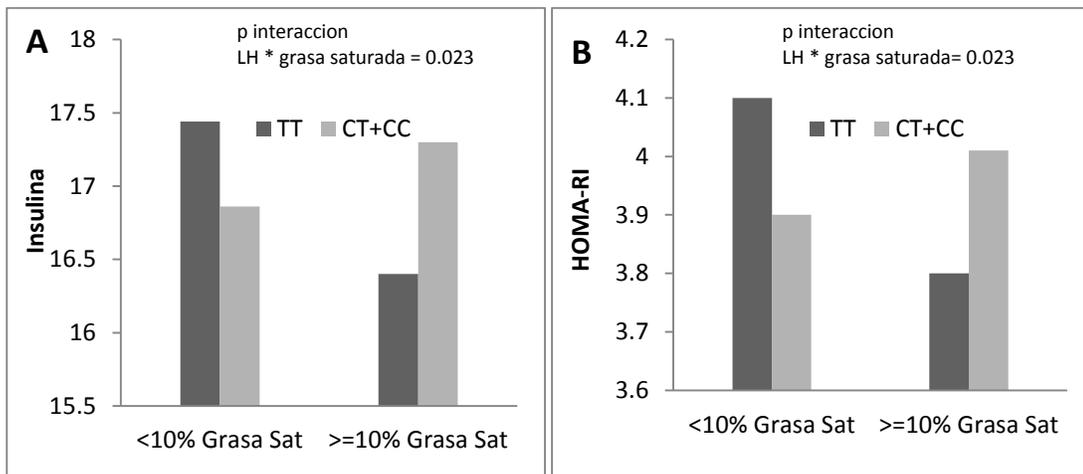


Medias ajustadas por edad, género e IMC. Los valores marcados con a y b son diferentes del otro grupo con una $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente. El valor *p* de interacción se obtuvo en el modelo de regresión.

En otras poblaciones se ha encontrado interacción entre el alelo T y el consumo de grasa saturada en las concentraciones de HDL. No se ha reportado si esta interacción afecta otras variables metabólicas como las que se evaluaron en este estudio. Se evaluó la posible interacción de la variante -514T con el consumo elevado de grasa saturada (mayor al 10%) en los parámetros

metabólicos evaluados en esta población. En ninguna de las variables metabólicas se observaron diferencias en los valores medios cuando se compararon a los homocigotos TT vs los portadores del alelo C estratificando de acuerdo al consumo de grasa saturada. Sin embargo, cuando se evaluó la interacción entre el polimorfismo y el consumo de grasa saturada sobre las variables metabólicas, solo se observó interacción estadísticamente significativa sobre las concentraciones de insulina y el índice HOMA-RI ($p=0.023$). Cuando la ingesta es mayor al 10% de grasa saturada, los portadores homocigotos TT tienen menores concentraciones de insulina y menores valores del índice HOMA-RI.

Figura 5. Concentraciones de insulina y HOMA-RI de acuerdo al genotipo según el consumo de grasa saturada.



Medias ajustadas por edad, género e IMC, el valor p para interacción se obtuvo en el modelo de regresión.

11. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que el polimorfismo C-514T se asocia con mayor riesgo de presentar aterosclerosis subclínica evaluada por la presencia de CAC así como HTG y DM2 y no se asocia a la presencia de RI, EH y SM después de ajustar por factores confusores. Es importante destacar que este es el primer estudio que reporta asociación del polimorfismo C-514T con la presencia de CAC en población mexicana sin antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular.

En la población mexicana la frecuencia del alelo T (57%), es una de las más altas reportada hasta el momento y similar a la reportada en población peruana⁶³ (56%). Nuestros datos muestran por primera ocasión en población mexicana que el polimorfismo C-514T se encuentra en fuerte desequilibrio de unión con los polimorfismos rs1077834 y rs2070895.

Asociación del polimorfismo con ECV:

La asociación del polimorfismo C-514T con la ECV tanto clínica como subclínica ha sido contradictoria. En hombres con diagnóstico de enfermedad arterial coronaria prematura (EAC) el alelo T se asoció con la presencia de EAC⁶⁴, mientras que en otro estudio de seguimiento a nueve años el alelo T no se asoció con riesgo de infarto agudo al miocardio.⁶⁵ La asociación con marcadores de aterosclerosis subclínica como presencia de CAC e incremento en el grosor de intima media carótida ha sido menos explorada. Hokanson y colaboradores²⁰ reportaron en diabéticos tipo 1 la asociación gen dosis-dependiente del polimorfismo C-514T con la presencia de CAC, esta asociación fue independiente de las concentraciones de C-HDL. El presente estudio, es el primero en reportar la asociación del polimorfismo C-514T con la presencia de CAC en población sin antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular prematura; la asociación fue independiente de la edad, género, IMC, presión arterial diastólica, insulina, C-HDL, TG y presencia de diabetes. Estos resultados concuerdan con lo observado por Hokanson, y sugieren que la variante -514T del gen de la lipasa pudiera ser un marcador genético que ayude a identificar

sujetos con mayor riesgo de ECV, con el objetivo de implementar medidas de prevención primaria para reducir o retardar la aparición de enfermedad cardiovascular.

Asociación de la variante -514T con la presencia de hígado graso:

Dada la alta prevalencia de exceso de peso (sobrepeso y obesidad) que enfrenta el país, las comorbilidades asociadas a esta patología van en aumento en forma paralela. De tal manera, identificar genes candidatos de susceptibilidad para el desarrollo de esteatosis hepática resulta relevante en nuestra población. La prevalencia de esteatosis (33%) observada en el presente trabajo es más alta a la reportada en otro estudio realizado población asintomática residente de la Ciudad de México, ellos reportaron una prevalencia de 14.3%⁶⁶. Las diferencias en las prevalencias pudieran deberse a varias razones tales como: diferencias en las poblaciones estudiadas, la forma de selección y la metodología empelada para realizar el diagnóstico de HG.

El polimorfismo C-514T se ha asociado con concentraciones elevadas de insulina y aumento de TG intrahepáticos.¹⁹ Sin embargo son escasos los estudios a nivel mundial que han analizado si el polimorfismo C-514T se asocia a la presencia de hígado graso. Estudios realizados en población asiática,^{47,67} mostraron que la frecuencia del alelo T fue mayor en el grupo control en comparación con el grupo con hígado graso (Alelo T; HG= 37% vs Control= 45%; $p < 0.05$), los autores sugieren que la variante -514T disminuye la susceptibilidad para la presencia de hígado graso. Nuestros datos no mostraron asociación entre el polimorfismo C-514T y la esteatosis hepática, de manera similar a lo observado en población asiática. Esta falta de asociación tal vez podría ser explicada además por interacciones gen-gen o gen-ambiente. Se han reportado otros SNPs en genes candidatos que se asocian a hígado graso (I148M de PNPLA3, APOC3) o resistencia al insulina (ADIPOR1)¹⁹. PNPLA3 es muy frecuente en población mexicana y la asociación con el hígado graso es muy fuerte, esta asociación podría estar opacando el efecto del alelo T de la lipasa hepática. Por otro lado los SNP de ADIPOR1 tienen una fuerte interacción con el ambiente para

el desarrollo del hígado graso¹⁹. La presencia de estas otras variantes podría afectar el efecto de la LH sobre la acumulación de triglicéridos en el hígado.

Asociación de la variante -514T con lípidos plasmáticos y comorbilidades de la obesidad

Los estudios en población caucásica, afroamericana y asiática han reportado que el alelo T se asocia a concentraciones altas de C-HDL y TG, también se ha descrito que esta asociación es modulada por el tipo de sujetos de estudio, raza, género, dieta y tamaño de muestra. En nuestra población el polimorfismo C-514T se asoció con riesgo elevado para la presencia de HTG y menor riesgo de presentar HA sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de C-HDL en función del genotipo aunque se observa una tendencia de los homocigotos TT a tener concentraciones más altas de C-HDL en comparación con los portadores del alelo C. Probablemente el que no hayamos observado diferencias ni asociación con las concentraciones de C-HDL como ha sido reportado, este dado por las diferencias de raza, los resultados del presente estudio son similares a los reportados en población peruana⁶³, en los cuales tampoco se observaron diferencias significativas en las concentraciones de C-HDL.

La lipasa hepática cataliza la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y LDL. El tamaño de LDL y su densidad se asocian inversamente con la actividad de la LH. El alelo -514T del promotor del gen de la LH se asocia a menor actividad de la lipasa hepática y presencia de partículas LDL grandes y flotantes¹⁸. La actividad de la LH no se ha asociado con, concentraciones plasmáticas de C-LDL sin embargo, cuando los factores que afectan la actividad de la LH se modifican por cambios en el estilo de vida o intervención farmacológica, inducen cambios significativos en el tamaño y densidad de la partícula. Los resultados del presente estudio muestran que los homocigotos TT tienen partículas de LDL significativamente más pequeñas en comparación con los portadores del alelo C y esta asociación fue significativa, esto es contrario a lo reportado. Una posible explicación a los resultados anteriores es que, se ha reportado que el polimorfismo C-514T se asocia con lipoproteínas

enriquecidas en TG⁴² además del aumento en las concentraciones plasmáticas de C-HDL y TG. Cuando las VLDL están enriquecidas en TG la actividad de la lipasa lipoproteica (LPL) aumenta generando IDL de menor tamaño pero enriquecidas en TG, estos al momento de ser hidrolizados por la LH generaran LDL pequeñas y densas a pesar de la disminución en la actividad de LH dada por la presencia del alelo T. Se ha reportado que las LDL pequeñas y densas incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular, debido a que permanecen más tiempo en el espacio subendotelial y son más susceptibles a ser oxidadas, lo que favorece la migración de macrófagos y su cambio fenotípico a células espumosas que se acumulan en el subendotelio y dan lugar a la placa ateromatosa.

El principal determinante de la aterogenicidad de la LH es la concentración de LDL pequeñas y densas por otro lado, la diabetes se asocia al incremento en el número de LDL pequeñas y densas. Los estudios que han evaluado si el polimorfismo C-514T se asocia a DM2 son escasos. En 522 sujetos de ambos sexos con intolerancia a la glucosa, provenientes del estudio Finnish DPS⁶⁸, se observó que el polimorfismo G-250A, que se encuentra en fuerte desequilibrio de unión con el C-514T del gen de la LH, el genotipo G-250G predice la conversión de intolerancia a la glucosa a DM2. En nuestro estudio la prevalencia de diabetes fue más alta en los homocigotos TT en comparación con los portadores del alelo C y la asociación del polimorfismo C-514T con la presencia de diabetes fue estadísticamente significativa e independiente de la edad, género e IMC. Nuestros resultados irían en contra de lo reportado en el estudio Finnish sin embargo, la población del estudio Finnish era una población con alto riesgo mientras que la de nosotros es una población de sujetos sanos. La asociación del polimorfismo C-514T con la diabetes debe confirmarse en poblaciones similares.

Interacción del polimorfismo C-514T con dieta:

Se ha reportado la interacción del polimorfismo C-514T con la dieta sobre concentraciones de C-HDL, principalmente con el consumo de grasa.^{49,50, 51} Framingham, la presencia del alelo T

correlacionó con concentraciones de C-HDL altas y mayor tamaño de HDL solo en sujetos que consumía menos de 30% de la ingesta de grasa. Además los sujetos TT que consumían una dieta alta en grasa presentaron concentraciones mayores de TG que sus contrapartes que consumían dieta baja en grasa. Sin embargo, en nuestro estudio no se observó interacción entre el polimorfismo C-514T y los componentes de la dieta sobre concentraciones de TG. Zhang y colaboradores, reportaron que en varones diabéticos el alelo T se asoció con concentraciones elevadas de C-HDL solamente con peso normal y con un consumo de grasa saturada mayor o igual al 30% de las Kcal totales. Tai y colaboradores estudiaron una población multiétnica. Únicamente en los indios se observó que la interacción entre grasa total y el polimorfismo C-514T moduló las concentraciones de C-HDL. Nettleon y colaboradores estudiaron una cohorte de caucásicos y afroamericanas y reportaron interacción entre el polimorfismo y la ingesta de grasa sobre las concentraciones de C-HDL solo en la población afroamericana. Todo lo anterior, demuestra que existen diferencias en el tipo de población estudiada, el género y la etnia de cada uno de los estudios, y pueden explicar los resultados contradictorios. Esto apoya que en nuestra población no se haya encontrado interacción entre la ingesta de grasa ó carbohidratos con polimorfismo C-514T sobre las concentraciones de TG y el tamaño de LDL a pesar de que se observaron diferencias entre los genotipos.

En la esteatosis hepática, está presente la resistencia a la insulina y es un importante predictor del desarrollo de esta enfermedad. El exceso en la ingesta de carbohidratos y grasa favorece el incremento de glucosa, ácidos grasos libres e insulina en circulación. En individuos sanos, concentraciones elevadas de TG en el hígado dan lugar a un incremento en la producción y secreción de VLDL sin embargo, en pacientes con hígado graso o esteatohepatitis, este incremento en la exportación de grasa vía VLDL puede fallar o ser insuficiente⁶⁹. Una dieta alta en grasa saturada se asocia a resistencia a la insulina⁶⁹ que podría desencadenar el desarrollo de esteatosis hepática. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que los homocigotos TT tienen menores concentraciones de insulina y HOMA-RI cuando consumen $\geq 10\%$ de grasa saturada y la

interacción entre el polimorfismo C-514T y la ingesta de grasa saturada sobre las concentraciones de insulina y el HOMA-RI fue significativa (0.023). Lo anterior podría explicar la falta de asociación del polimorfismo del con la presencia del hígado graso.

Este trabajo tiene algunas fortalezas. Se realizó una amplia caracterización de variables clínicas y metabólicas realizadas con métodos estandarizados. La población fue equilibrada en la distribución del género.

El presente estudio tiene algunas limitaciones: 1) No se evaluó la actividad enzimática de la lipasa hepática, para comprobar que efectivamente los portadores del alelo T tienen disminuida la actividad sin embargo, la mayoría de los estudios de asociación han reportado que afecta la transcripción de la enzima. 2) El diagnóstico de EH se estableció por TAC y exclusión de otras causas de enfermedad hepática crónica, pero no se confirmó por el estándar de oro que es la biopsia hepática. Sin embargo se ha mostrado correlación significativa entre el IAH:B en la TAC y el grado histológico de la esteatosis.⁷⁰ 3) La RI se estimó utilizando el HOMA-RI y no el estándar de oro que es la pinza euglucémica-hiperinsulinémica; no obstante el HOMA-RI ha mostrado ser una técnica confiable para evaluar sensibilidad a la acción de la insulina⁷¹. 4) Es un estudio tipo transversal por lo tanto no se puede establecer causalidad.

12. CONCLUSIONES

Los hallazgos de este trabajo muestran que en población adulta mexicana, hay una alta prevalencia tanto de esteatosis hepática como de la frecuencia del alelo de riesgo T. En población mexicana asintomática y sin antecedentes de ECV, el polimorfismo C-514T del gen de la LH se asocia a la presencia de CAC y puede ser un marcador para detectar personas con mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedad cardiovascular. El polimorfismo C-514T no se asoció a la presencia de hígado graso pero existe una interacción entre este polimorfismo y el consumo de grasa saturada que afecta la concentración de insulina y el HOMA-RI. Estos resultados deben ser confirmados en otros estudios.

13. BIBLIOGRAFIA

¹Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México). Mujeres y hombres en México /2012 / Instituto Nacional de Estadística y Geografía. -- México: INEGI, c2013.

²Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 /ENSANUT). http://www.insp.mx/ensanut/resultados_ensanut.pdf.

³Hernandez-Ono A, Monter-Carreola G, Zamora-Gonzalez J, Cardoso-Saldaña G, Posadas-Sánchez R, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C. Association of visceral fat with coronary risk factors in a population based sample of postmenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:33-39.

⁴Despres JP. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 2006; 38:52-63.

⁵Hu FB, Willet WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as Compared with Physical Activity in predicting Mortality among Women: *N. Engl. J. Med* 2004; 351: 2694-2703.

⁶Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zaenari I, Day C, Arcaro G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2007; 30:1212-1218.

⁷ Guerrero R, Vega GL, Grundy SM, Browning JD. Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology* 2009;49:791-80.

⁸Korentblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Liver, muscle and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology* 2008;49: 791-801.

⁹Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCoullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850.

¹⁰Francazani AL, Burdick L, Raselli S, Pedotti P, Grigore L, Santorelli G, Valenti L, Marashi A, Catapano A, Fargion S. Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Med* 2008; 121(1):72-78.

¹¹Assy N, Djibre A, Farah R, Grosovski M, Marmor A. Presence of coronary plaques in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Radiology* 2010; 254:393-400

¹²Brea A, Mosquera D, Martín E, Aritza A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case –control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1045-1050.

¹³Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R, Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J. Am. Coll. Cardiol* 1990;15: 827-832.

¹⁴Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schwartz RS. Coronary Artery Calcium Area by Electron –Beam Computed Tomography and Coronary Atherosclerosis plaque Area: A Histopathologic Correlative Study. *Circulation* 1995;92: 2157-2162.

¹⁵Verrijken A, Francque S, Mertens I, Talloen M, Peiffer F, van Gaal L. visceral adipose tissue and

inflammation correlate with elevated liver test in a cohort of overweight and obese patients. *Int J Obes (Lon)* 2010

¹⁶McKimmie RL, Daniel KR, Carr JJ, Bowden DW, Feedman BI, Register TC, hsu FC, Lohman KK, Weinberg RB, Wagenknecht LE. Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study. *Am j Gastroenterol* 2008; 103:3029-3035.

¹⁷Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40: 1387-1395.

¹⁸Jansen H, Chu G, Ehnholm C, Danllongeville J, Nicaud V, Talmud PJ. The allele of the hepatic lipase promoter variant C-480T is associated with increased fasting lipids and HDL and increased preprandial and postprandial LpCIII:B: European atherosclerosis research study (EARS) II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 199; 19:303-308.

¹⁹Stefan N, Schäfer S, Machio F, Machann J, Shick F, Clauseen CD, Stumvoll M, Häring H-U Frizsche a. Liver fat and insulin resistance are independently associated with the -514C>T polymorphism of the hepatic lipase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90: 4238-4243.

²⁰Hokanson John E., Cheng Suzanne, Snell-Bergeon Janet K, Fijal Bonnie A, Grow Michael A, Hung Chi, Ehrlich Henry, Erlich, James A, H. Eckel Robert, and Rewers Marian. A Common Promoter Polymorphism in the Hepatic Lipase Gene (LIPC-480C>T) Is Associated With an Increase in Coronary Calcification in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2002: 51:1208 –1213.

²¹Jansen H, Verhoeven AJM, Weeks L, Kastelein JJP, Halley JDL, van den Ouweland A, Jukema JW, Seidell JC, Birkenhäger JC, Common C-to-T Substitution at Position -480 of the Hepatic Lipase promoter Associated with a lowered Lipase Activity in Coronary Artery Disease Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2837-2842

²²Tan KC, Shiu SW, Chu BY. Effects of gender, hepatic lipase gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus on hepatic lipase activity in Chinese: *Atherosclerosis* 2001; 157: 233-239.

²³Talmud PJ, Berglund L, Hawe EM, Waterworth Dm, Isasi CR, Deckelbaum RE, Starc T, Ginsberg HN, Humphries Se, Shea S. Age-related effects of genetic variation on lipid levels: The Columbia University BioMarkers Study. *Pediatrics* 2001;108: e50.

²⁴Shohet RV, Vega GL, Bersot TP, Mahley RW, Grundy SM, Guerra R, Cohen JC. Sources of variability in genetic association studies: insights from the analysis of hepatic lipase (LIPC): *Hum Mutat* 2002; 19: 536-542.

²⁵Hong SH, Song j, Kim JQ,: Genetic variations of the hepatic lipase gene in Korean patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2000;33:291-232.

²⁶Vega GL, Clark LT, Tang A, Marcovina S, Grundy SM, Cohen JC. Hepatic lipase activity is lower in African American men than in white American men: effects of 5' flanking polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC). *J Lipid Res.* 1998; 39: 228-232

²⁷Tahvanainen E, Syvanne M, Frick MH, Murtomaki-Repo s, Antikainen M, Kesaniemi YA, Kauma H, Pasternak A, Taskinen MR, Ehnholm C, Association of variation in hepatic lipase activity with promoter variation in the hepatic lipase gene. The LOCAT Study Investigators. *J Clin Invest* 1998;101: 956-960.

-
- ²⁸Carr MC, Hokanson JE, Deeb SS, Purnell JQ, Mitchel ES, Brunzell JD. A hepatic lipase gene promoter polymorphism attenuates the increased in hepatic lipase activity with increasing intra-abdominal fat in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2701-2707.
- ²⁹Janis S Fisler and Craig H Warden. Dietary fat and genotype: toward individualized prescriptions for lifestyle changes *Am J Clin Nutr* 2005;81:1255-1256.
- ³⁰ Zhang Cuilin, Lopez-Ridaura R, Rimm EB, Rifai N, Hunter DJ, and Hu F B. Interactions between the -514C/T polymorphism of the hepatic lipase gene and lifestyle factors in relation to HDL concentrations among US diabetic men. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1429-1435
- ³¹Griet Bos, Dekker JM, Feskens EM, Ocke MC, Nijpels G, Stehouwer-Coen DA, Bouter LM, Heine RJ, and Jansen H. Interactions of dietary fat intake and the hepatic lipase -480C/T polymorphism in determining hepatic lipase activity: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr* 2005;81:911-915
- ³²Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT). http://www.insp.mx/ensanut/resultados_ensanut.pdf.
- ³³Krawczyk M, Fellow R, Bonfrate I, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Practi and Res Clin Gastrol* 2010;24:695-708.
- ³⁴Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* 2000 21:677-738.
- ³⁵ Couture P, Otvos JD, Cupples A, Lahoz C, Wilson PWF, Schaefer EJ, Ordovas JM. Association of the C-514T polymorphism in the hepatic lipase gene with variations in lipoprotein subclass profiles. The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:815-822.
- ³⁶Kotronen A, Hannele Y-J. Fatty liver A novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:27-38.
- ³⁷ Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M. The utility of radiological imaging in alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002. 123: 745-749.
- ³⁸ Bothe AE, Van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI, 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta analysis. *Eur Radiol* 2011; 21: 87-97.
- ³⁹Puljiz Zeljko, Puljiz Mario, Jelcic Ivo, Hozo Izet. Accuracy of ultrasound, computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnose of steatosis and nonalcoholic stetatohepatitis. *Acta Inform Med.* 2010; 18(3): 136-139.
- ⁴⁰ Idrovo Víctor, Guevara Gonzalo. Enfermedad hepática grasa no alcohólica: NAFLD. *Rev Colombiana de Gastroenterol* 2004 19;44-49.
- ⁴¹Perret Bertrand, Mabile Laurence, Martínez Laurent, Terré Francois, Barbaras Ronald, Collet Xavier. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J.Lipid Res.* 2002.43:1163-1169.
- ⁴² Zambon Alberto, Deeb Samir, Pauletto Paolo, Crepaldi Gaetano and Brunzell John D. Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14:179-189.

-
- ⁴³Deeb Samir S, Zambon Alberto, Carr Molly C, Ayyobi Amir F, Brunzell John D. Hepatic lipase and dyslipidemia: interactions among genetic variants. Obesity, gender, and diet. *J. Lipid. Res.* 2003;44:1279-1286.
- ⁴⁴Nie L, Wang J, Clark TL, Tang A, Vega GL, Grundy S, Cohen J. Body mass index and hepatic lipase gene (LIPC) polymorphism jointly influence postheparin plasma hepatic lipase activity. *J. Lipid Res* 1998; 39:1127–1130.
- ⁴⁵Miksztovic V, Lucero D, Zago V, Cacciagiù L, Lopez G, Gonzalez Ballerga E, Sordà J, Fassio E, Schereier L, Berg G. Hepatic lipase activity is increased in non-alcoholic fatty liver disease beyond insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012; 28(6):535-541.
- ⁴⁶St-Pierre J, Miller-Felix I, Paradis ME, Begeron J, Lamarche B, Despres JP, Gaudet D, Vohl CM. Visceral obesity attenuates the effect of the hepatic lipase -514C>T polymorphism on plasma HDL-cholesterol levels in French-Canadian men. *Mol Genetics Metabolis* 2003;78: 31-36.
- ⁴⁷Zhan Q, Li YY, Nie YQ, Zhou YJ, DU YL, Sha WH, Wang H. Association of hepatic lipase gene promoter polymorphism -514 C/T with non alcoholic fatty liver disease. *Zhanghua gan Zang Bing.* 2008; 16(5): 375-378.
- ⁴⁸Zhan Q, Lopez-Ridaura, Rimm EB, Hunter DJ, Hu FB. Genetic variation in the hepatic lipase gene and the risk of coronary heart disease among US diabetic men: potential interaction with obesity. *Diabetologia* 2006; 49:1152-1559.
- ⁴⁹Ordovas JM, Corella D, Demissie S, Cuppkas A, Couture P, Coltell O, Wilson PWF, Shaefer EJ, Tucker KL. Dietary fat intake determines the effect of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on high-density lipoprotein metabolism. Evidence of a strong dose effect in this gene-nutrient interaction in the framingham study. *Circulation* 2002; 106: 2315-2321.
- ⁵⁰Nettleton JA, Steffen LM, Ballantyne CM, Boerwunlle E, Folsom AR. Associations between HDL-Cholesterol and Polymorphism in hepatic lipase and lipoprotein lipase-gene are modified by dietary fat intake in African American and White adults. *Atherosclerosis* 2007; 194(2): e131-140.
- ⁵¹Shyong TE, Corella D, Deurenberg-Yap, Cutter J, Chee SK, Tang CE, Ordovas J. Dietary fat interacts with the -514C/T polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on plasma lipid profiles in a multiethnic asian population: The 1998 Singapore national health Survey. *J. Nutr* 2003;133:3399-3408.
- ⁵²Hernandez-Avila M, Romieu I, Parra S, Hernandez-Avila J, Madrigal H, Willet W. Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in Mexico City. *Salud Publica Mex,* 1998; 40:133-140.
- ⁵³ Hernández Ávila M, Resoles M, Parra S, and Romieu I, Sistema de evaluación de hábitos nutricionales y consumo de alimentos (SNUT), ISNP, Cuernavaca; México.
- ⁵⁴Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, et al. Direct measurement of High Density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated a-cyclodextrin. *Clin Chem* 1995;41:717-723.
- ⁵⁵.De Long D, De Long E, Wood P, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low and very low density lipoprotein cholesterol. *JAMA* 1986; 256:2372-2377.
- ⁵⁶Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes*

Care,2004;27:1487-1495.

⁵⁷Mazer NA, Giulianini F, Paynter NP, Jordan P, Mora S. A comparison of the theoretical relationship between HDL size and the ratio of HDL cholesterol to apolipoprotein A-I with experimental results from the Women's Health Study. *Clin Chem*. 2013;59:949-958. 2005;12:67-72.

⁵⁸Hirano T, Ito Y, Yoshino G. Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12:67-72.

⁵⁹Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E, *et al.*: Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007; 133(2):496-506.

⁶⁰Lahiri DK, Numberger JL Jr: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HWM DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid Res*. 1991;19: 5444.

⁶¹Sanchez-Castillo CP, Velazquez-Monroy O, Bever A, Lara-Esqueda A, Tapia-Conyer R, James WP. Anthropometry Cutoff points for predicting chronic disease in the Mexican National Health Survey 2000. *Obes Res* 2003;11: 442-451.

⁶²Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of THE National Cholesterol Education Program (NECP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel III) *JAMA* 2001;285: 2486-2497.

⁶³Huerta D, Acosta O, Miranda C, Polo S, Orè R, Bardales A, Pajuelo J. Relación del polimorfismo C-514T del gen de la lipasa hepática con indicadores nutricionales y lipoproteínas en una muestra poblacional peruana: una perspectiva nutrigenética. *An Fac Med* 2008; 69(4):244-249.

⁶⁴Ji J, Herbison CE, Mamotte C, Burke V, Taylor RR, van Bockxmeer FM. Hepatic lipase gene - 514C/T polymorphism and premature coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk* 2002; 9:105-113.

⁶⁵Fan YM, Salonen JT, Koivu TA, Toumainen TP, Nyyssonen K, Lakka TA, Salonen R, Seppanen K, Nikkari ST, Tahvanainen E, Lehtimäki T. Hepatic lipase C-480T polymorphism modifies the effect of HDL cholesterol on the risk of acute myocardial infarction in men: a prospective population based study. *J Med Genet* 2004;41:e28

⁶⁶Lizardi-Cervera J, Becerra-Laparra I, Chavez-tapia NC, Ramos-Ostos ME, Uribe-Esquivel M. Prevalencia de hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico en población asintomática. *Rev Gastroenterol Mex* 2006; 71(4):453-459.

⁶⁷Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Yang H, Zhan Qi, Huang J, Shi SL, Xiao-BL, Huang HL. Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease of Chinese people. *J Gastro Hepatology* 2010; 25: 772-777.

⁶⁸Todorova B, Kubaszek A, Pihlajamäki J, Linstrom J, Erikson J, Valle T, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukkaaniemi K, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M. The G-250A promoter polymorphism of the hepatic lipase gene predicts the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes mellitus: the Finnish diabetes prevention study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2019-2023.

⁶⁹Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2007;86: 285-300.

⁷⁰ Linamond P, Raman S, Kassman C, Sayre J, Ghobrial M, Busutti R, Saab S, Lu D. Macrovesicular hepatic steatosis in living related liver donors: correlation between CT and histologic findings. *Radiology* 2004; 230: 276-280.

⁷¹ Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23: 57-63.