



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"

**Estudio de asociación del número de repetidos en la región  
promotora del gen HMOX1 con el hígado graso no alcohólico  
en sujetos mexicanos con obesidad mórbida**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:  
**MARISOL OLIVARES ARÉVALO**

ASESOR:  
**M. en C. Hugo Villamil Ramírez**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

Mtro. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Estudio de asociación del número de repetidos en la región promotora del gen HMOX1 con el hígado graso no alcohólico en sujetos mexicanos con obesidad mórbida.

Que presenta la pasante: Marisol Olivares Arévalo

Con número de cuenta: 107003191 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de mayo de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
SECRETARIO	M. en C. Hugo Villamil Ramírez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/mmgm\*

Trabajo realizado en:

**Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a Salud**, perteneciente a la  
**Facultad de Química** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**,  
con sede en el **Instituto Nacional de Medicina Genómica**

Bajo la dirección de:

**M. en C. Hugo Villamil Ramírez**

## DEDICATORIA

A mi hermana, **Atsiri Olivares Arévalo**

## AGRADECIMIENTOS

A mi **mamá, Angélica**, quien ha estado conmigo incondicionalmente en cada paso; a mi **papá, Jehú**, que nunca me ha dejado caer ni rendirme. Gracias por todo lo que me han enseñado, por su ayuda, amor, alegría, confianza y ser esa voz en mi cabeza que siempre me alienta, ustedes son el principal motor de mi vida.

Al **M. en C. Hugo Villamil Ramírez**, porque has compartido conmigo tus conocimientos, tiempo, experiencia y consejos que me permitieron no sólo realizar este trabajo, sino ser mejor en lo personal y profesional; gracias por la paciencia y creer en mí.

A mis primos, **Miguel, Betsi, Pepe, Moy y Montse**, por todas esas risas, alegrías, juegos, apoyo y complicidad que compartimos; gracias por estar ahí cuando los necesito.

**José Luis**, gracias porque has compartido conmigo esta etapa y lo fascinante que es nuestra carrera; te agradezco que siempre tienes una palabra de aliento cuando más lo necesito y por todos momentos que juntos vivimos.

Al **Dr. Samuel Canizales Quinteros**, por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme ser parte del equipo.

A la **Dra. Paola León Mimila**, por su apoyo, consejos y asesorías en todo el proceso de este trabajo; gracias por la paciencia, ayuda y guía que me brindas.

A **toda mi familia**: tíos, tías, abuelita Ema y abuelita Bertha, que no sólo me han estado siempre para mí, también para mis papás; gracias porque ustedes han sido fundamentales para que pudiera seguir adelante en todos los aspectos de mi vida.

A mis amigos **Naye, Perlita, Jess, Brenda, Julio, Saúl, Johana**, les agradezco porque a pesar de la distancia y el tiempo, desde que los conozco han compartido conmigo alegrías, tristezas, ánimos y el sueño de ser profesionistas.

A todas las personas que contribuyeron de alguna manera para que pudiera realizar este proyecto experimental y mis compañeros de laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y los buenos profesores que he tenido a lo largo de mi vida académica.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> _ _ _ _ _	6
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> _ _ _ _ _	7
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> _ _ _ _ _	8
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> _ _ _ _ _	9
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> _ _ _ _ _	11
2.1. Hígado graso no alcohólico	11
2.1.1. Definición	11
2.1.2. Epidemiología	11
2.1.3. Etiopatogenia	12
2.1.4. Diagnóstico	15
2.1.5. Tratamientos	18
2.1.6. Antecedentes genéticos	19
2.1.6.1. Microsatélite promotor de HMOX1	22
2.1.6.2. SNP de HMOX1	23
2.1.6.3. Gen HMOX1	24
2.2. Enzima hemoxigenasa 1	26
<b>3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> _ _ _ _ _	29
3.1. Objetivo general	29
3.2. Objetivos particulares	29
3.3. Hipótesis	29
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	30
<b>5. METODOLOGÍA</b> _ _ _ _ _	32
5.1. Características generales del estudio	33
5.2. Consideraciones éticas	33
5.3. Evaluación antropométrica	33
5.4. Mediciones bioquímicas	34
5.5. Cuantificación de lípidos hepáticos	34

5.6.	Diagnóstico histológico	35
5.7.	Extracción de ADN	35
5.8.	Amplificación del (GT) <sub>n</sub> de HMOX1	36
5.9.	Electroforesis capilar de alta resolución del STR	37
5.10.	Validación de datos con muestras de referencia	38
5.11.	Genotipificación de los SNP por sondas TaqMan	39
5.12.	Análisis de desequilibrio de ligamiento y construcción de haplotipos	40
5.13.	Extracción de ARN	41
5.14.	Ensayo de expresión de HMOX1 por PCR en tiempo real	41
5.15.	Análisis estadístico	42
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> _ _ _ _ _	<b>44</b>
6.1.	Características de la población estudiada	44
6.2.	Frecuencia, distribución y análisis de riesgo del microsatélite promotor (GT) <sub>n</sub> de HMOX1	45
6.3.	Polimorfismos de un solo nucleótido rs2071746 y rs2071748	49
6.3.1.	Desequilibrio de ligamiento entre las variantes	49
6.3.2.	Frecuencia, distribución y análisis de riesgo en EHNA de rs2071747	50
6.4.	Frecuencia, distribución y análisis de riesgo en EHNA de haplotipos	53
6.5.	Análisis de expresión del gen HMOX1	55
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> _ _ _ _ _	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> _ _ _ _ _	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> _ _ _ _ _	<b>68</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS</b> _ _ _ _ _	<b>69</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS</b> _ _ _ _ _	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Prevalencia de HGNA por IMC	12
2	Mecanismo general del desarrollo de HGNA	14
3	Hallazgos histológicos en el HGNA	17
4	Algoritmo de diagnóstico propuesto	18
5	Prevalencia de HGNA por etnia	20
6	Número de alelos de riesgo con relación a la cantidad de triacilglicéridos hepáticos	21
7	Esquema del gen HMOX1	25
8	Reacción principal de hemoxigenasa	26
9	Estructura de HO-1	27
10	Diagrama metodológico	32
11	PCR in-silico de UCSC: Genome Browser	37
12	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%	37
13	Electroferograma	38
14	Esquema de genotipificación SNP rs2071746	40
15	Mapa de calor de equilibrio de ligamiento	40
16	Electroferogramas RIN	41
17	Curva de expresión	42
18	Prevalencia del HGNA en obesos mórbidos mexicanos	44
19	Distribución global del (GT) <sub>n</sub> de HMOX1	45
20	Distribución del (GT) <sub>n</sub> de HMOX1 en cada uno de los alelos	46
21	Distribución del (GT) <sub>n</sub> de HMOX1 en casos y controles	47
22	Genotipo del (GT) <sub>n</sub> de HMOX1 en casos y controles	48
23	Mapa de calor y posición de las variantes	50
24	Frecuencia de los SNP en la población total	51
25	Frecuencia de los SNP en casos y controles	51
26	Frecuencia de los diferentes haplotipos en la población total	53
27	Frecuencia de los haplotipos en casos y controles	53
28	Expresión del gen HMOX1 en la enfermedad	55
29	Expresión del gen HMOX1 en casos y controles	56
30	Expresión del gen HMOX1 con respecto al microsatélite promotor	56
31	Expresión génica de HMOX1 con el grado de inflamación	57



<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
32	Correlación entre los niveles de triacilglicéridos con la expresión de HMOX1	58
33	Correlación de insulina con los niveles de expresión de HMOX1	58
34	Resumen del estudio	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Principales biomarcadores séricos asociados a hígado graso no alcohólico.	16
2	Clasificación del IMS según la OMS	33
3	Puntuación de Kleiner para las características histológicas empleadas en el diagnóstico de HGNA	35
4	Condiciones utilizadas en la PCR para la amplificar el STR de HMOX1	36
5	Características según los grupos de estudio seleccionados	45
6	Clasificación de (GT) <sub>n</sub> de HMOX1 con base en la mediana estadística	47
7	Análisis de riesgo en el progreso a EHNA con el (GT) <sub>n</sub> de HMOX1	48
8	Asociación del (GT) <sub>n</sub> de HMOX1 con los parámetros bioquímicos e histológicos del HGNA	49
9	Análisis de riesgo de los SNP con el progreso a EHNA	52
10	Asociación del SNP rs2071746 con los parámetros bioquímicos e histológicos del HGNA	52
11	Análisis de riesgo de los haplotipos en casos y controles	54
12	Asociación del haplotipo A-Largo-G con parámetros bioquímicos e histológicos	54

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AGL	Ácidos grasos libres
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
AUDIT	Prueba de identificación de trastornos del consumo de alcohol
DL	Desequilibrio de ligamiento
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
EHS	Esteatosis hepática simple
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GWAS	Escaneo del genoma completo (siglas en inglés)
HDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HMOX1	Gen que codifica para la hemoxigenasa 1
HO-1	Hemoxigenasa 1
HO-2	Hemoxigenasa 2
IC	Intervalo de confianza
IMC	Índice de masa corporal
LDL	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
RM	Razón de momios
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
SM	Síndrome metabólico
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (siglas en inglés)
STR	Repetidos cortos en tándem (siglas en inglés)
TG	Triacilglicéridos
VHC	Virus de la hepatitis C
γ-GT	Gamma-glutamil transpeptidasa

## INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad con cifras epidémicas en todo el mundo, que trae consigo distintas comorbilidades metabólicas como el hígado graso no alcohólico (HGNA). En México, el 72.5% de la población presenta sobrepeso u obesidad, por lo que, considerando que se estima que alrededor del 70% de estas personas tiende a desarrollar HGNA, no es de extrañar que esta condición sea cada vez más prevalente en este país, significando una enfermedad hepática crónica con un riesgo de muerte asociado del 12% de quienes la padecen, en un período promedio de 10 años. Sin embargo, el alza de obesidad también afecta a los menores, teniendo entre sus consecuencias que el HGNA es actualmente el mayor problema hepático en niños y adolescentes a nivel mundial, derivando en estadios tempranos de insuficiencia hepática, cirrosis o hepatocarcinoma (León-Mimila, 2017; Betancourt-García, *et al*, 2016; Hernández, *et al*, 2016).

El HGNA es una enfermedad progresiva y crónica que se compone de dos entidades, la esteatosis hepática simple (EHS) en donde existe una acumulación de triacilglicéridos y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que además del almacenamiento de lípidos presenta un estado de estrés oxidativo e inflamación crónica; esta segunda entidad es la parte patógena de la enfermedad, la cual en estadios avanzados puede resultar en la pérdida de la función del hígado llevando a algunos pacientes a requerir un trasplante. Lo anterior se complica con las pocas herramientas, inespecíficas e invasivas, que se tienen para su diagnóstico (CENATRA, 2016; Vega-Badillo, 2016; Patel, *et al*, 2016).

No obstante, a pesar de la importancia que ha tomado esta entidad hepática en los últimos años, aún existen muchas interrogantes acerca de los mecanismos moleculares implicados en el progreso de EHS a EHNA o sus diferencias en el cuadro clínico; por esta razón, la investigación se ha encaminado hacia la identificación de los factores genéticos, dado que la heredabilidad calculada para esta condición es de alrededor del 34%, buscando así no sólo entender esta patología, sino también encontrar nuevas formas de prevención o diagnóstico (Vega-Badillo, 2016; León-Mimila, *et al*, 2015).

Recientemente, los estudios de escaneos del genoma completo (GWAs, por sus siglas en inglés) han permitido identificar variantes genéticas asociadas con el inicio y progresión del HGNA, particularmente el polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) rs738409 localizado en el gen PNPLA3 (gen de patina similar al dominio 3 de la fosfolipasa, por sus siglas en inglés), el cual se propone como el principal SNP y gen regulador de la esteatosis hepática y progresión del daño hepático. Sin embargo, en conjunto las variantes genéticas asociadas con el HGNA sólo logran explicar una pequeña proporción de la acumulación de lípidos en el hígado (Sookoian, *et al*, 2017; Speliotes, *et al*, 2011; Romeo, *et al*, 2008).

En este sentido, un estudio reciente realizado en un grupo de niños y adolescentes asiáticos, con diagnóstico de hígado graso no alcohólico evaluado por ultrasonido, encontró que un mayor número de repetidos del microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 se asoció significativamente con un mayor riesgo de HGNA y con mayor resistencia a la insulina (Chang PF, *et al*, 2015), debido a que el gen HMOX1 codifica para la hemoxigenasa 1 (HO-1), una enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo, propuesta como parte de los sistemas antioxidantes de la célula, con la capacidad de sobreexpresarse en presencia de metabolitos potencialmente tóxicos como las especies reactivas de oxígeno (ERO). Por lo tanto, es probable que tanto el microsatélite del promotor, como la enzima HMOX1 puedan tener una participación importante en la evolución a estadios más severos del daño hepático como la EHNA, sin embargo, a nuestro conocimiento esto no ha sido evaluado (Martínez–Hernández, *et al*, 2015; Córdova, *et al*, 2012; Song, *et al*, 2009)

Por tanto, en este trabajo, se evaluó la asociación entre el microsatélite (GT)<sub>n</sub> y dos SNP del promotor del gen HMOX1 con el HGNA y su progresión a EHNA en una cohorte de sujetos mexicanos con obesidad mórbida.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Hígado graso no alcohólico**

#### **2.1.1 Definición**

Se denomina hígado graso no alcohólico (HGNA) a la acumulación de triacilglicéridos (TG) en más del 5% de los hepatocitos, en ausencia de una causa secundaria de acumulación de grasa en el hígado, como el consumo significativo de alcohol, uso de medicamentos esteatogénicos, drogas, alguna condición genética o virus que comprometan la función hepática, como el virus de la hepatitis C (Castro et al, 2015; LaBrecque et al, 2012; Carrillo et al, 2011).

El HGNA es una condición progresiva que comprende un continuo de afecciones las cuales varían en cuanto a la gravedad del daño hepático. Esta condición puede evolucionar de la esteatosis hepática simple (acumulación de triacilglicéridos) a un estado más grave, acompañado de un proceso inflamatorio y daño de hepatocitos (esteatohepatitis no alcohólica), fibrosis, cirrosis e incluso puede conducir al desarrollo de carcinoma hepatocelular (Vega-Badillo, 2016; Castro, *et al*, 2015)

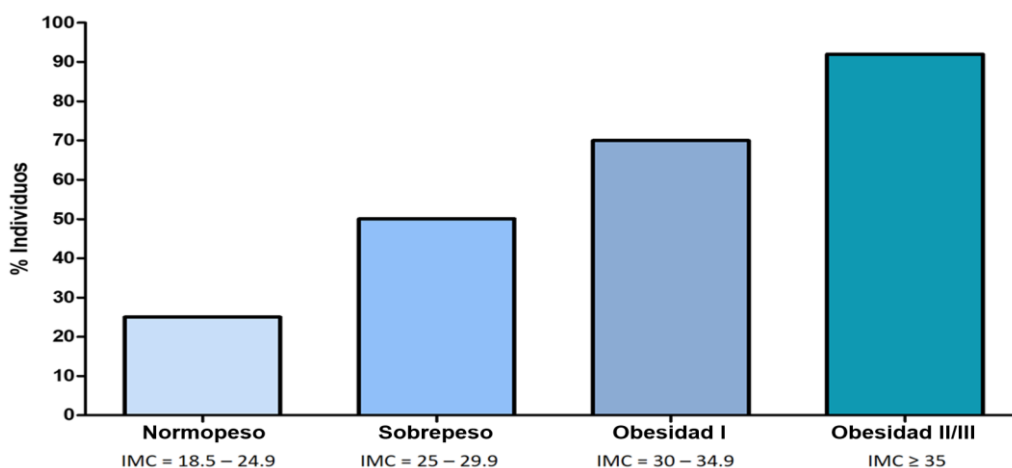
#### **2.1.2 Epidemiología**

El hígado graso no alcohólico en la actualidad es considerado la enfermedad hepática crónica más común en el mundo y se ha convertido en la principal indicación de trasplante hepático (Castro, *et al*, 2015; LaBrecque, *et al*, 2012). En comparación a la incidencia de otras enfermedades hepáticas, un mayor porcentaje (~35-50%) de casos de carcinoma hepatocelular se originan de la EHNA, siendo en su mayoría casos asintomáticos; por tanto, estos tumores tienden a ser más grandes y menos susceptibles a tratamientos en comparación con aquellos debidos a otras etiologías (Patel, *et al*, 2016).

La prevalencia de HGNA en la población general es aproximadamente del 25%. Sin embargo, no existe una cifra exacta ya que, al tratarse de una enfermedad asintomática, el diagnóstico es azaroso llevándose a cabo sólo en personas que se

sospecha tienen alguna otra enfermedad no relacionada (Hernández, *et al*, 2016; Vega-Badillo, 2016; LaBrecque, *et al*, 2012).

En los últimos años ha habido un aumento exacerbado en la prevalencia de esta condición, paralela al incremento en la prevalencia de obesidad, diabetes, dislipidemias y síndrome metabólico, por lo cual se ha considerado al HGNA como la expresión hepática de este síndrome (Bernal, 2016). En México, según datos de la ENSANUT medio camino, el 72.5% de la población mexicana presenta algún grado de sobrepeso u obesidad (Hernández, *et al*, 2016); por lo que, considerando que la prevalencia de HGNA en estos pacientes es de hasta un 92%, se puede estimar que aproximadamente 60 millones de mexicanos presentan HGNA.



**Figura 1. Prevalencia del hígado graso no alcohólico por el IMC.** Se observa un aumento proporcional entre el índice de masa corporal (IMC, kg/m<sup>2</sup>) y la prevalencia de hígado graso no alcohólico [Adaptado de Vega-Badillo, 2016; LaBrecque, *et al*, 2012].

### 2.1.3 Etiología

El HGNA es una enfermedad que presenta una alta variabilidad en cuanto a la tasa de progresión y las manifestaciones clínicas entre individuos. Esta alta variabilidad refleja la complejidad de la historia natural de esta condición y su origen multifactorial. Como muchas otras enfermedades metabólicas, el HGNA es ocasionado por la interacción entre los factores ambientales (principalmente por una dieta alta en calorías, ácidos grasos saturados e hidratos de carbono simples), sedentarismo, el microbioma y los factores de riesgo genéticos (Castro, *et al*, 2015; León-Mimila, *et al*, 2015; Martín-Domínguez, *et al*, 2013; LaBrecque, *et al*, 2012).

Se han propuesto varias hipótesis acerca de la fisiopatología del HGNA, considerando que es una condición compleja y progresiva. Actualmente la teoría más aceptada es aquella basada en múltiples agresiones que ocurren simultáneamente y las cuales determinan la severidad de esta condición considerando las entidades que lo integran (EHS y EHNA); aunque, la teoría mejor descrita y que ayuda a la comprensión de la fisiopatología de esta condición es la teoría de las dos agresiones (Buzzetti, *et al*, 2016; Castro, *et al*, 2015).

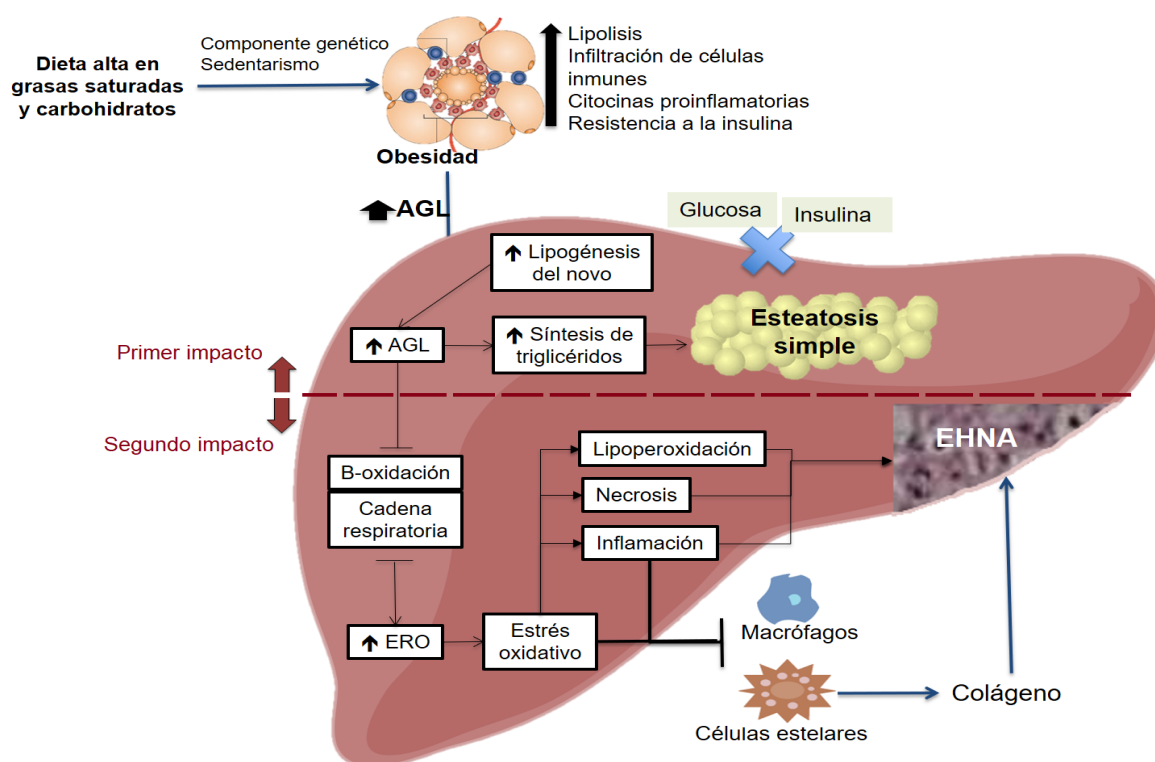
En esta teoría se dice que, en la primera agresión, ocurre la acumulación de grasa en forma de triacilglicéridos o lo que se denomina esteatosis hepática, en donde existe una captación exacerbada de ácidos grasos libres (AGL) provenientes de la lipólisis del tejido adiposo periférico, como mecanismo compensatorio de la resistencia a la insulina generada por una dieta alta en carbohidratos y grasas saturadas. Lo anterior provoca una disfunción de la  $\beta$ -oxidación, pues la célula intentará producir energía por vías alternas a la glucólisis, haciendo uso de los AGL que tiene disponibles, debido a que no puede introducir grandes cantidades de glucosa; además, existe una alteración en el transporte de triacilglicéridos y colesterol por el exceso de AGL que fueron captados. Hasta este punto se considera una entidad benigna en la que basta con una dieta adecuada, ejercicio y corregir el factor metabólico asociado, es decir dislipidemias, obesidad central o diabetes, para lograr la recuperación total del órgano (Bernal, 2016; Vega-Badillo, 2016; Castro, *et al*, 2015).

Para el segundo impacto, que lleva al desarrollo de esteatohepatitis, las alteraciones provocadas por los AGL en la  $\beta$ -oxidación y la cadena de transporte de electrones, provocan disfunción mitocondrial, la cual resulta en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), llevando a la peroxidación de lípidos en distintos compartimentos celulares, incluyendo la membrana celular, por lo que se produce la pérdida de forma o balonamiento hepatocelular. Este daño condiciona un incremento en la respuesta inflamatoria en el hepatocito y las células periféricas como macrófagos, ambas estimuladas por el estrés oxidativo, que se agrava debido a la obesidad, pues hay una gran producción de moléculas proinflamatorias provenientes del tejido adiposo periférico; además existe una baja en la producción de adiponectina, una enzima que sólo se produce en estos tejidos, implicada en frenar la respuesta inflamatoria y la oxidación de AGL (Vega-Badillo, 2016; Bernal, 2016; Martín, *et al*, 2013). Lo anterior

condiciona un mayor grado de apoptosis e infiltrado inflamatorio asociados al balonamiento celular; siendo esta enfermedad una consecuencia de la pérdida de homeostasis celular, a favor de moléculas prooxidantes e inflamatorias (Martín, *et al*, 2011; Castro, *et al*, 2015).

En este punto es importante señalar que hay estudios que sugieren que los TG tienen un bajo potencial tóxico, por lo que otros lípidos, como el colesterol, podrían coadyubar a la progresión del daño hepático y a la presentación de la forma más severa de la enfermedad o EHNA (Vega-Badillo, 2016)

Cuando el hígado está sometido a un daño oxidativo crónico con inflamación, desencadena un proceso necrótico en el hepatocito y la activación de células estelares, las cuales tienen la capacidad de producir fibras de colágeno, resultando en el desarrollo de fibrosis. Sólo el 3% de estos individuos pueden evolucionar a cirrosis, insuficiencia hepática o hepatocarcinoma. El riesgo asociado de muerte en pacientes con EHNA es del 12% en un período promedio de 10 años. (Vega-Badillo, 2016; Castro, *et al*, 2015; LaBrecque, *et al*, 2012).



**Figura 2. Mecanismo general del desarrollo de HGNA.** Se esquematizan la teoría de los dos impactos, englobando las dos entidades que abarca, es decir, esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Ácidos grasos libres (AGL); especies reactivas de oxígeno (ERO). [Modificado de León-Mimila, 2017; Castro, *et al*, 2015].



#### 2.1.4 Diagnóstico

La mayoría de los pacientes con HGNA pueden cursar asintomáticos, sin alteraciones clínicamente relevantes durante décadas, sin embargo, algunos pueden progresar a estadios más severos de la enfermedad rápidamente. Siendo común que su diagnóstico sea con base en pruebas de laboratorio que regularmente se prescriben en busca de otras enfermedades no relacionadas, principalmente una elevación crónica de las transaminasas, o pruebas de imagenología donde se evidencia la presencia de grasa en el hígado (Castro, *et al*, 2015; LaBrecque, *et al*, 2012).

Aunque no se tienen registros exactos de cuánto tiempo transcurre para la progresión de EHS a EHNA, pues por lo regular el diagnóstico se realiza cuando el paciente ya presenta un cuadro avanzado en el que la evolución es variada según las comorbilidades que presente, en promedio según lo determinado mediante un metaanálisis de estudios epidemiológicos, aquellos pacientes con diagnóstico de EHNA progresan a una etapa de fibrosis cada 7 años, mientras que aquellos con HGNA progresan cada 14 años. En general, ~20% de los pacientes progresan rápidamente a fibrosis avanzada; sin embargo, actualmente no se cuenta con métodos para identificar a los progresores rápidos. Además, la evaluación de la historia natural de la enfermedad no se ha esclarecido, debido a que las lesiones histológicas del HGNA pueden progresar, retroceder o mantenerse estables en el tiempo (Vega-Badillo, 2016; Castro, *et al*, 2015; LaBrecque, *et al*, 2012).

En pacientes con sospecha de HGNA, se deben descartar la presencia de agentes virales principalmente de virus de la hepatitis C (VHC), enfermedades hepáticas autoinmunes, errores innatos del metabolismo, hepatopatías congénitas o hereditarias, nutrición parenteral, consumo de drogas o el uso constante de medicamentos hepatotóxicos. Para excluir que se trata de una esteatosis alcohólica, se recomienda realizar cuestionarios especializados para evaluar si el paciente toma más de 20 g de alcohol al día. De igual forma, se deben buscar los factores de riesgo comúnmente asociados, es decir, una edad mayor a 40 años, la presencia de obesidad, diabetes u otros componentes del síndrome metabólico. Posteriormente, una vez descartadas otras causas de patología hepática, se debe confirmar el diagnóstico mediante pruebas de laboratorio e imagenología (Castro, *et al*, 2015; IMSS, 2014; LaBrecque, *et al*, 2012).

Recientemente, se han propuesto diferentes biomarcadores que se utilizan para otras patologías hepáticas en el diagnóstico de EHNA, que, a pesar de no ser definitivos, sirven como una guía; siendo los más importantes niveles séricos de glucosa, bilirrubinas, transaminasas, principalmente ALT (alaninaminotransferasa), triacilglicéridos y la presencia de algunas citocinas, como se detalla en la Tabla 1 (Santoyo, 2016; IMSS, 2014; LaBrecque, *et al*, 2012; Henry, *et al*, 2010).

**Tabla 1.** Principales biomarcadores séricos asociados a hígado graso no alcohólico.

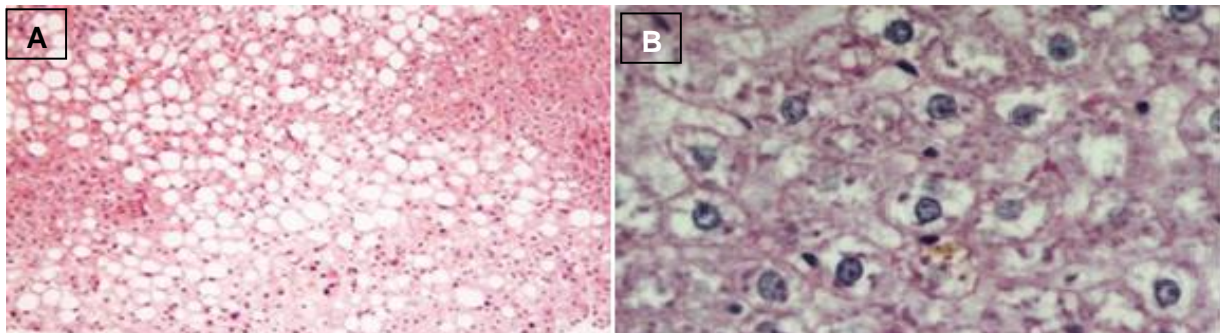
Parámetro	Valores de referencia	Alteraciones relacionadas a HGNA
Glucosa	60 – 100 mg/dL	Elevada (diabetes mellitus tipo 2)
HOMA	1.8 – 2	Elevado
ALT	Hombres: ≤ 30 UI/L Mujeres: ≤ 19 UI/L	Elevada
AST	Hombres: ≤ 40 UI/L Mujeres ≤ 35 UI/L	Elevada
AST/ALT	1	< 1
Albúmina	3.9 – 5.1 g/dL	Disminuida
Colesterol	< 200 mg/dL	Normal
Triacilglicéridos	<150 mg/dL	Normal o elevado
HOMA: homeostatic model assessment (índice para determinar resistencia a la insulina) ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa		

El estudio enzimático es útil para llegar a un diagnóstico de daño hepático, debido a que en condiciones fisiológicas normales la concentración plasmática de las transaminasas (AST y ALT), así como  $\gamma$ -GT es muy baja, debido a su localización intracelular, por lo que incrementos relativos de 5 veces lo normal en plasma evidencian una lisis celular severa, encontrándose alteradas en cualquier patología hepática con un alto grado de sensibilidad (Santoyo, 2016; Henry, *et al*, 2010).

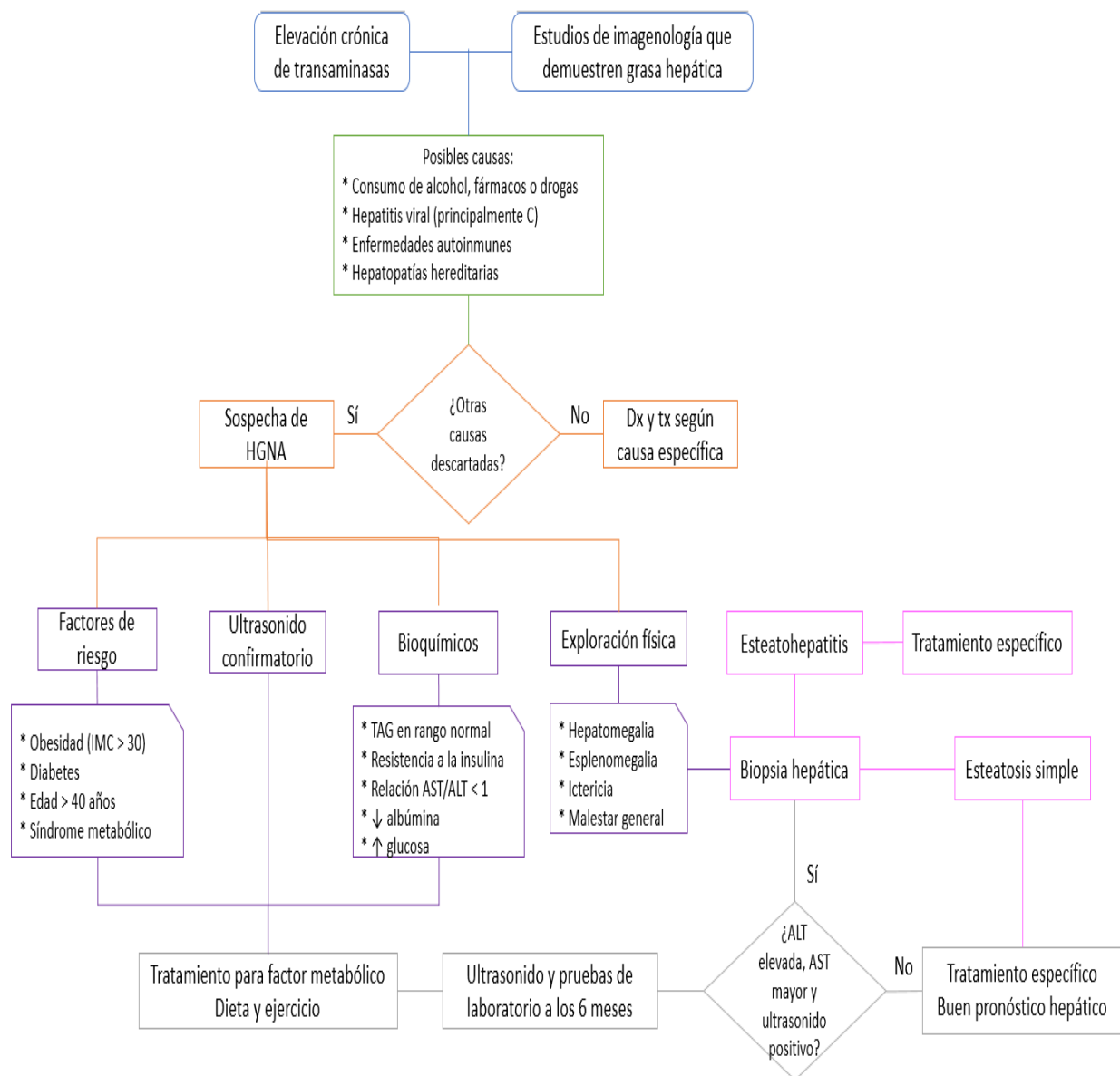
En cuanto a las pruebas de imagenología, el ultrasonido es el método de elección debido a su accesibilidad, especificidad y sensibilidad mayor al 50%, sin embargo, este método no distingue la presencia de EHNA, el grado de daño hepático, inflamación o el grado fibrosis. En ese sentido, aunque la resonancia magnética es el mejor método no invasivo para establecer un diagnóstico de HGNA, ya que relaciona la intensidad entre el bazo y el hígado para determinar el contenido de grasa hepática y el grado de inflamación, este método es poco utilizado debido a su baja accesibilidad (IMSS, 2014; Carrillo, *et al*, 2011).

A pesar de que la mayoría de los pacientes son asintomáticos, en algunos casos pueden referir dolor leve en el cuadrante derecho, fatiga o cansancio generalizado (astenia) y debilidad muscular. En la exploración física se encuentran datos de hepatomegalia, esplenomegalia o ictericia, cuando se trata de un problema hepático avanzado (LaBrecque, *et al*, 2012; Carrillo, *et al*, 2011).

La biopsia hepática es considerada el estándar de oro para establecer un diagnóstico certero de EHNA, ya que el análisis histológico permite establecer el grado de infiltración de grasa en el hígado (esteatosis) así como el grado de daño hepático (inflamación y/o balonamiento de los hepatocitos) (Figura 5); no obstante, este procedimiento es invasivo y debe ser realizado por un patólogo experto para evitar problemas de muestreo o interpretación, recomendándose sólo en personas con elevaciones crónicas de los niveles de transaminasas o ultrasonido con evidencias de esteatosis recurrentes durante seis meses, aún con tratamiento para las posibles comorbilidades, así como cuando hay evidencia de daño hepático en la exploración física (IMSS, 2014; LaBrecque, *et al*, 2012; Carrillo, *et al*, 2011).



**Figura 3. Hallazgos histológicos en hígado graso no alcohólico.** En la imagen A se muestra la histología de tejido hepático con esteatosis simple. Imagen B, hígado con esteatohepatitis, se observa balonización celular y vacuolas lipídicas microvesiculares. [Modificado de Santos, *et al*, 2010; Buqué, *et al*, 2008]



**Figura 4. Algoritmo de diagnóstico propuesto.** Transaminasas: alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST); diagnóstico (DX); tratamiento (Tx); hígado graso no alcohólico (HGNA); índice de masa corporal (IMC); ultrasonido positivo con evidencia de esteatosis. [Adaptado de IMSS, 2014; LaBrecque, *et al*, 2012]

### 2.1.5 Tratamiento

Actualmente no existe algún fármaco aprobado para el tratamiento del hígado graso no alcohólico. Por tanto, la intervención se basa en el tratamiento de los factores asociados a su desarrollo, como la obesidad, diabetes o dislipidemias. (Castro, *et al*, 2015; IMSS, 2014; LaBrecque, *et al*, 2012). Dado que los pacientes con obesidad son un grupo importante de riesgo, diversos estudios han demostrado que la reducción

gradual del 5 al 10% de peso impacta directamente en la mejoría de los parámetros histológicos y séricos del HGNA, por lo cual el tratamiento se basa en la administración de una dieta hipocalórica, con alto contenido de alimentos ricos en fibra vegetal y antioxidantes, así como rutinas de ejercicio preferentemente aeróbico (Castro, *et al*, 2015). En las personas que presentan alguna comorbilidad del síndrome metabólico como diabetes o dislipidemias, el tratamiento farmacológico de estas condiciones (metformina o fibratos) suele ser adyuvante en la remisión parcial o total del daño hepático (IMSS, 2014; LaBrecque, *et al*, 2012).

Por otra parte, la cirugía bariátrica es recomendada en pacientes con IMC >35, ya que se ha mostrado un impacto positivo sobre los niveles de transaminasas, generando una reducción en la esteatosis hepática de hasta un 90%, en la esteatohepatitis de 84%, así como la fibrosis en 50% (Cazzo, *et al*, 2017; LaBrecque, *et al*, 2012; Carrillo, *et al*, 2011).

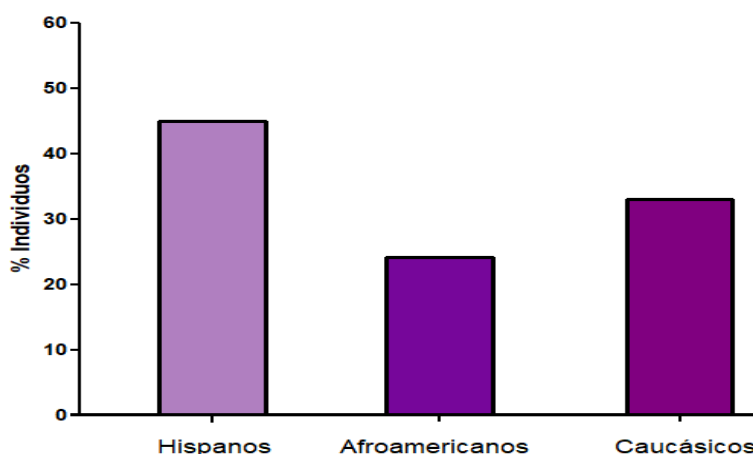
Para casos muy avanzados, es decir, cuando ya se presenta cirrosis, está indicado el trasplante hepático, sin embargo, es importante mantener un estilo de vida saludable, pues existe un riesgo incrementado de volver a desarrollar la enfermedad en el órgano trasplantado si no se lleva un control adecuado. Cabe señalar que este procedimiento no se realiza regularmente a las personas con IMC >35 por los riesgos que conlleva la cirugía y la posibilidad de volver a desarrollar HGNA (Cazzo, 2017; LaBrecque, *et al*, 2012).

#### **2.1.6. Antecedentes genéticos**

Se ha sugerido que la elevada prevalencia del HGNA puede ser explicada, en parte, por factores genéticos, ya que se ha calculado que la heredabilidad en hispanos es de alrededor del 34%, contrastando con los afroamericanos, el grupo menos susceptible a esta hepatopatía en donde componente genético explica entre 14 al 20% la enfermedad (Sookoian, *et al*, 2017).

Al estudiar la prevalencia diferencial entre personas de varios grupos étnicos, se confirma que el componente genético y el ambiente donde se desarrollan son parte fundamental de la etiopatogenia; lo anterior fue demostrado en el trabajo de DeFilippis *et al* en el 2013, pues en una cohorte de 6814 participantes mexicoamericanos,

afroamericanos y caucásicos, diagnosticados por tomografía computarizada, encontraron en aquellos con ascendencia hispana un porcentaje mayor de sujetos con esta condición hepática, Figura 5.



**Figura 5. Prevalencia del hígado graso no alcohólico por etnia.** Hispanos 45%; afroamericanos 24% [Adaptado de DeFilippis, *et al*, 2013; LaBrecque, *et al*, 2012].

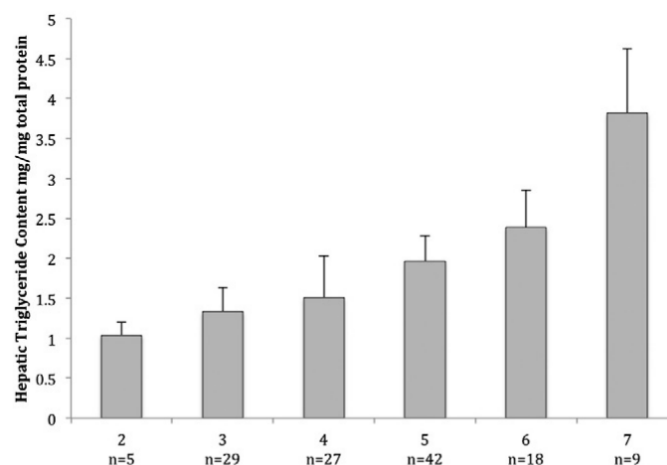
Por esta razón, recientemente, los estudios genéticos basados en el análisis de genes candidatos o GWAS, han identificado variantes genéticas asociadas a la acumulación de grasa hepática y la progresión a EHNA (Sookoian, *et al*, 2017; Palmer, *et al*, 2013). Es así como, en los trabajos de GWAS realizados para el estudio de HGNA, se han identificado diversos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) relacionados con el metabolismo de los lípidos y la glucosa, los cuales están estrechamente relacionados a la patogenia de esta condición hepática, diferenciándose según las características de la población de estudio, principalmente el grupo de edad y la etnia de los participantes (León-Mimila, *et al*, 2015; Speliotes, *et al*, 2011; Romeo, *et al*, 2008).

Actualmente, se considera que el gen PNPLA3, específicamente el SNP rs738409 (I148M), identificado por Romeo y *et al* en el año 2008, es la variante que explica en mayor medida la acumulación de grasa y la progresión del daño hepático en diversos grupos poblacionales (Sookoian, *et al*, 2017). El gen PNPLA3 codifica para una enzima con actividad de hidrolasa y transacetilasa de triacilglicéridos, por lo cual promueve tanto su anabolismo como catabolismo. Estudios funcionales *in vitro* han demostrado que la variante I148M es funcional y restringe el acceso del sustrato al sitio catalítico de la enzima reduciendo su actividad. Llama la atención que esta variante es

notablemente más frecuente en población de origen americano en comparación con otras poblaciones en el mundo (Sookian, *et al*, 2017; León-Mimila, *et al*, 2015).

Otros polimorfismos que también han sido consistentemente asociados en diversos estudios con una mayor susceptibilidad a desarrollar HGNA se localizan en los genes *NCAN* (neurocan), *TM6SF2* (miembro 2 de la superfamilia transmembranal 6) y *GCKR* (regulador de glucocinasa). No obstante, a pesar de su asociación, estas variantes no han podido ser incluidas como biomarcadores en la clínica debido a que no han demostrado mejorar la sensibilidad ni la especificidad de las pruebas en más del 1% (Sookoian, *et al*, 2017; Dongionvanni P, *et al*, 2016; Speliotes, *et al*, 2011).

En México, un trabajo previo de nuestro grupo de investigación realizado en la cohorte de obesos mórbidos de la clínica de cirugía bariátrica del hospital General Dr. Rubén Leñero, encontró asociación de variantes en los genes *PNPLA3*, *LYPLAL1*, *GCKR* y *PPP1R3B* con un mayor riesgo de HGNA y EHNA (RM= 2,55, valor  $p = 0,045$ ), aunque, en conjunto estas variantes no explican más del 20% la acumulación de grasa hepática, Figura 7 (León-Mimila, *et al*, 2015).



**Figura 6. Número de alelos de riesgo con relación a la cantidad de triacilglicéridos hepáticos.** Se observa un incremento proporcional entre el número de alelos de riesgo y el contenido hepático de triacilglicéridos. [Obtenido de León-Mimila, *et al*, 2015].

Además, en otro trabajo en la misma cohorte de obesos mórbidos del hospital “Dr. Rubén Leñero”, se observó que cuando había una menor concentración de la proteína transportadora de colesterol-HDL, *ABCA1* (valor  $p < 0.01$ ), así como mayores niveles del *miRNA-33a* (valor  $p = 0.006$ ) y del *miRNA-144* (valor  $p = 0.024$ ), se aumentaba el

riesgo de desarrollar EHNA, sugiriendo que la acumulación de triacilglicéridos no es el único factor que condiciona al desarrollo de HGNA (Vega-Badillo, *et al*, 2017).

Recientemente, un estudio realizado en una cohorte de pacientes pediátricos con diagnóstico de HGNA por medio de ultrasonido (Chang PF, *et al*, 2015) reportó la asociación del microsatélite localizado en el promotor del gen HMOX1, el cual codifica para la enzima hemoxigenasa 1 (HO-1) con el HGNA, siendo la frecuencia del alelo largo de este repetido significativamente mayor en niños con HGNA (RM = 18.84, IC del 95% = 1.45–245.22, valor  $p = 0.025$ ). La presencia de repetidos largos se ha asociado en diversos estudios con una menor expresión del gen HMOX1, y esto a su vez se asocia con un bajo efecto protector ante el estrés oxidativo, ya que esta enzima forma parte de los sistemas antioxidantes de la célula. Sin embargo, se desconoce la participación de este microsatélite en estadios más severos del HGNA como la EHNA (Peachlaner, *et al*, 2015; Córdova, *et al*, 2012).

#### **2.1.6.1 Microsatélite promotor de HMOX1**

Los microsatélites, o STR (short tandem repeat), se definen como secuencias de ADN, con una longitud de 2 a 6 nucleótidos, que se agrupan en bloques de repetidos sin interrupción un determinado número de veces, el cual es variable entre cada individuo (Vázquez, *et al*, 2015).

El microsatélite del gen HMOX1, se localiza en la región promotora del gen, cromosoma 22q12, muy cercano al marco abierto de lectura. Es un repetido dinucleótido (GT), con una longitud variable según la población de estudio. Diversos estudios han reportado, una asociación entre un mayor número de repetidos y la menor expresión del gen HMOX1, resultando en menores niveles de la enzima (Chang PF, *et al* 2015; Peachlaner, *et al*, 2015; Song, *et al*, 2009).

Pechlaner *et al* en el 2015, en un estudio que incluyó 812 sujetos austríacos, reportaron una longitud del microsatélite de 12 a 44 repetidos, los cuales distribuyeron en tres grupos Small (S) <23, Medium (M) =23-31 y Large (L) ≥32, en los que observaron que los sujetos portadores del alelo largo (L) tiene un riesgo incrementado de presentar eventos cardiovasculares (RM= 5.45, IC 95%= 2.39–12.42,  $p < 0.0001$ ) y arterioesclerosis progresiva ( $p = 0.0012$ ).



De igual forma, en el 2012, Córdova y colaboradores estudiaron este microsatélite en 1193 mestizos mexicanos, encontrando que la longitud del STR varía de 10 a 39 repetidos con una distribución bimodal, teniendo como punto de corte 25; con esto ellos concluyen una relación entre lupus eritematoso sistémico (LES) y tener al menos un alelo corto (C) (RM=1.46; IC 95%=1.10–1.95;  $p=0.009$ ), explicando que la asociación entre el alelo C y LES puede deberse a que la sobreexpresión de la enzima promueve la sobreproducción de sus metabolitos secundarios que forman parte de la patogénesis de la enfermedad.

En contraste con la anterior, en el 2015, el grupo de Martínez-Hernández no encontró relación del STR de HMOX1 con el síndrome metabólico (RM=1.0; IC (95%)= 0.7–1.5; valor  $p=1.6$ ), pero si observaron una asociación con la hipertensión arterial (valor  $\beta=3.2$ ; valor  $p=0.009$ ).

#### **2.1.6.2 SNP de HMOX1**

Los polimorfismos de un solo nucleótido son cambios en una sola base de la secuencia de DNA que se presentan en más del 1% de la población. Los genotipos resultantes de estos cambios pueden clasificarse en tres tipos: homocigoto para el alelo común, heterocigoto y homocigoto poco frecuente o raro (Checa, 2007).

El microsatélite promotor (GT) $_n$  de HMOX1 se encuentra en un bloque genético en el que también están presentes los SNP rs2071746 y rs2071748, los cuales se ha demostrado que pueden influir en la expresión del gen HMOX1.

El SNP rs2071746 (A/T) está localizado en la región promotora del gen HMOX1, en el cromosoma 22q12, con distancia al marco abierto de lectura de -413pb. El alelo silvestre es “A” y cuando se encuentra mutado a “T” se sugiere una menor expresión del gen, disminuyendo los niveles de HO-1 (Song, *et al*, 2009; Qiao, *et al*, 2013). Estudios *in silico* han relacionado esta variante con la modulación de la unión de factores de transcripción, así como sensibilidad a DNAsas, aunque no existe soporte experimental que lo compruebe (RegulomeDB<sup>A</sup>, 2011). Según los datos reportados en la literatura, la frecuencia del alelo “A” es de 73% en mexicoamericanos, 37% en afroamericanos y 56% en europeos (Ensembl<sup>A</sup>, 2017).

Por otra parte, el SNP rs2071748 (G/A) se encuentra en el intrón 1 del gen HMOX1, al presentarse el alelo mutado (A), se cree que se disminuye la expresión en comparación con el alelo normal (G). A pesar de que datos *in silico* muestran asociación de esta variante con la modulación de la unión de factores de transcripción y DNAsa, no se cuenta con estudios experimentales sólidos que respalden esta teoría. Cabe señalar, que en el caso de esta variante, la frecuencia para el alelo G se reporta en la literatura como 75% para la población mexicoamericana, 62% en afroamericanos y 44% en europeos (Ensembl<sup>B</sup>, 2017; RegulomeDB<sup>B</sup>, 2011; Sheu, *et al*, 2009).

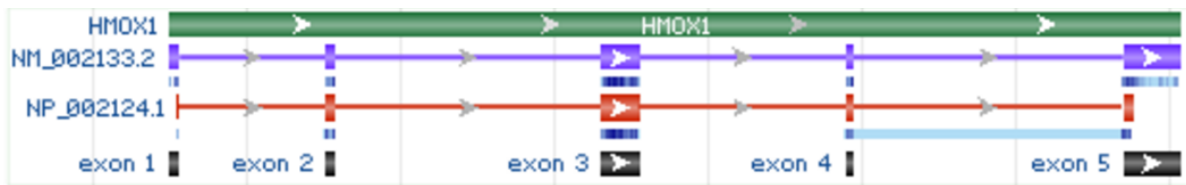
Así pues, un estudio realizado por Sheu *et al* en el 2009, mostró que los polimorfismos no tienen grandes implicaciones en las enfermedades ligadas al estrés oxidativo cuando se estudian por separado; en contraste, al estudiar el bloque mediante un análisis de haplotipos con el microsatélite, los portadores del haplotipo S-TGA ((GT)<sub>n</sub> de HMOX1, rs2071746, rs2071748 y rs5755720, respectivamente) presentaron un mayor riesgo de desarrollar síndrome respiratorio agudo (RM=1.75; IC 95%=1.15-2.68;  $p=0.010$ ), así como una tendencia a presentar menores niveles de HMOX1 en circulación ( $p=0.066$ ).

Del mismo modo, Song y colaboradores en el año 2009 en una población de 3089 sujetos chinos, no encontraron asociación con el SNP rs2071746; pero al analizar el microsatélite (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 observaron que el genotipo L/L se asoció con aumento de riesgo para el desarrollo de diabetes (RM = 1.65, IC del 95%= 1.16–2.36, valor  $p= 0.006$ ); cuando estudiaron ambas variantes en conjunto observaron que el haplotipo L-T también incrementaba el riesgo a diabetes (RM=1.56, IC(95%)=1.16-2.09; valor  $p=0.003$ ). Además, en el análisis de expresión, observaron que las personas con DM2 y resistencia a la insulina presentaron una menor expresión de HO-1, según los datos de intensidad de fluorescencia obtenidos por citometría ( $64.8 \pm 13.09$  para los controles;  $38.38 \pm 20.7$  pacientes con IGR;  $37.0 \pm 22.7$  DM2).

### 2.1.6.3 Gen HMOX1

El gen HMOX1, codifica para la proteína hemoxigenasa 1, también llamado BK286B10, HMOX1D o HSP-32. Se localiza en el cromosoma 22 en la región q12.3. Este gen

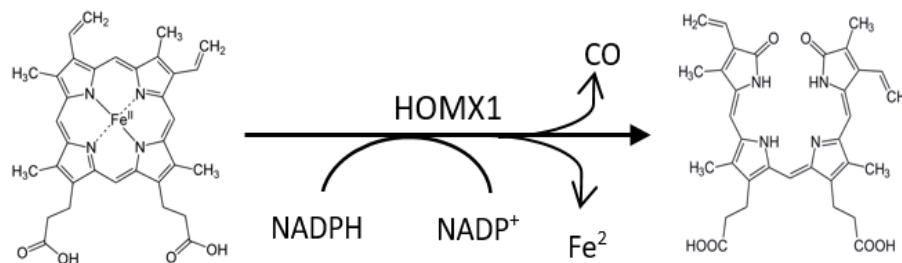
tiene una longitud de 20,148pb y está conformado por 5 exones que codifican un ARN mensajero único que da paso a la proteína funcional.



**Figura 7. Esquema del gen HMOX1.** Se muestran al gen empezando por el marco abierto de lectura; localización aproximada de los cinco exones. [Obtenida de GenBank (NG\_023030.1), 2017].

## 2.2 Enzima hemoxigenasa 1

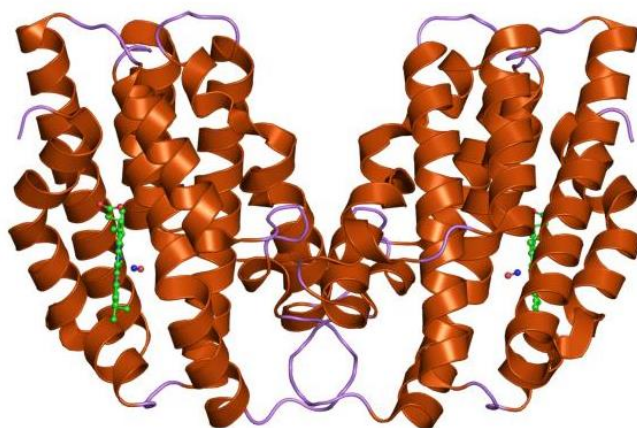
La hemoxigenasa (HO) es la principal enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo, del cual se obtienen como subproductos hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), biliverdina y monóxido de carbono (CO) (UniProtKB (P09601), 2014; Orozco-Ibarra, *et al*, 2010; Garrido, *et al*, 2005).



**Figura 8. Reacción principal de hemoxigenasa.** Lado izquierdo sustrato (grupo hemo); lado derecho producto (biliverdina). [Modificado de Pfam (PF01126), 2016].

En el humano, se conocen dos isoformas, la hemoxigenasa 1 (HO-1) que es inducible y la hemoxigenasa 2 (HO-2) que se expresa de manera constitutiva. Aunque las dos enzimas catalizan la misma reacción, son productos de la expresión de dos diferentes genes, por lo que su estructura difiere en más del 50% de sus aminoácidos (Orozco-Ibarra, *et al*, 2010).

La isoforma HO-1 fue descubierta en 1980, denominada también como proteína de choque térmico 32 (HSP-32, por sus siglas en inglés), se expresa en condiciones fisiológicas normales es en bazo, pero puede sobre expresarse en otros tejidos cuando existen situaciones de estrés para la célula (Orozco-Ibarra, *et al*, 2010). Su peso molecular es de aproximadamente 32 KDa, consta de 233 aminoácidos y está constituido por 4 cadenas (Figura 9) [UniProtKB (P09601), 2014; Pfam (PF01126), 2016]. Entre las moléculas que promueven su expresión, se encuentran, su principal sustrato (el grupo hemo), medicamentos, metales, radiación ultravioleta, hipoxia, endotoxinas bacterianas, además especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, por lo que se asocia a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Garrido, *et al*, 2005),



**Figura 9. Estructura de HO-1.** Estructura propuesta por cristalografía. [Obtenida de Pfam (PF01126), 2016].

A la HO-1 se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiapoptóticas, no sólo por su actividad propiamente, sino por los productos que ella es capaz de generar. Se ha reportado que su expresión se incrementa significativamente en respuesta a estímulos de estrés celular, hipoxia, presencia de endotoxinas bacterianas, radiaciones ionizantes, citocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, metales pesados, etc., por lo que se considera que es la enzima más inducible por diversos estímulos en comparación con cualquier otra descrita hasta el momento. Del mismo modo la HO-1 participa en procesos de proliferación de células endoteliales, transducción de señales intracelulares, homeostasis del ion hierro, regeneración celular, regulación negativa de moléculas y células inflamatorias, regulación positiva de la síntesis de quimiocinas y la vasodilatación, entre otras (OMIM, 2016; Pfam (PF01126), 2016; UniProtKB (P09601), 2014).

En concreto, con relación al HGNA se ha demostrado en modelos murinos a los que se les induce obesidad y diabetes, que la sobreexpresión de gen HO-1 reduce los niveles de citocinas proinflamatorias, la adiposidad, así como la esteatosis hepática y su progresión a EHNA al disminuir el grupo hemo, el cual se ha visto que promueve la producción de ERO (Hinds, *et al*, 2014; Ntube, *et al*, 2013).

Del mismo modo, la HO-1 ha sido implicada en otras enfermedades como asma, aterosclerosis, cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes y metabólicas, debido a la gran cantidad de moléculas que promueven su expresión y la capacidad que tiene de

disminuir el daño producido por las ERO (OMIM, 2016; Pechlaner, *et al*, 2016; Córdoba, *et al*, 2012; Sheu, *et al*, 2009).

Por otra parte, la isoforma HO-2 se expresa normalmente en cerebro, hígado, testículos y endotelio; posee dos sitios de unión al grupo hemo, además del sitio catalítico, teniendo una limitada disponibilidad para realizar reacciones de óxido-reducción y formación de hemoproteínas. Sin embargo, dada su afinidad por las moléculas hemo, puede fungir como modulador de CO, NO y O<sub>2</sub>; siendo similar en la secuencia del gen a la eritropoyetina, encargada de la regulación de oxígeno y nitrógeno (Orozco-Ibarra, *et al*, 2010).

### **3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar la asociación del microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> localizado en el gen HMOX1 con el hígado graso no alcohólico, particularmente en el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica, en sujetos mexicanos con obesidad mórbida.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- \* Determinar la longitud y frecuencia del número de repetidos del microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 en el grupo de obesos mórbidos mexicanos.
- \* Calcular la frecuencia de los SNP en los sujetos participantes.
- \* Establecer si existe una asociación de los tres promotores de región ((GT)<sub>n</sub>, rs2071746 y rs2071748) con el riesgo a desarrollar EHNA.
- \* Evaluar la asociación de las variantes seleccionadas del gen HMOX1 con los parámetros histológicos de HGNA (esteatosis, balonamiento, inflamación y fibrosis).
- \* Evaluar la asociación del (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 y los dos polimorfismos del gen HMOX1 seleccionados, con los parámetros bioquímicos de HGNA (transaminasas, triacilglicéridos y colesterol).
- \* Analizar el desequilibrio de ligamiento entre el STR de HMOX1, rs2071748 y rs2071746.
- \* Construcción de haplotipos y asociación con el riesgo a desarrollar EHNA, así como los parámetros bioquímicos e histológicos relacionados.
- \* Ensayo de expresión por PCR en tiempo real del gen HMOX1 relacionado al HGNA, EHNA, parámetros histológicos y bioquímicos.

#### **3.3 Hipótesis**

Un mayor número de repetidos del microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1, el alelo T del SNP rs2071746 y el alelo A del SNP rs2071748, relacionados con el gen HMOX1 en el cromosoma 22q13, se asocian con el desarrollo de EHNA en sujetos mexicanos con obesidad mórbida.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El hígado graso no alcohólico se considera la enfermedad hepática crónica más común en el mundo, representando un problema de salud pública creciente en función del exacerbado incremento en la prevalencia de obesidad. Además, se ha demostrado que la frecuencia de esta patología es particularmente alta en población de origen hispano, específicamente mexicoamericanos en comparación con otras poblaciones como caucásicos o afroamericanos (Sherif, et al, 2016).

El diagnóstico invasivo (biopsia hepática) e inespecífico (pruebas de laboratorio), la heterogeneidad en el cuadro clínico y la alta heredabilidad calculada en 34% para el HGNA (Vega-Badillo, 2016; Castro, et al, 2015), han abierto el paso a la búsqueda de biomarcadores genéticos que, en conjunto con las pruebas clínicas y bioquímicas ya existentes, ayuden al diagnóstico temprano del HGNA y la prevención de su progresión a estadios más avanzados de la enfermedad.

En este sentido, los análisis de GWAS han identificado variantes genéticas asociadas a esta hepatopatía que no explican, en gran medida, la acumulación de grasa hepática o el daño que se produce, resultando en que su inclusión como biomarcadores no han logrado mejorar la sensibilidad ni especificidad de las pruebas diagnósticas en más del 1% (Sookoian, *et al*, 2017; Romeo, et al, 2008).

Por otra parte, el estudio de genes candidatos también ha contribuido al entendimiento del HGNA; tal es el caso de un trabajo que evidenció una relación directa de un mayor número de repetidos del microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 con el riesgo aumentado de HGNA en niños y adolescentes obesos asiáticos diagnosticados por ultrasonido (Chang PF, *et al*, 2015), ya que se propone que tanto el microsatélite como los SNP rs2071746 y rs2071748, pertenecientes a un bloque génico, modulan la sobreexpresión de la enzima HO-1 que forma parte de los sistemas antioxidantes celulares (Córdova, et al, 2012; Sheu, et al, 2009; Song, et al, 2009), sin embargo no se ha evaluado su participación en estadios más severos de la enfermedad como el HGNA.

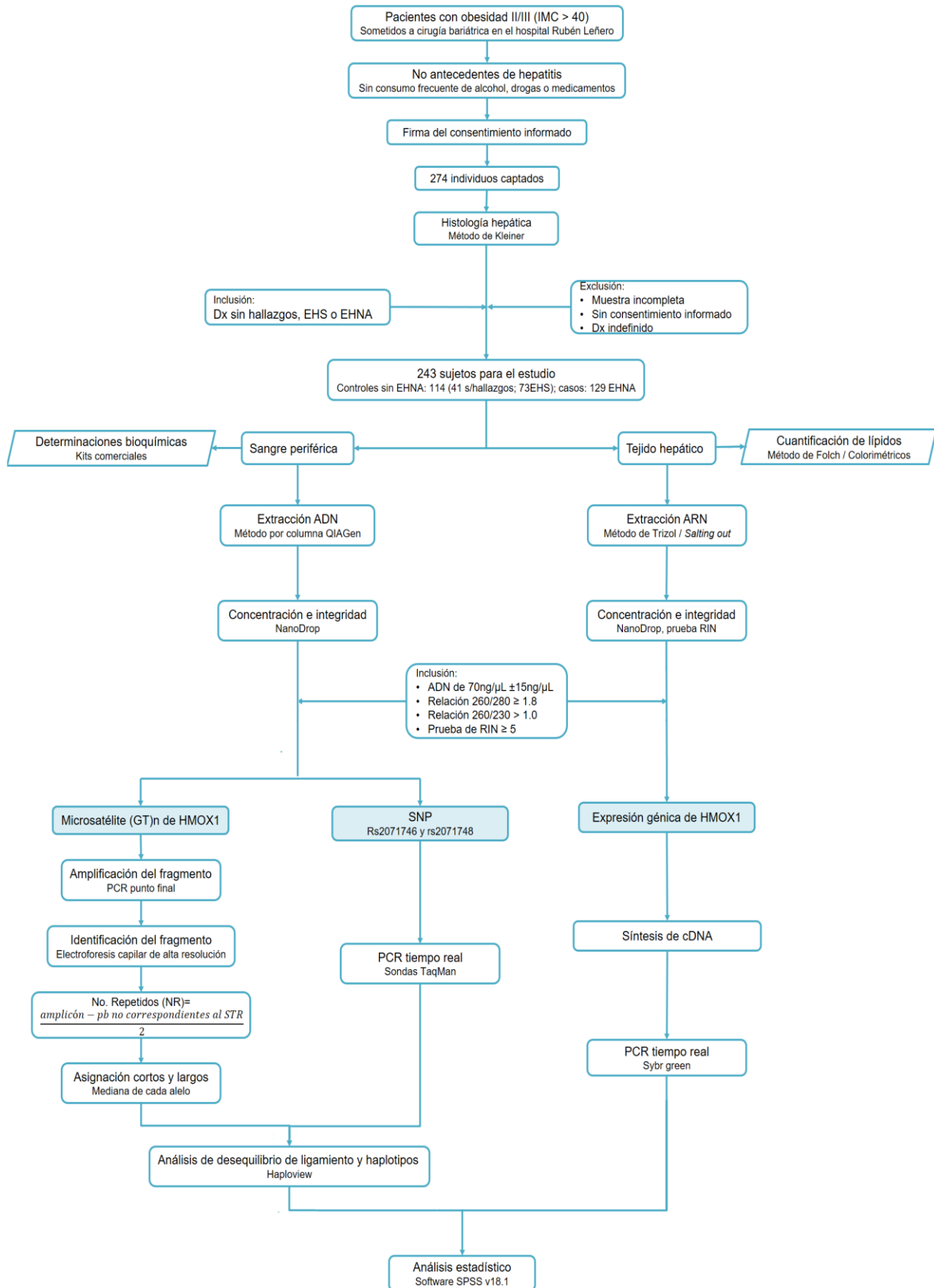
De manera que, aunque estas estrategias genéticas han sido valiosas para la identificación de nuevas variantes génicas y mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la progresión del HGNA; una proporción significativa del componente



genético de predisposición para esta enfermedad aún debe ser identificada y validada, requiriendo esfuerzos adicionales en la búsqueda de genes relevantes para esta condición.

Por lo tanto, el interés de este trabajo fue evaluar la asociación entre variantes localizadas en el promotor del gen HMOX1, principalmente el microsatélite (GT)<sub>n</sub> en la progresión de esteatosis simple a EHNA, así como asociar los parámetros histológicos y bioquímicos en la cohorte de obesos mórbidos mexicanos, sabiendo que esta población tiene alta incidencia de HGNA; lo cual podría conducir a una nueva estrategia para su prevención y/o diagnóstico.

## 5. METODOLOGÍA



**Figura 10. Diagrama metodológico.** Pasos generales por seguir en el estudio de las variantes del gen HMOX1. Índice de masa corporal (IMC), diagnóstico (Dx).

## 5.1 Características generales y población de estudio

El presente trabajo es un estudio de tipo transversal, observacional, el cual incluyó un total de 274 adultos mexicanos mestizos con obesidad grado II o III ( $IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$ ) obtenidos de la cohorte de cirugía bariátrica del Hospital General “Dr. Rubén Leñero” en la Ciudad de México. Como criterio de inclusión se consideró que los participantes no presentaran antecedentes de hepatitis crónica o un consumo de alcohol mayor a 20 g/día. Aproximadamente el 75% de los participantes fueron mujeres con una media de edad de 38 años. De todos los pacientes se obtuvieron muestras de sangre periférica con un ayuno previo de 8-10 horas. Además, se obtuvo una biopsia hepática tomada al momento de la cirugía del borde libre del lóbulo hepático izquierdo mediante la técnica de resección en cuña con bisturí armónico al momento de la cirugía bariátrica.

## 5.2 Consideraciones éticas

Todos los participantes incluidos en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado previo a la realización de la cirugía. Además, este estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica y se realizó con base en los principios establecidos en la declaración de Helsinki.

## 5.3 Evaluación antropométrica

Se realizaron mediciones antropométricas como peso, talla, circunferencia de cintura y circunferencia de cadera siguiendo procedimientos estandarizados y utilizando equipos calibrados según las normas de calidad establecidas internacionalmente (Lohman, 1998). Se calculó el IMC utilizando la fórmula, peso en kilogramos dividido entre la talla en metros elevada al cuadrado y el estatus de obesidad se definió de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación del IMC según la OMS

Valor ( $\text{kg/m}^2$ )	Significado
< 18.5	Desnutrición
18.5 – 24.9	Normal
25.0 – 29.9	Sobrepeso
30.0 – 34.9	Obesidad grado I
35.0 – 39.9	Obesidad grado II
> 40	Obesidad grado III (mórbida)

IMC: Índice de masa corporal. [Adaptado de Vega-Badillo, 2016; OMS, 2017]

#### **5.4 Mediciones bioquímicas**

Las determinaciones bioquímicas se realizaron a partir de una muestra de sangre periférica en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), el cual cuenta con la certificación del *College of American Pathologists*, mediante procedimientos estandarizados y reactivos comerciales. Las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total (CT) y triacilglicéridos (TG) se midieron a través de métodos enzimáticos; los niveles de HDL usando ácido fosfotúngstico y  $Mg^{2+}$ ; la insulina sérica por ensayos de radioinmunoanálisis; además, para la actividad de las transaminasas en suero, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), se utilizaron kits colorimétricos comerciales (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA).

El estatus de hipertrigliceridemia se definió con niveles séricos de TG  $\geq 150$  mg/dL, la hipercolesterolemia con niveles de colesterol total  $\geq 200$  mg/dL y la hipoalfalipoproteinemia con valores de colesterol HDL  $\leq 40$  mg/dL, de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el panel de tratamiento para los adultos NCEP-ATP III (National Institutes for Health, 2002). El diagnóstico de diabetes se estableció considerando un valor de glucosa sérica en ayuno  $\geq 126$  mg/dL, diagnóstico previo o bien por el uso de hipoglucemiantes.

#### **5.5 Cuantificación de lípidos hepáticos**

La extracción de lípidos del tejido hepático se hizo con base en el método de Folch (Folch, *et al*, 1957); para esto, se homogeneizaron 50 mg de tejido hepático en solución salina fisiológica (SSF, 0.9%), después, con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) se recuperaron los lípidos de la fase orgánica, la cual se evaporó con nitrógeno gaseoso y se resuspendió en isopropanol/tritón X-100 al 10%. Finalmente, para determinar las concentraciones de triacilglicéridos y colesterol total se realizaron ensayos colorimétricos comerciales (Diagnostic Systes, Alemania); los valores obtenidos fueron normalizados con la concentración de proteína total.

## 5.6 Diagnóstico histológico

La evaluación histológica se realizó en el Departamento de Patología experimental del INCMNSZ, mediante la tinción de hematoxilina–eosina y tricrómico de Masson. El diagnóstico de HGNA se estableció siguiendo el método de Kleiner (Vega-Badillo, 2016). El método de Kleiner, se basa en la puntuación NAS, la cual va de 0 a 8 y se basa en la sumatoria del grado de esteatosis (0-3), inflamación (0-3) y balonamiento celular (0-2). Del mismo modo también se evaluó el grado de fibrosis como se detalla en la Tabla 3.

Con base en el NAS score, los grupos de estudio se clasificaron de la siguiente manera: sujetos sin esteatosis (NAS= 0), sujetos con esteatosis simple (NAS= 1–2) y pacientes con EHNA (NAS  $\geq$  5). Aquellos participantes con una puntuación de NAS= 3 – 4 fueron clasificados como indefinidos y no fueron incluidos en el análisis.

**Tabla 3.** Puntuación de Kleiner de las características histológicas para el diagnóstico de HGNA.

<b>Esteatosis</b> % grasa hepática	<b>Grado</b>	<b>Inflamación lobular</b> Focos de inflamación en zona lobular -20x por campo	<b>Grado</b>	<b>Balonamiento</b> Presencia	<b>Grado</b>
< 5%	0	0	0	Poco	1
5 – 33%	1	< 2	1		
34 – 66%	2	2 – 4	2	Abundante	2
> 66%	3	> 4	3		
<b>Presencia de fibrosis</b>			<b>Estadio</b>		
Sin fibrosis			F0		
Fibrosis perisinusoidal o portal			F1		
Fibrosis perisinusoidal y portal/periportal			F2		
Fibrosis formando puentes			F3		
Cirrosis			F4		
Score: Sin EHNA: 0 – 2; indefinidos: 3 – 4; EHNA $\geq$ 5. [Adaptado de Vega-Badillo, 2016]					

## 5.7 Extracción de ADN

La extracción del ADNg se realizó a partir de 200 $\mu$ L de leucocitos obtenidos de sangre periférica, utilizando el Kit QIAamp 96 DNA Blood (QIAGEN, Hilden, Alemania)

siguiendo la metodología indicada por el fabricante. Este método se basa en una separación por columnas. El procedimiento consiste en la lisis celular, la recuperación y purificación de ADN. Posteriormente se evaluó la integridad y concentración del ADN<sub>g</sub> por medio de espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Fisher, Delaware, EUA).

Para realizar los ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) dado que se trataba de un ensayo cuantitativo, se estableció como criterio de inclusión que las muestras tuvieran una concentración de 70ng/μL ±15ng/μL, con relación 260/280 entre 1.8 y 2.0, relación 260/230 > 1.

### 5.8 Amplificación del STR de HMOX1

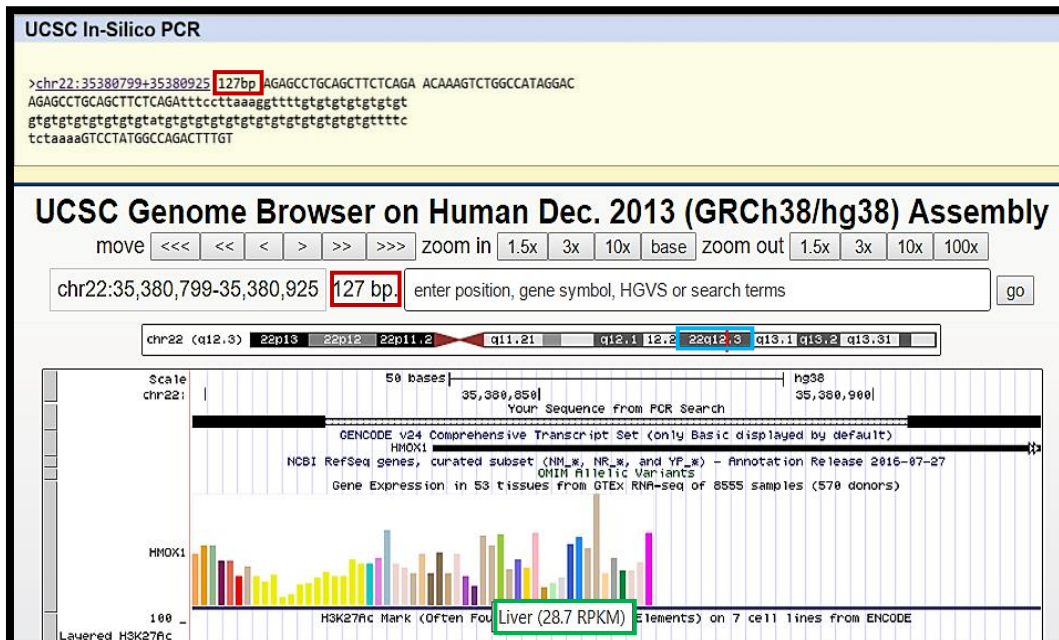
La amplificación del fragmento de la región promotora del gen HMOX1 se llevó a cabo mediante una PCR convencional; se diseñaron los iniciadores con base en lo reportado en la literatura para la amplificación de la región (Chang PF, *et al*, 2015) y la secuencia disponible en el GenBank para el cromosoma 22 (NG\_023030.1, 2016), teniendo el primer sentido marcado 5'-6FAM-AGAGCCTGCAGCTTCTCAGA-3', y el primer antisentido 5'-ACAAAGTCTGGCCATAGGAC-3'. En la Tabla 4 se describen las condiciones en las que se realizó la PCR.

**Tabla 4.** Condiciones utilizadas en la PCR para amplificar el STR de HMOX1.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Pre-incubación	95	10'	1
Desnaturalización	94	1'	30
Alineamiento	63	1'30"	
Extensión	72	2'30"	
Enfriamiento final	72	7'	1

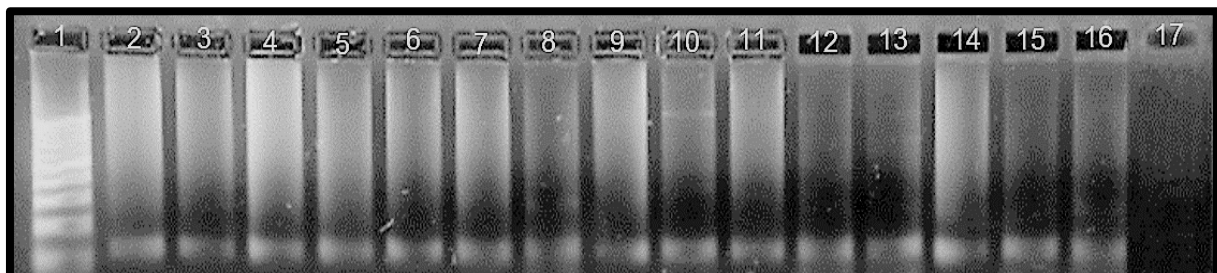
Se muestran las temperaturas, tiempo ('=minutos; "=segundos) y ciclos de cada una de las etapas de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

La longitud del amplificado se estableció a través de una PCR – *in silico* (Figura 11) realizada en el sitio “UCSC: Genome Browser” (Universidad de California, EUA), cuyos datos fueron corroborados en “Primer - Blast” (Maryland, EUA). Además, con estos resultados también calculamos la cantidad de pares de bases en el amplificado que no corresponden al (GT)<sub>n</sub> de HMOX1.



**Figura 11. PCR-in silico.** Recuadro rojo: tamaño del amplicón; recuadro azul: localización del fragmento; recuadro verde: expresión en hígado. [Imagen modificada de UCSC *In silico* PCR, 2017]

Para evaluar que el producto amplificado corresponde al fragmento esperado (tamaño aproximado 128 pares de bases), se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.5%, utilizando TAE (tris, ácido acético y EDTA) 1x como buffer de corrida; se tomó 1µL del cromógeno, 4µL del producto de la reacción y 4µL del marcador alélico TAMRA de 100 a 500pb; lo corrimos a 65V por 30 minutos, Figura 12.

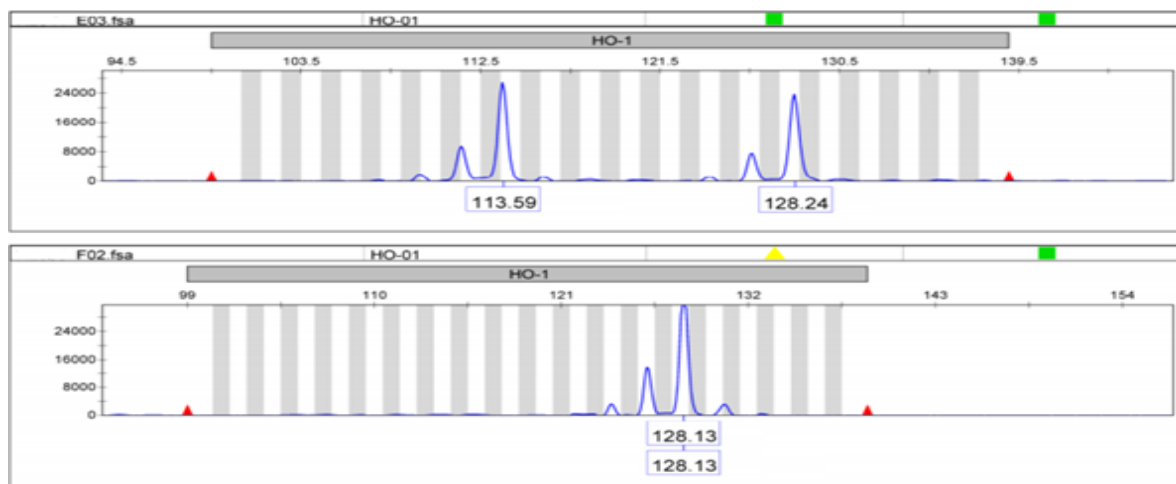


**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.** Carril 1 escalera alélica, 2 control, 3 – 16 muestras amplificadas, carril 17 blanco.

### 5.9 Electroforesis capilar de alta resolución del (GT)<sub>n</sub> promotor de HMOX1

Para determinar el tamaño del fragmento amplificado se realizó una electroforesis capilar de alta resolución en el analizador ThermoFisher 3730 DNA Analyzer. La

reacción utilizada en esta etapa fue de 49.5µL de formamida para desnaturalizar al ADN, 0.5µL de LIZ500 como marcador de tamaño y 1µL de ADN. Los fragmentos fueron previamente marcados con el fluorocromo 6 – FAM, resultando un color azul bajo una longitud de onda de 494 a 522 nm. Visualizamos los datos arrojados por el analizador en el software GeneMapper (AB, Los Ángeles California, EUA), con el que hicimos la determinación del tamaño del amplificado en pares de bases (pb) a través de los electroferogramas generados (Figura 13).



**Figura 13. Electroferograma.** Los picos más altos muestran el tamaño del fragmento, zona sombreada delimitación donde se espera el fragmento.

Al tener los datos de la longitud del amplificado, calculamos la cantidad de repetidos con la fórmula mostrada a continuación:

$$\text{No. de repetidos} = \frac{\text{amplificación} - \text{pb no correspondientes al STR}}{2}$$

### 5.10 Validación de datos con muestras de referencia

Para validar los resultados obtenidos, a la par del trabajo con el ADN de los pacientes, analizamos tres muestras de secuencia conocida obtenidas del repositorio de Coriell, las cuales tuvieron valores experimentales consistentes con lo reportado; variación en  $\pm 1$  pb, aceptada en el diagnóstico clínico.



Una vez que se obtuvo el tamaño aproximado del fragmento por electroforesis capilar de alta resolución, calculamos la cantidad de repetidos que había en cada una de las muestras, con base en la fórmula construida a partir de los datos generados por la PCR *in silico*. A continuación, mostramos un ejemplo de cómo se obtuvo el número de repetidos (NR) en la muestra NA11930 del repositorio de Coriell, cuyo valor experimental del amplicón fue 113.76 pb; este proceso se realizó de igual manera tanto en las otras muestras de referencia como en las de los pacientes.

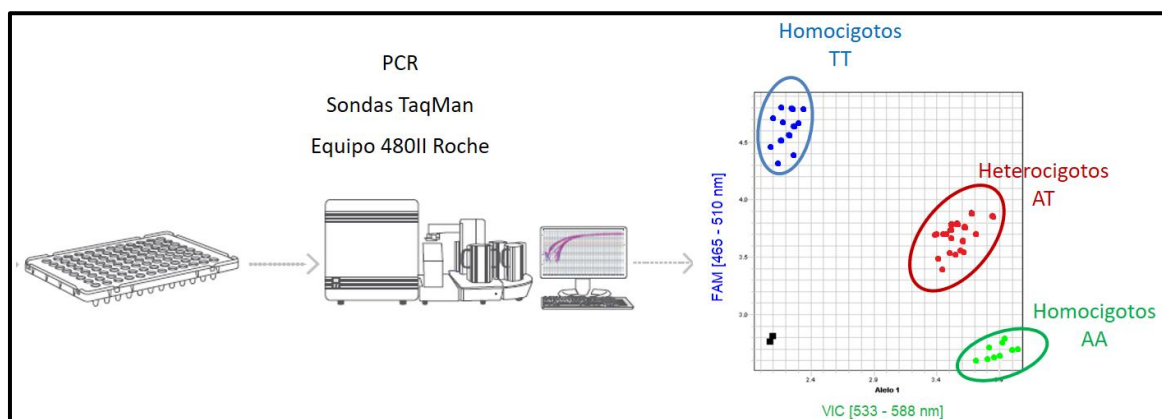
$$NR = \frac{\text{Amplicón} - 69}{2}$$
$$NR = \frac{113.76 - 69}{2} = 22$$

En este caso, el valor experimental (22 repetidos) coincidió con el reportado (23 repetidos), constatando así que la metodología era adecuada para el estudio de este microsatélite.

### **5.11 Genotipificación de los SNP rs2071746 y rs2071748 por sondas Taqman**

El genotipo de cada una de las muestras se obtuvo a través de un ensayo con sondas Taqman por PCR en tiempo real utilizando el equipo LightCycler 480 II (Indiana, EUA), con el software LightCycler 480 1.5.1.62 (Indiana, EUA) para la lectura y análisis de resultados. Las sondas utilizadas fueron diseñadas por ThermoFisher (Delaware, EUA) marcadas con los fluorocromos VIC (verde,  $\lambda = 533 - 580$  nm) en el alelo frecuente y FAM (azul,  $\lambda = 465 - 510$  nm) para el alelo mutado; los cebadores para generar el amplicón de rs2071746 y rs2071748 se realizaron según la secuencia del GenBank para el gen HMOX1 (NG\_023030.1) y la sonda fue generada por el fabricante.

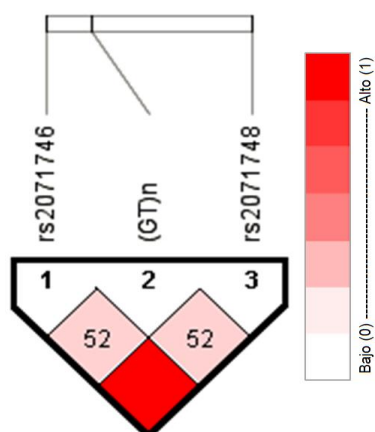
Los resultados de la discriminación alélica se muestran en la Figura 14, agrupándose los homocigotos dominantes en la parte inferior izquierda con una fluorescencia verde, los heterocigotos a la mitad del gráfico en color rojo, mientras los homocigotos recesivos se muestran en la parte superior derecha. Los datos de referencia sobre la frecuencia de cada alelo, así como el genotipo, se buscaron en la base de datos Ensembl, con los identificadores de cada SNP, es decir rs2071746 y rs2071748 para la especie humana (EMBL-EBI, 2017)



**Figura 14. Esquema de genotipificación SNP rs2071746.** Lado izquierdo placa donde se colocan las muestras, en medio el equipo utilizado y a la derecha el gráfico generado.

### 5.12 Análisis de desequilibrio de ligamiento y construcción de haplotipos

Para calcular el desequilibrio de ligamiento entre cada una de las variantes analizadas se utilizó el software HaploView 4.2 (Instituto Broad del MIT and Harvard, EUA), en donde se analizaron los SNP introduciendo los datos del genotipo con la codificación numérica según el par de base de que se trate, es decir 1=A, 2=C, 3=G y 4=T; para el microsatélite promotor el número asignado fue 2=Cortos o 4=Largos. Se obtuvo el equilibrio de Hardy-Weinberg, el cual mide la relación entre la frecuencia alélica y la genotípica,  $D'$  que nos habla del nivel de heredabilidad conjunta que tiene un bloque ( $D'_{fuerte} > 8$ ) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) con el que podemos estimar la redundancia estadística de estudiar dos variantes. También nos dice cuáles son los bloques o haplotipos más frecuentes en la población, además un análisis de asociación de los haplotipos con la enfermedad sin ajuste.

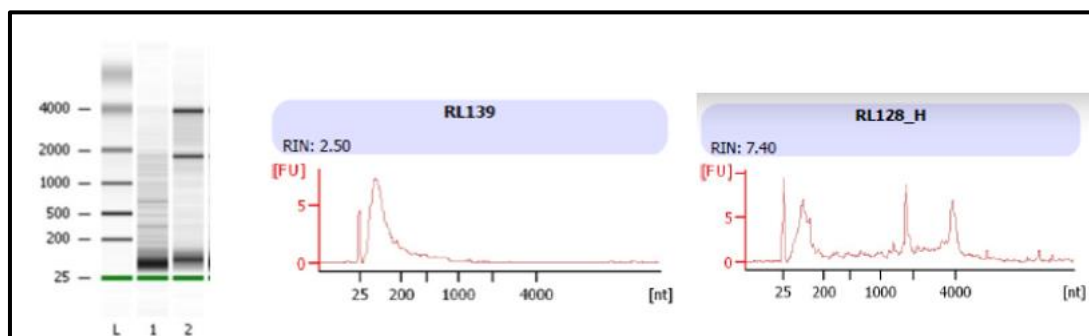


**Figura 15. Mapa de calor desequilibrio de ligamiento.** Bloque de las tres variantes estudiadas del (GT) $_n$  de HMOX1, rombo rojo  $D'=100$ . [Modificado de HaploView, 2017]

Los haplotipos generados en el software se muestran con las variantes en orden de su localización, es decir, primero se ve la variante de rs2071746, después el microsatélite y por el último de rs2071748; teniendo los bloques A–largo–G, T-Corto-A, A-Corto-G y T-Largo-A como los más representativos.

### 5.13 Extracción de ARN

El ARN de tejido hepático fue extraído por el método de *salting out*, basándonos en el protocolo de Triazol. Para esto, seguimos dos etapas, la primera trata de recuperar los ácidos nucleicos en general, lisando las células, eliminando proteínas y otros contaminantes inherentes de la muestra; en la segunda, se purifica el ARN eliminando el ADN. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de ARN en la muestra utilizando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Fisher, Delaware, EUA), con la misma metodología y cantidad que describimos en el apartado 5.4 de extracción de ADN; para verificar la calidad e integridad del ARN obtenido, utilizamos el chip *Eukaryote total RNA Nano*, mediante la prueba RIN (RNA Integrity Number).

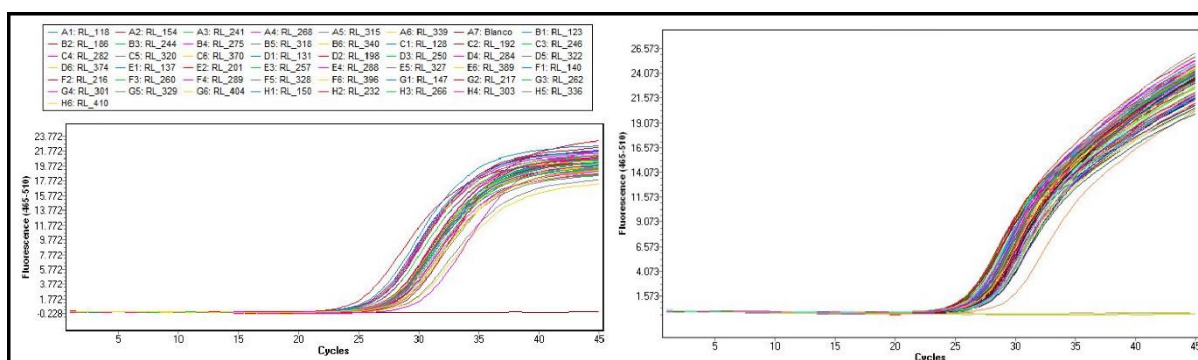


**Figura 16. Electroferogramas RIN.** Se muestran los electroferogramas de dos muestras, la primera con un RIN malo y la segunda de buena calidad. En la electroforesis sólo se observan bandas de ARN ribosomal en la muestra 2.

### 5.14 Ensayo de expresión de HMOX1 por PCR en tiempo real

El ensayo por PCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo LightCycler 480 II (Indiana, EUA), utilizando para la lectura y el análisis de resultados el software LightCycler 480 1.5.1.62 (Indiana, EUA).

Los cebadores que empleamos en esta etapa fueron diseñados con base en la secuencia reportada en GenBank del ARNm de HMOX1 (NM\_002133.2, 2017), teniendo como primer sentido GGCAGAGGGTGATAGAAGAGG, primer antisentido AGCTCCTGCAACTCCTCAAA. La sonda para medir la fluorescencia fue la no. 15 del catálogo de Roche, seleccionada de acuerdo con el amplicón de 73 nucleótidos generado. Debido a que nuestro gen es de baja a mediana expresión, el gen constitutivo de referencia que elegimos fue hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1) con la sonda 73 del catálogo de Roche. Se cuantificó la expresión del gen HMOX1 con respecto al gen constitutivo midiendo la fluorescencia generada por Sybr Green; para el análisis consideramos el valor Ct (ciclo del umbral) como el número de ciclos mínimos necesarios para que la señal de fluorescencia pueda ser leída por el detector, el cual nos permite cuantificar la cantidad cADN inicial al calcular la diferencia del valor Ct en las diferentes muestras.



**Figura 17. Curva de expresión.** Se muestra la cantidad de fluorescencia de cada muestra en los diferentes ciclos de amplificación. Lado izquierdo curva para el gen de estudio HMOX1, lado derecho para el gen constitutivo HPRT.

## 5.15 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo por medio del programa SPSS v18.0 (Chicago, EUA). Con el fin de evaluar los rasgos antropométricos y bioquímicos de la población, calculamos la media  $\pm$  desviación estándar para las variables continuas, mientras para las variables ordinales establecimos la mediana con el rango intercuartil de cada uno de los parámetros. Empleamos la prueba *t de Student para muestras independientes* con la finalidad de evaluar las diferencias entre grupos; valores de *p* menor a 0.050 fueron considerados significativos.

Para caracterizar al (GT)<sub>n</sub> de HMOX1, se calculó la frecuencia, mediana y moda de manera conjunta, así como dividiendo cada alelo y finalmente, en casos contra controles; debido a las diferencias existentes entre los dos alelos, decidimos tomar como punto de corte la mediana de cada uno, así pues, para el alelo 1 cortos (C) < 29, largos (L) ≥ 29, mientras en el caso del alelo 2 C < 30, L ≥ 30.

Mediante regresión múltiple evaluamos si hay asociación con el riesgo a desarrollar EHNA teniendo las variantes del gen HMOX1, siguiendo los modelos genéticos aditivo, dominante o recesivo; tomando como valor *p* significativo <0.050 y valor *p* tendencia <0.150, la razón de probabilidades (OR, por sus siglas en inglés) mayor a 1 de riesgo y OR<1 de protección. El análisis de correlación con los parámetros bioquímicos (AST, ALT, γ-GT, insulina, triacilglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, colesterol total hepático, triacilglicéridos hepáticos) e histológicos (esteatosis, balonamiento, inflamación, fibrosis, puntaje NAS) fue mediante un modelo de regresión lineal, de igual forma, el valor de significancia menor a 0.050 y de tendencia menor a 0.150; en este caso el riesgo se asoció un valor β positivo.

En ambas regresiones las covariables utilizadas fueron edad, género, porcentaje de ancestría americana, IMC, diagnóstico de diabetes y número de ensayo.

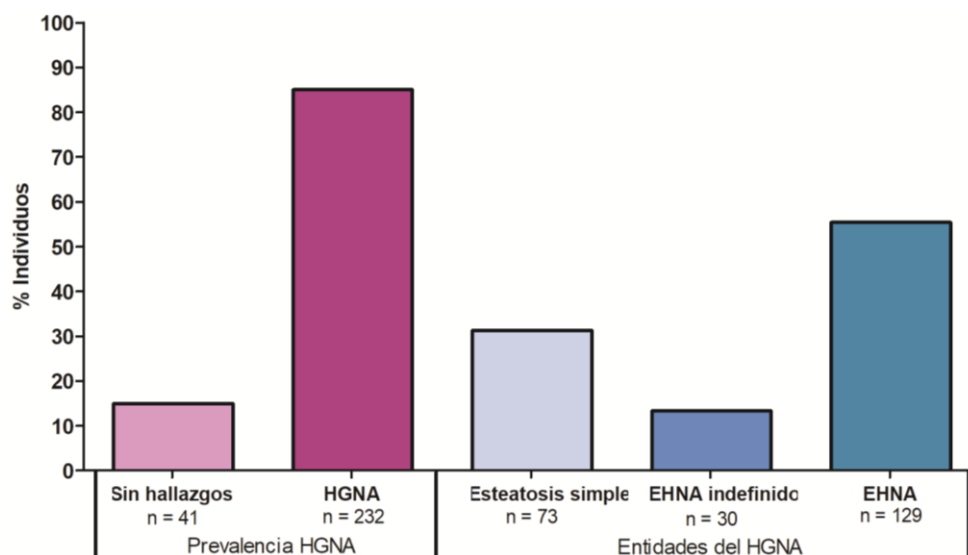
Por último, para el análisis de expresión génica calculamos la media de expresión ± error estándar con la prueba *t de Student para muestras independientes*, agrupando según la variable de interés, es decir, en los grupos de estudio, las variantes, los parámetros bioquímicos y los histológicos; en todos los casos las diferencias fueron calculadas con *pruebas no paramétricas para muestras independientes*, considerando estadísticamente significativas aquellas que tuvieran un valor *p* por debajo de 0.050.

Todos los gráficos mostrados en este trabajo fueron realizados con el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, California, EUA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características de la población estudiada

De los 273 individuos con diagnóstico histológico que se tenían disponibles, se excluyeron aquellos pacientes con diagnóstico de EHNA indefinida (n=30), por lo que en este estudio se analizaron un total de 243 pacientes. La prevalencia del hígado graso en la cohorte analizada fue del 85%; de este porcentaje, el 31.3% presentó esteatosis simple, el 13.3% EHNA indefinida y el 55.4% restante presentó esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), Figura 18. Las características antropométricas y bioquímicas de cada uno de los grupos se describen en la parte de anexos (Anexo I).



**Figura 18. Prevalencia del HGNA en población de estudio.** HGNA: Hígado graso no alcohólico; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica. Se grafica frecuencia porcentual.

Con base en los anterior, clasificamos los grupos de estudio como: grupo control con sujetos sin hallazgos histológicos más esteatosis simple y casos con esteatohepatitis no alcohólica. El porcentaje de mujeres y la edad de los participantes fue similar entre los grupos, Tabla 5; sin embargo, como se esperaba la prevalencia de diabetes fue más alta en el grupo de EHNA ( $p=0.009$ ). Respecto a los parámetros bioquímicos, los pacientes con EHNA presentaron niveles significativamente más altos de transaminasas,  $\gamma$ -GT, triacilglicéridos (TG) séricos y TG hepáticos ( $p \leq 5 \times 10^{-6}$ ); asimismo, observamos alteraciones en las concentraciones de glucosa, insulina, HOMA-IR, HDL y colesterol hepático en el grupo de sujetos con EHNA ( $p < 0.05$ ).

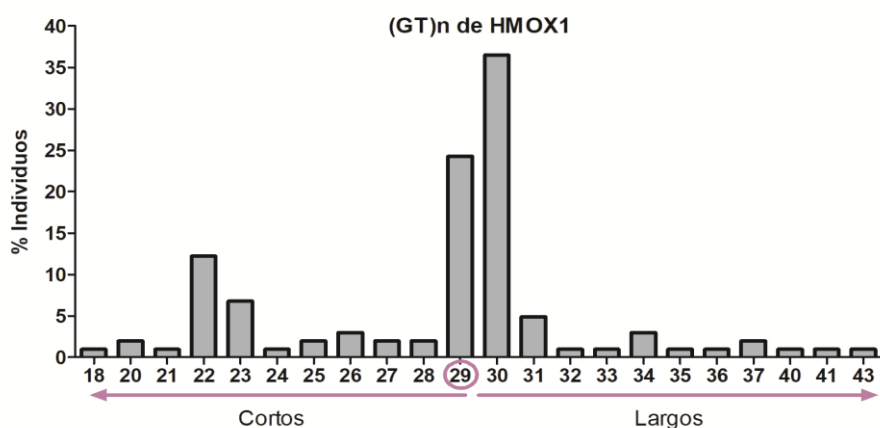
**Tabla 5.** Características de la población según los grupos de estudio seleccionados.

	Sin EHNA 114	EHNA 129	Valor p*
Femenino, %	79.8	71.9	NS
Edad, años	38 ± 10	37 ± 9	NS
IMC, Kg/m <sup>2</sup>	42.2 ± 6.0	44.3 ± 5.6	0.007
AST, UI/L	24 (20 – 31)	31 (25 – 48)	2x10 <sup>-6</sup>
ALT, UI/L	23 (18 – 32)	34 (25 – 48)	2x10 <sup>-7</sup>
γ-GT, UI/L	16 (12 – 22)	21 (17 – 32)	5x10 <sup>-6</sup>
Glucosa, mg/dL	89 (76 – 99)	94 (83 – 106)	0.015
Insulina, μUI/dL	9.7 (6.2 – 13.6)	16.2 (10.6 – 23.0)	0.001
HOMA – IR	2.11 (1.32 – 3.20)	3.50 (2.41 – 6.08)	0.002
Diabéticos, %	5.7	16.3	0.009
Colesterol, mg/dL	176 ± 33	174 ± 42	NS
HDL – C, mg/dL	39 ± 10	34 ± 9	0.001
LDL – C, mg/dL	110 ± 28	105 ± 36	NS
Triacilglicéridos, mg/dL	121 (90 – 158)	143 (115 – 202)	2x10 <sup>-5</sup>
CT hepático, mg/mg-proteína	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.09	0.009
TG hepático, mg/mg-proteína	1.20 ± 0.79	3.28 ± 1.70	1x10 <sup>-6</sup>

Valores: Porcentaje, media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartil).  
 \* Calculada con prueba T de Student para dos muestras independientes.  
 IMC: Índice de masa corporal; AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa;  
 γ-GT: Gamma-glutamil transpeptidasa; NS: no significativo.

## 6.2 Frecuencia, distribución y análisis de riesgo del microsatélite promotor (GT)n de HMOX1

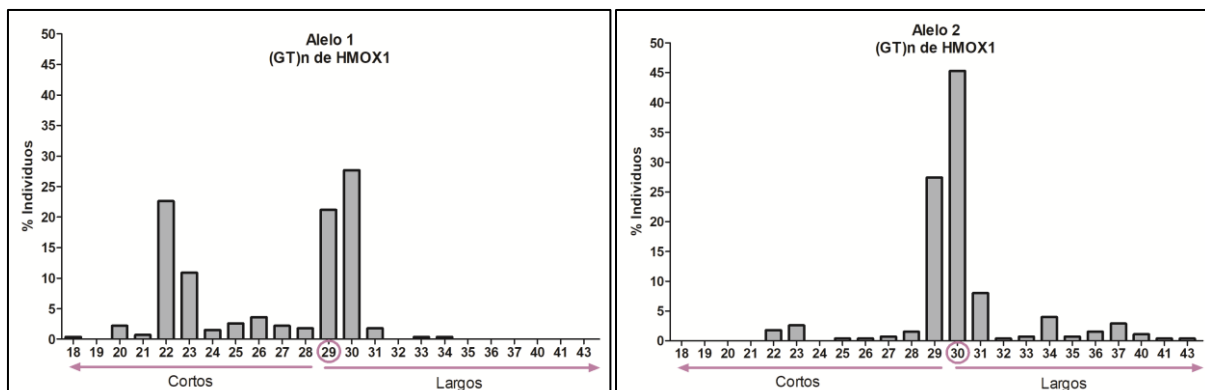
En esta cohorte de obesos mórbidos, el rango del STR del gen HMOX1 fue de 18 a 43 repetidos GT, mostrando una distribución bimodal con picos en 22 y 30 repetidos, representando el 12.2% y 36.5% de los valores mostrados, respectivamente. En este sentido, tomamos un primer punto de corte para designar alelos cortos y largos de 29, el cual representa la mediana estadística de esta población, Figura 19.



**Figura 19.** Distribución global del (GT)n de HMOX1. Se muestra la frecuencia porcentual de los alelos cortos y largos los 243 sujetos incluidos. Círculo morado: mediana.

Al establecer un corte en 29 repetidos, las frecuencias de los alelos CC (corto-corto), CL (corto-largo) y LL (largo-largo) tanto en casos como controles fueron similares, por tanto, no se observaron diferencias significativas entre el grupo sin EHNA vs EHNA (RM=1.271, IC(95%)=0.681-2.372,  $p=0.452$ ); además, la frecuencia de los repetidos en la población no siguió el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=7.08 \times 10^{-6}$ ), lo cual indica que puede haber un sesgo en función del fenotipo o que se presenta consanguinidad.

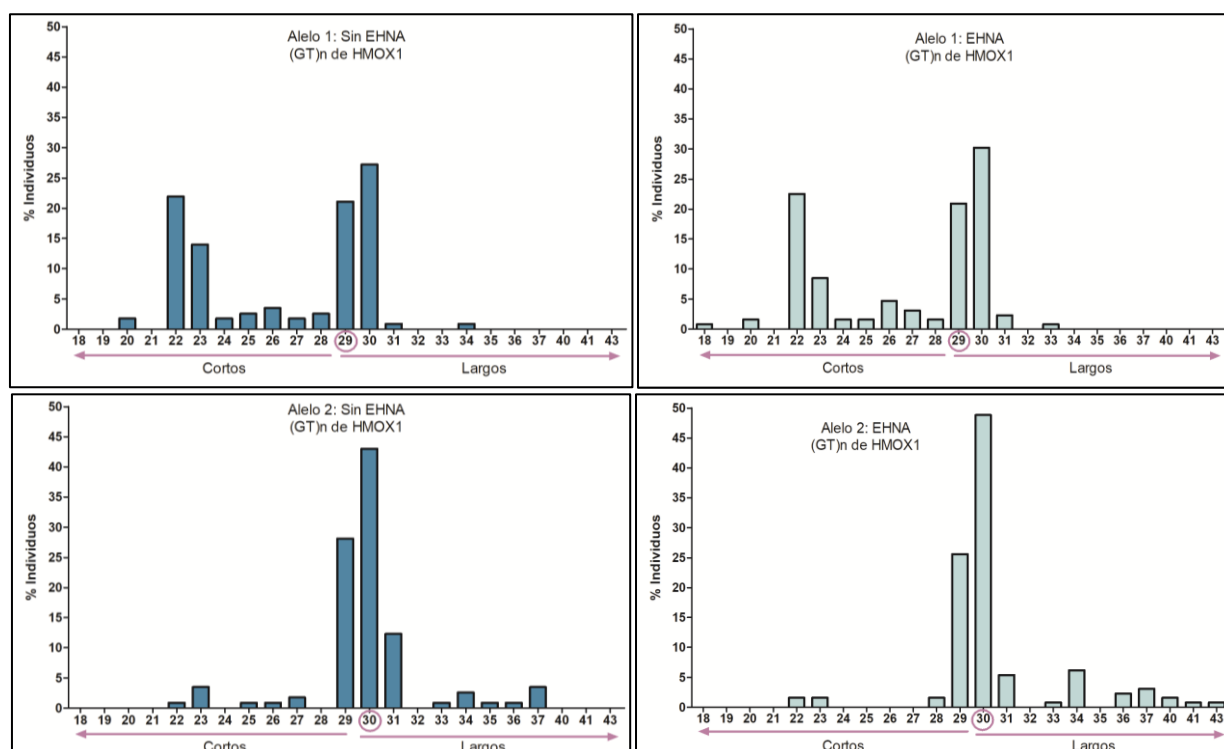
Al analizar la frecuencia del (GT) $_n$  de HMOX1 por cada uno de los alelos (Figura 20), se observó un comportamiento diferencial; ya que el alelo 1 mostró una distribución bimodal, con un pico en 22 y un segundo pico en 30 (rango de 18 a 34 repetidos). La moda observada para el alelo 1 fue de 30 repetidos (28.4% de los individuos) y la mediana de 29. Mientras que para el alelo 2 se observó un sólo pico en 30 repetidos, siendo la longitud del STR de 22 a 43 repetidos. La moda para el alelo 2 fue de 30 repetidos con una frecuencia de 46.1% y una mediana en 30.



**Figura 20. Distribución del (GT) $_n$  de HMOX1 por cada alelo. La frecuencia de los alelos se muestra en %. El número en círculo establece la mediana.**

Posteriormente, al analizar las diferencias en las frecuencias de cada uno de los alelos entre los casos y los controles (Figura 21), se encontró que para el alelo 1 no se observaron diferencias ni en las frecuencias ni en la longitud del repetido; no obstante, para el alelo 2 se observó un mayor rango en los sujetos con diagnóstico de EHNA.





**Figura 21. Distribución del (GT)n de HMOX en controles y casos co diagnóstico de EHNA.** Los gráficos superiores muestran la distribución del alelo 1 y los graficos inferiores muestran la distribución del alelo 2 en el grupo sin EHNA vs el grupo con EHNA. Las barras azules oscuro indican los sujetos controles y las barras azul claro indican los casos con EHNA. Los círculos indican la mediana de la distribución en cada uno de los grupos.

Debido a las diferencias en la distribución de los dos alelos, para este estudio se establecieron dos puntos de corte, con base en la mediana estadística observada para cada uno de los alelos del repetido. Así, para el alelo 1 el corte se estableció en 29 y para el alelo 2 el corte se estableció en 30 (Tabla 6). Al realizar un análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los alelos se obtuvo un valor de 0.978.

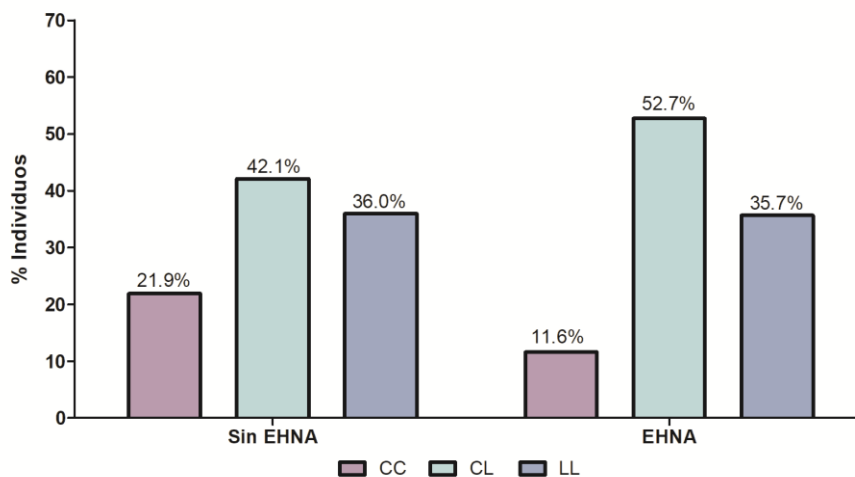
**Tabla 6.** Clasificación del (GT)n de HMOX1 con base en la mediana estadística

Alelo 1 (mediana= 29)		Alelo 2 (mediana= 30)	
Clasificación	GT (n)	Clasificación	GT (n)
C	(117) 48.1%	C	(81) 33.3%
L	(126) 51.9%	L	(162) 66.7%

Valores: (n total) %

Basados en la clasificación establecida para la población analizada, se observó una frecuencia de los alelos CC del 16.5%, de los alelos CL del 47.7% y de los alelos LL del 35.8%. Al realizar un análisis comparativo de las frecuencias entre el grupo de sujetos control vs el grupo de casos con EHNA, como se muestra en la Figura 22, se

observó una frecuencia de los alelos CC (21.9%) de casi el doble en los sujetos sin EHNA, al comparar con los que presentan EHNA (11.6%). Del mismo modo la frecuencia de alelos largos ya sea en forma homocigota o heterocigota fue mayor en el grupo de sujetos con EHNA vs el grupo de sujetos control (52.7% y 35.7% vs 42.1% y 36%, respectivamente).



**Figura 22. Genotipo del (GT)n de HMOX1 en casos y controles.** Controles: Sin EHNA; casos: EHNA. Barras moradas homocigotos cortos (CC), barras rosas heterocigotos (CL), barras azules homocigotos largos (LL).

Posteriormente, al hacer un análisis del número de repetidos (GT)n de HMOX1 con el riesgo de EHNA, se observó una asociación significativa con un mayor riesgo de EHNA para los portadores de al menos un alelo largo, es decir siguiendo un modelo dominante (CC vs CL + LL) ( $p = 0.024$ ; RM=2.524; IC 95%=1.127 – 5.649). Además, se observó una tendencia con mayor riesgo de EHNA al comparar el grupo de sujetos homocigotos para los alelos cortos vs el grupo de sujetos homocigotos para los alelos largos (CC vs LL) ( $p=0.105$ ), Tabla 6.

**Tabla 7.** Análisis de riesgo en el progreso a EHNA con el (GT)n de HMOX1.

	Sin EHNA	EHNA		RM (IC del 95%)	Valor $p$
CC	(25) 21.9%	(15) 11.6%	CC vs CL vs LL	1.273 (0.830 – 1.952)	0.269
CL	(48) 42.1%	(68) 52.7%	CC vs CL + LL	2.524 (1.127 – 5.649)	<b>0.024</b>
LL	(41) 36.0%	(46) 35.7%	CC vs LL	2.083 (0.857 – 5.059)	0.105

Las asociaciones fueron ajustadas por edad, género, ancestría, IMC y diagnóstico de diabetes.  
RM: Razón de momios; IC: Intervalo de confianza; valores: (n total) %.

Al realizar un análisis de asociación del número de repetidos (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 con los parámetros histológicos y bioquímicos relacionados con el HGNA, se observó una asociación significativa del mayor número de repetidos con un elevado grado de inflamación ( $p=0.050$ ), puntaje de NAS ( $p=0.050$ ) y aumento del grado de fibrosis ( $p=0.021$ ). Del mismo modo se observó una tendencia de asociación con un mayor grado de esteatosis ( $p=0.121$ ) y balonamiento ( $p=0.135$ ). En el análisis con los parámetros bioquímicos, se observó una asociación del microsatélite (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 con menores niveles séricos de colesterol HDL ( $p=0.042$ ), además de una tendencia con elevación en los niveles de ALT sérica ( $p=0.058$ )

**Tabla 8.** Asociación del (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 con los parámetros histológicos y bioquímicos del HGNA

Variables	LL vs CL vs CC		CC vs CL + LL	
	Valor $\beta$ (error)	Valor $p$	Valor $\beta$ (error)	Valor $p$
Esteatosis	0.070 (0.119)	0.556	0.338 (0.217)	0.121
Balonamiento	0.086 (0.087)	0.324	0.240 (0.160)	0.135
Inflamación	0.159 (0.100)	0.113	0.360 (0.184)	<b>0.050</b>
NAS	0.315 (0.263)	0.232	0.937 (0.481)	<b>0.050</b>
Fibrosis	0.111 (0.044)	<b>0.012</b>	0.192 (0.081)	<b>0.019</b>
ALT	5.463 (2.882)	0.230*	10.211 (5.243)	0.058*
AST	2.344 (3.147)	0.333*	5.306 (5.723)	0.932*
Y-GT	-0.691 (1.803)	0.619*	0.402 (3.284)	0.889*
HDL	-1.584 (0.948)	0.096	-3.533 (1.724)	<b>0.042</b>
LDL	-3.859 (3.462)	0.266	-7.166 (6.323)	0.259
Colesterol	-3.422 (3.935)	0.386	-8.064 (7.177)	0.263
Triacilglicéridos	10.490 (8.783)	0.539*	7.080 (16.095)	0.939*
CT hepático	0.016 (0.017)	0.340*	0.024 (0.034)	0.482*
TG hepático	0.337 (0.358)	0.350*	0.906 (0.726)	0.217*

Ajustado por edad, género, ancestría, IMC, diabetes  
 CT: Colesterol total; TG: triacilglicéridos; \* Valor  $p$  calculado con valores normalizados

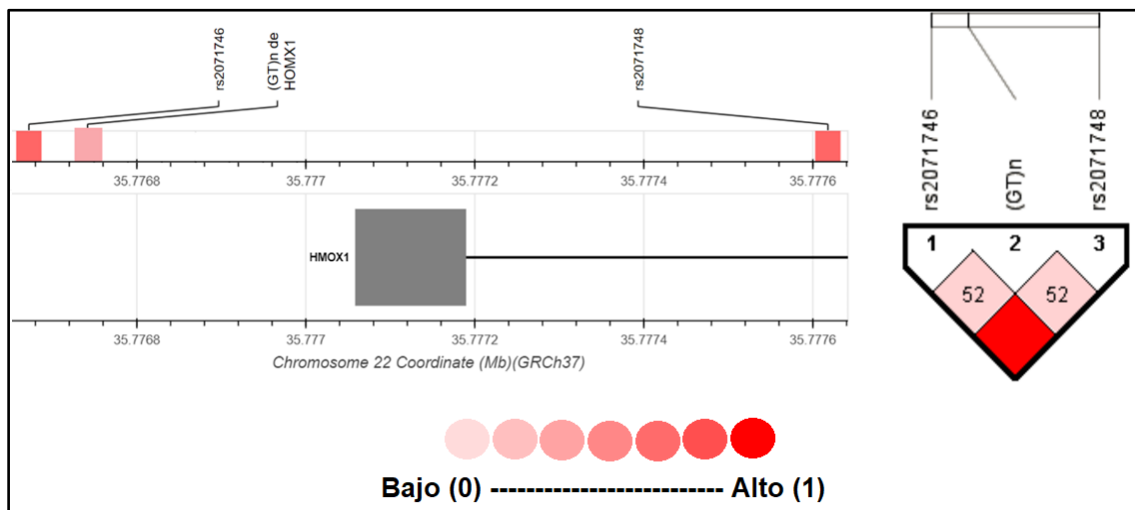
### 6.3 Polimorfismos de un sólo nucleótido rs2071746 y rs2071748

#### 6.3.1 Desequilibrio de ligamiento

En la literatura se reportan polimorfismos asociados con la expresión del gen HMOX1, así como con el microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub>. Por esta razón, también estudiamos los

SNP rs2071746, rs2071748, pues estas variantes pueden contribuir a entender mejor la modulación del gen y su relación con enfermedades ligadas al estrés oxidativo (Tanaka, *et al*, 2011; Sheu, *et al*, 2009; Song, *et al*, 2009).

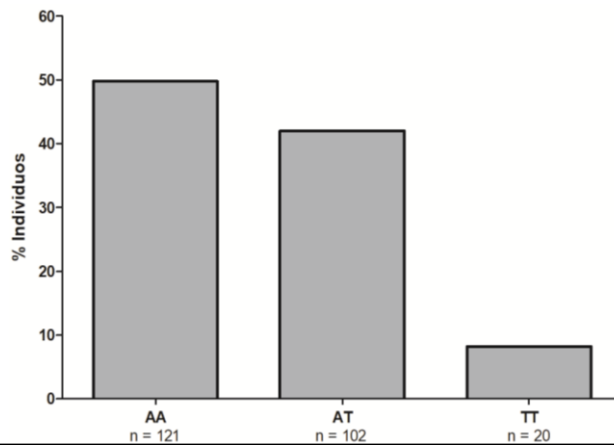
Mediante un análisis de desequilibrio de ligamiento (DL), vimos que, en nuestra población de 243 individuos con obesidad mórbida, los SNP se encuentran en perfecto DL entre ellos, con un valor de  $D'=1.000$  y  $r^2=1.000$ , significando que las mutaciones se presentan siempre juntas y tienen la misma asociación con la enfermedad. Por el contrario, con el microsatélite ambos SNP tiene una asociación baja con una  $D'=0.529$ , valor de  $r^2=0.171$ ; esto quiere decir que no se trata de un bloque génico que se presente de manera conjunta en todos los casos, además, la relación de la expresión de HMOX1 es variable con el STR y los SNP, Figura 23.



**Figura 23. Mapa de calor y posición de las variantes.** Imagen del lado derecho mapa de calor para el desequilibrio de ligamiento; lado izquierdo posición de las variantes en la región génica. [Modificado de HaploView, 2017; LDlink, 2017]

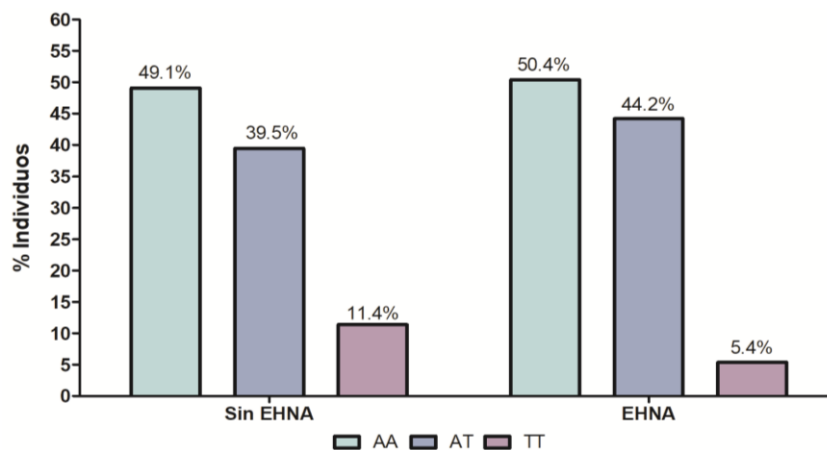
### 6.3.2 Frecuencia, distribución y análisis de riesgo en EHNA de rs2071746

Dado que los SNP estudiados están en perfecto desequilibrio de ligamiento, ambos tienen la misma frecuencia, distribución y valores de asociación en el análisis de este trabajo, por lo tanto, sólo presentamos los resultados del SNP rs2071746. En este sentido, tenemos que la frecuencia genotípica (Figura 24) fue de 50.2% homocigoto dominante, 42.8% heterocigoto y 7.0% homocigoto recesivo; la frecuencia alélica era de 0.71 para el silvestre en los dos polimorfismos, 0.29 para el mutado.



**Figura 24. Frecuencia de rs2071746 en la población total.** Presencia de cada genotipo en los 243 sujetos participantes.

De manera similar a los resultados anteriores, las frecuencias por casos y controles son idénticas en ambos SNP. Así, observamos que el homocigoto raro es más frecuente en los participantes sin EHNA (11.4%) cuando los comparamos con aquellos que presentan EHNA (5.4%), aunque, las tendencias gráficas son idénticas tanto en controles como casos, Figura 25.



**Figura 25. Frecuencia del SNP rs2071746 en casos y controles.** Barras verdes homocigotos dominantes, barras azules heterocigotos, barras rosas homocigotos recesivos.

En el análisis de riesgo, no se evidenció asociación con el progreso a esteatohepatitis no alcohólica. Sin embargo, observamos valores de tendencia bajo un modelo recesivo ( $p=0.134$ ), sugiriendo que ser homocigoto raro provee protección, Tabla 9.

**Tabla 9.** Análisis de riesgo para rs2071746 en casos y controles

	Sin EHNA	EHNA		OR (IC del 95%)	Valor p
AA	(56) 49.1	(65) 50.4	AA vs AT vs TT	0.904 (0.562 – 1.456)	0.679
AT	(45) 39.5	(57) 44.2			
TT	(13) 11.4	(7) 5.4	AA + AT vs TT	0.415 (0.132 – 1.310)	0.134
A	(163) 71.5	(181) 70.2	A vs T	0.886 (0.565 – 1.391)	0.600
T	(65) 28.5	(77) 29.8			

Ajustado por edad, género, ancestría, IMC, diagnóstico de diabetes.  
OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; valores: (n total) %

En la relación de los SNP con los parámetros histológicos, encontramos valores significativos en un modelo recesivo con balonamiento ( $p=0.025$ ), además, una tendencia con disminución de inflamación ( $p=0.062$ ), fibrosis ( $p=0.087$ ) y puntaje de NAS ( $p=0.085$ ); en los bioquímicos no se encontró asociación con ninguno de los indicadores, pero sí tendencia a menores niveles de la enzima Y-GT ( $p=0.053$ ) y baja en la acumulación de triacilglicéridos hepáticos ( $p=0.056$ ).

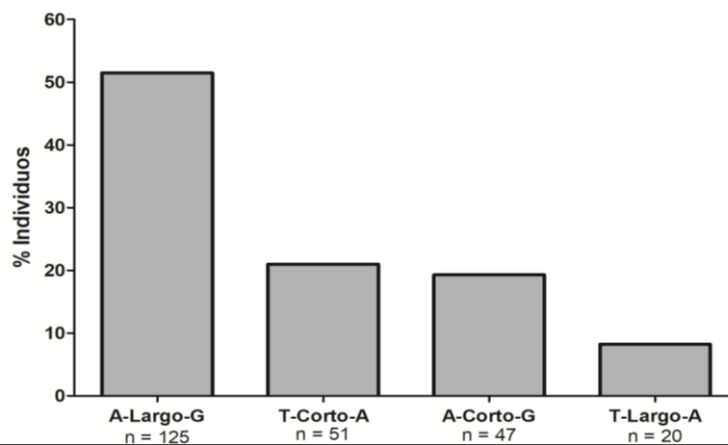
**Tabla 10.** Asociación de rs2071746 con parámetros bioquímicos e histológicos del HGNA

Variables	AA vs AT vs TT		AA + AT vs TT	
	Valor $\beta$ (error)	Valor p	Valor $\beta$ (error)	Valor p
Esteatosis	-0.017 (0.134)	0.901	-0.362 (0.310)	0.245
Balonamiento	-0.121 (0.098)	0.216	-0.508 (0.226)	<b>0.025</b>
Inflamación	-0.018 (0.051)	0.724	-0.321 (0.122)	0.062
Fibrosis	-0.002 (0.069)	0.978	-0.230 (0.163)	0.087
NAS	-0.176 (0.297)	0.553	-1.191 (0.687)	0.085
ALT	-0.563 (3.257)	0.887	-9.693 (7.498)	0.195
AST	0.150 (3.528)	0.129	-5.908 (8.146)	0.883
Y-GT	0.611 (2.024)	0.986	-7.488 (4.638)	0.053
HDL	1.361 (1.065)	0.203	1.867 (2.478)	0.452
LDL	0.215 (3.893)	0.956	0.970 (9.030)	0.915
Colesterol	0.626 (4.418)	0.888	3.136 (10.247)	0.760
Triacilglicéridos	-15.272 (9.817)	0.495	-35.419 (22.771)	0.255
CT hepático	-0.021 (0.019)	0.266	-0.055 (0.044)	0.223
TG hepático	-0.655 (0.394)	0.102	-1.813 (0.931)	0.056

Ajustado por edad, género, ancestría, IMC, diabetes  
CT: Colesterol total; TG: triacilglicéridos  
\* Valor p calculado con valores normalizados

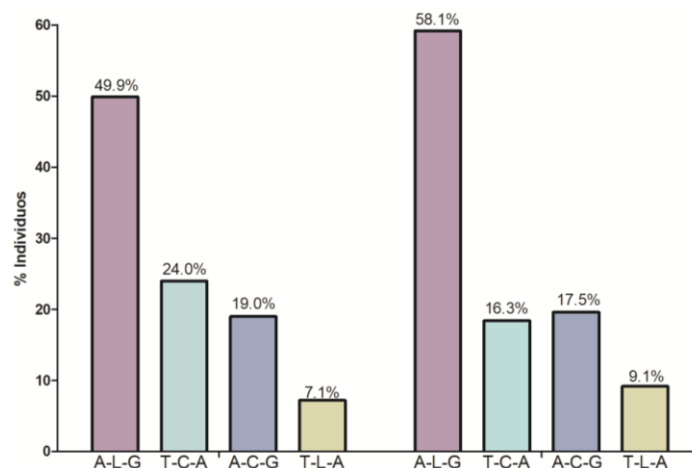
## 6.4 Frecuencia, distribución y análisis haplotipos

Diversos trabajos demuestran que estudiar las variantes de un bloque génico en conjunto pueden explicar en mayor medida la asociación genética de éstas hacia un fenotipo. Por lo tanto, evaluamos la relación de los 4 haplotipos más frecuentes en nuestra población con el progreso a EHNA; teniendo A-L-G (A-Largo-G) como el más común, presente en el 51.5% de los participantes, seguido de T-C-A (T-Corto-A) con 21%, A-C-G (A-Corto-G) en 19.3% y, finalmente, T-L-A (T-Largo-A) en 8.2%.



**Figura 26. Frecuencia de los haplotipos en la población total.** Se muestra cómo se distribuyen los bloques en los 243 individuos seleccionados.

Al dividir los diferentes haplotipos en casos y controles, vimos que el más frecuente es A-L-G en los sujetos con EHNA (59.2%) frente a los controles, mientras el haplotipo T-C-A se presenta en mayor medida en los sujetos sin EHNA (24.0%); aunque las diferencias son menos marcadas, como se observa en la Figura 27.



**Figura 27. Frecuencia de los haplotipos: casos y controles.** Barras moradas el haplotipo más común, es decir, A-Largo-G. Frecuencia porcentual.

El análisis de riesgo, Tabla 11, mostró asociación estadísticamente significativa entre los haplotipos que presentan al menos un alelo largo con el riesgo a desarrollar EHNA, resaltando A-Largo-G ( $p=0.010$ ) con mayor significancia.

**Tabla 11.** Análisis de riesgo de los haplotipos en casos y controles

	Sin EHNA	EHNA	OR (IC del 95%)	Valor $p$
A-largo-G	(57) 49.9%	(75) 58.1%	2.723 (1.274 – 5.818)	<b>0.010</b>
T-corto-A	(27) 24.0%	(20) 16.3%	1.249 (0.677 – 2.304)	0.476
A-corto-G	(22) 19.0%	(22) 17.5%	1.305 (0.717 – 2.377)	0.384
T-largo-A	(8) 7.1%	(12) 9.1%	1.859 (1.000 – 3.457)	<b>0.050</b>

Ajustado por edad, género, ancestría, IMC, diabetes  
 OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; valores: (n total) %

Cuando analizamos la relación del haplotipo A-L-G con los parámetros histológicos relacionados al HGNA, encontramos asociación significativa con aumento de esteatosis ( $p=0.050$ ), balonamiento ( $p=0.017$ ), puntaje de NAS ( $p=0.017$ ) y fibrosis ( $p=0.006$ ); además, tendencia a mayor inflamación ( $p=0.057$ ). Asimismo, A-L-G se asoció con concentraciones más altas de ALT sérica ( $p=0.045$ ); además, mostró una tendencia con la disminución de HDL sérica y acumulación TG hepáticos.

**Tabla 12.** Asociación del haplotipo A-Largo-G con parámetros bioquímicos e histológicos.

Variables	A – Largo – G	
	Valor $\beta$ (error)	Valor $p$
Esteatosis	0.395 (0.203)	<b>0.050</b>
Balonamiento	0.358 (0.0148)	<b>0.017</b>
Inflamación	0.330 (0.172)	0.057
NAS	1.083 (0.450)	<b>0.017</b>
Fibrosis	0.214 (0.076)	<b>0.006</b>
ALT	10.223 (4.917)	<b>0.045</b>
AST	6.286 (5.367)	0.818
Y-GT	1.394 (3.083)	0.818
HDL	-2.886 (1.623)	0.077
LDL	-3.226 (5.952)	0.589
Colesterol	-5.844 (6.748)	0.388
Triacilglicéridos	13.500 (15.087)	0.598
CT hepático	0.039 (0.033)	0.252
TG hepático	1.239 (0.705)	0.084

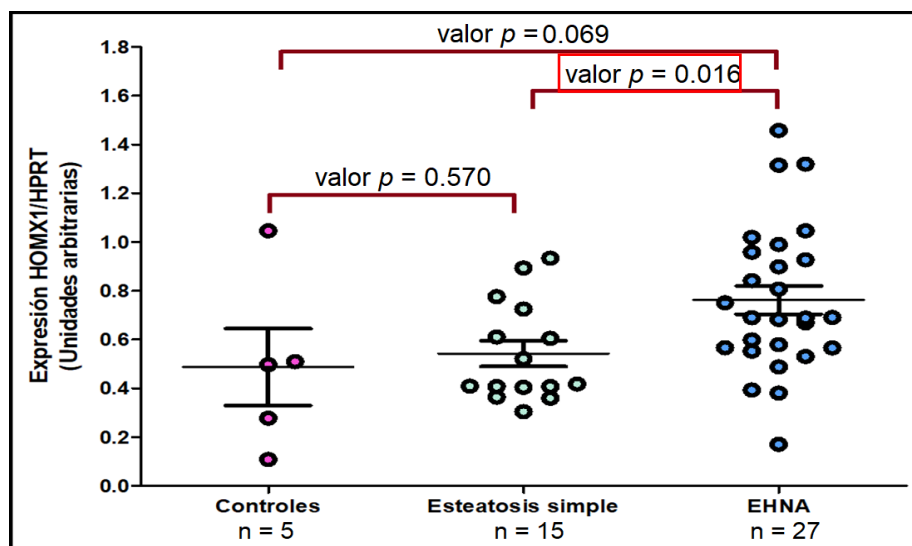
Ajustado por edad, género, ancestría, IMC, diabetes  
 CT: Colesterol total; TG: triacilglicéridos  
 \* Valor  $p$  calculado con valores normalizados



## 6.5 Análisis de expresión del gen HMOX1

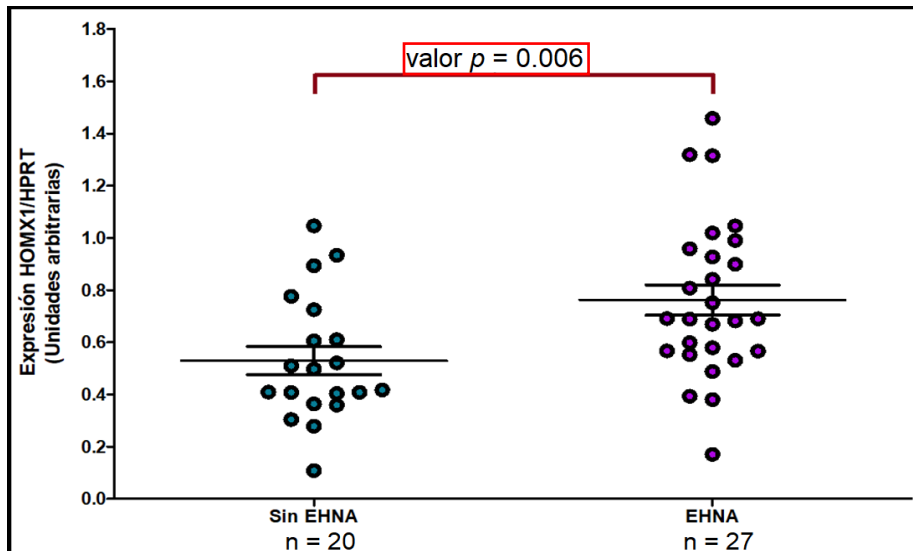
Para conocer la relación de la expresión del gen con la enfermedad, el (GT)n de HMOX1 y los SNP, hicimos análisis de expresión tomando una subcohorta de 47 individuos al azar. En esta sección sólo se muestran los gráficos más representativos, no obstante, es importante mencionar que en la sección de anexos se muestra el análisis con los SNP y algunos parámetros histológicos.

En este análisis, al comparar los datos de expresión en sujetos sin esteatosis ( $0.488 \pm 0.158$ ), sujetos con esteatosis simple ( $0.543 \pm 0.053$ ) y sujetos con EHNA ( $0.762 \pm 0.058$ ), encontramos que este último grupo presenta una mayor expresión del gen HMOX1; teniendo diferencias estadísticamente significativas de aquellos con esteatosis simple al comparar con EHNA ( $p=0.016$ ); mientras en los sujetos sin hallazgos y con EHNA las diferencias son de tendencia ( $p=0.069$ ), Figura 28. En este caso el valor de la diferencia entre grupos es de 0.023.



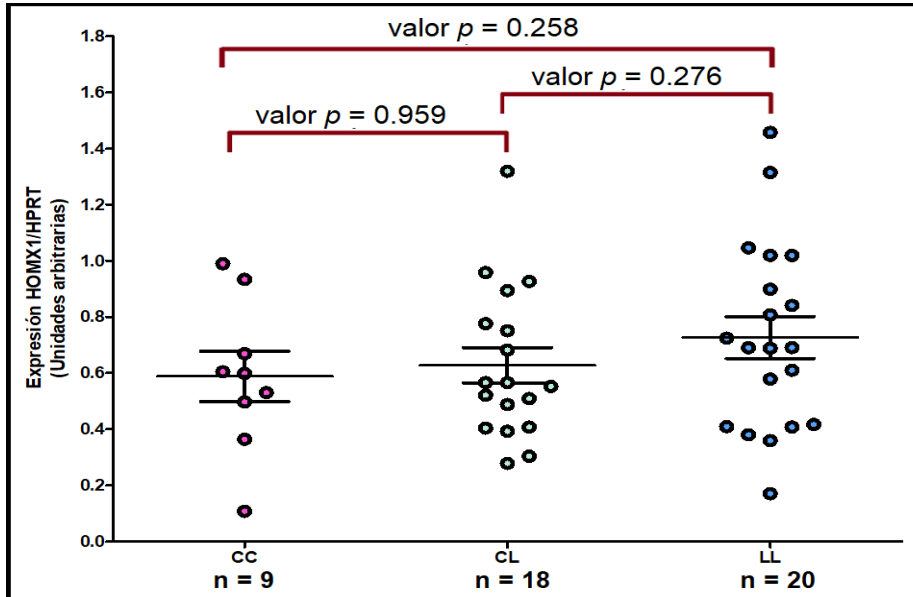
**Figura 28. Expresión del gen HMOX1 en la enfermedad.** Valor  $p$  sobre líneas rojas, significativo; cuadro rojo diferencias significativas. Se gráfica media  $\pm$  error estándar.

Al agrupar las muestras analizadas en controles (sin EHNA,  $0.529 \pm 0.054$ ) y casos (EHNA;  $0.762 \pm 0.058$ ), la diferencia de medias para la expresión del gen es aún más significativa que en el caso anterior ( $p=0.006$ ); mostrando de igual forma, que hay una mayor expresión del gen en los participantes con EHNA, como se observa en la Figura 29.



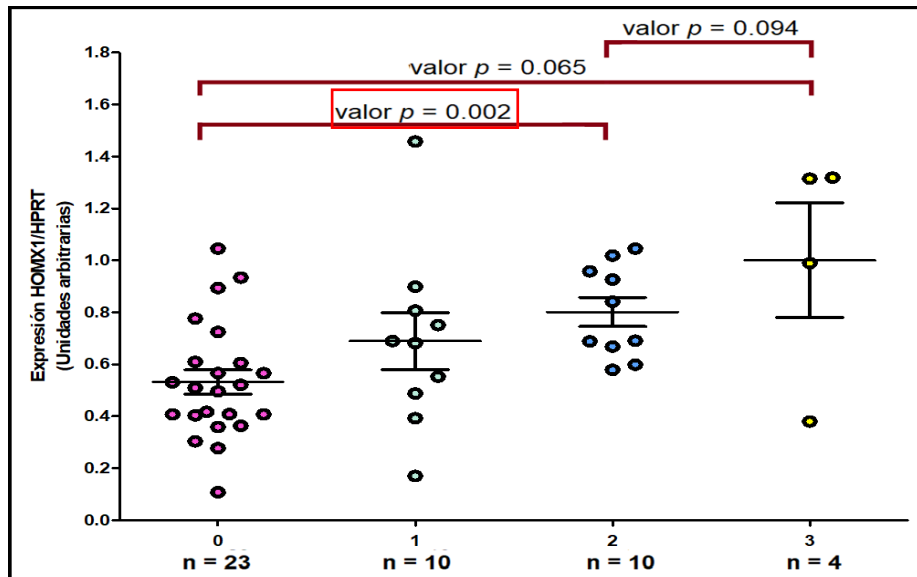
**Figura 29. Expresión del gen HMOX1 en sujetos sin EHNA vs EHNA.** Valor  $p$  sobre línea roja, denota diferencias significativas. Gráfica media  $\pm$  error estándar.

Posteriormente, se analizó la relación del microsatélite con los niveles de expresión del gen *HMOX1* en tejido hepático, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes genotipos del microsatélite, CC ( $0.589 \pm 0.089$ ), CL ( $0.628 \pm 0.063$ ) y LL ( $0.825 \pm 0.120$ ). Sin embargo, en la gráfica se muestra una mayor expresión del gen en los sujetos portadores del genotipo LL en comparación con el genotipo CC y CL ( $p$  anova=0.410).



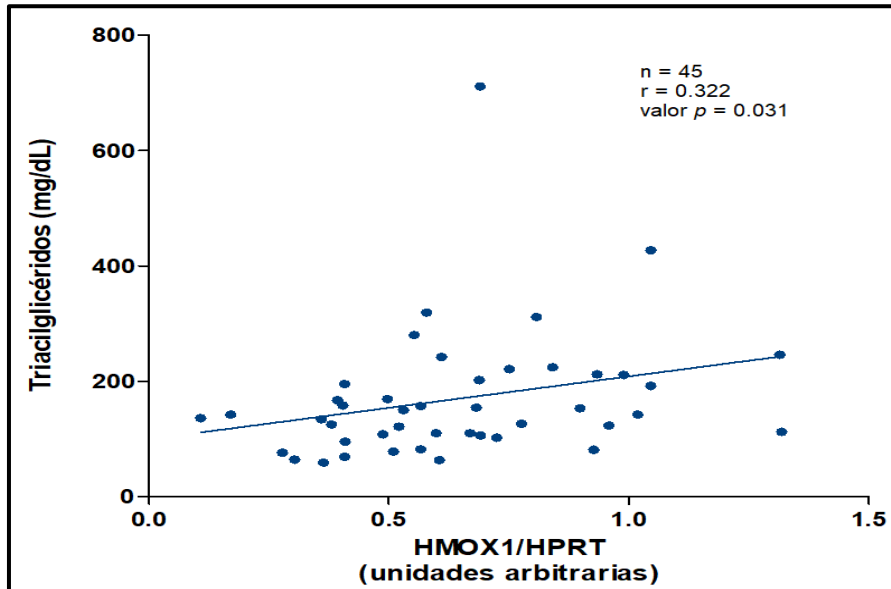
**Figura 30. Expresión del gen HMOX1 con respecto al microsatélite promotor.** Valor  $p$  sobre líneas rojas, no significativo. Gráfica media  $\pm$  error estándar.

En contraste, cuando se analizó la correlación de los niveles de expresión del gen *HMOX1* con los parámetros histológicos relacionados con el HGNA, se observó una asociación significativa de la expresión del gen *HMOX1* con el grado de inflamación ( $p=0.012$ ), encontrando niveles significativamente más elevados de expresión del gen en función del incremento del grado de inflamación hepática (Figura 31).

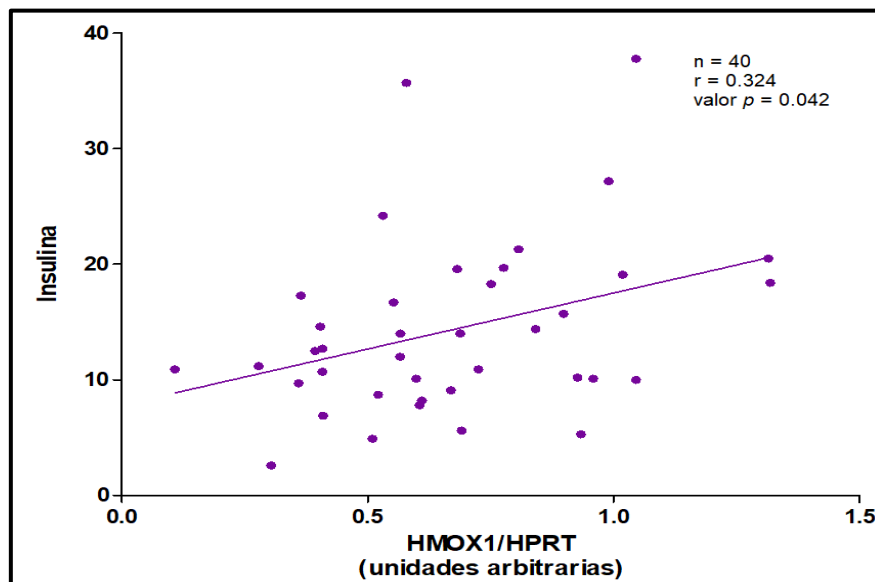


**Figura 31. Expresión génica de HMOX1 con el grado de inflamación.** Valor  $p$  sobre líneas rojas; cuadro rojo más significativo. Total = 47 muestras; media  $\pm$  error estándar.

Por último, se realizó un análisis de correlación de la expresión de HMOX1 con los parámetros bioquímicos, como glucosa, insulina triacilglicéridos, colesterol y transaminasas; sin embargo, sólo se encontraron correlaciones positivas, estadísticamente significativas, con los niveles de triacilglicéridos ( $r= 0.322$ ,  $p= 0.031$ ) e insulina séricos ( $r= 0.324$ ,  $p=0.042$ ), Figura 31 y Figura 32.



**Figura 31. Correlación entre la expresión del gen *HMOX1* con la concentración de triacilglicéridos.** La recta muestra una correlación positiva entre los niveles de expresión del gen y los triacilglicéridos circulantes.



**Figura 33. Correlación de insulina con los niveles de expresión de *HMOX1*.** Se muestra una recta con correlación positiva; indicando la elevación de los niveles de expresión de *HMOX1* y la insulina.

## 7. DISCUSIÓN

El HGNA es un problema de salud pública en aumento a nivel mundial, el cual se encuentra estrechamente relacionado con la presencia de otras alteraciones metabólicas como obesidad y diabetes. Además, diversos estudios han señalado que los hispanos son un grupo más vulnerable a presentar esta condición, en comparación con otras poblaciones como caucásicos o afroamericanos, poniendo de manifiesto que el componente genético está íntimamente relacionado con el riesgo a desarrollar esta hepatopatía (Castro, *et al*, 2015; Vega-Badillo, 2016; LaBrecque, *et al*, 2012).

En este estudio, la prevalencia de HGNA fue del 85%, este valor concuerda con lo reportado en la literatura, pues se estima que en sujetos con obesidad severa esta condición hepática se presenta hasta en 90% (LaBrecque, *et al*, 2012). Los reportes indican que en la población mundial alrededor del 37% presenta EHNA, aunque en nuestra cohorte la prevalencia de esteatohepatitis fue de 55.4%, esta diferencia podría deberse al grupo de estudio de sujetos con obesidad mórbida, al método de diagnóstico utilizado o al componente genético hispano que sugiere una mayor vulnerabilidad al desarrollo de esta enfermedad (Vega-Vadillo, 2016; Castro, *et al*, 2015).

Por otra parte, el 24.3% presentó diabetes y dentro de este grupo la prevalencia de HGNA era de 91.5%, resaltando la relación que existe entre esta enfermedad con el daño hepático, aunque no es un valor representativo de la población ni concuerda con la prevalencia reportada en diabéticos de HGNA (Vega-Badillo, 2016; Castro, *et al*, 2015; LaBrecque, *et al*, 2012).

El objetivo de este trabajo fue estudiar tres variantes en el gen que codifica para la enzima HO-1, el microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1, además los SNP rs2071746 y rs2071748, en el progreso de esteatosis simple a EHNA, ya que, siguiendo la teoría de la fisiopatología de esta enfermedad, en este punto es donde las moléculas oxidantes generadas por las alteraciones que provocan los cúmulos de lípidos en la célula juegan un papel crucial en el daño que presentan los hepatocitos, es decir un estado inflamatorio crónico, la pérdida de la forma celular (balonamiento) y apoptosis, por lo que el hígado no puede funcionar adecuadamente (Castro, *et al*, 2015; Chang PF, *et al*, 2015).

Bajo este supuesto, aquellas personas con la capacidad de sobreexpresar enzimas antioxidantes, como la HO-1, tendrían considerablemente un riesgo menor de progresar a un estadio más severo de la enfermedad, como la EHNA, ya que estas enzimas coadyuvan a neutralizar las moléculas oxidantes formadas (Bernal, 2016; Chang PF, *et al*, 2015; Martín, *et al*, 2013).

Previamente, un trabajo realizado por Chang PF *et al*, realizado en el 2015, sugirió la relación del microsatélite del promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 con la esteatosis hepática en niños obesos, diagnosticada por ultrasonido. En el presente trabajo se buscó determinar si el microsatélite del gen HMOX1, también participa en la progresión del daño hepático o en el desarrollo de EHNA, dado que, en esta cohorte de sujetos con obesidad severa, se obtuvo un diagnóstico por evaluación histológica, el cual no sólo cuantifica el grado de esteatosis, si no también el grado de inflamación y daño hepático (balonamiento hepatocelular).

El comportamiento del microsatélite (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 en esta cohorte de población mexicana fue similar al reportado en otros estudios, de tipo bimodal (Chang PF, *et al*, 2015; Lüblinghoff, *et al*, 2009; Sheu, *et al*, 2009), al dividir por casos y controles la longitud del STR es mayor en los sujetos con EHNA; el rango en el que se encuentra el microsatélite va de 18 a 43 repetidos, siendo mayor que lo reportado por Córdoba y colaboradores en el año 2012 para un grupo de estudio de población mexicana.

Dado que no existe un consenso sobre la metodología más adecuada para establecer puntos de corte para el microsatélite (GT)<sub>n</sub> de HMOX1, ya que, en la mayoría de los estudios, como el de Córdoba utilizan los reportados en la literatura para población europea (25 repetidos), otros siguen el de 27 repetidos que usan algunos estudios asiáticos, sin tener una explicación clara del porqué las diferentes clasificaciones. También existen trabajos que toman en cuenta la moda, mediana o los picos que se generan en la distribución bimodal (Pechlaner, *et al*, 2015; Qiao, *et al*, 2014; Lüblinghoff, *et al*, 2009).

En nuestro estudio, establecimos dos puntos de corte en función de la distribución del repetido en nuestra población; el primero fue considerando los dos alelos a la vez, encontrando que la media en esta población fue de 29, la cual tomamos como punto de corte; sin embargo, debido a que el valor del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)

fue muy bajo, y que cada uno de los alelos presento un comportamiento diferente, pues mientras un alelo presentó una distribución bimodal, el otro alelo sólo tenía un pico en 30 repetidos, se descartó este análisis. Por lo tanto, decidimos clasificar cada alelo por separado con base en la mediana, tomando en cuenta que sólo se trata de una clasificación de referencia para hacer el análisis de asociación, de esta forma la distribución de alelos siguió el equilibrio de H-W.

Estudiar el equilibrio de H-W es importante porque cuando se encuentra cercano a 1 se siguen las leyes de la segregación independiente de Mendel, es decir, no tenemos un sesgo hacía ningún genotipo, ni hay consanguinidad que pueda estar moviendo los valores de asociación; en este sentido, un meta-análisis realizado por Qiao y colaboradores en el 2014, habló de la importancia de este equilibrio en los estudios que se realizan en torno al (GT)<sub>n</sub> de HMOX1, debido a que en la mayoría de los artículos no se realiza, por lo tanto el punto de corte que eligen puede estar sesgando los resultados. En nuestro caso, el punto de corte elegido de acuerdo a cada alelo, nos muestra que no hay sesgo que pueda estar interviniendo en el análisis de asociación.

De esta forma, observamos que el análisis de asociación del microsatélite con el riesgo de EHNA, sugiere que presentar al menos un alelo largo (modelo dominante) aumenta el riesgo de desarrollar EHNA en casi 2.5 veces en comparación con los sujetos que no presentan alelos largos, (RM= 2.524; IC (95%)= 1.127–5.649;  $p=0.024$ ), lo cual es consistente con lo reportado el estudio de Chang PF *et al*, donde también observan una asociación significativa con un mayor riesgo de esteatosis hepática (RM= 18.84; IC (95%)=;  $p=0.025$ ).

Las diferencias en el intervalo de confianza y la RM del estudio de Chang PF con este pueden estar dadas por el número de individuos analizados, el hecho de que nosotros trabajamos con sujetos adultos o el tipo de diagnóstico, ya que la histología permite tener un análisis más fino de la enfermedad, estratificando entre sus diferentes etapas, mientras con la imagenología sólo se pueden detectar grados avanzados de esteatosis y no permite diferenciar entre las dos entidades de HGNA; por lo tanto, la RM que nosotros obtuvimos puede ser menor por estar dirigido sólo al progreso a EHNA.

El estudio de este microsatélite también nos aportó datos interesantes sobre los parámetros histológicos y bioquímicos relacionados al HGNA, pues bajo un modelo

dominante para el alelo largo, se observa un mayor riesgo a presentar fibrosis, así como una tendencia a inflamación y puntaje de NAS, lo cual indica que no sólo está implicado en la esteatosis hepática sino en la progresión a estadios más severos de la enfermedad hepática; aunado a lo anterior, vimos una disminución en los niveles séricos de HDL, además de la tendencia a aumentar la concentración sérica de la enzima ALT, confirmando que este promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 se relaciona con un daño hepático severo (Bernal, 2016; Santoyo, 2016).

A pesar de que nuestro principal interés era la asociación con el microsatélite promotor, las variantes como los SNP rs2071746 y rs2071748 en el gen HMOX1, que también han sido estudiados, pueden explicar en mayor medida la expresión génica de esta enzima, pues se dice que las tres variantes son parte de un bloque génico, como lo demuestran Sheu *et al* en su estudio publicado en 2009 realizado en población asiática (Sheu, *et al*, 2009).

En nuestro estudio los SNP se encontraron en perfecto desequilibrio de ligamiento entre sí, con una  $D'=1$  concordando con los resultados de Sheu, sin embargo, el (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 tiene un valor de  $D'$  de 0.5 y  $r^2$  igual a 0.171 con ambos SNP, indicando que las mutaciones no siempre se heredan juntas y su relación con la enfermedad puede ser variable (Song, *et al*, 2009; Tanaka, *et al*, 2011). Por lo cual decidimos analizar los SNP de manera independiente.

En particular, los SNP tienen una frecuencia alélica del alelo mayor (A o G, según sea el caso) de 0.710, siendo un valor muy parecido al reportado en la base de datos de ENSEMBL, pues para el alelo "A" del SNP rs2071746 la frecuencia es de 0.727, mientras para el alelo "G" del SNP rs2071748 es de 0.750. En cuanto al genotipo, rs2071746 y rs2071748 tienen una frecuencia de homocigotos recesivos de 0.070, lo cual es consistente con 0.078 para TT y 0.062 de AA, reportado en ENSAMBL. El hecho de que alélica y genotípicamente tengamos valores parecidos a lo reportado para poblaciones mexicoamericanas, así como un equilibrio de H-W de 0.972, nos habla de que los individuos incluidos en el estudio no están sesgados hacia ningún genotipo en particular, siendo más confiables los resultados a pesar del número reducido de la muestra analizada (EMBL-EBI, 2017).



Así pues, en el análisis de riesgo no encontramos valores significativos ni de tendencia para ninguno de los SNP; sólo se tuvo una asociación estadísticamente significativa con balonamiento celular ( $p = 0.025$ ). Los resultados obtenidos concuerdan con los trabajos publicados en torno al SNP rs2071746, pues en la mayoría llegan a la conclusión de que este SNP no tiene relación con la expresión génica de HMOX1, por lo tanto, tampoco con las enfermedades ligadas cuando se tienen poblaciones de más de mil individuos (Qia, *et al*, 2014; Bao, *et al*, 2010; Song, *et al*, 2009; Lüblinghoff, *et al*, 2009).

Por el contrario, analizar los haplotipos nos arrojó un resultado significativo, pudiendo indicar que, a pesar de no estar en perfecto desequilibrio de ligamiento, estudiar estas variantes como un bloque es importante para evaluar el riesgo genético que HMOX1 aporta al desarrollo de EHNA. Este tipo de análisis es una herramienta que se ha utilizado en estudios previos donde se quiere conocer la relación que tienen diversas variantes de un gen con el desarrollo de una enfermedad, como es el caso del estudio de Sheu *et al* del 2009, donde analizaron el (GT)<sub>n</sub> de HMOX1, rs2071748, rs2071746 y rs5755720, encontrando que el haplotipo Cortos–TG daba un mejor resultado que cuando estudiaban las variantes por separado.

En nuestro trabajo, el haplotipo A–Largo–G es el más frecuente en la población general, con un mayor porcentaje 51.5%, estadísticamente significativo, en los casos (RM=2.723; IC=1.274–5.518;  $p=0.012$ ), además, este haplotipo tiene una asociación significativa con mayor balonamiento ( $p=0.017$ ), fibrosis ( $p=0.006$ ), puntaje de NAS ( $p=0.017$ ), concentraciones séricas de ALT, así como una tendencia al aumento de la inflamación ( $p=0.057$ ) y triacilglicéridos hepáticos ( $p=0.084$ ), disminución de HDL ( $p=0.077$ ).

Las asociaciones encontradas nos muestran que el haplotipo también tiene relación con los parámetros bioquímicos e histológicos propios del deterioro hepático en esta enfermedad, así como sus estadios más avanzados, por lo que en conjunto con las pruebas séricas de laboratorio podría ser un buen predictor de daño. No obstante, es necesario hacer estudios en poblaciones más grandes para corroborar los hallazgos (Bernal, 2016; Santoyo, 2016; Castro, *et al*, 2015; Song, *et al*, 2009).

En general, esta parte genética sugiere que tener al menos un alelo largo, así como el haplotipo A–Largo–G incrementa el riesgo para desarrollar EHNA, resultado que es consistente con los estudios entorno a estos polimorfismos, pues se habla de que tener repeticiones largas de Guanina–Timina (GT) podría producir una conformación Z-ADN que impide a los factores de transcripción encontrar su sitio de reconocimiento, produciendo una baja en la transcripción y traducción de la enzima HO–1 (Song, *et al*, 2009; Sheu, *et al*, 2009; Chang PF, *et al*, 2015).

Esta asociación con los parámetros bioquímicos e histológicos es interesante porque podríamos pensar que la enzima y los metabolitos que genera son capaces de reducir el estrés oxidativo en la célula, disminuyendo la lipoperoxidación; lo que se traduce en la disminución del balonamiento, inflamación y necrosis, reflejándose en el decremento de los niveles séricos de ALT, una enzima intracelular que sólo se eleva en la circulación cuando hay rotura de las células, muy sensible a las patologías hepáticas (Chang PF, *et al*, 2015; Henry, *et al*, 2010; Bernal, 2016; Santoyo, 2016).

En contraste con lo anterior, cuando hicimos el análisis de expresión génica teníamos mayores niveles de HMOX1 en el estadio más severo del HGNA o EHNA ( $p=0.023$ ) como en los grados más avanzados de esteatosis ( $p = 0.007$ ) e inflamación ( $p = 0.012$ ); además se observó una correlación positiva de los niveles de HMOX1 con triacilglicéridos ( $p = 0.031$ ) y con insulina ( $p = 0.042$ ).

El hecho de que haya una expresión incrementada del gen HMOX1 en estos parámetros podría parecer contradictorio a lo expuesto en la mayoría de los trabajos, no obstante, es importante tener varios aspectos en consideración, pues al existir un daño hepático tan marcado, los altos niveles de expresión de HO-1 que estamos encontrando pueden ser resultado de un mecanismo de respuesta antioxidante por parte de la célula ante la gran cantidad de ERO que se están produciendo.

Además, no hubo una asociación significativa de ninguna de las variantes con la expresión génica, por lo que tal vez haya algunas otras modulaciones del microambiente que estén interviniendo en la expresión, más allá de los polimorfismos estudiados; asimismo, se ha encontrado que el rango de sobreexpresión en el que actúa la enzima es delimitado, ya que en un ambiente oxidativo como el que presentan los sujetos metabólicamente comprometidos, las moléculas prooxidantes como el

hierro libre pueden estar contribuyendo al daño hepático que se presenta (Scheingraber, *et al*, 2009; Sheu, *et al*, 2009; Kramer, *et al*, 2013).

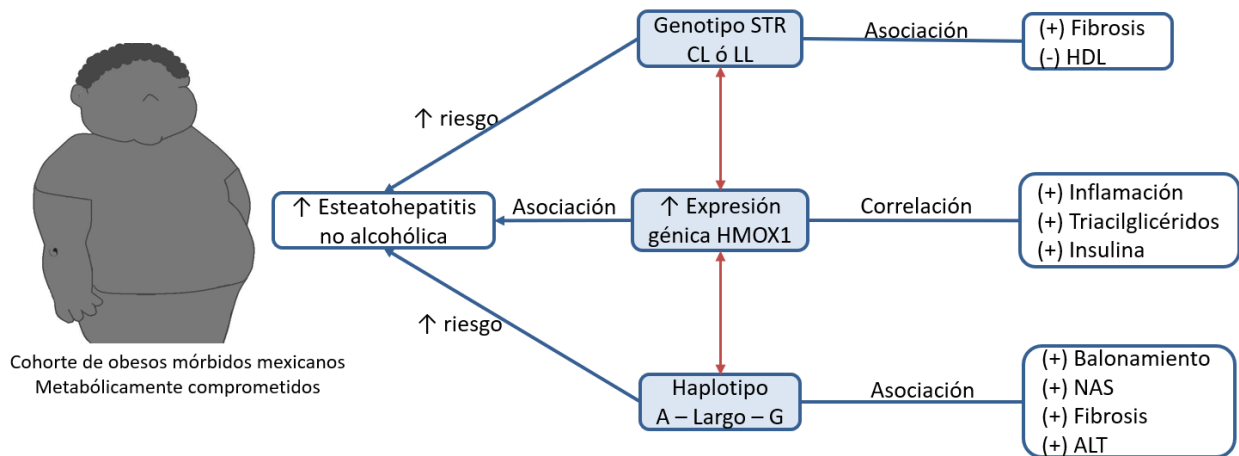
Otro punto para tomar en cuenta es que las variantes pueden estar modulando la expresión génica de manera distinta en cada individuo según el microambiente, el tejido del que se trata y la interacción que exista entre genes, pues en un estudio realizado en 2009 por Sheu *et al* en población americana como la nuestra, también hubo una asociación del alelo largo con mayores niveles de la enzima, ellos al correlacionarlo con mediciones séricas de ésta.

Una desventaja importante de este estudio es que sólo se incluyeron individuos con obesidad severa, metabólicamente comprometidos, por lo que no tenemos un punto de comparación de los niveles de expresión de HMOX1 en sujetos sanos que nos permita determinar si los niveles de expresión de HMOX1 se encuentran alterados para ver los efectos del gen sobre metabolitos secundarios y la señalización antioxidante (Ntube, *et al*, 2013; Sheu, *et al*, 2009).

No obstante, existen estudios *in vivo* realizados en modelos animales que demuestran que HO-1 provee efectos citoprotectores en el hepatocito, resultando en la disminución de esteatosis y producción de citocinas proinflamatorias (Hinds, *et al*, 2014). Tal es el caso del estudio realizado por Ntube y colaboradores en el 2013, quienes evaluaron los efectos de HO en un modelo murino con obesidad y diabetes tipo 2, encontrando que la administración de hemina (promotor de la expresión de HO en hepatocitos) resultaba en la reducción de las concentraciones de triacilglicéridos y colesterol, así como en la inhibición de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, condicionando la disminución de daño hepático, balonamiento celular, inflamación e incluso fibrosis (Ntube, *et al*, 2013).

En resumen (Figura 34), los resultados de este trabajo experimental indican que los sujetos mexicanos con obesidad mórbida tienen un riesgo aumentado de desarrollar esteatohepatitis no alcohólica con mayores niveles de fibrosis y disminución de las HDL cuando tienen al menos un alelo largo del microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1. De igual forma presentar el haplotipo A-L-G incrementa el riesgo a EHNA con mayor balonamiento, fibrosis, puntaje de NAS y niveles séricos de ALT.

A pesar de que los niveles de expresión correlacionaron con EHNA, inflamación, triacilglicéridos e insulina, no se vio relación alguna con las variantes génicas estudiadas, por lo que en la modulación de la expresión génica pueden estar interviniendo otros factores no analizados en el presente estudio.



**Figura 34. Resumen del estudio.** Relación de las variantes génicas relevantes, niveles de expresión, esteatohepatitis no alcohólica y parámetros séricos e histológicos asociados. Líneas azules significancia estadística; líneas rojas sin asociación. [Olivares-Arévalo, Marisol, 2018]

## 8. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de hígado graso no alcohólico en esta muestra de población mexicana con obesidad severa fue del 85%, concordando con lo reportado en la literatura para este grupo poblacional. De los cuales, el 31.3% presentó esteatosis simple y 55.4% esteatohepatitis no alcohólica.
2. La presencia de al menos un alelo largo en el microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 (CL o LL) confiere un mayor riesgo para el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica y se asoció con un mayor grado de fibrosis, lo que sugiere que está implicado en la progresión a estadios más severos del daño hepático.
3. En contraste, los SNP rs2071746 y rs2071748, localizados en la región promotora del gen HMOX1 no se asociaron significativamente con el riesgo de EHNA en esta cohorte de sujetos con obesidad mórbida.
4. El haplotipo del microsatélite y los SNP's estudiados en este trabajo, A-Largo-G, se asoció significativamente con un mayor riesgo de presentar esteatohepatitis no alcohólica, así como grados avanzados de balonamiento, puntaje de NAS, fibrosis y niveles séricos de ALT, lo cual sugiere una regulación más compleja de gen HMOX1.
5. Los sujetos con esteatohepatitis presentaron mayores niveles de expresión génica de HMOX1. Además, la expresión del gen se asoció positivamente con un mayor grado de balonamiento y mayores niveles séricos de triacilglicéridos e insulina, lo cual sugiere su participación en el metabolismo hepático y su participación en el desarrollo y progresión del HGNA.

## 9. PERSPECTIVAS

A lo largo del desarrollo de este trabajo y con en base en las conclusiones obtenidas, planteamos las siguientes expectativas, considerando que aún faltan muchos estudios para poder incluir alguna variante génica como biomarcador en el diagnóstico clínico:

Realizar ensayos de citotoxicidad en hepatocitos con altas concentraciones de lípidos y glucosa, para observar el efecto citoprotector de HOMX1 y relacionar con los estudios de expresión enzimática según la longitud del repetido.

Estudiar las características del repetido y los SNP rs2071746, rs2071748 en diferentes grupos de edad, para determinar si HOMX1 es un factor de riesgo para desarrollar hígado graso no alcohólico en edades tempranas.

Relacionar la expresión de HOMX1 con otras enzimas que puedan intervenir en situaciones de estrés oxidativo en el hepatocito, asociadas con los niveles altos de ácidos grasos libres.

Validar los hallazgos de este estudio en una muestra con un mayor número de individuos que sea representativa para la población mexicana, relacionando con evidencia histológica la asociación del microsatélite promotor (GT)<sub>n</sub> de HMOX1 con los diversos estadios de la enfermedad; asimismo, determinar la sensibilidad y especificidad como biomarcador sérico para el diagnóstico de hígado graso no alcohólico.

## 10. REFERENCIAS

- Bao, W., Song, F., Li, X., et al. (2010). Association Between Heme Oxygenase-1 Gene Promoter Polymorphisms and Type 2 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. *American Journal of epidemiology*, 172, 631-636.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263–265.
- Bernal, R. (2015). Hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica y alcohólica. *Gastroenterología de México*, 80(1), 41-43.
- Bernal, R. (2016). El hígado en el síndrome metabólico. (Haro, F., & O. Fuentes, Edits.) *Gastrotrilogía: Patología hepática y pancreática de la A a la Z*, 1, 52 - 56.
- Betancourt-García, M., Arguelles, A., Montes, J., Et al. (2016). Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: The rise of a lethal disease among mexican american hispanic children. *Obesity surgery*, 27, 236-244.
- Buqué, X., Aspichueta, P., & Ochoa, B. (2008). Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Revista española de enfermedades digestivas*, 100(9), 565-578.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism clinical and experimental*, 65, 1038-1048.
- Carrasco, R., Castillo, R., Huerta, P., et al. (2003). La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático. *MedUNAB*, 5(16), 15-20.
- Carrillo, R., & Muciño, J. (2011). Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 54(3), 29-45.
- Casado, M., & Carreño, R. (2009). La biopsia hepática: Indicaciones, técnica y complicaciones. 32(4), 286-290.
- Castro, L., & Silva, G. (2015). Hígado graso no alcohólico. *Revista Médica Clínica Condesa*, XXVI(5), 601-612.
- Cazzo, E., Pareja, J., & Chaim, E. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease and bariatric surgery: a comprehensive review. *Scielo*, 1-19.
- CENATRA. (10 de Abril de 2017). Boletín Estadístico – Informativo: Centro Nacional de Trasplantes. 1(2), 50.
- Chalasanani, N., Guo, X., Loomba, R., et al. (2010). Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical advances in liver, pancreas and biliary tract*, 139, 1567-1576.
- Chang, PF, Lin, Y., Liu, K., et al. (2015). Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and the risk of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Obesity*, 39(8), 1236-1240.
- Checa, A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*, 20(3), 213-221.
- Chen, H., Chan, I., et al. (2011). Haplotype effect in the IGF1 promoter accounts for the association between microsatellite and serum IGF1 concentration. *Clinical Endocrinology*(74), 520-527.
- Córdova, E., Martínez-Hernández, A., Ramírez-Bello, J., et al. (2012). HMOX1 promoter (GT)<sub>n</sub> polymorphism is associated with childhood-onset systemic lupus erythematosus but not with juvenile rheumatoid arthritis in a Mexican population. *Clinical and Experimental Rheumatology*(30).

- DeFilippis, A., Blaha, M., Martin, S., et al. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 227, 429-436.
- Del Ben, M., Polimeni, L., Carnevale, R., et al. (2014). NOX1-generated oxidative stress is associated with severity of ultrasound liver steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterology*, 14(81).
- Dezsöfi, A., Baumann, U., Dhawan, A., et al. (2015). Liver Biopsy in Children: Position Paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *Revista de posiciones médicas*, 60(3), 408-420.
- DiStefano, J., Kingsley, C., Craing Wood, G., et al. (2015). Genome-wide analysis of hepatic lipid content in extreme obesity. *Acta diabetológica*, 52, 373-382.
- LDLink. (2017). *LDMatrix*. Recuperado Noviembre de 2017, de <https://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/?tab=ldmatrix>
- Dongiovanni, P., & Valenti, L. (2016). Genetics of nonalcoholic fatty liver. *Metabolism*, 65(8), 1026-1037.
- Ensembl<sup>A</sup>. (2017). *Variant: rs2071746*. Recuperado Octubre de 2017, de [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=22:35380179-35381179;v=rs2071746;vdb=variation;vf=1491149](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=22:35380179-35381179;v=rs2071746;vdb=variation;vf=1491149)
- Ensembl<sup>B</sup>. (2017). *Variant: rs2071748*. Recuperado Octubre de 2017, de [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=22:35381125-35382125;v=rs2071748;vdb=variation;vf=1491151](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=22:35381125-35382125;v=rs2071748;vdb=variation;vf=1491151)
- Fisher, C., Kierzek, A., Plant, N., et al. (2014). Systems biology approaches for studying the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(41), 15070-15078.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226, 497-509.
- García, C. (2012). *Enfermedad hepática grasa no alcohólica*. Boletín, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Unidad de Investigación. Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid.
- García, L. (11 de 2016). Hígado graso no alcohólico y trasplante. *Médicos y pacientes*. Obtenido de <http://asscat-hepatitis.org/blog/dr-landa-garcia-higado-graso-no-alcoholico-y-trasplante/>
- Garrido, G., Sánchez, C., Rodeiro, I., et al. (2005). Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta farmacéutica Bonaerense*, 24(4), 619-626.
- GenBank. (2016). *NCBI Reference Sequence: NG\_023030.1*. Recuperado Enero de 2017, de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_023030.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_023030.1)
- Graffigna, M., Catoira, N., Soutelo, J., et al (2017). Diagnóstico de esteatosis hepática por métodos clínicos, bioquímicos y por imágenes. *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*, 54(1), 37-46.
- Hernández, M., Rivera, J., Shamah, T., Cuevas, L., et al. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*. Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública.
- Henry, J., Dufour, R., & Lott, J. (2010). *El laboratorio en el diagnóstico clínico* (Vol. I). Nueva York: Marbán libros.
- Hinds, T., Sodhi, K., Meadows, C., & Fedorova. (2014). Increased HO-1 Levels Ameliorate Fatty Liver Development Through a Reduction of Heme and Recruitment of FGF21. *Obesity biology and integrated physiology*, 22(3), 705-712.
- IMSS. (2014). *Diagnóstico y tratamiento de enfermedad hepática grasa no alcohólica del adulto*. Consejo de salubridad general. Ciudad de México: CENETRA.



- Jaycox, S. (2016). A Fatty World: Exploring Racial Disparity in NAFLD/NASH. *iMedPub Journals*, 2(2), 1-6.
- Kramer, M., Sponholz, C., Slaba, M., et al. (2013). Alternative 5' untranslated regions are involved in expression regulation of human heme oxygenase-1. *PLoS One*, 8, 1-10.
- LaBrecque, D., Abbas, Z., Ferenci, P., et al. (2012). *Enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica*. Estados Unidos de América: Organización Mundial de Gastroenterología.
- León-Mimila, P. (2017). *Contribución de variantes genéticas comunes a la obesidad y sus complicaciones en población mexicana*. Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México.
- León-Mimila, P., Vega-Badillo, J., Gutiérrez-Vidal, R., Villamil-Ramírez, H., et al. (2015). A genetic risk score is associated with hepatic triglyceride content and non-alcoholic steatohepatitis in Mexicans with morbid obesity. *Experimental and molecular pathology*, 98, 178-183.
- López-Ortega, A., Araguren, A., Plaza, A., et al. (2014). Estrés oxidativo y alteraciones de la funcionalidad hepática en ratones hembras con hígado graso experimental. *Revista veterinaria*, 25(1), 7-11.
- Lüblinghoff, N., Winkler, K., Winkelmann, B., et al. (2009). Genetic variants of the promoter of the heme oxygenase-1 gene and their influence on cardiovascular disease. *BioMed Central*, 36(10), 1-9.
- Martín-Domínguez, V., González, R., Mendoza, J., et al. (2013). Etiopatogénea, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólica. *Revista española de enfermedades digestivas*, 105(7), 409-420.
- Martínez, J., Torres, P., & Juárez, M. (2013). Los ácidos grasos y la lipotoxicidad: implicaciones metabólicas. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 56(1).
- Martínez-Hernández, A., Córdova, E., Rosillo-Salazar, O., et al. (2015). Association of HMOX1 and NQO1 polymorphisms with Metabolic Syndrome Components. *PLoS ONE*, 10(5), 1-12.
- Méndez, N., Chávez-Tapia, N., et al. (2010). Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales. *Revista de gastroenterología de México*, 2(75), 143-148.
- Miller, M., Walsh, S., Atrih, A., et al. (2014). The serum proteome of nonalcoholic fatty liver disease: A multimodal approach to discovery of biomarkers of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 29, 1839-1847.
- National Center for Biotechnology Information. (2017). *HMOX1: Heme oxygenase 1 [Homo sapiens (human)]*. Recuperado Enero de 2017, de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=3162](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=3162)
- National Institute for Health. (2002). Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).
- Ntube, T., Mishra, M., Tiwari, S., et al. (2013). The Heme Oxygenase System Rescues Hepatic Deterioration in the Condition of Obesity Co-Morbid with Type-2 Diabetes. *PLoS ONE*, 8, 1-11.
- OMIM. (2016). *HEME OXYGENASE 1; HMOX1*. Recuperado Mayo de 2017, de <http://omim.org/entry/141250>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *Obesidad y sobrepeso: 10 datos sobre la obesidad*. Recuperado Noviembre de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>

- Orozco-Ibarra, M., & Pedraza-Chaverri, J. (2010). Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. *Neurociencias*, 15(1), 47-55.
- Palmer, N., Musani, S., Yerges-Armstrong, L., et al. (2013). Characterization of european-ancestry NAFLD-Associated variants in individuals of African and Hispanic descent. *Hepatology*, 58(3), 966-975.
- Páramo, D., Otero, W., Pineda, L., et al. (2010). Fibrogénesis hepática. *Revista colombiana de gastroenterología*, 25(2), 187-197.
- Paredes, A., Gálvez, F., & Gallegos, D. (s.f.). *Interpretación de exámenes de laboratorio hepático y aproximación diagnóstica en pacientes con pruebas alteradas*. Obtenido de [www.med.ufro.cl/clases\\_apuntes/.../15-higado-y-pruebas-hepaticas.pdf](http://www.med.ufro.cl/clases_apuntes/.../15-higado-y-pruebas-hepaticas.pdf)
- Patel, Y., Berg, C., Moylan, C., et al. (2016). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Key Considerations Before and After Liver Transplantation. *Springer*, 61, 1406-1416.
- Pechlaner, R., Willeit, P., Summerer, M., et al. (2015). Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with progressive atherosclerosis and incident cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 35(1), 229-236.
- Pfam (EMBL-EBI). (2016). *Family: Heme\_oxygenase (PF01126)*. Recuperado Junio de 2017, de <http://pfam.xfam.org/family/PF01126>
- Qiao, H., Sai, X., et al. (2014). Association between Heme oxygenase 1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to coronary artery disease: A HuGE review and meta-analysis. *Human Genome Epidemiology (HuGE)*, 179(9), 1039-1048.
- RegulomeDB<sup>A</sup>. (2011). *chr22:35776671 (rs2071746)*. Recuperado Septiembre de 2017, de <http://www.regulomedb.org/snp/chr22/35776671>
- RegulomeDB<sup>B</sup>. (2011). *chr22:35777617 (rs2071748)*. Recuperado Noviembre de 2017, de <http://www.regulomedb.org/snp/chr22/35777617>
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., et al. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*, 40(12), 1461–1465.
- Rueda, B., Oliver, J., Robledo, G., et al. (2007). HO-1 promoter polymorphism associated with rheumatoid arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATIS*, 56(12), 3953–3958.
- Santos, L., Hernández, G., Varón, P., et al. (2010). Enfermedad hepática por infiltración grasa no alcohólica. La nueva pandemia del milenio. *Revista colombiana de gastroenterología*, 25(4), 380-398.
- Santoyo, R. (2016). Enzimas hepáticas anormales en paciente asintomático: evaluación y manejo. *Grastrotología: Protología hepatobiliar y pancreática de la A a la Z, I*, 13-16.
- Scheingraber, S., Bauer, M., et al. (2009). Inhibition of hemoxygenase-1 improves survival after liver resection in jaundiced rats. *European Surgical Research*, 42, 157-167.
- Segarra, E. (2006). *Fisiología de los aparatos y sistemas*. Cuenca: Imprenta de la Facultad de Ciencias Médicas.
- Sherif, Z., Saeed, A., Ghavimi, S., et al. (2016). Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Perspectives on US Minority Populations. *PMC*, 61(5), 1214-1225.
- Sheu, C.-C., Zhai, R., Wang, Z., et al. (2009). Heme Oxygenase-1 microsatellite polymorphism and haplotypes are associated with the development of acute respiratory distress syndrome. *Intensive care med*, 35, 1343-1351. doi:
- Song, F., Li, X., Muxun, Z., et al. (2009). Association Between Heme Oxygenase-1 Gene Promoter Polymorphisms and Type 2 Diabetes in a Chinese Population. *American Journal of Epidemiology*, 170(6), 747–756.
- Sookoian, S., & Pirola, C. (2017). Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and molecular hepatology*, 23, 1-12.

- Speliotes, E., Yerges-Armstrong, L., Wu, J., et al. (2011). Genome-Wide Association Analysis Identifies Variants Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease That Have Distinct Effects on Metabolic Traits. *PLoS Genetics*, 7, 2-14.
- Tanaka, G., Aminuddin, F., Akhbir, L., et al. (2011). Effect of heme oxygenase-1 polymorphisms on lung function and gene expression . *BMC Medical Genetics*, 12(117), 2-8.
- UCSC In-Silico PCR. (2017). Recuperado Febrero de 2017, de [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr22%3A35380799-35380925&hgid=676441373\\_ay4ahCrLt9UB7vIAxUSZME19AK2C](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr22%3A35380799-35380925&hgid=676441373_ay4ahCrLt9UB7vIAxUSZME19AK2C)
- UniProtKB. (2014). *UniProtKB - P09601 (HMOX1\_HUMAN)*. Recuperado Mayo de 2017, de [http://www.uniprot.org/help/entry\\_status](http://www.uniprot.org/help/entry_status)
- Uribe, M. (2008). Esteatosis hepática, obesidad y comorbilidades. *Gastroenterología Mexicana*, 73(2), 22-28.
- Vázquez, A., & Morales, A. (2015). Microsatélites. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 75-100.
- Vega-Badillo, J. (2016). *Participación del transportador de colesterol ABCA1 en el desarrollo de hígado graso no alcohólico (HGNA) en sujetos con obesidad mórbida*. Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wattacheril, J., Lavine, J., Chalasani, N., & et al. (2017). Genome-wide associations related to hepatic histology in nonalcoholic fatty liver disease in hispanic boys. *The Journal of Pediatrics*, 190, 100-107.

## 11. APÉNDICE

### Anexo 1. Características de la población en general

	Sin hallazgos (41)	Esteatosis simple (73)	EHNA (129)
Femenino, %	80.5	79.5	71.9
Edad, años	39 ± 11	38 ± 9	37 ± 9
IMC, Kg/m <sup>2</sup>	41.3 ± 5.7	42.8 ± 6.0	44.3 ± 5.6
Diabéticos, %	5.3	5.9	16.3
Glucosa, mg/dL	90 (77 – 100)	88 (75 – 94)	94 (83 – 106)
Insulina, µUI/dL	9.1 (4.9 – 12.0)	10.8 (7.7 – 14.3)	16.2 (10.6 – 23.0)
HOMA – IR	2.17 (1.20 – 2.91)	2.07 (1.57 – 3.32)	3.50 (2.41 – 6.08)
AST, UI/L	24 (20 – 32)	25 (20 – 31)	31 (25 – 48)
ALT, UI/L	21 (17 – 31)	25 (19 – 33)	34 (25 – 48)
γ-GT, UI/L	14 (11 – 22)	16 (12.5 – 22.5)	21 (17 – 32)
CT, mg/dL	167 ± 29	181 ± 35	174 ± 42
HDL – C, mg/dL	39 ± 9	114 ± 29	34 ± 9
LDL – C, mg/dL	102 ± 26	167 ± 29	105 ± 36
TG, mg/dL	105 (78 – 140)	127 (97 – 169)	143 (115 – 202)
CT hepático, mg/mg-p	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.09
TG hepático, mg/mg-p	0.86 ± 0.66	1.44 ± 0.81	3.28 ± 1.70

Valores: número total, porcentaje; media ± desviación estándar; mediana (rango intercuartil).

IMC: Índice de masa corporal; AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; γ-GT: Gamma-glutamil transpeptidasa; HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad; TG: Triacilglicéridos; mg-p: miligramos de proteína.

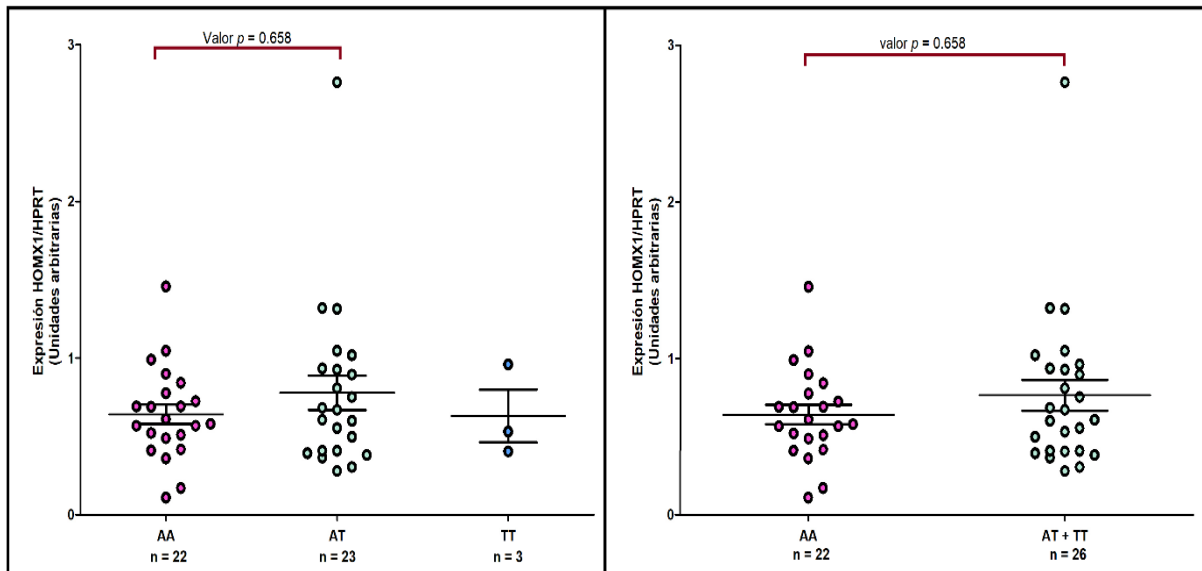
### Anexo 2. Análisis de riesgo del progreso a EHNA con (GT)n de HMOX1, corte en 29

	Sin EHNA	EHNA		OR (IC del 95%)	Valor p
CC	(41) 36.0%	(40) 31.0%	CC vs CL vs LL	1.129 (0.773 – 1.649)	0.530
CL	(40) 35.1%	(47) 36.4%	CC vs CL + LL	1.271 (0.681 – 2.372)	0.452
LL	(33) 28.9%	(42) 32.6%	CC vs LL	1.390 (0.640 – 3.018)	0.406

Ajustado por edad, género, ancestría, IMC, diagnóstico de diabetes.

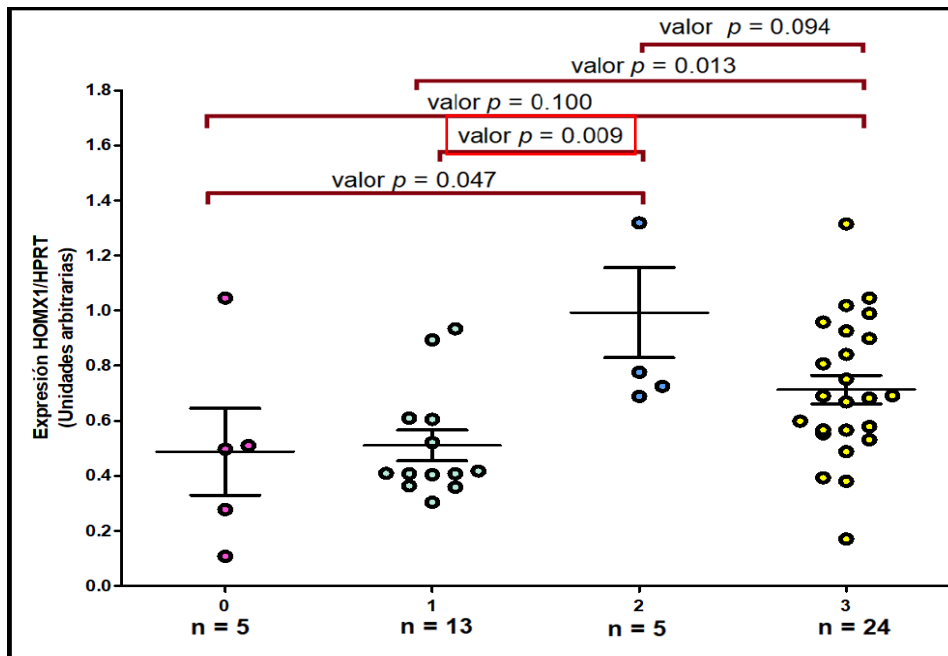
OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; valores: (n total) %

**Anexo 3.** Expresión del gen HMOX1 según el genotipo del SNP.



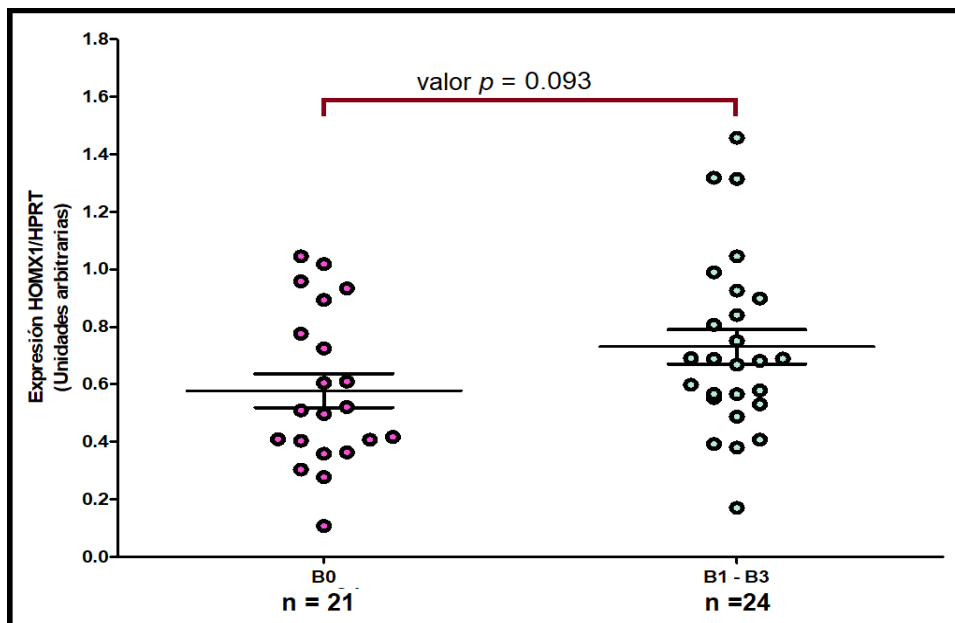
Valor  $p$  sobre líneas rojas. Total 48 muestras; media  $\pm$  error estándar; lado izquierdo modelo aditivo, lado derecho dominante.

**Anexo 4.** Expresión génica con el grado de esteatosis



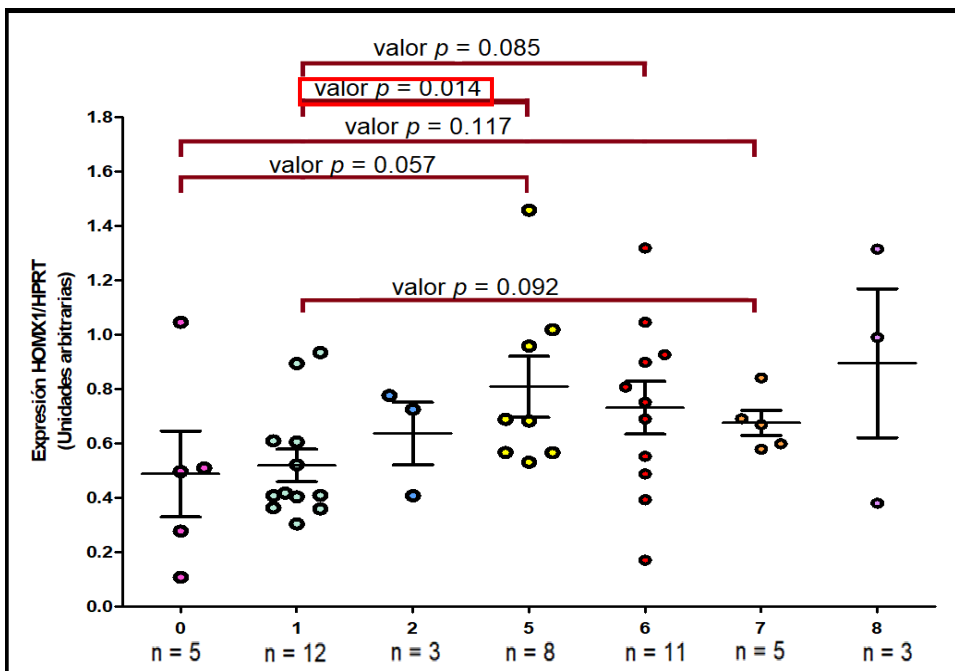
Valor  $p$  sobre líneas rojas; cuadro rojo: más significativa. 47 muestras en total. Gráfica media  $\pm$  error estándar.

**Anexo 5.** Expresión del gen HMOX1 en el grado de balonamiento celular



Valor  $p$  sobre línea roja. Total = 47 muestras; media  $\pm$  error estándar; B0: sin hallazgos, B1-3: algún grado de balonamiento celular.

**Anexo 6.** Expresión génica de HMOX1 en el puntaje de NAS.



Valor  $p$  sobre líneas rojas; cuadro rojo: más significativo. Total = 47 muestras. Se gráfica media  $\pm$  error estándar.