



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CONTRIBUCIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN LA MODULACIÓN DE
METABOLITOS ASOCIADOS CON EL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Elvira Zurisadai Ocampo Medina

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Samuel Canizales Quinteros
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Verónica Guarner Lans
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad de México. Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ocampo Medina Elvira Zurisadai
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

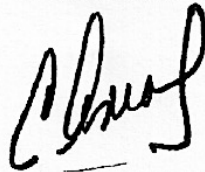
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 8 de abril del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Contribución de variantes genéticas en la modulación de metabolitos asociados con el hígado graso no alcohólico**", dirigida por el/la Dr(a). **Canizales Quinteros Samuel**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Chagoya Hazas Victoria Eugenia
VOCAL	Tovar Palacio Armando Roberto
VOCAL	Juárez Oropeza Marco Antonio
VOCAL	Canto Cetina Ileana Patricia
SECRETARIO	Pedraza Chaverri José

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 8 de abril de 2019.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros, de la Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química UNAM – Instituto Nacional de Medicina Genómica, por su asesoría y apoyo en la realización de este proyecto.

A la M. en C. Isabel Ibarra González de la Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigación Biomédicas UNAM – Instituto Nacional de Pediatría, y a la Dra. Marcela Vela Amieva del Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz, Instituto Nacional de Pediatría, por su apoyo técnico y asesoría para la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Hugo Villamil Ramírez, técnico académico titular de Facultad de Química de la UNAM, por su asistencia técnica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo con la beca No. 818631, comprendida en el periodo del 01 de febrero de 2017 al 31 de enero de 2019.

Al financiamiento CN-17-199 de UC MEXUS-CONACyT y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el aporte económico para asistir a una estancia de investigación en la Universidad de Los Ángeles, California.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	5
I. ANTECEDENTES	
1. Definición de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.....	7
2. Fisiopatología de la EHGNA.....	7
2.1 La hipótesis de “las dos agresiones”	7
2.2 Hipótesis de “las múltiples agresiones”	9
3. Factores de riesgo y epidemiología de la EHGNA.....	9
3.1 El síndrome metabólico.....	9
3.2 La presencia de obesidad.....	10
3.3 Diabetes tipo 2 y la EHGNA.....	10
4. Métodos diagnósticos para la EHGNA.....	11
4.1 Evaluación histológica.....	12
4.2 Biomarcadores clínicos.....	12
5. Alteraciones metabólicas en la EHGNA.....	13
5.1 Alteraciones en el metabolismo de lípidos.....	14
5.1.1 Síntesis y transporte de acilcarnitinas.....	14
5.1.2 Relación de las acilcarnitinas con la EHGNA.....	16
5.2 Alteraciones en el metabolismo de aminoácidos.....	17
5.2.1 Aminoácidos de cadena ramificada y su participación en la EHGNA.....	17
5.2.2 Aminoácidos aromáticos y la EHGNA.....	19
6. Factores que regulan los niveles de metabolitos	19
6.1 La genética como modulador del metaboloma.....	19
6.2 Variantes genéticas asociadas con aminoácidos y acilcarnitinas.....	20
7. Integración genómica-metabólica en el estudio de la EHGNA.....	25
II. JUSTIFICACIÓN.....	27
III. HIPÓTESIS.....	28
IV. OBJETIVOS.....	28

1. Objetivo general.....	28
2. Objetivos particulares.....	28
V. METODOLOGÍA.....	29
1. Población de estudio.....	29
2. Medición de parámetros antropométricos.....	29
3. Determinaciones bioquímicas.....	29
4. Evaluación histológica.....	30
5. Metabolómica dirigida.....	31
5.1 Control de calidad.....	32
6. Cuantificación del contenido hepático de lípidos.....	32
7. Estudio de asociación del genoma completo.....	33
7.1 Extracción de DNA.....	33
7.2 Controles de calidad.....	33
7.3 Asociación genómica.....	33
7.4 Réplica de la asociación genómica.....	34
8. Modelo de Aleatorización Mendeliana.....	34
8.1 Modelo de Estimación de Métodos Causales.....	34
8.2 Modelo de Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos.....	35
9. Cuantificación de la expresión génica.....	35
10. Análisis estadístico.....	36
VI. RESULTADOS.....	38
1. Caracterización de la población de estudio.....	38
2. Parámetros antropométricos y bioquímicos.....	39
3. Asociación de metabolitos con la EHGNA.....	41
3.1 Diferencias entre grupos de la EHGNA.....	41
3.2 Relación con los rasgos histológicos de la EHGNA.....	43
4. Participación del estatus de DT2 en el perfil metabolómico de la EHGNA.....	46
5. Variantes genéticas asociadas con los niveles séricos de metabolitos.....	50
5.1 Efecto de la variación genética en los niveles de metabolitos.....	53
6. Asociación de variantes genéticas con la EHGNA: Modelo de Aleatorización Mendeliana...54	
6.1 Estimación de Métodos Causales.....	54
6.1.1 Análisis de riesgo para la EHGNA y EHNA.....	54

6.1.2 Asociación con los rasgos histológicos de la EHGNA.....	55
6.2 Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos.....	57
7. Relación de <i>PRODH</i> con la EHGNA.....	57
7.1 Contenido hepático de lípidos y variantes en <i>PRODH</i>	57
7.2 Evaluación de la expresión hepática de <i>PRODH</i>	58
7.2.1 Efecto de rs5747933 en la expresión de <i>PRODH</i>	59
7.2.2. Expresión de <i>PRODH</i> en la EHGNA.....	59
VII. DISCUSIÓN	61
1. Frecuencia de la EHGNA y aspectos bioquímicos.....	61
2. Asociación de metabolitos con la EHGNA.....	61
2.1 Aminoácidos de cadena ramificada (BCAA)	61
2.2 Aminoácidos relacionados con los BCAA.....	62
2.3 Aminoácidos aromáticos (AAA)	63
2.4 Otros aminoácidos.....	64
2.5 Acilcarnitinas de cadena corta.....	67
2.6 Acilcarnitinas de cadena media y larga.....	69
3. Variación genética asociada con los metabolitos de la EHGNA.....	69
3.1 Variantes asociadas con los niveles de acilcarnitinas.....	70
3.2 Variantes asociadas con los niveles de aminoácidos.....	73
4. Participación de prolina y <i>PRODH</i> en la EHGNA.....	74
VIII. CONCLUSIONES.....	76
IX. PERSPECTIVAS.....	77
X. REFERENCIAS.....	78
XI. ANEXOS.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación histológica de la EHGNA, de acuerdo al sistema de puntaje de actividad del hígado graso no alcohólico (NAS). *Pág. 12*

Tabla 2. Estudios de asociación del genoma completo realizados para la identificación de variantes genéticas asociadas con los niveles de aminoácidos y acilcarnitinas circulantes. *Pág. 22*

Tabla 3. Parámetros antropométricos y determinaciones bioquímicas en la población de estudio. *Pág. 40*

Tabla 4. Correlaciones de los niveles séricos de metabolitos con los rasgos histológicos de la EHGNA. *Pág. 44*

Tabla 5. Correlaciones significativas de los niveles séricos de metabolitos con los rasgos histológicos de la EHGNA, estratificando por estatus de DT2. *Pág. 49*

Tabla 6. Asociaciones con nivel de significancia de genoma completo ($p < 5 \times 10^{-8}$), asociadas con los niveles séricos de metabolitos relacionados con la EHGNA. *Pág. 52*

Tabla 7. Frecuencia reportada de las variantes genéticas asociadas con los niveles séricos de metabolitos. *Pág. 52*

Tabla 8. Análisis de riesgo de la presencia de al menos una copia de la variante rara en el desenlace de HGNA y EHNA. *Pág. 55*

Tabla 9. Variantes genéticas relacionadas con los niveles de metabolitos y su asociación con los rasgos histológicos de la EHGNA. *Pág. 56*

Tabla 10. Modelo de Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos para evaluar la causalidad de metabolitos en la EHGNA. *Pág. 57*

Tabla suplementaria 1. Lista de metabolitos séricos cuantificados por espectrometría de masas en tándem. *Pág. 89*

Tabla suplementaria 2. Correlaciones de niveles séricos de metabolitos con determinaciones bioquímicas. *Pág. 91*

Tabla suplementaria 3. Correlaciones de niveles séricos de metabolitos con los rasgos histológicos de la EHGNA, estratificando por estatus de DT2. *Pág. 92*

Tabla suplementaria 4. Resultados del estudio de asociación de genoma completo, de variantes genéticas asociadas con los niveles séricos de metabolitos relacionados con la EHGNA. *Pág. 94*

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de la fisiopatología de la EHGNA, de acuerdo a la hipótesis de las dos agresiones. *Pág. 8*
- Figura 2.** Transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria a través de la síntesis de acilcarnitinas. *Pág. 15*
- Figura 3.** Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. *Pág. 18*
- Figura 4.** Modelo de Aleatorización Mendeliana propuesto para la identificación de posible causalidad de metabolitos en la EHGNA. *Pág. 26*
- Figura 5.** Prevalencia de la EHGNA en la población de estudio. *Pág. 38*
- Figura 6.** Gráfico PLS-DA de metabolitos séricos y EHGNA. *Pág. 46*
- Figura 7.** Diferencias en la concentración sérica de metabolitos entre grupos de la EHGNA. *Pág. 42*
- Figura 8.** Gráfico PLS-DA de metabolitos séricos, en grupos con EHNA y DT2. *Pág. 46*
- Figura 9.** Diferencias en la concentración sérica de metabolitos entre sujetos con EHNA y sin EHNA, estratificando por el estatus de DT2. *Pág. 48*
- Figura 10.** Mapas de desequilibrio de ligamiento. a) para las variantes asociadas con los niveles de butirilcarnitina (C4). b) para las variantes asociadas con los niveles de prolina. En los cuadros se indica el valor de r^2 . *Pág. 51*
- Figura 11.** Efecto de la variación genética en los niveles séricos de metabolitos. *Pág. 53*
- Figura 12.** Contenido hepático de lípidos, en función del genotipo de *PRODH*. *Pág. 58*
- Figura 13.** Relación de la expresión hepática de *PRODH* con los niveles séricos de prolina. *Pág. 59*
- Figura 14.** Expresión hepática de *PRODH*. *Pág. 60*
- Figura 15.** Metabolismo de tirosina y su relación con la lipogénesis de novo. *Pág. 64*
- Figura 16.** Estructura y metabolismo de prolina. *Pág. 65*
- Figura 17.** Metabolismo de propionil carnitina y propionil-CoA. *Pág. 68*
- Figura 18.** Efecto de la variante en *ACADS* en los niveles de AC C4. *Pág. 71*
- Figura 19.** Efecto de la variante en *SLC22A1* en los niveles de AC C8:1. *Pág. 72*
- Figura 20.** Localización de la variante Thr275Asn en *POX*. *Pág. 73*

ABREVIATURAS

α -KDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa
α -KG	α -cetoglutarato
AA	Amioácidos
AAA	Aminoácidos aromáticos
AC	Acilcarnitinas
ACADS	acyl-CoA dehydrogenase short chain
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AGL	Ácidos grasos libres
Akt/PKB	Proteína cinasa B
ALT	Alanina aminotransferasa
AM	Aleatorización Mendeliana
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
AST	Aspartato aminotransferasa
AUROC	Área bajo la curva ROC
BCAA	Áminoácidos de cadena ramiicada
BCAT	transaminasa mitocondrial de los aminoácidos de cadena ramificada
BCKA	cetoácidos de cadena ramificada
BCKD	deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada
C-HDL	colesterol contenido en lipoproteínas de alta densidad
CACT	translocasa de carnitinas-acilcarnitinas
CES	células estrelladas hepáticas
CK	células de Kupffer
CPT1	carnitina-O-palmitoil transferasa 1
CPT2	carnitina-O-palmitoil transferasa 2
DT2	Diabetes tipo 2
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ES	Esteatosis simple
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GA	Glutaminasa
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GSH	Glutación
HFD	Dieta alta en grasa
HIF-1 α	factor inducible por hipoxia 1 α
IGF-I	Factor de crecimiento I tipo insulina
IL-1 β	interleucina 1 beta
IMC	Índice de Masa corporal
LDN	lipogénesis de novo
LPS	lipopolisacáridos
MEC	Matriz extracelular
mQTLs	loci de rasgos metabólicos cuantitativos
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NAS	Sistema de puntaje de actividad del HGNA
OCT1	Transportador de cationes orgánicos 1
P5C	1-Pirrolina 5-carboxilato

P5CR	1-Pirrolina 5-carboxilato Reductasa
PDH	piruvato deshidrogenasa
POX	Prolina oxidasa
PRODH	Prolina deshidrogenasa
RE	Retículo endoplásmico
RI	Resistencia a insulina
ROC	receiver operating characteristic
ROS	especies reactivas de oxígeno
SCAD	deshidrogenasa de acil-CoA de cadena corta
SLC22A1	Solute Carrier Family 22 Member 1
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SREBP1c	Proteína de unión 1 al elemento regulador de esteroides
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TG	Triglicéridos
TNF α	factor de necrosis tumoral α
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es altamente prevalente en la población mexicana, y comprende la acumulación de lípidos en los hepatocitos (esteatosis) y el desarrollo de procesos inflamatorios y de daño hepatocelular (esteatohepatitis). La obesidad y la resistencia a insulina son los principales factores de riesgo para el desarrollo de la EHGNA. Además, los pacientes con EHGNA presentan anomalías en el metabolismo de aminoácidos (AA) y acilcarnitinas (AC). La modulación en los niveles de estos metabolitos se debe, en parte, a variantes en genes que participan en su metabolismo. La identificación de estas variantes genéticas podría ser útil como una aproximación para evaluar si estos metabolitos contribuyen causalmente al desarrollo de la EHGNA. Por ello, el objetivo de este estudio fue Identificar metabolitos (AA y AC) circulantes asociados con la EHGNA, así como variantes genéticas relacionadas con los cambios en la concentración de estos metabolitos. El estudio consistió de tres etapas: En la primera se cuantificaron AA y AC en sueros de 431 individuos mexicanos con obesidad y se evaluó su relación con la EHGNA. En la segunda etapa se realizó un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) para identificar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con los niveles de los metabolitos relacionados con la EHGNA y finalmente, se evaluó si los SNPs identificados se asociaban con los rasgos histológicos de la EHGNA o con un mayor riesgo de esteatohepatitis. Los resultados mostraron que los niveles circulantes de los aminoácidos Ala ($r=0.15$, $p=0.02$), Tyr ($r=0.25$, $p=1.9 \times 10^{-05}$), Pro ($r=0.19$, $p=2.2 \times 10^{-03}$), y Met ($r=0.16$, $p=0.01$); así como las acilcarnitinas C3 ($r=0.20$, $p=9.0 \times 10^{-04}$), C4 ($r=0.17$, $p=0.01$) y C8:1 ($r=0.24$, $p=8.9 \times 10^{-05}$) correlacionaron positivamente con mayor grado de esteatosis hepática y otros rasgos histológicos de la EHGNA. El escrutinio del genoma completo presentó asociación de cinco variantes genéticas con algunos metabolitos: rs5747933 en el gen *PRODH* con prolina ($b=0.76$, $p=5.6 \times 10^{-14}$), rs2066938 en el gen *UNC119B* con C4 ($b=0.18$, $p=2.7 \times 10^{-20}$), rs1168067 en el gen *CABP1* con C4 ($b=-0.12$, $p=3.5 \times 10^{-11}$), rs1799958 en el gen *ACADS* con C4, ($b=0.20$, $p=4.5 \times 10^{-25}$) y rs62440901 en el gen *SLC22A1* con C8:1 ($b=-0.11$, $p=7.4 \times 10^{-08}$). De estas variantes, únicamente rs5747933 en *PRODH* se asoció con un mayor riesgo de EHNA (OR=2.96, IC 95% = 1.57 – 5.56) y con los rasgos histológicos de la EHGNA [grado de esteatosis ($b=0.30$, $p=0.02$), inflamación lobular ($b=0.33$, $p=2.4 \times 10^{-03}$), balonamiento hepatocelular ($b=0.23$, $p=0.02$) y puntaje de actividad del HGNA ($b=0.85$, $p=9.6 \times 10^{-04}$)]. Los portadores de la variante rs5747933 en *PRODH* mostraron un mayor contenido hepático de lípidos ($p<0.05$). Además, el análisis de aleatorización mendeliana presentó una asociación positiva de *PRODH* con el puntaje de actividad del HGNA ($\beta \hat{X}Y=0.037$, $p=0.002$), sugiriendo que los niveles elevados de prolina pueden estar implicados

en el desarrollo de la EHGNA. En conclusión, los resultados de este estudio muestran que mayores niveles circulantes de alanina, tirosina, prolina y metionina, y las AC C3, C4 y C8:1 se asocian con la EHGNA. Además, el análisis de aleatorización mendeliana sugiere que niveles elevados de prolina participan en el desarrollo de la EHGNA. Es necesario realizar estudios funcionales del gen *PRODH* para corroborar su participación en esta patología.

I. ANTECEDENTES

1. Definición de la enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se define como la acumulación de grasa en el hígado mayor a un 5% del peso total del hígado y del total de hepatocitos (Goh, 2006), que no es atribuible al consumo significativo de alcohol (<20g/día) u otros fármacos (Liu, 2016). La EHGNA comprende una serie de manifestaciones histopatológicas que van desde la simple acumulación de lípidos en los hepatocitos, denominada esteatosis simple, hasta etapas más severas de la enfermedad como la presencia de inflamación lobular y el daño hepatocelular, clasificados en conjunto como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Brown, 2016).

2. Fisiopatología de la EHGNA

La EHGNA comprende la interacción de múltiples factores como son los genéticos, epigenéticos, ambientales, y metabólicos. Aun cuando los mecanismos moleculares que conducen a la EHGNA no se han dilucidado en su totalidad, la “hipótesis de las dos agresiones” es la teoría más aceptada para explicar su patogénesis (Day, 1998). Esta teoría propone la necesidad de una primera agresión para la acumulación hepática de lípidos, proceso conocido como esteatosis simple. La primera agresión sensibilizaría al hígado ante la aparición de una segunda agresión, la cual conduciría a la activación de procesos inflamatorios y de daño hepatocelular, proceso conocido como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

2.1 La hipótesis de “las dos agresiones”

Primera agresión: Acumulación hepática de lípidos (esteatosis hepática)

La primera agresión conduce al establecimiento de esteatosis hepática, la cual se caracteriza por una acumulación hepática de lípidos mayor al 5% del peso total del hígado. Esta agresión está ocasionada principalmente por el aumento en la captación hepática de lípidos desde la circulación (Figura 1). El incremento de ácidos grasos libres (AGL) en la circulación se debe, en gran medida, a una mayor actividad lipolítica del tejido adiposo (Tilg, 2010; Than, 2015), efecto comúnmente ocasionado por la resistencia a insulina (RI) (Reccia, 2017). Es por ello que la RI se considera como un factor de riesgo para el desarrollo de esteatosis hepática. El consumo de dietas hipercalóricas también contribuye a una mayor cantidad de AGL en la circulación. Por

otra parte, el establecimiento de esteatosis hepática también es ocasionado por una menor remoción de lípidos del hígado, así como por una mayor síntesis hepática de AGL (lipogénesis de novo, LDN) (Than, 2015; Reccia, 2017). Cabe mencionar que la evidencia apunta a que los AGL provenientes del tejido adiposo y de la dieta contribuyen en mayor medida al establecimiento de la primera agresión que aquellos producidos por la LDN (Tilg, 2010).

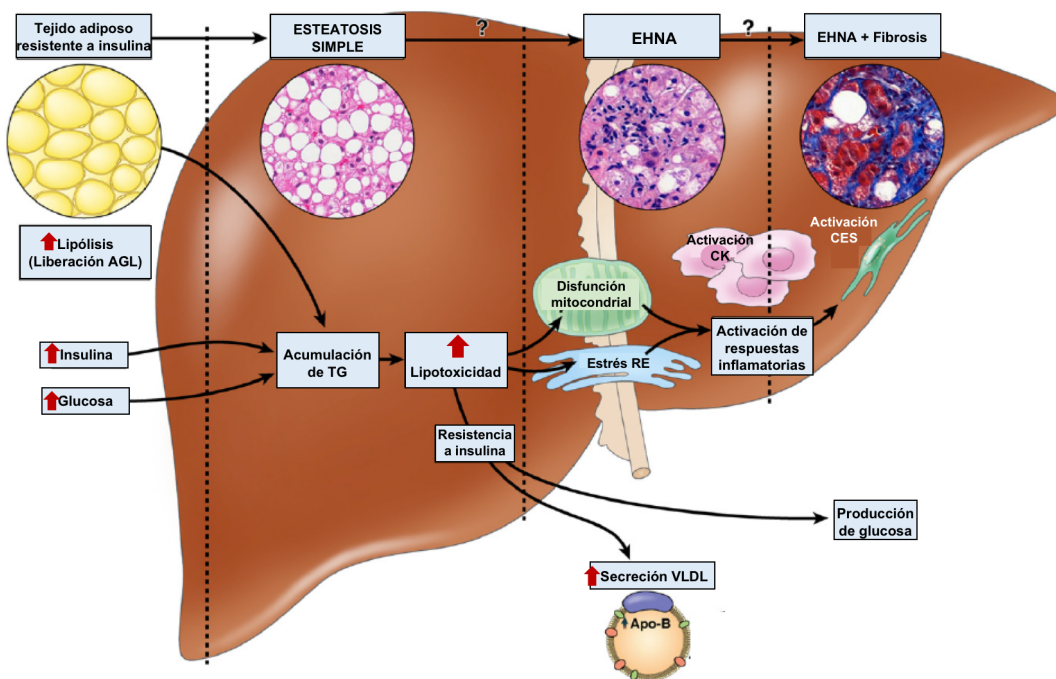


Figura 1. Esquema de la fisiopatología de la EHGNA, de acuerdo a la hipótesis de las dos agresiones. Modificada de Cusi, 2012. Abreviaturas: AGL, ácidos grasos libres. TG, triglicéridos. RE, retículo endoplásmico. CK, células de Kupffer. CES, células estrelladas hepáticas. VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. EHNA, Esteatohepatitis no alcohólica.

Segunda agresión: Progresión a procesos inflamatorios (esteatohepatitis no alcohólica)

De acuerdo a la hipótesis de las dos agresiones, el exceso de lípidos hepáticos acumulados ocasiona que el hígado sea más vulnerable a la acción de una segunda agresión, la cual implica una serie de procesos moleculares tales como la peroxidación lipídica, la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidante, eventos que en su conjunto pueden desembocar en el daño de los hepatocitos y el desarrollo de procesos inflamatorios, etapa conocida como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Cusi, 2012; Than, 2015) (Figura 1).

Diversos estudios sugieren que cuando existe una acumulación exacerbada de lípidos en el hígado, se favorece la activación de las células de Kupffer (CK), que son los macrófagos

residentes en el tejido hepático (Lanthier, 2015). La activación de las CK está vinculada con la producción de moléculas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y la interleucina 1 beta ($IL-1\beta$), por lo que su activación sería un factor importante la progresión a EHNA (Reid, 2016). Además de las CK, otras células que son activadas en la segunda agresión son las células estrelladas hepáticas (CES). Éstas son sintetizadoras de colágena, por lo que su activación se vincula con el desarrollo de lesiones fibróticas (Byrne, 2015). Debido a que en la esteatosis hepática incrementa la cantidad de lípidos que ingresan a la mitocondria para su oxidación, la capacidad de oxidación lipídica de la mitocondria es rebasada, lo que conduce a la disfunción mitocondrial, a la consecuente generación de metabolitos tóxicos derivados de los lípidos y a la sobreproducción de ROS (Adams, 2010; Cusi, 2009). Cuando las ROS producidas exceden los sistemas antioxidantes propios de los hepatocitos se establece el estrés oxidante la célula, evento característico de la presencia de EHNA y que conduce al daño hepatocelular (Reccia, 2017).

2.2 Hipótesis de las “múltiples agresiones”

Estudios recientes han argumentado que la etiopatogenia del HGNA es más compleja que la simple manifestación de “dos agresiones” consecutivas, pues la evidencia apunta que se requiere la participación de diversos factores que actúen en conjunto y de manera sinérgica para el desarrollo y progresión de esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica (Buzzetti, 2016; Tilg, 2010). De manera reciente, la microbiota intestinal se ha propuesto como un factor importante en el desarrollo de la EHNA. Modificaciones en la microbiota intestinal pueden perturbar la permeabilidad de la mucosa intestinal y permitir el ingreso de endotoxinas bacterianas como los lipopolisacáridos (LPS) (Buzzetti, 2016).

3. Factores de riesgo y epidemiología de la EHNA

3.1 El síndrome metabólico

El hígado graso no alcohólico se considera como la manifestación hepática del síndrome metabólico, dado que la acumulación hepática de lípidos se correlaciona positivamente con las siguientes características: altos niveles de glucosa en ayuno (hiperglicemia), altos niveles de triglicéridos en circulación (hipertrigliceridemia), bajos niveles de colesterol contenido en lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), aumento en la circunferencia de cintura y elevación en la presión arterial padecimiento (Yu, 2013; Asrih, 2015; Haas, 2016).

3.2 La presencia de obesidad

La presencia de obesidad ha sido señalada como el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EHGNA. Estudios epidemiológicos han mostrado que la EHGNA está presente en alrededor del 7 al 16% de personas normopeso ($IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$) (Milić, 2014). Este porcentaje incrementa notablemente en presencia de algún grado de obesidad, siendo que más del 70% de los sujetos con obesidad ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) presentan alguna etapa de la EHGNA (Than, 2015; Williams, 2011). En individuos con obesidad mórbida ($IMC \geq 40 \text{ Kg/m}^2$), la presencia de la EHGNA es incluso aún más alta (90%), constituyendo a este grupo como el más vulnerable a padecer esta enfermedad. Además, se ha estimado que el porcentaje de sujetos que progresan de esteatosis simple a EHNA es de entre un 10 y un 30% (Levene, 2012; Younossi, 2018). En presencia de obesidad mórbida, este porcentaje puede ser de hasta un 60%, particularmente en poblaciones hispanoamericanas (Machado, 2006; Yu, 2013). Estudios realizados en población mexicana han señalado que la frecuencia de la EHGNA es de entre un 17% y un 40% en población abierta (Cantoral, 2019; Juárez Hernández, 2018; Moreno-del Castillo, 2018; Lizardi-Cervera, 2006). Aún más, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (Hernández-Ávila, 2016), la prevalencia de obesidad en la población mexicana es $>70\%$, colocando así a esta población en un alto riesgo de presentar EHGNA y sus complicaciones (Younossi, 2018).

3.3 Diabetes tipo 2 y la EHGNA

La EHGNA está estrechamente relacionada con la presencia de diabetes tipo 2 (DT2), siendo la resistencia a insulina la principal alteración metabólica en que ambas patologías convergen, en la mayoría de los casos (Tilg, 2017). Aproximadamente, un 22% de pacientes con EHGNA presentan DT2 y este porcentaje es aún mayor en individuos con EHNA (44%) (Younossi, 2016). Estudios epidemiológicos han mostrado que, con frecuencia, la EHGNA precede al desarrollo de DT2. Se estima que los sujetos con esteatosis hepática manifiestan un riesgo dos a cuatro veces mayor de desarrollar DT2 que aquellos sin esteatosis hepática, y que alrededor de un 58% de los sujetos con EHGNA desarrollarán DT2 años después (Lalluka, 2016; Armstrong, 2014; Anstee, 2013). Aún más, estudios han mostrado que los defectos en la regulación del metabolismo lipídico que conducen a la EHGNA, se establecen previamente al desarrollo de hiperglicemia y de DT2 (Anderson, 2014), por lo que la EHGNA constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de DT2.

Por otra parte, aún cuando la evaluación histológica basal muestre esteatosis simple en ausencia de daño hepatocelular, aquellos sujetos que presentan ambas patologías, EHGNA y DT2, tienen un mayor riesgo de progresar a la etapa más severa de la EHGNA, EHNA, e incluso evolucionar al desarrollo de fibrosis hepática, una etapa donde ocurre la deposición hepática excesiva de proteínas de la matriz extracelular (MEC), principalmente colágena (Bataller, 2005) y que puede conducir a estados patológicos irreversibles como cirrosis y hepatocarcinoma celular (Anstee, 2013). Estudios han mostrado que los pacientes con DT2 progresan a EHNA en proporciones de hasta 80%, y a fibrosis hepática en porcentajes de entre 30 y 40% (Goh, 2014; Bazick, 2015), por encima del 10% de progresión a EHNA reportado en pacientes con EHGNA, pero sin DT2. La alta prevalencia de EHNA en pacientes con DT2 posee una gran relevancia clínica, pues es la presencia de EHNA el fenotipo que se asocia con un mayor riesgo de complicaciones patológicas. Incluso, se predice que en los siguientes años, EHNA se convierta en la causa principal de transplante de hígado en muchos países (Wree, 2013).

Además de la resistencia a insulina, otras alteraciones metabólicas conducen al desarrollo de EHNA en pacientes con EHGNA y DT2; sin embargo, los aspectos moleculares de estas alteraciones aún no se conocen en su totalidad, por lo que identificar qué otras alteraciones metabólicas tienen lugar al presentarse ambas patologías, es crucial para identificar a aquellos sujetos con alto riesgo de desarrollar EHNA y/o fibrosis.

4. Métodos de diagnóstico para la EHGNA

En algunos casos, la presencia de la EHGNA está acompañada de una elevación moderada en la circulación de las transaminasas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). La cuantificación sérica de ambas enzimas ha sido empleada clínicamente como un indicador de daño hepático, presente no solo en la EHGNA sino en otras patologías hepática (Sattar, 2014). Asimismo, se ha estimado que hasta un 80% de sujetos con EHGNA presentan niveles normales de estas enzimas, imposibilitando su uso como marcadores de diagnóstico preciso de la EHGNA (Rinella, 2015; Voiculescu, 2014). Por ello, se han buscado otras estrategias para identificar la presencia de la EHGNA, como es la ultrasonografía, la cual puede detectar la presencia de esteatosis hepática, ya que las vesículas lipídicas le confieren un aspecto “brillante” al hígado (Ballestri, 2017). Sin embargo, la presencia de células inflamatorias y daño hepatocelular, características de EHNA, no pueden ser observadas a través de este procedimiento (Hannah, 2016). Con este fin se ha buscado desarrollar métodos diagnósticos para la identificación de EHNA, tales como la medición sérica de marcadores de inflamación, como IL-6 o $TNF\alpha$; así como de daño celular, como la citoqueratina 18 (Wong,

2018). Sin embargo, debido a la falta de especificidad de estos métodos, el diagnóstico de certeza para la EHGNA sigue siendo la evaluación histológica en una biopsia hepática.

4.1 Evaluación histológica

Para facilitar el diagnóstico histológico, Kleiner y cols. desarrollaron el sistema de puntaje de actividad del HGNA, el cual evalúa los tres aspectos histopatológicos más relevantes: el porcentaje de esteatosis, el grado de inflamación y la presencia de balonamiento hepatocelular (Kleiner, 2005). La esteatosis hepática es la característica central de la EHGNA, por lo que identificar vacuolas lipídicas en más del 5% de los hepatocitos define la presencia de la EHGNA (Brown, 2016). La infiltración de células inflamatorias (inflamación intralobular) es la principal característica de EHNA (Takahasi, 2014). Además, el daño hepatocelular que ocurre en la EHNA ocasiona alteraciones en los filamentos intermedios del citoesqueleto, alterando así la morfología del hepatocito y confiriéndole un aspecto 'hinchado'. Este proceso se denomina balonamiento hepatocelular y está asociado con un mayor riesgo de progresión a fibrosis (Matteoni, 1999). El sistema de puntaje de actividad del HGNA (NAS, por sus siglas en inglés) considera la suma de estos tres aspectos histológicos, de tal forma que puede adquirir valores de 0 a 8. Con base en esta clasificación, las etapas de la EHGNA son: ausencia de HGNA (Score = 0), esteatosis simple (Score 1-2, sin inflamación lobular), Esteatohepatitis no alcohólica limítrofe (EHNA-L) (Score 3-4) y Esteatohepatitis no alcohólica (Score ≥ 5) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación histológica de la EHGNA, de acuerdo al sistema de puntaje de actividad del hígado graso no alcohólico (NAS)

Grado	Esteatosis	Inflamación lobular	Balonamiento hepatocelular
0	<5	0	Ausente
1	5-33	<2	Poco
2	34-67	2-4	Abundante
3	>67	>4	-
Puntaje máximo	3	3	2

Características evaluadas en cada rubro: esteatosis, % de grasa hepática. Inflamación lobular, Focos de inflamación en zona lobular / 20x en campo óptico. Balonamiento hepatocelular, presencia o ausencia.

4.2 Biomarcadores clínicos

Debido a que las mediciones bioquímicas implementadas hasta la fecha son inespecíficas del EHGNA, a que la ultrasonografía no permite identificar la presencia de EHNA, y a que la toma de una biopsia hepática es un procedimiento altamente invasivo, en los últimos años se han

realizado esfuerzos para la identificación de marcadores biológicos (biomarcadores) específicos de la EHGNA, que permitan diferenciar la presencia de esteatosis hepática y de EHNA, que puedan ser obtenidos a través de métodos con mínima invasividad y que además sean reproducibles (Alkhoury, 2016).

Para determinar si un biomarcador es específico de la EHGNA, se toma en cuenta la sensibilidad y la especificidad de la medición, tomando como referencia el método diagnóstico de certeza, esto es, la evaluación histológica. Estos indicadores se grafican en una curva ROC (receiver operating characteristic) y el cálculo del área bajo la curva ROC (AUROC) se considera un valor preciso de la utilidad de un biomarcador en la detección de la EHGNA. El valor de AUROC puede adquirir valores de 0 a 1, siendo ≥ 0.9 el valor esperado para un biomarcador preciso de la EHGNA. Los biomarcadores identificados hasta la fecha para el diagnóstico de la EHGNA tienen una baja sensibilidad y capacidad de detección de la EHGNA (AUROC < 0.8), por lo que no permiten discriminar entre los distintos grados de esteatosis hepática y tampoco son específicos para la presencia de EHNA (Wong, 2018). Por lo tanto, aún son necesarios más estudios para identificar nuevos biomarcadores, específicos de la EHGNA y que permitan la detección de inflamación y balonamiento hepatocelular.

Por otra parte, además de la identificación de EHNA en tiempo basal, se han buscado desarrollar modelos para predecir el desarrollo de EHNA y fibrosis en pacientes con alto riesgo de desarrollarla, como son los pacientes con EHGNA y DT2 en conjunto (Bazick, 2015). Estos modelos manifiestan una buena especificidad (90%) pero baja sensibilidad (50%), además de que incorporan los resultados obtenidos por métodos sumamente invasivos (la toma de biopsias hepáticas en tiempo basal), por lo que aún es necesaria la búsqueda de biomarcadores que puedan relacionarse con el riesgo de progresión de esteatosis simple a EHNA en pacientes con DT2. Para ello, es de suma importancia identificar aquellas moléculas en circulación cuyas concentraciones estén diferenciadas entre pacientes con EHGNA + DT2 y pacientes con EHGNA pero sin DT2.

5. Alteraciones metabólicas en la EHGNA

La identificación de marcadores biológicos específicos de esteatosis hepática y EHNA no solo es útil con fines de diagnóstico y predicción, sino que además puede proporcionar información valiosa acerca de las alteraciones metabólicas que pueden estar ocurriendo durante la EHGNA. Los mecanismos moleculares causantes tales alteraciones metabólicas involucran modificaciones en la expresión y/o actividad de enzimas y transportadores participantes en rutas

metabólicas específicas. En consecuencia, existen cambios en los niveles de metabolitos participantes en estas rutas metabólicas (aumento o disminución), lo cual proporciona una medida indirecta de las alteraciones en estas vías metabólicas (Camps, 2016). Una estrategia valiosa para identificar los cambios en los niveles de metabolitos es la metabolómica, que es la identificación del conjunto de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (<1.5 kDa), presentes en un sistema biológico y que forman parte de los procesos metabólicos llevados a cabo en la célula (Abu-Bakar, 2015). Dado que el hígado participa en la regulación de diversos procesos bioquímicos a nivel sistémico, la identificación de metabolitos diferenciados en la EHGNA puede contribuir a un mejor entendimiento de las alteraciones bioquímicas que estarían teniendo lugar durante esta patología.

5.1 Alteraciones en el metabolismo de lípidos

Debido a que en la EHGNA existe un alto ingreso de AGL al hígado, la capacidad metabólica mitocondrial es rebasada por la sobrecarga de lípidos presentes para ser oxidados (Liu, 2010; Cusi, 2012). En consecuencia, intermediarios de la oxidación lipídica pueden acumularse dentro la mitocondria, salir al espacio citosólico y, finalmente, a sitios extracelulares, constituyendo de esta forma posibles biomarcadores del metabolismo oxidante mitocondrial (Patterson, 2016).

5.1.1 Síntesis y transporte de acilcarnitinas

Para que la β -oxidación se lleve a cabo, los AGL deben ser transportados a través de la membrana celular e ingresar a la matriz mitocondrial. Debido a que la membrana mitocondrial es impermeable al paso de moléculas acil-CoA (Figura 2), los ácidos grasos deben ser esterificados con moléculas de carnitina para formar las acilcarnitinas (AC) (Figura 2), las cuales pueden ser transportadas a través de la membrana mitocondrial (Figura 2). La conversión de moléculas acil-CoA a acilcarnitinas es catalizada por la enzima carnitina-O-palmitoil transferasa 1 (CPT1), que se ubica en la membrana externa mitocondrial (McCoin, 2015). Una vez generadas, las AC son ingresadas a la matriz mitocondrial a través de la translocasa de carnitinas-acilcarnitinas (CACT), que está ubicada en el espacio intermembranal de la mitocondria (Schooneman, 2013). Finalmente, una vez localizadas en la matriz mitocondrial, las AC son reconvertidas a moléculas de carnitina libre y acil-CoA por acción de la enzima carnitina-O-palmitoil transferasa 2 (CPT2) (McCoin, 2015).

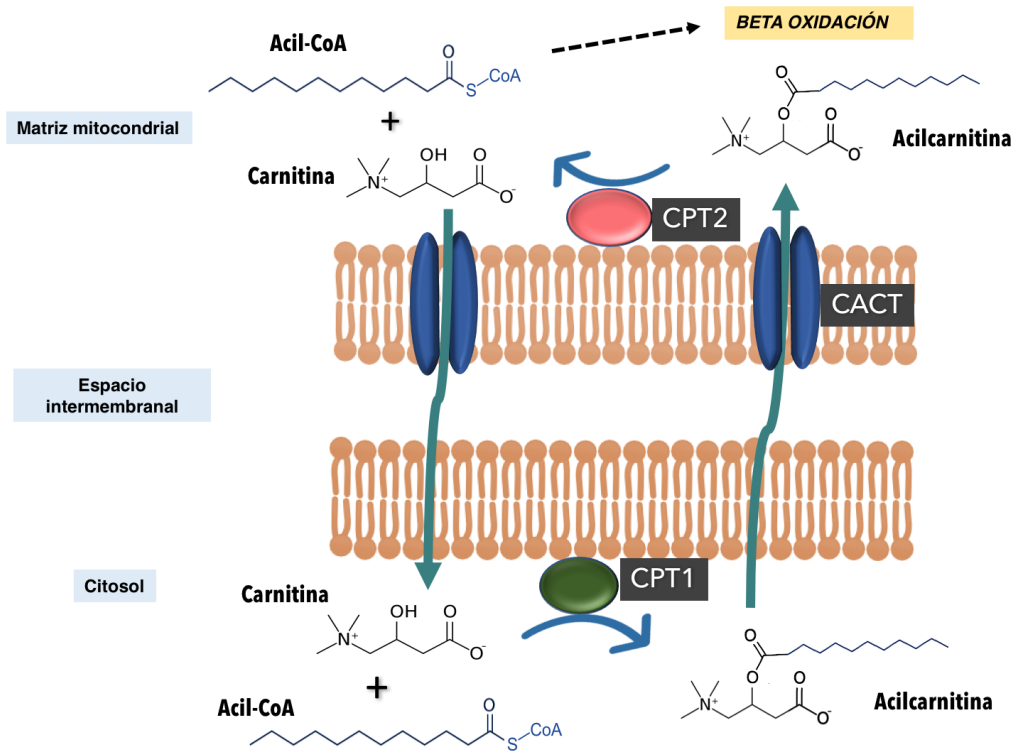


Figura 2. Transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria a través de la síntesis de acilcarnitinas. Modificada de Lehninger, 2008. Se presenta el ejemplo del ingreso del ácido láurico (C12). Abreviaturas: CPT1, carnitina-O-palmitoil transferasa 1. CPT2, carnitina-O-palmitoil transferasa 2. CACT, translocasa de carnitinas-acilcarnitinas.

Tanto CACT como CPT2 llevan a cabo pasos reversibles del transporte de las AC, por lo que, bajo ciertas condiciones cuando los ácidos grasos no son metabolizados eficientemente, estos pueden acumularse en el interior de la mitocondria y promover su reconversión a sus respectivas AC, la cuales saldrían al citosol y, en última instancia, al exterior de la célula (Noland, 2009).

Se ha identificado que las acilcarnitinas son exportadas al exterior de la célula por procesos de difusión facilitada a través de las familias de transportadores de solutos orgánicos, SLC16 y SLC22 (McCoin, 2015). En este sentido, existe evidencia de que los niveles de acilcarnitinas en circulación correlacionan con su concentración intracelular, principalmente de los tejidos muscular y hepático (Bell, 1982; Pochini, 2004; Alves, 2011). Como consecuencia, los niveles de acilcarnitinas en circulación funcionan como biomarcadores de alteraciones en la oxidación de ácidos grasos. Incluso, su medición se ha implementado como estudios de rutina para la identificación de ciertos errores innatos del metabolismo (Rinaldo, 2008), en donde una o más enzimas participantes en la oxidación y/o transporte de ácidos grasos está alterada, tendiendo

como consecuencia la acumulación de acilcarnitinas. Debido a que el hígado es el principal contribuidor a la oxidación de ácidos grasos en estados de ayuno, la medición de las acilcarnitinas refleja principalmente la función hepática en el metabolismo lipídico (McCoin, 2015).

5.1.2 Relación de las acilcarnitinas con la EHGNA

Se ha reportado que en pacientes con EHGNA existen niveles mayores de AC, tanto en el tejido hepático como en la circulación, en comparación con individuos sin EHGNA (Kalhan, 2011; Lake, 2015). A nivel molecular, las AC podrían estar ejerciendo el desarrollo de estrés oxidante y la activación de respuestas inflamatorias en el hígado, razón por la que las AC son consideradas moléculas 'lipotóxicas'. Existe evidencia de que las moléculas lipotóxicas afectan la señalización de insulina, lo que constituye un factor de riesgo principal en la etiopatogenia de la EHGNA (Schooneman, 2013).

Las AC se clasifican de acuerdo a la longitud de su cadena carbonada: Cuando poseen de 2 a 5 carbonos en su cadena, se clasifican como AC de cadena corta. Cuando poseen de 6 a 12 carbonos en su cadena, se denominan como AC de cadena media. Cuando presentan ≥ 14 carbonos en su cadena, se clasifican como AC de cadena larga (Tabla suplementaria 1) (Rinaldo, 2008). En general, las AC de cadena media y larga son productos del metabolismo de los ácidos grasos, mientras que las de cadena corta lo son del metabolismo de aminoácidos.

Se ha reportado que pacientes con esteatosis hepática presentan mayores niveles hepáticos y en circulación de AC de cadena media y larga que los sujetos sin esteatosis (Kalhan, 2011; Lake, 2015). Algunas AC tales como octanoil carnitina (C8), lauril carnitina (C12), palmitoil carnitina (C16) y estearoil carnitina (C18) han sido asociadas no solo con la acumulación hepática de lípidos, sino también con la progresión a EHNA, la etapa más severa de la EHGNA, tanto en modelos murinos como en humanos (Han, 2017; Lake, 2015). La participación de las acilcarnitinas como posibles agentes inflamatorios ha sido descrito recientemente, particularmente para las acilcarnitinas de cadena media y larga (McCoin, 2015). En ensayos *in vitro* realizados en macrófagos de roedores, se observó que la administración de las acilcarnitinas C12 y C14 inducía la activación de NF- κ B, un factor de transcripción con actividad pro-inflamatoria (Adams, 2009). Dado que la activación de NF- κ B, en conjunto con otras moléculas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α , ha sido relacionada con la progresión de esteatosis simple a EHNA (Than, 2015; Buzzetti, 2016), es probable que las AC sean además

de un marcador de una incompleta oxidación de AGL, agentes causales de resistencia a la insulina, acumulación hepática de lípidos y progresión a esteatohepatitis no alcohólica.

Además de las AC de cadena media y larga, algunas AC de cadena corta, tales como propionil carnitina (C3) y α -metilbutiril/isovaleril carnitina (C5), se han relacionado con el desarrollo de resistencia a insulina y la EHGNA (Newgard, 2009; Kalhan, 2011). Estas AC son subproductos del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (Figura 2). La AC C3 resulta de la oxidación de isoleucina y valina, mientras que la AC C5, que comprende las especies α -metilbutiril e isovaleril carnitina, resulta de la oxidación de isoleucina y leucina, respectivamente, (Newgard, 2009). El hecho de que sujetos con EHGNA presenten elevados niveles de C3 y C5 se ha atribuido principalmente a que los niveles de BCAA en estos pacientes son más altos, en comparación con los sujetos sin EHGNA (Kalhan, 2011).

5.2 Alteraciones en el metabolismo de aminoácidos

Además de las AC, estudios de metabolómica conducidos en humanos han identificado que los niveles séricos de ciertos aminoácidos (AA), principalmente los de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés) y los aromáticos (AAA), están incrementados en presencia de la EHGNA (Gaggini, 2018; Lake, 2015; Kalhan, 2011; Iwasa, 2015; Cheng, 2015).

Los AA son las unidades fundamentales que constituyen las proteínas, por lo que su presencia en el organismo es vital para las funciones celulares. Sin embargo, en los últimos años se ha identificado que los aminoácidos también poseen actividad biológica, participando en la regulación de diferentes rutas bioquímicas e interfiriendo en diferentes procesos celulares, que incluyen la señalización de insulina, la activación de respuestas inflamatorias y la función mitocondrial (Sunny, 2015; Lynch, 2014; Mu, 2018).

5.2.1 Aminoácidos de cadena ramificada y su participación en la EHGNA

El aumento de los BCAA (leucina, isoleucina y valina) circulantes se ha relacionado con alteraciones metabólicas como la resistencia a insulina, DT2 e hígado graso no alcohólico (Lynch, 2014). Los BCAA son aminoácidos esenciales que constituyen entre el 15 y el 25% del total de proteínas ingeridas en la dieta (Lu, 2013). El metabolismo de los BCAA comprende dos etapas: en la primera, la transaminasa mitocondrial de los aminoácidos de cadena ramificada (BCATm, por sus siglas en inglés) remueve el grupo amino de los BCAA, formando sus respectivos cetoácidos de cadena ramificada (BCKA, por sus siglas en inglés) (Figura 3). En la

segunda etapa, la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada (BKCD, por sus siglas en inglés) lleva a la producción de moléculas acil-CoA, las cuales dan lugar a la formación de propionil carnitina (C3), isobutiril carnitina (C4), isovaleril carnitina / metilbutiril carnitina (C5) y tigilil carnitina (C5:1) (Figura 3; Adams, 2011). Debido a que forman parte de la misma vía metabólica, las alteraciones en los niveles de los BCAA frecuentemente están acompañadas por alteraciones en los niveles de las AC de cadena corta (Newgard, 2009).

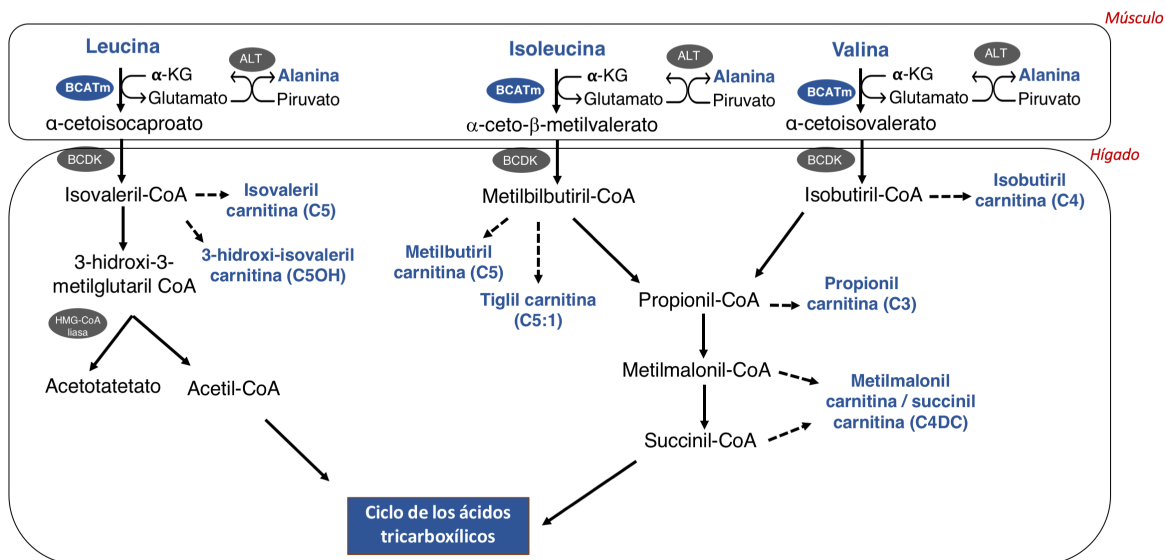


Figura 3. Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. En azul se resaltan aquellos metabolitos cuantificados en el presente estudio. Abreviaturas: BCATm, transaminasa mitocondrial de los aminoácidos de cadena ramificada. BCKD, deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada. α KG, alfa cetoclutarato. ALT, alanina aminotransferasa. HMG-CoA liasa, hidroximetilglutaril-CoA liasa. Referencias: Adams, 2011; Newgard, 2012; Lynch, 2014; Newgard, 2009; Shah, 2012; Schooneman, 2013.

Debido a que los BCAA son abundantes en las proteínas, la presencia de RI, manifestada con frecuencia en la EHGNA, promueve a una mayor liberación de estos AA desde el músculo, esto debido a que la RI incrementa la proteólisis muscular, ocasionando así que los BCAA aumenten en la circulación (Adams, 2011). Por otra parte, estudios de transcriptómica en hígado han identificado que una menor expresión de genes participantes en el catabolismo de los BCAA se asocia con una mayor acumulación hepática de lípidos; además, los sujetos con EHNA presentan una menor expresión de estos genes en comparación con sujetos con esteatosis simple (Lake, 2015). En el mismo sentido, se ha reportado un incremento en los niveles de BCAA acorde con mayores grados histológicos de inflamación y balonamiento hepatocelular (Gaggini, 2018). Aunado a esto, la evidencia en estudios *in vivo* sugiere que el incremento en los niveles de BCAA no solo es una consecuencia de la EHGNA, sino que también podría estar desempeñando un papel causal en el desarrollo de esta patología. Un estudio en modelo murino mostró que la suplementación de BCAA incrementa los niveles de AGL acumulados en los hepatocitos y promueve el daño hepático, esto a través de la señalización por AMPK y mTOR,

ocasionando la activación de la lipólisis del tejido adiposo y la inhibición de la reesterificación de los AGL a triglicéridos en los hepatocitos, respectivamente (Zhang, 2016).

5.2.2 Aminoácidos aromáticos y la EHGNA

Además de los BCAA, estudios de metabolómica han asociado la EHGNA con niveles elevados de los aminoácidos aromáticos (AAA) fenilalanina y tirosina (Kaikkonen, 2017). Se ha reportado que los niveles séricos de tirosina son mayores en pacientes con EHGNA en comparación con sujetos con esteatosis hepática y sujetos sin EHGNA (Kalhan, 2011; Lake, 2015). Además, niveles elevados de tirosina se han relacionado con mayores grados de inflamación lobular, balonamiento hepático y fibrosis (Gaggini, 2018). De manera interesante, un estudio conducido en adolescentes hispanos con EHGNA, diagnosticados por ultrasonografía, reportó que los individuos con esteatosis hepática presentaron mayores niveles séricos de tirosina en comparación con los individuos sin esteatosis hepática (Jin, 2016). Aún más, al llevar a cabo un análisis de rutas metabólicas, se identificó que el metabolismo de tirosina era la ruta más desregulada en presencia de esteatosis hepática, planteando así la posibilidad de que las alteraciones en el metabolismo de tirosina puedan estar íntimamente relacionadas con el desarrollo de la EHGNA. Por lo anterior, la identificación de metabolitos relacionados con la EHGNA es muy útil, no solo con el fin de ser utilizados como biomarcadores clínicos de la enfermedad, sino también como una medición indirecta para detectar alteraciones en rutas metabólicas, las cuales pueden tener como desenlace el desarrollo de la EHGNA. A pesar de esta información, los estudios a nivel metabolómico para la detección de un perfil de riesgo asociado con la EHGNA aún son escasos.

6. Factores que regulan los niveles de metabolitos

6.1 La genética como modulador del metaboloma

Al ser una 'imagen en tiempo real' de lo que está ocurriendo en el organismo, el metaboloma está modulado por factores exógenos, como la dieta, y por factores endógenos, como la genética (Dumas, 2014). La contribución que la genética tiene en la variación observada en los niveles de metabolitos se denomina heredabilidad (Shah, 2009). Los niveles en circulación de AA y AC tienen una alta heredabilidad, siendo de entre un 33% y un 80% para el caso de los AA y de un 23% a un 79% para las AC (Dharuri, 2014; Shah, 2009). En un estudio conducido en >2,000 individuos de origen europeo, se estimó que la contribución de la genética en la variación de los niveles en circulación es mayor para los AA no esenciales que para los

esenciales, esto debido a que los AA no esenciales experimentan reacciones de síntesis y degradación, mientras que los AA esenciales no son sintetizados en el organismo (Rhee, 2013). De manera interesante, Rhee y cols. plantearon la posibilidad de que la contribución de la genética en la modulación de los niveles de metabolitos es incluso mayor que la contribución de variables clínicas como la edad, el sexo y el IMC.

Mediante el uso de herramientas genómicas se pueden identificar variantes genéticas a gran escala, en un amplio número de muestras y en un corto periodo de tiempo. Una de las estrategias más empleadas para la genotipificación de variantes genéticas, esto es, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) es por medio de microarreglos de DNA (Bumgarner, 2013). Una vez conseguida la genotipificación, se llevan a cabo los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés), que consisten en identificar aquellos SNPs que estén asociados significativamente con alguna variable de desenlace, en este caso, los niveles de algún metabolito. Los SNPs asociados significativamente con variación en los niveles séricos de metabolitos se definen como loci de rasgos metabolómicos cuantitativos (mQTLs, por sus siglas en inglés) (Suhre, 2016). La identificación de mQTLs asociados con la EHGA puede proveer información a nivel molecular acerca de la funcionalidad de enzimas y/o transportadores participantes en las rutas metabólicas de los AA y AC.

6.2 Variantes asociadas con aminoácidos y acilcarnitinas

Se han realizados algunos estudios con el fin de identificar mQTLs, los cuales han permitido la localización de diferentes genes asociados a nivel de genoma completo ($p < 10^{-8}$) con la variación en los niveles séricos de AA y AC (Tabla 2), siendo los siguientes loci los que se han replicado con mayor consistencia: *ACADM*, asociado con los niveles de AC de cadena corta y cadena media; *ACADS*, asociado con los niveles de AC de cadena corta; *CPS1*, asociado con los niveles de glicina; *PRODH*, asociado con los niveles de prolina; *SL16A9*, asociado con los niveles de carnitina libre y AC de cadena corta; *SLC16A10*, asociado con los niveles de tirosina y otros AA; *SLC22A1*, asociado con los niveles de AC de cadena corta y cadena media, y *SLC22A4*, asociado con los niveles de AC de cadena corta y media, y valina. Todos estos genes tienen una relación biológica plausible con sus metabolitos asociados, codificando para proteínas relacionadas con su transporte o metabolismo. No obstante, a pesar de la cantidad de estudios conducidos para identificar mQTLs, todos han sido realizados en poblaciones de origen europeo y uno en población asiática, por lo que no existe información disponible acerca del impacto que las variantes identificadas en estos trabajos o variantes no descritas tienen en

los niveles de AA y AC en poblaciones hispanas, en las cuales existe un alto riesgo de desarrollar la EHGNA.

Tabla 2. Estudios de asociación del genoma completo realizados para la identificación de variantes genéticas asociadas con los niveles de aminoácidos y acilcarnitinas circulantes

Estudio	País	n	Genotipificación	Metabólica: muestra, método y metabolitos cuantificados	Genes	SNP	Metabolito	p
Gieger, 2008 Plos Genetics	Alemania	284	Microarreglo: Affymetrix 500K	Suero MS/MS 363 metabolitos	<i>PARK2</i>	rs992037	Lys	1.2E-07
Illig, 2009 Nature Genetics	Alemania y Reino Unido	1,809	Microarreglo: Affymetrix 6.0 e Illumina Hap317K	Suero MS/MS 163 metabolitos	<i>ACADM</i>	rs211718	C12/C10	1.3E-63
					<i>ACADS</i>	rs2014355	C3/C4	5.1E-96
					<i>CPS1</i>	rs2216405	Gly	1.9E-30
					<i>PHGDH</i>	rs541503	Orn/Ser	3.0E-12
					<i>SCD</i>	rs603424	C14/C16:1	1.5E-17
					<i>SLC16A9</i>	rs7094971	C0	3.8E-20
Suhre, 2011 Nature	Alemania y Reino Unido	2,820	Microarreglo: Illumina HumanHap300, HumanHap610Q, 1M-Duo y 1.2MDuo 1M	Suero ULPC/GC - MS/MS 250 metabolitos	<i>SLC22A4</i>	rs272889	Val/C5	7.9E-15
					<i>ACADS</i>	rs2066938	C4/C3	4.4E-305
					<i>CPS1</i>	rs2216405	Gly	1.6E-27
					<i>ETFDH</i>	rs8396	C10	5.5E-15
					<i>PRODH</i>	rs2023634	Prolina	2.0E-22
					<i>SLC16A10</i>	rs7760535	Ile/Tyr	1.4E-12
Kettunen, 2012 Nature Genetics	Finlandia	8,330	Microarreglo	suero 1H-NMR 216 metabolitos	<i>SLC22A1</i>	rs662138	C4/C3	7.3E-25
					<i>SLC22A4</i>	rs272889	C5	7.4E-16
					<i>F12</i>	rs2545801	Phe	8.7E-11
					<i>SLC16A10</i>	rs6900341	Ala/Tyr	3.7E-15
					<i>SLC1A4</i>	rs2160387	Ala/Val	2.6E-22
					<i>TAT</i>	rs4788815	Phe/Tyr	2.6E-14
Rhee, 2013 Cell Metabolism	USA	2,076	Microarreglo: Affymetrix 500K	Plasma LC-MS 217 metabolitos	<i>CPS1</i>	rs7422339	Gly	2.4E-58
					<i>GCKR</i>	rs1260326	Ala	7.6E-12
					<i>PRODH</i>	rs2078743	Pro	2.2E-14
					<i>SLC16A10</i>	rs411604	Tyr	1.0E-08
					<i>SLC16A9</i>	rs1171617	C0	5.9E-26
Yu, 2014 Plos Genetics	USA	1,260	GWAS Affymetrix 6.0 chip	Suero LC/GS - MS 308 metabolitos	<i>SIAE</i>	rs12282107	C2	5.0E-14
					<i>CPS1</i>	rs7422339	Gly	4.0E-12
Shin, 2014 Nature Genetics	Alemania y Reino Unido	7,824	Microarreglo	Plasma o suero LC/GC - MS/MS 529 metabolitos	<i>ABCC1</i>	rs2062541	C6/C8	1.1E-25
					<i>ACADM</i>	rs4949874	C2/C6	2.0E-172
					<i>ACADS</i>	rs2066938	C4	3.16E-630

					<i>ALX3</i>	rs1466788	C0	3.1E-16
					<i>CPS1</i>	rs715	Gly	1.6E-147
					<i>IVD</i>	rs9635324	C3/C5	8.8E-43
					<i>PAH</i>	rs1498694	Phe	7.3E-11
					<i>PEX5L</i>	rs9842133	C0	4.2E-12
					PRODH	rs2540647	Val /Pro	2.0E-70
					<i>SCAPER</i>	rs2404602	C4	3.6E-13
					SLC16A10	rs9400467	Tyr	6.5E-14
					SLC22A1	rs662138	C4	5.0E-49
					SLC22A4	rs272889	Val/C5	2.6E-51
Demirkan, 2015 Plos Genetics	Países bajos	2,842	Microarreglo y Secuenciación de exomas	Suero 1H-NMR 42 metabolitos	<i>2p12 locus</i>	rs11687765	Val	3.5E-08
					CPS1	rs715	Gly	1.3E-32
					PRODH	rs2540641	Pro	1.1E-19
					SLC16A9	rs1171614	C0	4.8E-14
					<i>SLC7A9</i>	rs8056893	Lys	2.1E-08
					<i>ACADL</i>	rs2286963	C9	2.8E-118
					ACADM	rs7552404	C8	1.8E-49
					ACADM	rs7552404	C10	3.0E-34
					ACADM	rs7552404	C10:1	3.5E-35
					<i>C4orf46</i>	rs8396	C8	2.9E-14
<i>C4orf46</i>	rs8396	C10	2.0E-18					
					CPS1	rs16844839	Gly	3.4E-99
					CPS1	rs715	Ser	2.8E-11
					<i>GLS2</i>	rs2657879	Gln	1.9E-14
					<i>HSD17B6</i>	rs12297049	Phe	1.1E-10
Draisma, 2015 Nature Communication	Países bajos, Alemania, Australia, Estonia y Reino Unido	7,478	Microarreglos	Suero MS 163 metabolitos	<i>PHGDH</i>	rs477992	Ser	2.5E-21
					<i>PRODH</i>	rs2238732	Pro	2.9E-39
					PRODH	rs2540641	Pro	2.1E-59
					<i>PSPH</i>	rs4947534	Ser	4.4E-18
					SLC16A10	rs9400467	Tyr	1.7E-10
					SLC16A9	rs1171606	C0	6.1E-30
					SLC16A9	rs1171614	C0	1.5E-81
					SLC16A9	rs1171614	C2	2.3E-15
					SLC16A9	rs1171616	C3	5.6E-10
					SLC22A1	rs662138	C8:1	1.5E-14
					<i>SLC22A16</i>	rs12210538	C18:1	2.2E-11
					<i>SLC22A16</i>	rs12210538	C18:2	5.0E-21
					SLC22A4	rs270602	C2	2.1E-15

						SLC22A4	rs270601	C18:1	8.0E-16
						SLC22A4	rs273914	C18:2	9.3E-23
						SLC22A5	rs6893782	C0	1.3E-17
						THEM4	rs10494270	C9	5.0E-13
Kettunen, 2016 Nature Communications	Finlandia, Holanda, Alemania, Países Bajos	24,925	Microarreglos	Suero o plasma 1H-NMR 123 metabolitos		GCSH	rs10083777	Gly	3.0E-13
						GLDC	rs140348140	Gly	3.7E-40
						HAL	rs7954638	His	7.3E-15
						NDRG2	rs1998848	His	4.9E-10
						SLC38A4	rs4554975	Ala	6.1E-13
						SLC41A3	chr3:125905336:D	Gly	1.1E-09
						ASPG	rs8012505	Asn	1.0E-14
Koshiba, 2016 Scientific Reports	Japón	512	Secuenciación del genoma completo	Plasma 1H-NMR 37 metabolitos		CPS1	rs1047891	Gly	1.0E-50
						PAH	rs118092776	Phe	1.0E-12
						PRODH	rs5747933	Pro	1.0E-14
Rhee, 2016 Nature Communications	USA	2,076	Secuenciación de exomas	Plasma MS 217 metabolitos		PRODH	rs2078743	Pro	2.2E-14
						PRODH	rs5747933	Pro	2.3E-12
Long, 2017 Nature genetics	Reino Unido	2,049	Secuenciación del genoma completo y secuenciación de exomas	Suero UPLC-MS/MS 644 metabolitos		ACADM	rs211723	C10	2.4E-23
						ACADS	rs1799958	C4	4.9E-224
						CPS1	rs1047891	Gly	6.8E-112
						GCDH	rs8012	C5	2.6E-22
						HAL	rs61937878	His	1.6E-18
						PHGDH	rs478093	Ser	1.5E-13
						PRODH	rs2540645	Pro	1.7E-18
						PRODH	rs9604915	Pro	1.5E-11
						SLC22A1	rs662138	C4	9.0E-24
						SLC22A4	rs10075801	C5	7.4E-14

En negritas se resaltan los genes replicados en más de 5 estudios.

Se ha estimado que contribución que la genética tiene en la EHGNA es de entre un 20 y un 50% (Anstee, 2013), siendo más alta para poblaciones hispanoamericanas que para otras poblaciones, como la afroamericana (Sookoian, 2017). Estudios realizados para la identificación de variantes asociadas con la EHGNA han mostrado que existen al menos tres loci independientes asociados con la esteatosis hepática y en general, con el riesgo de la EHGNA: El SNP rs748409 ubicado en el gen *PNPLA3*, el SNP rs58542926 localizado en el gen *TM6SF2* y el SNP rs780094 ubicado en el gen *GCKR*. A pesar de que en diferentes estudios se ha podido replicar la asociación de estas tres señales, el porcentaje de variabilidad que puede ser explicado por estas tres regiones genéticas es de alrededor del 10% (Sookoian, 2017). Por ello, al buscar mQTLs implicados en el desarrollo y/o progresión de la EHGNA, permitiría la identificación de genes novedosos que no se han identificado por medio de estudios de GWAS dirigidos a la EHGNA y que contribuyen a la predisposición genética para el desarrollo de esta patología.

7. Integración genómica-metabólica en el estudio de la EHGNA

Si bien el abordaje metabólico para el estudio de la EHGNA provee información muy valiosa, éste no permite establecer con certeza si los niveles de metabolitos y/o sus rutas metabólicas se modifican como una consecuencia de la EHGNA o si estos cambios tienen un papel causal en el desarrollo de esta patología. Con este fin, una aproximación que se ha desarrollado para evaluar la posible causalidad de metabolitos en una patología es el modelo de Aleatorización Mendeliana (AM) (Holmes, 2017). La AM se basa en la premisa de que las variantes genéticas son heredadas de forma aleatoria durante la meiosis y permanecen invariables a través del tiempo; por ello, no pueden ser modificadas por procesos patológicos u otros eventos. De acuerdo con el modelo de AM, es altamente probable que un metabolito, tal como AA y AC, tenga un papel causal en el desarrollo y/o progresión de la EHGNA si se cumplen los siguientes criterios: 1) que los niveles séricos del metabolito se relacionen con la EHGNA, 2) que existan variantes genéticas que modulen los niveles de estos metabolitos y 3) que estas variantes genéticas se asocien de forma directa con la EHGNA, de manera independiente a factores de confusión relacionados con el fenotipo (Lotta, 2016). Con base en el modelo de AM, la identificación de SNPs asociados con la variación de los niveles de AA y AC relacionados con el EHGNA, sugeriría que estos metabolitos están conduciendo al desarrollo y/o progresión de la EHGNA (Fig. 4).

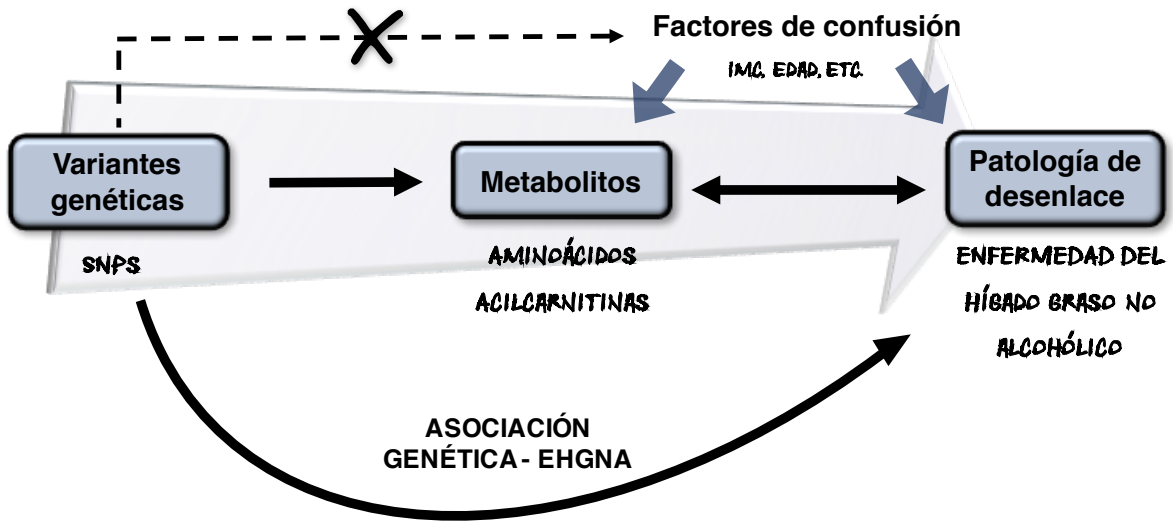


Figura 4. Modelo de Aleatorización Mendeliana propuesto para la identificación de posible causalidad de metabolitos en la EHGNA.

II. JUSTIFICACIÓN

La EHGNA es una patología de alta prevalencia en México y en el mundo. La presencia de obesidad y la resistencia a insulina son los principales factores de riesgo para el desarrollo de la EHGNA y la presencia de DT2 se asocia con un mayor riesgo de progresión de esteatosis simple a esteatohepatitis no alcohólica. Sin embargo, los desórdenes en los procesos metabólicos que suceden en conjunto, en presencia de EHGNA y DT2, y que promueven al mayor riesgo para la progresión a EHNA, aún no se conocen en su totalidad. Existen alteraciones en el metabolismo de lípidos y de aminoácidos durante el desarrollo de esteatosis hepática y la progresión a esteatohepatitis no alcohólica. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en estas alteraciones aún no se han dilucidado por completo. Aún más, no es posible determinar si las alteraciones en los niveles de estos metabolitos suceden como una consecuencia del establecimiento de la EHGNA o si tienen un papel causal en el desarrollo de esta patología. Es por ello que un análisis integrativo que combine la cuantificación de metabolitos en circulación (metabolómica) asociados con la EHGNA y la identificación de variantes genéticas relacionadas con estos metabolitos (genómica), podría permitir: 1) una mayor comprensión a nivel molecular de las alteraciones existentes en el metabolismo de AA y AC presentes en la EHGNA; 2) Identificar si existe una firma metabolómica diferenciada en presencia de DT2 en los pacientes con EHGNA y que se asocie con el riesgo de EHNA; y 3) por medio de la aproximación de aleatorización mendeliana, establecer si la desregulación del metabolismo de AA y AC podría ser un agente causal del desarrollo de la EHGNA.

III. HIPÓTESIS

La concentración circulante de metabolitos (aminoácidos de cadena ramificada, aromáticos y acilcarnitinas) será mayor en presencia de la EHGNA, en comparación con sujetos sin EHGNA. Esta concentración será modulada, en parte, por variantes genéticas que también estarán asociadas con la EHGNA.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Identificar aminoácidos y acilcarnitinas circulantes asociados con la EHGNA (esteatosis y esteatohepatitis), así como variantes genéticas relacionadas con los cambios en la concentración de estos metabolitos.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si existe asociación de la concentración sérica de aminoácidos y acilcarnitinas con la EHGNA y sus rasgos histológicos.
2. Analizar si la presencia de DT2 se asocia con un patrón de metabolitos diferenciado en los pacientes con EHGNA.
3. Identificar las variantes genéticas (SNPs) asociadas con la concentración de los metabolitos relacionados con la EHGNA.
4. Aplicar el Modelo de Aleatorización Mendeliana para determinar la causalidad de los metabolitos en la EHGNA.

V. METODOLOGÍA

1. Población de estudio

Se realizó un estudio de corte transversal, en el que se incluyeron 431 individuos con obesidad sometidos a cirugía bariátrica para la reducción del peso corporal, en el Hospital General “Dr. Rubén Leñero”. Para el ingreso a cirugía bariátrica, los sujetos debían cumplir con las siguientes características: que tuvieran obesidad clase III ($IMC \geq 40 \text{ Kg/m}^2$) u obesidad clase II ($IMC \geq 35 \text{ Kg/m}^2$) con presencia de una o más comorbilidades como DT2, hipertensión arterial, concentración sérica de triglicéridos $\geq 150 \text{ mg/dL}$ o de C-HDL $\leq 50 \text{ mg/dL}$ (DeMaria, 2007).

Los criterios de inclusión para la participación en el estudio fueron los siguientes: que los individuos accedieran a la toma de una muestra de sangre y una biopsia de tejido hepático. Los criterios de exclusión fueron: que reportaran un consumo significativo de alcohol ($\geq 20 \text{ g/día}$) y que padecieran otras enfermedades hepáticas como hepatitis viral. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica y del Hospital General “Dr. Rubén Leñero”.

2. Medición de parámetros antropométricos

La evaluación de los parámetros antropométricos como el peso, la talla, circunferencia de cintura y cadera se realizó conforme a las recomendaciones del manual de referencia de estandarización antropométrica (Lohman, 1988), con equipos que cumplieron con los estándares de calidad internacionales. El IMC se calculó dividiendo el peso corporal entre la talla elevada al cuadrado (Kg/m^2). El grado de obesidad se definió con base en la clasificación establecida por la OMS: Obesidad clase II, $IMC \geq 35 \text{ Kg/m}^2$ y obesidad clase III ($IMC \geq 40 \text{ Kg/m}^2$).

3. Determinaciones bioquímicas

Para las determinaciones bioquímicas, se tomó una muestra de sangre periférica posterior a un ayuno de 8 horas. La muestra se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para separar el suero para las determinaciones bioquímicas. La concentración sérica de glucosa, insulina, hemoglobina glucosilada, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y ácido úrico se midió por métodos estandarizados comercialmente (UNICEL Dxc600, Beckman Coulter CA, USA).

La concentración de glucosa se midió por el método enzimático de glucosa oxidasa. Los niveles de insulina se determinaron mediante inmunoensayos (Access 2 Immunoassay System, Beckman Coulter). El índice HOMA-IR (modelo de evaluación de homeostasis de resistencia a la insulina) se calculó como el producto de los niveles en ayuno de glucosa (mg/dL) e insulina ($\mu\text{U/mL}$), dividido entre 405 (Mathews, 1985). Para la medición del porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c) se emplearon estuches comerciales y métodos estandarizados (Beckman Coulter). La concentración de colesterol total (CT) se determinó por el método enzimático de colesterol esterasa – oxidasa. Los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) se midieron por métodos enzimáticos colorimétricos. A partir de los valores de CT y C-HDL, se calcularon los niveles de colesterol LDL (C-LDL) (Friedwal, 1972). La actividad de las enzimas de funcionamiento hepático, asparto aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT), se evaluó mediante métodos comerciales estandarizados (Beckman Coulter,). La medición de los niveles de leptina y adiponectina se realizó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Linco, MO, USA).

Las determinaciones se llevaron a cabo en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

4. Evaluación histológica

Las biopsias de tejido hepático se obtuvieron al momento de la cirugía bariátrica y se tomaron del lóbulo izquierdo mediante la técnica de resección de cuña con bisturí armónico. Las biopsias se colocaron en tubos con RNAlater (Applied Biosystems, CA, USA) y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Posteriormente, una porción de la biopsia se fijó en formaldehído al 10% y se embebió en parafina, seccionando y tiñéndola con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Para la caracterización histológica de las biopsias hepáticas se empleó el sistema de puntuación semicuantitativo propuesto por Kleiner y cols. (Kleiner, 2005), el cual evalúa tres aspectos histológicos: el grado de esteatosis, los focos de inflamación y la presencia de balonamiento hepatocelular (tabla 1). Con la suma de los rasgos histológicos, se calculó el puntaje de actividad del HGNA (NAS), el cual puede adquirir valores de 0 a 8. Con base en el puntaje NAS, los individuos se clasificaron en los siguientes grupos: sin HGNA (NAS=0), esteatosis simple (NAS=1-2, sin inflamación), EHNA indefinido (NAS=3-4), EHNA (NAS ≥ 5). Las evaluaciones

histológicas se realizaron en colaboración con un patólogo del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ).

La escala de fibrosis se consideró en un rango de 0-4, clasificando a los pacientes en los siguientes grupos: F0, sujetos sin fibrosis; F1, sujetos con fibrosis perisinusoidal o portal; F2, sujetos con fibrosis perisinusoidal y portal/periportal; F3, sujetos con fibrosis en puente; F4, sujetos con cirrosis.

5. Metabolómica dirigida

La medición de la concentración sérica de aminoácidos y acilcarnitinas se llevó a cabo por metabolómica dirigida. Las muestras de suero se colocaron en papeles filtro de 5cm x 5cm (Whatman 903TM, GE Healthcare Bio-Sciences Corp. MA, USA), añadiendo tres alícuotas de 30 μ L por papel filtro. Por separado, se agregaron 5 μ L de cada uno de los sueros para formar una mezcla de muestras, como control interno para las mediciones. Los papeles filtro se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Para su colocación en placas de microtitulación de 96 pozos, se hicieron perforaciones de 3 mm en cada uno de los papeles filtro (DBS Puncher Instrument PerkinElmer).

Para la medición por espectrometría de masas en tándem se empleó un estuche comercial para metabolómica dirigida para aminoácidos y acilcarnitinas (NeoBase Non-derivatized MS/MS Kit, PerkinElmer, Finland). Los viales con los estándares internos de aminoácidos y acilcarnitinas se reconstituyeron con 1 mL de la solución de extracción. En cada placa se colocó por triplicado los controles analíticos de niveles altos y controles analíticos de niveles bajos, proporcionados en el estuche comercial (Whatman, no. 903), así como el control interno de las muestras (mezcla de muestras). Para la preparación de la solución de trabajo se agregaron 100 μ L del estándar interno de aminoácidos, 100 μ L del estándar interno de acilcarnitinas, 275 μ L del estándar interno de succinil acetona y 10.525 mL de la solución de extracción. Esta solución se preparó instantes previos a la medición de cada placa.

Para la extracción y cuantificación de metabolitos, por cada placa se llevó a cabo el siguiente procedimiento: en cada pozo se añadieron 100 μ L de la solución de trabajo y se cubrió con un plástico auto adherente para microplaca. Durante 45 minutos, se incubó a 45°C con una agitación constante de 745 rpm. Posteriormente, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se trasvasaron a placas termo-resistentes con fondo en V y se cubrió con papel aluminio para evitar la evaporación de las muestras. Durante 2 horas, se incubó a temperatura ambiente. Finalmente, la placa se colocó

en un auto-inyector 2777 C Waters auto-sampler (Waters Corp., Milford, MA) y para la inyección de las muestras se empleó una bomba de HPLC (Waters 1525 μ). Las muestras se analizaron por espectrometría de masas en el equipo Micromass Quattro Micro API Tandem Quadropole System (Waters Corp., Milford, MA). El software empleado en el tándem fue MS/MS Quattro Micro® Mass Lynx.

A través de este procedimiento se midió la concentración sérica de 11 aminoácidos y 31 acilcarnitinas. En la tabla suplementaria 1 se muestra la lista completa de aminoácidos y acilcarnitinas cuantificados, así como los estándares internos empleados para la determinación.

5.1 Control de calidad

En el primer paso del control de calidad, todos aquellos metabolitos cuyas concentraciones estuvieran por debajo del límite de detección del equipo en más del 50% de las mediciones se descartaron del análisis. La lista completa de metabolitos excluidos del análisis estadístico se presenta en la tabla suplementaria 1.

En seguida, se realizaron gráficas de Levey-Jennings, empleando los controles analíticos de niveles altos y bajos, y los controles internos. Las muestras que tuvieran valores fuera de los límites de dos desviaciones estándar eran reprocesadas. Se calculó el coeficiente de variación de los controles analíticos y los controles internos localizados en la misma placa (intraplaca) y en diferentes placas (interplaca) para cada uno de los metabolitos analizados, verificando que éste fuera $\leq 30\%$.

6. Cuantificación del contenido hepático de lípidos

En un subgrupo de 110 muestras se extrajo lípidos del tejido hepático por el método propuesto por Folch y cols. (Folch, 1957). Brevemente, 50 mg de tejido hepático se homogenizaron en solución salina (0.9%) y se realizó la extracción por el método cloroformo/metanol en una proporción 2:1. La fase orgánica se evaporó con la inyección de nitrógeno gaseoso. Posteriormente, los lípidos se resuspendieron en isopropanol y Triton X-100 al 10%. La concentración de triglicéridos, colesterol total, colesterol libre y fosfolípidos se determinó por medio de ensayos colorimétricos comerciales (Diagnostic Systems, Holzheim, Bavaria, Germany) y espectrofotometría (Beckham DU 640, CA, USA). Los datos se normalizaron con la concentración de proteína total y se reportan como mg/mg de proteína.

7. Estudio de asociación de genoma completo

7.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 1 mL de sangre periférica, empleando el estuche comercial QIAmp 96 DNA Blood Kit (QIAGEN, MD, USA), que se basa en la extracción por columnas en placas de 96 pozos. La concentración del DNA se determinó por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Para el análisis de pureza, se utilizó el cociente de las absorbancias registradas a 260/280 (presencia de proteínas) y 260/230 (presencia de sales); ambos valores tenían que ser ≥ 1.2 . Para el estudio de asociación de genoma completo (GWAS), se utilizaron 1.5 – 2 μg de DNA genómico para su inclusión en el microarreglo multiétnico de genotipificación (MEGA, por sus siglas en inglés) de la plataforma Illumina, el cual contiene más de 1,600 k SNPs.

7.2 Controles de calidad

Los controles de calidad estándares aplicados a los datos obtenidos del microarreglo fueron los siguientes:

- Eliminación de los SNP con un llamado de variante menor al 95% (aquellos que hubiesen sido genotipificados en menos del 5% de los individuos).
- Eliminación de los SNP con una frecuencia alélica menor al 5% en la población de estudio.
- Exclusión de los SNP que no cumplieran con el equilibrio de Hardy Weinberg ($p < 1 \times 10^{-5}$).

Después del control de calidad, permanecieron un total de 624,242 SNP. A partir de estos, se llevó a cabo la imputación de marcadores, usando el Software Beagle. Posteriormente, aquellos individuos con un llamado de variante $< 5\%$ o con inconsistencias en la identidad genética y el sexo fenotípico registrado, fueron removidos del análisis. Finalmente, 905,392 SNPs se incluyeron en el análisis final de asociación.

7.3 Asociación genómica

El estudio de asociación genómica (GWAS) se realizó en el software Plink v1.07 bajo un modelo aditivo, usando un modelo lineal mixto, que incluyó las variables edad, sexo e IMC como factores fijos del modelo. Dado que en la población de estudio algunos sujetos eran

parientes en primer grado, se consideró la matriz de semejanza genética como una variable de ajuste en el GWAS, utilizando para ello el software GCTA. En el modelo lineal mixto, el genotipo se considera una variable numérica que adquiere valores con base al número de copias del alelo menor, siendo 0 para la ausencia del alelo menor, 1 para una copia del alelo y 2 para dos copias del alelo menor. Se consideró un valor de $p < 5 \times 10^{-8}$ significativo a nivel de genoma completo y de 1×10^{-5} a 5×10^{-8} como sugestivo de asociación. La localización de los SNPs con respecto a los genes de la región se determinó consultando los sitios web dbSNP y ENSEMBLE.

7.4 Réplica de la asociación genómica

Se buscó replicar las señales obtenidas en el GWAS a partir de un nivel de significancia sugestivo ($p < 10^{-6}$). Para ello, se empleó un grupo independiente de sujetos mexicanos con obesidad ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$, $n=245$), para los cuales el criterio de inclusión fue que donaran una muestra de sangre. En este grupo de réplica se cuantificaron los niveles séricos de aminoácidos y acilcarnitinas. Del paquete linfocitario se extrajo el DNA para la genotipificación de variantes genéticas en los microarreglos MEGA y MEGA^{EX}. Una vez obtenidos los valores de asociación en el grupo de réplica, se realizó un meta-análisis conjuntando la población de estudio con el grupo de réplica ($N=676$). El meta-análisis se realizó con el método de varianza inversa en el software METAL (Willer, 2013), considerando un valor de $P < 5 \times 10^{-8}$ como significativo.

8. Modelo de Aleatorización Mendeliana

8.1 Modelo de Estimación de Métodos Causales

El análisis de Aleatorización Mendeliana (AM) se llevó a cabo a través de dos modelos distintos. El primero fue el modelo convencional de AM, denominado Estimación de Métodos Causales (Teumer, 2018), que consiste en lo siguiente: Primero se estima el efecto de una variable instrumental (Z) en una variable de exposición (X), ajustando por variables de confusión relacionadas. Posteriormente, se lleva a cabo la asociación de la variable instrumental (Z) con la variable de desenlace (Y), obteniendo así un efecto causal directo, independiente de variables de confusión. En este caso, la variable instrumental (Z) está representada por las variantes genéticas, la variable de exposición (X) constituye los niveles séricos de metabolitos y la asociación entre ambas está dada por los resultados del GWAS. La variable de desenlace (Y)

está representada por el fenotipo de la EHGNA y sus rasgos histológicos, y las variables de confusión son la edad, el sexo, el IMC y el estatus de DT2.

En la Estimación de Métodos Causales, se llevó a cabo una regresión logística multinomial para evaluar el riesgo de EHGNA y EHNA conferido por la presencia de SNPs asociados con los niveles séricos metabolitos. Para evaluar el riesgo de EHGNA, se comparó el grupo de sujetos sin EHGNA (grupo control) con el grupo de sujetos con EHGNA (esteatosis simple y EHNA). Para evaluar el riesgo de EHNA, se comparó al grupo de sujetos sin EHNA (control y esteatosis simple) con el grupo de sujetos con EHNA. El análisis se ajustó por variables de confusión tales como edad, sexo, IMC, estatus de DT2 y los primeros dos componentes de la matriz de semejanza genética, lo cual permite llevar a cabo la comparación entre individuos emparentados. Adicionalmente se llevó a cabo un análisis de regresión lineal multivariada, para evaluar la relación de SNPs con los rasgos histológicos de la EHGNA. En este análisis, los SNPs se ingresaron como variables continuas, adquiriendo valores de 0, 1 o 2 (siendo 0 para la ausencia del alelo menor, 1 para una copia del alelo y 2 para dos copias del alelo menor), y se consideró la edad, el sexo, el IMC, el estatus de DT2 y los primeros dos componentes de la matriz de semejanza genética como variables de ajuste.

8.2 Modelo de Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos

El segundo modelo empleado para llevar a cabo el análisis de AM fue la Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos (2SLS, por sus siglas en inglés) (Teumer, 2018; Burgess, 2017) que consiste en lo siguiente: en el primer paso, se lleva a cabo una regresión entre la variable instrumental (Z) y la variable de exposición (X), obteniendo así valores ajustados (\hat{X}) que son independientes de otras variables de confusión y que consideran la variación explicada por la variable de instrumental (Z) en la variable de exposición (X). En el segundo paso, se realiza una regresión de la variable de desenlace (Y) en los valores ajustados (\hat{X}), obteniendo así un efecto estimado causal $\beta_{\hat{X}Y}$. En este modelo, la variable instrumental (Z) está representada por las variantes genéticas, la variable de exposición (X) constituye los niveles séricos de metabolitos y, dado que la variable de desenlace (Y) debe ser una variable continua, ésta considera al puntaje de actividad del HGNA (NAS) dentro del modelo.

9. Cuantificación de la expresión génica

En un subgrupo de 151 muestras, se extrajo RNA total de tejido hepático. Una parte de la biopsia hepática se colocó en Trizol (Thermo Fisher Scientific), se homogenizó en un equipo Polytron

PT 2500 E y se llevó a cabo la extracción de RNA por el método cloroformo-isopropanol. Se realizó un tratamiento con DNAsas para la remoción del DNA genómico y con inhibidores de RNAsas (DNasa I recombinant, RNAase-free, Roche). Posteriormente, se llevó a cabo un segundo procedimiento de extracción por el método cloroformo-isopropanol. El RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Los controles de calidad para el RNA obtenido fueron los siguientes: cumplir con las relaciones $260/280$ y $260/230 \geq 1.20$ y observar en un gel de agarosa las bandas correspondientes al RNA ribosomal 18S y 28S, indicando una buena integridad del RNA.

Se emplearon 500 ng de RNA total extraído del tejido hepático para la síntesis de cDNA, utilizando los reactivos del estuche comercial TaqMan Reverse Transcription (Applied Biosystems). Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo la determinación de la expresión relativa del mRNA del gen *PRODH*, utilizando a *HPRT* como gen constitutivo. Los oligos específicos para el ensayo se diseñaron con el software en línea Universal ProbeLibrary System Assay Design (Roche) y fueron los siguientes: *PRODH*-F, 5' – GCGCCATCCTGGACTATG – 3'; *PRODH*-R, 5'- CAGCTGAGGTGCAGGACTC – 3'; *HPRT*-F, 5' – TGACCTTGATTTATTTTGCATACC – 3'; *HPRT*-R, 5' – CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT – 3'. Para la amplificación se usó el reactivo Light Cycler TaqMan Master Real Time PCR y las sondas TaqMan No. 25 y No. 73 de la librería universal de Roche (Roche) para amplificar *PRODH* y *HPRT*, respectivamente. Todos los ensayos de expresión génica se llevaron a cabo en el termociclador LightCycler 480 v2.0 (Roche Applied Science, CA, USA). La expresión de mRNA se calculó en relación a la expresión del gen *HPRT*, empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

10. Análisis estadístico

Se aplicó la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov para determinar si las variables continuas tenían una distribución normal. En caso de no presentar una distribución normal ($P < 0.05$), las variables se transformaron por medio de logaritmo base 10, raíz cuadrada o raíz cúbica, según fuera el caso, para una aproximación a la normalidad.

El análisis discriminante de cuadrados mínimos parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo con las determinaciones metabolómicas como variables cuantitativas explicativas. Como observaciones de desenlace se tomó en cuenta el fenotipo de la EHNA (esteatosis simple, EHNA-L o EHNA) o el estatus de DT2.

La comparación de medias entre grupos se llevó a cabo empleando la prueba t de student para comparar dos grupos y la prueba ANOVA de una vía con prueba post hoc Tukey para

comparación de más de dos grupos. Las variables categóricas se compararon con la prueba chi-cuadrada. Los análisis de correlaciones parciales y regresión lineal se realizaron usando como variables de ajuste la edad, el sexo, el IMC y el estatus de DT2. Los valores de P fueron corregidos empleando el método de las comparaciones múltiples (FDR, False Discovery Rate).

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software estadístico SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics, version 24, Chicago, IL, USA) y en la paquetería de programación en R. Los gráficos se realizaron en el programa GraphPad Prism (San Diego, CA, USA).

VI. RESULTADOS

1. Caracterización de la población de estudio

De los 431 individuos incluidos en la población de estudio, 43 (10%) fueron clasificados como sujetos sin EHGNA (grupo control) y los 388 restantes (90%) se ubicaron en alguna etapa de la EHGNA. De estos, 86 (20%) tuvieron esteatosis simple, 136 (32%) fueron individuos con EHNA indefinido/limítrofe (EHNA-L) y 166 (38%) fueron del grupo de EHNA. En la figura 5 se esquematiza la frecuencia de la EHGNA y sus etapas en los diferentes grupos de estudio.

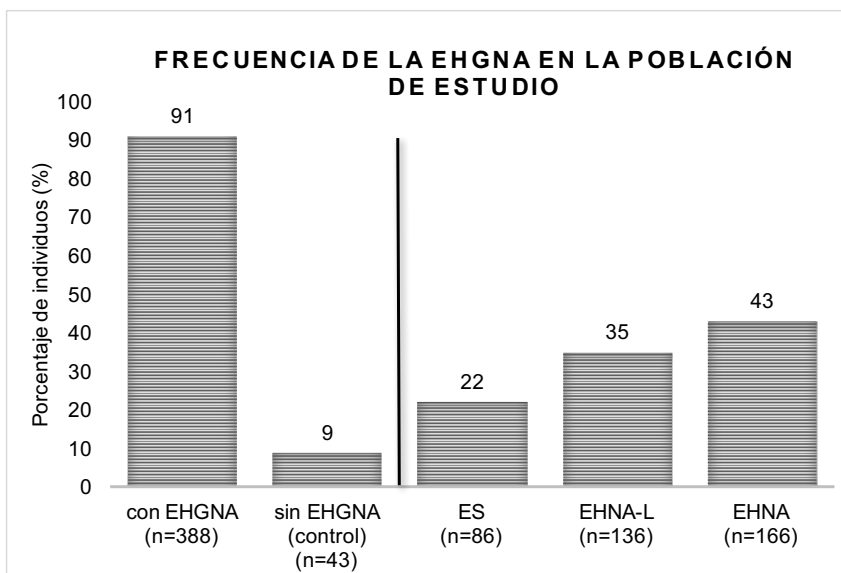


Figura 5. Frecuencia de la EHGNA en la población de estudio. *Izquierda:* Prevalencia de la EHGNA en la población de estudio. *Derecha:* clasificación de la población en función de la severidad de la EHGNA, de acuerdo a la evaluación histológica. Abreviaturas: ES, esteatosis simple. EHNA-L, esteatohepatitis no alcohólica limítrofe. EHNA, esteatohepatitis no alcohólica. Los números arriba de las barras indican el porcentaje de individuos.

El 76% de la población de estudio fueron mujeres. Este porcentaje varió entre los distintos grupos de estudio: 81% en el grupo control; 83% en el grupo con esteatosis simple (ES); 77% en el grupo con EHNA-L y 72% en el grupo con EHNA. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 3).

La mediana del índice de masa corporal (IMC) de los sujetos de estudio fue de 43 Kg/m². A través de los grupos de estudio, el IMC incrementó proporcionalmente a la severidad de la EHGNA: la mediana de IMC en el grupo control fue de 40.4 Kg/m²; en el grupo con ES fue de 41.2 Kg/m²; en el grupo con EHNA-L fue de 42.9 Kg/m² y en el grupo con EHNA fue de 45.2 Kg/m². El IMC de los grupos con EHNA-L y EHNA fue significativamente mayor que el del grupo

control (Tabla 3). La frecuencia de DT2 en la población de estudio fue del 30% y fue significativamente diferente entre los distintos grupos de estudio. De los sujetos del grupo control, 6 (14%) fueron diabéticos; en el grupo con ES, 22 (25%) tuvieron DT2; 43 sujetos del grupo EHNA-L tuvieron DT2 (30%) y 57 (33%) individuos en el grupo EHNA fueron diabéticos.

La presencia de algún grado de fibrosis tuvo una frecuencia del 20.4% (n=88). De estos sujetos, 69 (16%) presentaron el menor grado de fibrosis, F1; 15 (3.5%) se ubicaron en el grado de fibrosis F2; tres (0.7%) presentaron grado de fibrosis 3 y solamente un individuo (0.2%) mostró el grado más severo de fibrosis, F4.

2. Parámetros antropométricos y bioquímicos

En la tabla 3 se muestran los parámetros antropométricos y bioquímicos de la población de estudio. No hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio con respecto a la edad, los niveles de glucosa, hemoglobina glucosilada, colesterol total, colesterol LDL y leptina. Se obtuvieron valores más altos de IMC, índice HOMA, insulina y enzimas ALT y GGT en los grupos con EHNA-L y EHNA en comparación con el grupo control. De estas mediciones, los niveles de insulina y enzimas ALT y GGT fueron estadísticamente mayores en los individuos con EHNA en comparación con los sujetos del grupo de ES y EHNA-L. Los niveles de colesterol HDL y AST fueron más altos y los de adiponectina más bajos en los individuos con EHNA en comparación con los demás grupos. Se observaron mayores niveles de triglicéridos circulantes de manera proporcional a la severidad del HGNA, teniendo los grupos con ES, EHNA-L y EHNA mayores niveles que el grupo control y el grupo con EHNA mayores niveles que los individuos con ES y EHNA-L, aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos con ES y EHNA-L.

Tabla 3. Parámetros antropométricos y determinaciones bioquímicas de la población de estudio

Parámetro	CTRL (n=43) 9%	ES (n=86) 20%	EHNA-L (n=136) 32%	EHNA (n=166) 39%
Sexo (%F)	35 (81.4)	71 (82.6)	105 (77.2)	118 (71.5)
Edad (años)	39.0 (30.0 - 48.0)	36.5 (30.0 - 44.3)	37.0 (30.0 - 45.0)	37.0 (29.0 - 43.0)
IMC (Kg/m²)	40.4 (37.4 - 44.1)	41.2 (37.8 - 45.3)	42.9 (40.0 - 48.9) *	45.2 (40.0 - 49.3)
DT2 (%)	6 (13.9)	22 (24.7)a	43 (29.9)a	57 (32.9)a
Glucosa (mg/dL)	90.0 (75.3 - 100.3)	87.0 (75.3 - 94.0)	90.5 (78.3 - 94.0)	94.0 (83.0 - 107.5)
Insulina (μIU/mL)	9.0 (4.8 - 12.0)	11.1 (7.4 - 15.1)	12.4 (8.0 - 15.1)*	15.7 (10.6 - 22.9) *, #, §
HOMA_IR	1.8 (1.0 - 2.9)	2.3 (1.3 - 3.4)	2.8 (1.6 - 3.4)*	3.5 (2.3 - 5.4) *
HbA1c %	5.3 (4.9 - 5.6)	5.3 (5.1 - 5.7)	5.6 (5.3 - 5.7)	5.5 (5.2 - 5.9)
TG (mg/dL)	100.0 (78.0 - 136.0)	126.0 (95.5 - 162.8) *	130.0 (98.3 - 162.8) *	143.0 (111.0 - 189.0) *, #, §
CT (mg/dL)	157.0 (145.0 - 185.0)	173.0 (155.0 - 197.8)	168.0 (147.0 - 197.8)	167.0 (145.0 - 194.0)
HDL-C (mg/dL)	38.0 (34.0 - 45.0)	35.5 (31.0 - 45.0)	36.8 (30.0 - 45.0)	34.0 (28.0 - 40.0) *, #, §
LDL-C (mg/dL)	96.2 (81.8 - 125.0)	110.0 (92.0 - 131.9)	104.2 (88.1 - 131.9)	101.6 (80.8 - 126.0)
AST (IU/mL)	24.0 (20.0 - 32.0)	25.0 (20.0 - 31.0)	27.0 (22.0 - 31.0)	30.5 (24.0 - 46.3) *, #, §
ALT (IU/mL)	21.0 (16.0 - 31.5)	25.0 (18.5 - 34.0)	27.0 (19.0 - 34.0) *	33.0 (24.0 - 48.0) *, #, §
GGT (IU/mL)	14.0 (10.0 - 22.0)	16.5 (13.0 - 23.3)	18.0 (14.0 - 23.3) *	21.0 (16.8 - 32.0) *, #, §
Leptina (μIU/mL)	30.6 (17.9 - 47.4)	31.2 (22.4 - 46.4)	34.4 (20.3 - 46.4)	40.7 (24.1 - 59.8)
Adiponectina (μIU/mL)	8.5 (7.2 - 11.6)	7.4 (5.9 - 10.8)	7.4 (5.9 - 10.8)	6.6 (4.9 - 8.1) *, #, §

Los datos se presentan como mediana y (rango intercuartilar). Prueba estadística: ANOVA de una vía, post hoc Tukey con nivel de significancia del 95%. Valor de $P < 0.05$ para las siguientes comparaciones: * vs control, # vs ES, § vs EHNA-L. Prueba de chi cuadrada entre variables categóricas, a: Valor de $P < 0.05$.

Abreviaturas: ES, esteatosis simple; EHNA, Esteatohepatitis no alcohólica; EHNA-L, EHNA indefinido/limitrofe; %F, porcentaje del sexo femenino; DT2, Diabetes Tipo 2; IMC, índice de masa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, índice del modelo homeostático para la evaluación de resistencia a la insulina; TG, triglicéridos; CT, Colesterol total; HDL-C, colesterol en lipoproteínas de alta densidad; LDL-C, colesterol en lipoproteínas de baja densidad; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transferasa; Adip, adiponectina. IU: unidades internacionales.

3. Asociación de metabolitos con la EHGNA

En primer lugar, se buscó identificar si existía un perfil específico de metabolitos que diferenciara a los individuos con EHGNA de aquellos sin EHGNA y que permitiría identificar las diferentes etapas de la EHGNA. Para ello, se llevó a cabo un análisis discriminante de cuadrados mínimos parciales (PLS-DA), usando las determinaciones séricas de metabolitos como variables explicativas y las etapas de la EHGNA como observaciones de desenlace. El análisis PLS-DA mostró que no existe un perfil metabolómico específico diferenciado entre los grupos de la EHGNA (Figura 6), por lo que se procedió a analizar individualmente cada metabolito.

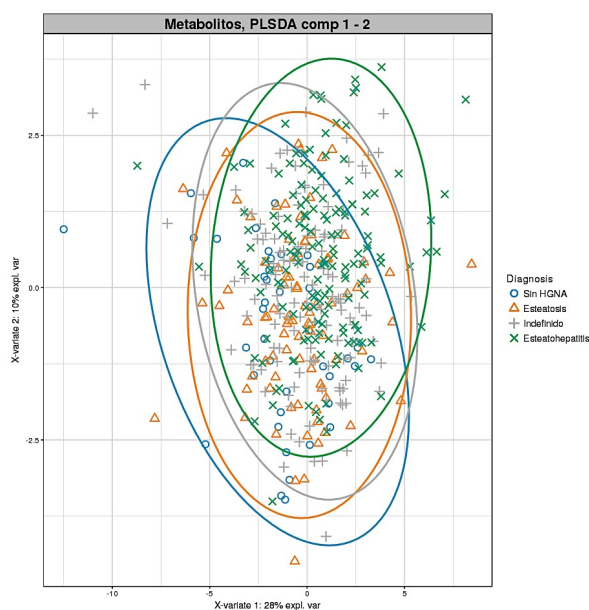


Figura 6. Gráfico de PLS-DA de metabolitos séricos y EHGNA. Círculos color azul indican al grupo control (sin EHGNA). Los triángulos color naranja indican a los sujetos en el grupo de esteatosis simple. Cruces color gris señalan a los individuos del grupo de EHNA-L y las equis color verde indican a los individuos del grupo de EHNA.

3.1 Diferencias entre grupos de la EHGNA

BCAA y AA relacionados con su catabolismo

Los niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), Cileucina/isoleucina y valina, fueron significativamente más altos en los grupos con ES y EHNA, en comparación con el grupo control (Fig. 7a). Los grupos con EHNA-L y EHNA mostraron niveles más altos de alanina, en comparación con el grupo control y con ES.

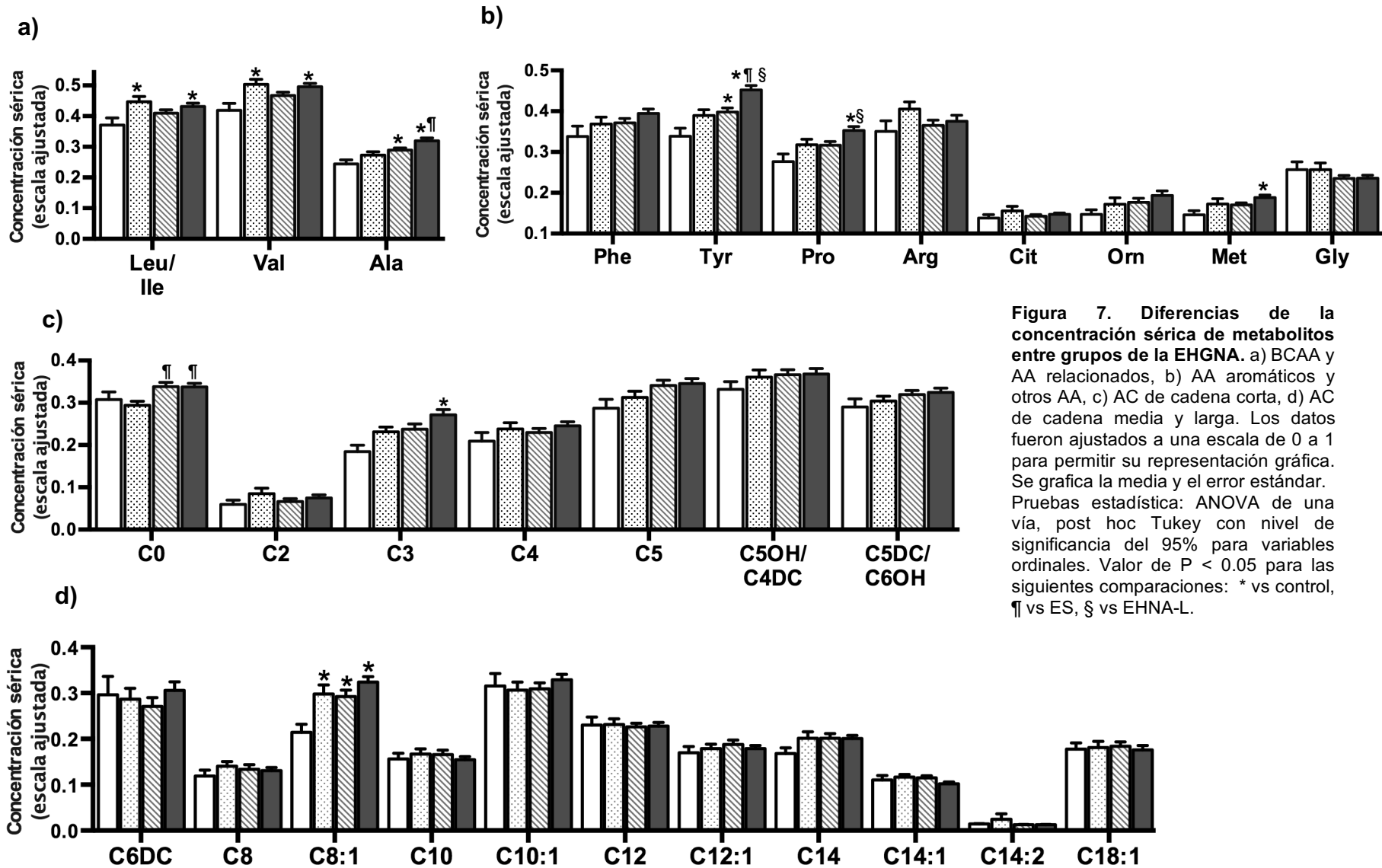


Figura 7. Diferencias de la concentración sérica de metabolitos entre grupos de la EHGNA. a) BCAA y AA relacionados, b) AA aromáticos y otros AA, c) AC de cadena corta, d) AC de cadena media y larga. Los datos fueron ajustados a una escala de 0 a 1 para permitir su representación gráfica. Se grafica la media y el error estándar. Pruebas estadística: ANOVA de una vía, post hoc Tukey con nivel de significancia del 95% para variables ordinales. Valor de $P < 0.05$ para las siguientes comparaciones: * vs control, † vs ES, § vs EHNA-L.

AA aromáticos y otros AA

Los sujetos con EHNA-L y EHNA mostraron mayores niveles de tirosina que el grupo control, y solo los individuos con EHNA tuvieron mayores niveles en comparación con el grupo con ES y con EHNA-L (Fig. 7b). No hubo diferencias significativas en los niveles de fenilalanina a través de los distintos grupos de estudio. Los individuos con EHNA también presentaron mayores niveles de prolina, en comparación con los sujetos del grupo control y EHNA-L. Los sujetos con EHNA presentaron mayores niveles de metionina, en comparación con el grupo control (Fig. 7b).

Acilcarnitinas

De las AC de cadena corta, únicamente se observaron diferencias significativas en los niveles de la propionil carnitina (C3), siendo el grupo con EHNA el que mostró los niveles más altos de esta AC. Los niveles de la carnitina libre (C0) fueron mayores en los sujetos con EHNA-L y EHNA que en los individuos con ES (Fig. 7c). De las AC de cadena media y larga cuantificadas, solo se observaron diferencias significativas entre grupos del HGNA para los niveles de Octenol carnitina (C8:1) (Fig. 7d). Los niveles de esta AC fueron significativamente mayores en los grupos con ES, EHNA-L y EHNA, en comparación con el grupo control.

3.2 Relación con los rasgos histológicos de la EHGNA

Además de evaluar las diferencias en los niveles séricos de metabolitos entre los grupos de la EHGNA, se buscó identificar si los metabolitos se asociaban con los grados de esteatosis hepática, inflamación lobular, presencia de balonamiento hepatocelular y la suma de estos tres, representada en el puntaje de actividad del HGNA (Puntaje NAS). En la tabla 4 se presentan todas las correlaciones de los metabolitos cuantificados con los rasgos histológicos de la EHGNA.

BCAA y AA relacionados con su catabolismo

Los BCAA no se correlacionaron significativamente con los rasgos histológicos de la EHGNA. Por su parte, los niveles de alanina se correlacionaron positivamente con todos los rasgos histológicos de la EHGNA, esto es, grado de esteatosis hepática ($r=0.15$, $p=0.02$), inflamación lobular ($r=0.16$, $p=0.01$), balonamiento hepatocelular ($r=0.21$, $p=4.6 \times 10^{-4}$) y puntaje de actividad del HGNA ($r=0.22$, $p=3.3 \times 10^{-4}$).

Tabla 4. Correlaciones de los niveles séricos de metabolitos con los rasgos histológicos de la EHGA

Clase	Metabolito	Grado de esteatosis		Inflamación lobular		Balonamiento hepatocelular		Puntaje NAS	
		r	p	r	p	r	p	r	p
BCAA y AA relacionados con su catabolismo									
AA	Leu/Ile	0.09	0.22	0.03	0.71	0.01	0.98	0.06	0.47
	Val	0.12	0.10	-0.01	0.99	0.01	0.93	0.06	0.46
	Ala	0.15	0.02	0.16	0.01	0.21	4.6E-04	0.22	3.3E-04
AA aromáticos y otros AA									
AA	Phe	0.11	0.14	0.08	0.29	0.12	0.10	0.13	0.06
	Tyr	0.25	1.9E-05	0.13	0.06	0.23	9.8E-05	0.26	1.2E-05
	Pro	0.19	2.2E-03	0.10	0.17	0.18	0.01	0.20	9.6E-04
	Arg	0.03	0.70	-0.02	0.82	-0.07	0.38	-0.02	0.85
	Met	0.16	0.01	0.08	0.30	0.16	0.01	0.17	0.01
	Gly	-0.09	0.22	0.01	0.93	0.02	0.77	-0.03	0.71
AANP	Cit	0.04	0.68	-0.01	0.99	0.04	0.69	0.03	0.71
	Orn	0.05	0.51	0.06	0.48	0.11	0.10	0.09	0.21
Acilcarnitinas									
CL	C0	0.11	0.12	0.07	0.31	0.09	0.21	0.12	0.09
	C2	-0.07	0.38	0.05	0.58	0.08	0.30	0.01	0.88
AC cadena corta	C3	0.20	9.0E-04	0.02	0.80	0.09	0.25	0.14	0.04
	C4	0.17	0.01	-0.04	0.61	0.06	0.48	0.08	0.26
	C5	0.12	0.10	0.01	0.97	0.07	0.33	0.09	0.25
	C5OH/C4DC	0.05	0.56	0.04	0.62	0.00	0.99	0.04	0.62
	C5DC/C6OH	0.07	0.33	0.05	0.58	0.06	0.43	0.08	0.30
	C6DC	-0.08	0.26	0.03	0.70	-0.01	0.90	-0.03	0.71
AC cadena media	C8	-0.01	0.93	-0.02	0.82	-0.04	0.67	-0.03	0.74
	C8:1	0.24	8.9E-05	0.10	0.18	0.14	0.04	0.21	6.5E-04
	C10	-0.05	0.58	-0.03	0.70	-0.05	0.56	-0.05	0.51
	C10:1	-0.01	0.93	-0.04	0.62	-0.02	0.85	-0.03	0.72
	C12	-0.05	0.57	0.08	0.27	-0.01	0.93	0.01	0.93
	C12:1	-0.07	0.38	0.05	0.56	-0.05	0.56	-0.03	0.71
AC cadena larga	C14	0.03	0.75	0.01	0.99	0.11	0.13	0.05	0.51
	C14:1	0.03	0.71	0.10	0.18	0.08	0.30	0.09	0.25
	C14:2	0.09	0.25	0.09	0.21	0.04	0.62	0.10	0.19
	C18:1	0.11	0.14	0.02	0.85	0.01	0.99	0.06	0.47

Correlaciones parciales ajustadas por edad, sexo, IMC y status de DT2. Valor de *P* corregido por el método de comparaciones múltiples (FDR). En negritas se resaltan las correlaciones estadísticamente significativas. Abreviaturas: Puntaje NAS, puntaje de actividad del HGNA; AA, aminoácidos; AC, acilcarnitinas; CL, carnitina libre; AANP, aminoácidos no proteicos.

AA aromáticos y otros AA

La concentración sérica de tirosina se correlacionó positivamente con mayores grados de esteatosis ($r=0.25$, $p=1.9 \times 10^{-5}$), balonamiento hepatocelular ($r=0.23$, $p=9.8 \times 10^{-5}$) y puntaje de actividad del HGNA ($r=0.26$, $p=1.2 \times 10^{-5}$). En el mismo sentido, la concentración de prolina se

asoció con mayores grados de esteatosis ($r=0.19$, $p=2.4 \times 10^{-3}$), balonamiento hepatocelular ($r=0.18$, $p=0.01$) y puntaje de actividad del HGNA ($r=0.20$, $p=9.6 \times 10^{-4}$). Los niveles de metionina se correlacionaron con mayores grados de esteatosis hepática ($r=0.16$, $p=0.01$), balonamiento hepatocelular ($r=0.16$, $p=0.01$) y puntaje de actividad del HGNA ($r=0.17$, $p=0.01$).

Acilcarnitinas

Los niveles de las AC de cadena corta, C3 y C4, se asociaron con mayor grado de esteatosis ($r=0.20$, $p=9.0 \times 10^{-4}$ y $r=0.17$, $p=0.01$; respectivamente). Los niveles de C3 también se correlacionaron con el puntaje de actividad del HGNA ($r=0.14$, $p=0.04$). De las AC de cadena media y larga, únicamente la concentración de C8:1 se correlacionó con mayores grados de esteatosis ($r=0.24$, $p=8.9 \times 10^{-5}$), balonamiento hepatocelular ($r=0.14$, $p=0.04$) y puntaje de actividad del HGNA ($r=0.21$, $p=6.5 \times 10^{-4}$).

Posteriormente, se buscó identificar las relaciones existentes entre los parámetros bioquímicos y los metabolitos asociados con la EHGNA. En la tabla suplementaria 2 se presentan los resultados de estas asociaciones. Niveles circulantes de TG se correlacionaron positivamente con los metabolitos Val, Ala, Tyr, Pro, Met, C0, C3, C4 y C8:1, siendo la más alta con C8:1 ($r=0.38$, $p=2.7 \times 10^{-14}$). Los niveles de las enzimas de funcionamiento hepático, ALT y AST, también se correlacionaron positivamente con los niveles circulantes de Leu, Ala, Tyr y Met. Además, ALT correlacionó con los niveles de Val, C3 y C4; AST con los niveles de Pro y GGT con los niveles de Val, Ala, Tyr, C0, C4 y C8:1. Por su parte, los niveles circulantes de colesterol total correlacionaron positivamente con los niveles de BCAA, Ala, Tur, C0 y C8:1. De manera interesante, los niveles de glucosa correlacionaron negativamente con los de Leu, Val, Tyr, Pro, Met, C3 y C4.

En seguida, se analizó si los metabolitos asociados con la EHGNA se relacionaban con un mayor contenido hepático de lípidos, cuantificados en un subgrupo de 110 individuos de la población de estudio. Únicamente tirosina, prolina y la AC C8:1 se correlacionaron positivamente con el contenido hepático de TG ($r=0.22$, $p=0.02$; $r=0.26$, $p=0.005$ y $r=0.21$, $p=0.03$, respectivamente). Sin embargo, posterior a la corrección por múltiples pruebas, estas correlaciones no permanecieron significativas. Los resultados se muestran en la tabla suplementaria 3.

4. Participación del estatus de DT2 en el perfil metabólico de la EHGNA

Debido a que la EHGNA y la DT2 son patologías íntimamente relacionadas, y a que la presencia de DT2 en pacientes con EHGNA es un factor de riesgo importante para la progresión de esteatosis simple a EHNA, e incluso a fibrosis, se buscó evaluar si existía un perfil de metabolitos característico de la presencia de ambas patologías, DT2 y EHNA, diferente a aquel en pacientes con únicamente una de las dos patologías. De esta forma, la población de estudio se dividió en cuatro grupos de estudio: 1) 91 pacientes sin EHNA y sin DT2; 2) 106 pacientes con EHNA, pero sin DT2; 3) 29 pacientes sin EHNA, pero con DT2 y 4) 54 pacientes con EHNA y DT2.

Primero se buscó identificar si existía un perfil metabólico que diferenciara a los pacientes con EHNA y DT2 de aquellos con EHNA o solo con DT2. El análisis de PLS-DA no mostró que existiera algún patrón metabólico diferencial entre dichos grupos (Figura 8), por lo que se procedió a analizar individualmente cada metabolito.

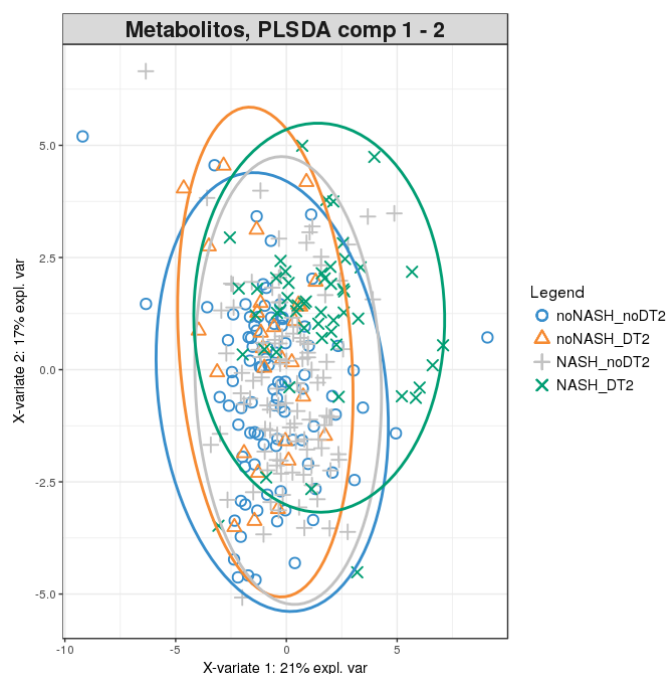


Figura 8. Gráfico de PLS-DA de metabolitos séricos en grupos con EHNA y DT2. Círculos color azul indican al grupo sin EHNA y sin DT2. Los triángulos color naranja indican al grupo sin EHNA, pero con DT2. Cruces color gris señalan al grupo con EHNA, pero sin DT2. Las equis color verde indican al grupo con EHNA y con DT2.

En seguida, se evaluó si existían diferencias en las concentraciones de metabolitos entre los grupos de DT2 y/o EHNA. En la figura 9 se presentan aquellos metabolitos que mostraron diferencias significativas entre grupos. Los niveles de tirosina fueron más altos en el grupo con

EHNA que en el grupo sin EHNA, tanto en sujetos diabéticos como no diabéticos (Fig. 9a). Los niveles de alanina, prolina, metionina y ornitina fueron más elevados en el grupo con EHNA que en el grupo sin EHNA, pero únicamente en el grupo de diabéticos. De manera interesante, los niveles de alanina, tirosina y metionina fueron más bajos en los sujetos diabéticos sin EHNA en comparación con los sujetos no diabéticos, pero con EHNA. Los niveles de glicina mostraron comportamientos opuestos en presencia y ausencia de DT2: fueron menores en los sujetos con EHNA que en los sujetos sin EHNA, en el grupo de no diabéticos, y fueron mayores en los sujetos con EHNA que en los sujetos sin EHNA, en el grupo de diabéticos.

Con respecto a las AC, los niveles de la C3, C5DC/C6OH, C10 y C14:1 fueron mayores en los sujetos con EHNA y DT2 en comparación con los individuos sin EHNA y sin DT2 (Fig. 9b). Los niveles de la AC C8:1 fueron mayores en el grupo con EHNA en comparación con el grupo sin EHNA, únicamente en los sujetos sin DT2. Los niveles de C5DC/C6OH, C10 y C12 fueron mayores en los sujetos con EHNA y DT2 en comparación con los sujetos sin DT2, pero con EHNA.

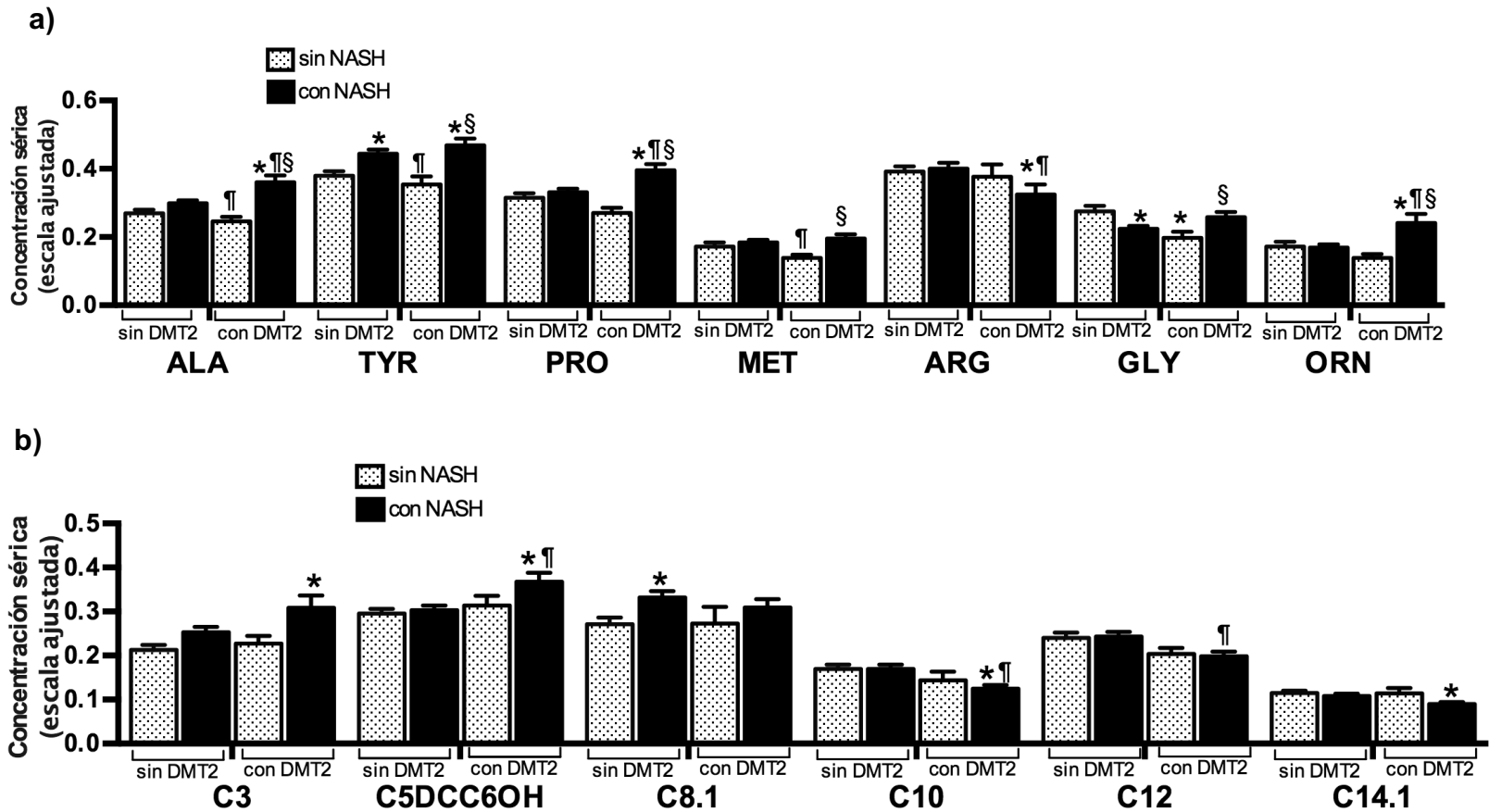


Figura 9. Diferencias en la concentración sérica de metabolitos entre sujetos con EHNA y sin EHNA, estratificando por estatus de DT2. a) Concentración sérica de AA b) Concentración sérica de AC. Se presentan solo los metabolitos con diferencias significativas entre grupos. Los datos fueron ajustados a una escala de 0 a 1 para permitir su representación gráfica. Se grafica la media y el error estándar. Pruebas estadística: ANOVA de una vía, post hoc Tukey con nivel de significancia del 95% para variables ordinales. Valor de $P < 0.05$ para las siguientes comparaciones: * vs sin DT2 + sin EHNA, ¶ vs sin DT2 + con EHNA, § vs con DT2 + sin EHNA.

Posteriormente, se buscó identificar si las correlaciones existentes entre los metabolitos y los rasgos histológicos de la EHGNA eran indistintas de la presencia de DT2. Para ello, se estratificó la población de estudio en pacientes diabéticos (n=116) y no diabéticos (n=270) y se condujo el mismo análisis de correlación que para la población de estudio total. En la tabla 5 se muestran aquellas correlaciones significativas entre los metabolitos y los rasgos histológicos de la EHGNA y en la tabla suplementaria 3 se muestran la lista completa de todas las correlaciones de los metabolitos con los rasgos histológicos de la EHGNA, estratificando por estatus de DT2.

Tabla 5. Correlaciones significativas de los niveles séricos de metabolitos con los rasgos histológicos de la EHGNA, estratificando por estatus de DT2.

Metabolito	Grado de esteatosis		Inflamación lobular		Balonamiento hepatocelular		Puntaje NAS	
	r	p	r	p	r	p	r	p
BCAA y aminoácidos relacionados con su catabolismo								
ALA	0.10	0.40	0.05	0.73	0.15	0.13	0.13	0.26
	0.30	0.01	0.35	3.0E-03	0.33	4.6E-03	0.41	2.6E-04
AA aromáticos y otros aminoácidos								
TYR	0.25	1.7E-03	0.05	0.73	0.23	4.4E-03	0.23	4.4E-03
	0.29	0.02	0.28	0.02	0.23	0.07	0.33	4.2E-03
PRO	0.12	0.30	-0.02	0.91	0.11	0.31	0.09	0.40
	0.40	2.6E-04	0.35	3.0E-03	0.31	0.01	0.44	7.1E-05
MET	0.13	0.25	0.01	0.93	0.12	0.27	0.12	0.30
	0.27	0.03	0.22	0.09	0.21	0.09	0.29	0.01
Acilcarnitinas								
C3	0.21	0.01	0.02	0.89	0.07	0.56	0.14	0.17
	0.20	0.11	0.02	0.87	0.11	0.42	0.14	0.30
C8:1	0.26	1.1E-03	0.03	0.85	0.18	0.07	0.21	0.01
	0.17	0.19	0.22	0.08	0.05	0.78	0.19	0.13

Correlaciones parciales ajustadas por edad, sexo e IMC. Valor de *P* corregido por el método de comparaciones múltiples (FDR). En negritas se resaltan las correlaciones estadísticamente significativas. En sombreado gris se indican las correlaciones realizadas en el grupo de pacientes con DT2. En blanco están indicadas las correlaciones conducidas en el grupo de pacientes sin DT2. Abreviaturas: Puntaje NAS, puntaje de actividad del HGNA.

Similar al comportamiento observado al estratificar por estatus de DT2 en los niveles séricos, tirosina fue el único metabolito asociado con los rasgos histológicos de la EHGNA, tanto en sujetos con DT2 como en sujetos sin DT2. En ambos grupos, tirosina se correlacionó con mayores grados de esteatosis ($r=0.25$, $p=1.7 \times 10^{-3}$ en no diabéticos y $r=0.29$, $p=0.02$ en diabéticos) y de puntaje de actividad del HGNA ($r=0.23$, $p=4.4 \times 10^{-3}$ en no diabéticos y $r=0.33$, $p=4.2 \times 10^{-3}$ en diabéticos). Tirosina también se asoció con mayor balonamiento hepatocelular

($r=0.23$, $p=4.4 \times 10^{-3}$) únicamente en los sujetos no diabéticos, mientras que se asoció con mayor grado de inflamación ($r=0.28$, $p=0.02$) solo en los diabéticos. Los aminoácidos alanina, prolina y metionina se asociaron con los rasgos de la EHGNA solamente en el grupo con DT2. Por su parte, las acilcarnitinas C3 y C8:1 se asociaron con los rasgos de la EHGNA únicamente en el grupo sin DT2: tanto C3 como C8:1 se correlacionaron con mayor grado de esteatosis hepática y solo la AC C8:1 se asoció con un mayor puntaje de actividad de la EHGNA.

5. Variantes genéticas asociadas con los niveles séricos de metabolitos

En total fueron diez los metabolitos diferenciados entre los grupos de estudio de la EHGNA y/o que se asociaron con los rasgos de la EHGNA: Leu, Val, Ala, Tyr, Pro, Met, C0, C3, C4 y C8:1. Para identificar cuáles variantes genéticas (SNP) podrían estar contribuyendo a las diferencias observadas en la concentración sérica de estos metabolitos, se procedió a hacer un estudio de asociación del genoma completo (GWAS). Se identificaron un total de 108 SNP distribuidos en 42 genes, con una significancia sugestiva a nivel de genoma completo ($p < 10^{-6}$), asociados con la concentración sérica de alguno de los diez metabolitos identificados para el HGNA: 34 SNP en 15 genes asociados con los niveles séricos de AA y 74 SNP en 27 genes asociados con los niveles séricos de AC (Tabla suplementaria 4).

Con el fin de identificar aquellas señales que se replicaran, se condujo un estudio de asociación de genoma completo en un grupo independiente de 245 sujetos mexicanos con obesidad. De los 108 SNP asociados con los niveles de AA y AC en la población de estudio, se replicaron 34 asociaciones en el grupo de sujetos con obesidad (Tabla suplementaria 4). Posteriormente, se llevó a cabo un meta-análisis conjuntando los resultados de los GWAS realizados en la población de estudio de sujetos con obesidad mórbida y en el grupo independiente de individuos con obesidad (N=676). De los 34 SNPs replicados, únicamente 26 SNP mostraron una significancia estadística a nivel de genoma completo ($p < 10^{-8}$) posterior al meta-análisis [22 asociados con los niveles séricos de butirilcarnitina (C4), tres asociados con los niveles de prolina y uno con los niveles de octenoilcarnitina (C8:1) (Tabla suplementaria 4)].

Al realizar un análisis de desequilibrio de ligamiento (LD), se identificó que las 22 variantes asociadas con los niveles de la AC C4 se distribuían en tres bloques distintos ($r^2 > 0.9$). En el primer bloque, el SNP rs2066938 localizado en *UNC119B*, fue la señal más significativa. En el segundo bloque, el SNP rs1168067 ubicado en *CABP1*, fue el que mostró el valor de asociación más significativo y en el tercer bloque, fue el SNP rs1799958 localizado en *ACADS*, quien presentó la asociación más significativa (Fig. 10a). También se realizó un análisis de LD para

los tres SNPs asociados con los niveles de prolina, localizados en el gen, *PRODH*, el cual mostró que las tres variantes estaban en un mismo bloque de LD ($r^2 > 0.9$) (Fig. 10b). De estas tres señales, el SNP rs5747933 fue la única variante no sinónima.

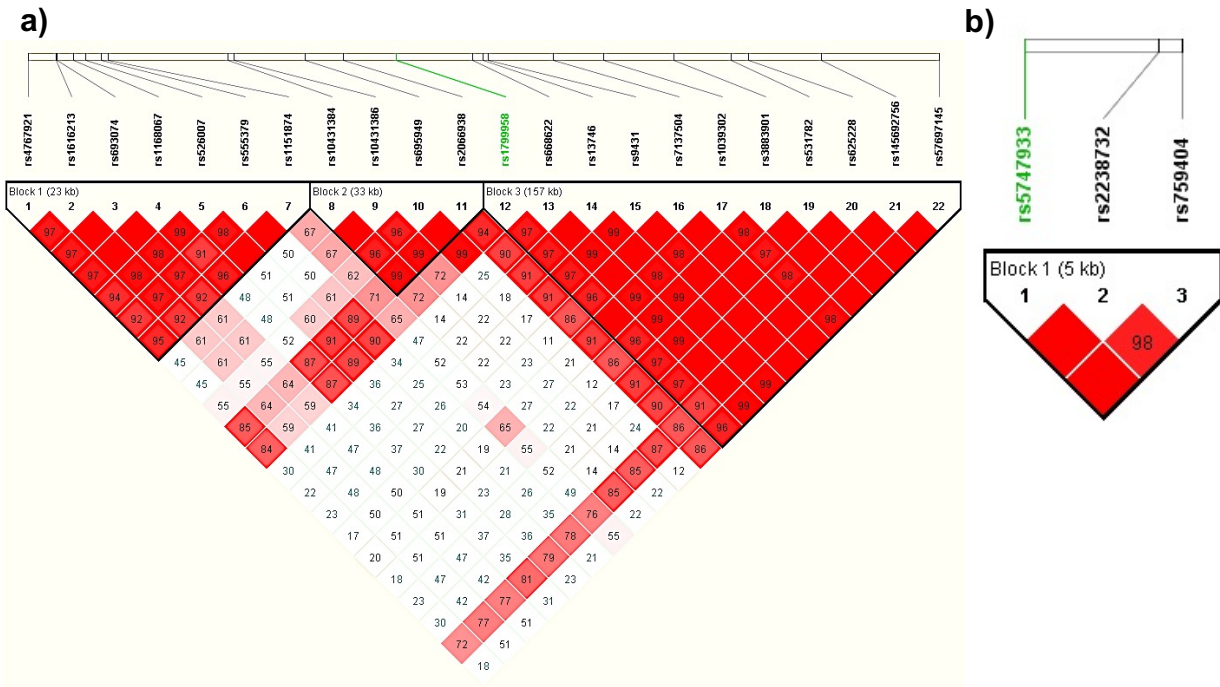


Figura 10. Mapas de disequilibrio de ligamiento. a) para las variantes asociadas con los niveles de butirilcarnitina (C4). b) para las variantes asociadas con los niveles de prolina. En los cuadros se indica el valor de r^2 .

En resumen, del estudio de asociación de genoma completo conducido para identificar variantes genéticas asociadas con los niveles séricos de los metabolitos relacionados con la EHGNA, se consideraron seis variantes genéticas para análisis posteriores. Estas variantes se localizaron en seis loci independientes, con un nivel de asociación de genoma completo ($p < 10^{-8}$) (Tabla 6).

En la tabla 7 se presentan las frecuencias de las variantes asociadas con los niveles de metabolitos y su comparación con otras poblaciones. La variante rs5747933 en *PRODH*, tuvo una frecuencia del 15%, comparable a la reportada para poblaciones con ancestría mexicana (16%). La variante 1799958 en *ACADS* tuvo una frecuencia del 37%, por debajo del 40% reportado para poblaciones con ancestría mexicana. La variante rs62440901 en *SLC22A1* tuvo una frecuencia del 25%, menor al 30% reportado en poblaciones con ancestría mexicana.

Tabla 6. Variantes genéticas asociadas con los niveles séricos de metabolitos relacionados con la EHGNA, a un nivel de significancia de genoma completo ($p < 5 \times 10^{-8}$).

Metabolito asociado	Chr	SNP	Tipo de variante	Gen más cercano	bp	A1	A2	MAF	Cohorte obesos mórbidos (n=431)			Grupo de validación (n=245)			Meta-análisis (N=676)		
									b	se	p	b	se	p	b	se	p
Pro	22	rs5747933	Sentido erróneo	<i>PRODH</i>	18910355	A	C	0.15	0.61	0.11	5.2E-08	1.54	0.25	4.8E-10	0.76	0.10	5.6E-14
	12	rs2066938	utr 3'	<i>UNC119B</i>	121160615	G	A	0.32	0.21	0.03	2.1E-16	0.14	0.03	7.2E-06	0.18	0.02	2.7E-20
C4	12	rs1168067	Intrónica	<i>CABP1</i>	121082469	A	G	0.41	-0.12	0.02	9.9E-08	-0.12	0.03	8.3E-05	-0.12	0.02	3.5E-11
	12	rs1799958	Sentido erróneo	<i>ACADS</i>	121176083	A	G	0.37	0.23	0.02	1.8E-20	0.15	0.03	7.3E-07	0.20	0.02	4.5E-25
C8:1	6	rs62440901	Intrónica	<i>SLC22A1</i>	160569068	A	G	0.25	-0.11	0.02	1.3E-06	-0.09	0.04	0.01	-0.11	0.02	7.4E-08

Regresión lineal, asumiendo un modelo genético aditivo, ajustado por edad, sexo, IMC y matriz de semejanza genética. Abreviaturas: SNP, Polimorfismo de un Solo Nucleótido; Chr, cromosoma; A1, alelo menor; A2, alelo mayor; MAF frecuencia del alelo menor; b, valor de beta para la asociación SNP-metabolito; se, error estándar de la regresión.

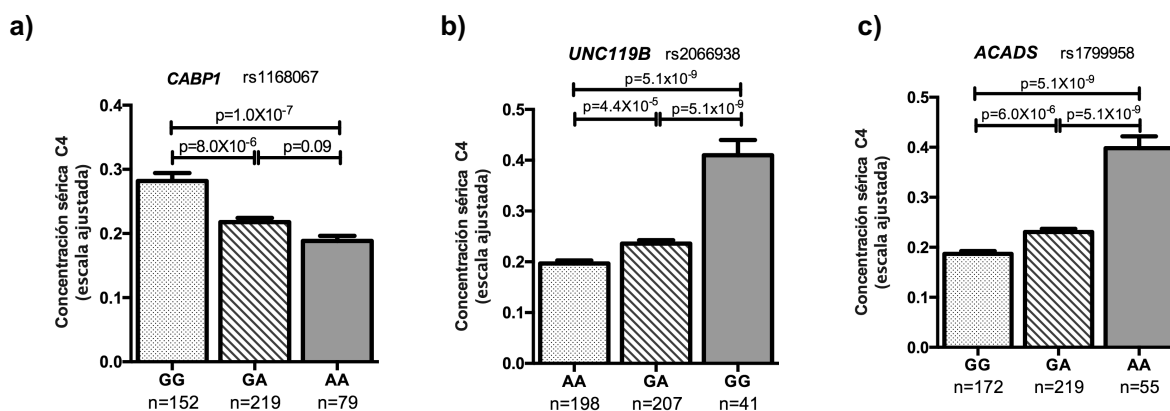
Tabla 7. Frecuencia reportada de las variantes genéticas asociadas con los niveles séricos de metabolitos

SNP	Gen	Frecuencia reportada MXL	Frecuencia reportada EUR	Frecuencia población de estudio
rs5747933	<i>PRODH</i>	16%	5%	15%
rs2066938	<i>UNC119B</i>	36%	27%	32%
rs1168067	<i>CABP1</i>	41%	44%	41%
rs1799958	<i>ACADS</i>	40%	27%	37%
rs62440901	<i>SLC22A1</i>	30%	15%	25%

Referencia para las frecuencias reportadas: 1000 Genomes Project. *Nature*, 2015. MXL, individuos con ancestría mexicana, residentes en Los Ángeles, California. EUR: individuos con ancestría europea.

5.1 Efecto de la variación genética en los niveles de metabolitos

En la figura 11 se ilustra el efecto que las variantes identificadas ejercen sobre sus respectivos metabolitos. Los individuos con al menos una copia del alelo raro (A) en *CABP1* mostraron una concentración de C4 18% menor que los individuos homocigotos silvestres, y aquellos individuos homocigotos para la variante mostraron un 26% menos que los homocigotos silvestres (Figura 11a). Los sujetos portadores del SNP rs2066938 en *UNC119B* tuvieron una mayor concentración sérica de C4, en comparación con los individuos sin la variante, siendo un 14% mayor para los heterocigotos y un 76% mayor para los homocigotos (Figura 11b). Los sujetos con al menos una copia del alelo raro (A) en *ACADS* tuvieron una concentración sérica de C4 16% mayor que los individuos homocigotos para el alelo silvestre (G). Esta diferencia fue aún mayor en los sujetos homocigotos para el alelo raro, pues estos mostraron una concentración 79% mayor que los sujetos sin la variante (Figura 11c). Los individuos portadores de la variante en *PRODH* tuvieron una concentración de prolina 11% mayor que los sujetos sin la variante, y los individuos homocigotos para el alelo raro mostraron una concentración 38% mayor que los homocigotos para el alelo silvestre (Figura 11d). Los individuos portadores de la variante en *SLC22A1*, rs62440901, tuvieron una menor concentración sérica de la AC C8:1, siendo 11% menor para los portadores de una copia del alelo y 22% para los homocigotos (Figura 11e).



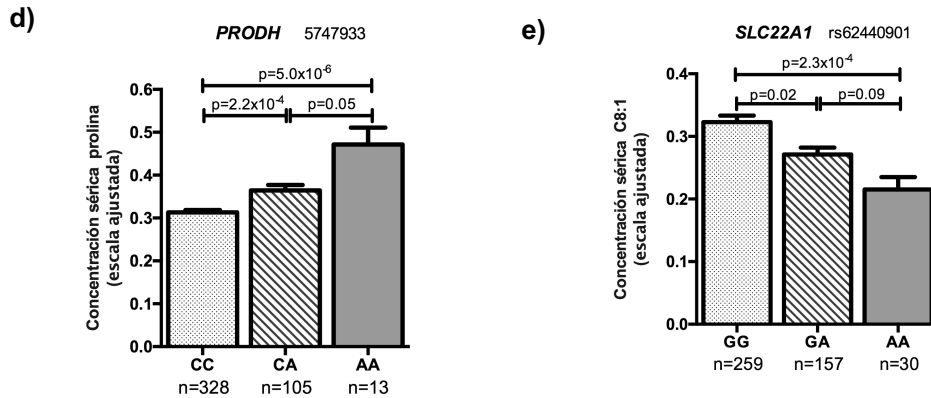


Figura 11. Efecto de la variación genética en los niveles séricos de metabolitos. a) Efecto del SNP rs1168067 en *CABP1* en los niveles séricos de butirilcarnitina. b) Efecto del SNP rs2066938 en *UNC119B* los niveles séricos de butirilcarnitina. c) Efecto del SNP rs1799958 en *ACADS* en los niveles séricos de butirilcarnitina. d) Efecto del SNP rs5747933 en *PRODH* en los niveles séricos de prolina. e) Efecto del SNP rs62440901 en *SLC22A1* en los niveles séricos de octenoincarnitina.

6. Asociación de variantes genéticas con la EHGNA: Modelo de Aleatorización Mendeliana

Una vez identificadas las variantes genéticas asociadas con los niveles de metabolitos séricos relacionados con la EHGNA (Tabla 5), se evaluó si estas variantes también estaban asociadas con la presencia de EHGNA y sus rasgos histológicos, a través de un análisis de Aleatorización Mendeliana (AM), para así establecer la posible causalidad de estos metabolitos en el desarrollo y progresión de la EHGNA. El análisis de AM se llevó a cabo por medio de dos métodos: la Estimación de Métodos Causales y la Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos.

6.1 Estimación de Métodos Causales

6.1.1 Análisis de riesgo para la EHGNA y EHNA

En primer lugar, se condujo un análisis de riesgo para la presencia de la EHGNA, incluyendo en un solo grupo a los sujetos con esteatosis simple y EHNA, y comparándolo con respecto al grupo control. El análisis de riesgo mostró que ninguna de las variantes presentes en *CABP1*, *UNC119B*, *ACADS*, *PRODH* y *SLC22A1* se asociaba significativamente con un mayor riesgo de EHGNA. Sin embargo, la variante rs5747933, localizada en *PRODH*, mostró una tendencia a asociarse con mayor riesgo de EHGNA (OR 2.31 [0.91 – 5.87], $p=0.08$). De forma interesante, al hacer el análisis de riesgo con respecto a la presencia de EHNA (vs grupo control y esteatosis simple), la presencia de la variante en *PRODH* se asoció significativamente con mayor riesgo

de EHNA (OR = 2.96 [1.57 – 5.56], $p=7.6 \times 10^{-4}$) (Tabla 8). Las otras variantes genéticas no presentaron asociación significativa con la EHNA.

Tabla 8. Análisis de riesgo de la presencia de al menos una copia de la variante rara en el desenlace de HGNA y EHNA.

SNP	Gen	Metabolito modulado	Riesgo HGNA			Riesgo EHNA		
			OR	IC (95%)	P	OR	IC (95%)	P
rs5747933	<i>PRODH</i>	Pro	2.31	0.91 - 5.87	0.08	2.96	1.57 - 5.56	7.6E-04
rs1168067	<i>CABP1</i>	C4	0.81	0.39 - 1.49	0.57	1.01	0.58 - 1.76	0.96
rs2066938	<i>UNC119B</i>	C4	1.15	0.57 - 2.33	0.69	1.22	0.71 - 2.09	0.47
rs1799958	<i>ACADS</i>	C4	1.51	0.75 - 3.08	0.25	1.15	0.66 - 1.98	0.62
rs62440901	<i>SLC22A1</i>	C8:1	1.09	0.53 - 2.23	0.82	0.95	0.55 - 1.64	0.86

Regresión logística multinomial empleando un modelo dominante para los efectos genéticos. Variables de ajuste incluidas en el modelo: edad, sexo, IMC, estatus de DT2 y primeros dos componentes de la matriz semejanza genética. Comparaciones para el riesgo de HGNA: sujetos con HGNA (esteatosis simple y EHNA) vs sujetos sin HGNA (grupo control). Comparaciones para el riesgo de EHNA: sujetos con EHNA vs sujetos sin EHNA (grupo control y esteatosis simple). En ambos, se excluyó del análisis al grupo con EHNA-L.

6.1.2 Asociación con los rasgos histológicos de la EHGNA

Posteriormente, se analizó si las variantes genéticas se asociaban con los rasgos histológicos de la EHGNA (Tabla 9). Al igual que en el análisis de riesgo para EHNA, únicamente la variante en *PRODH* se asoció con mayores grados de esteatosis ($B=0.30$, $p=0.02$), inflamación lobular ($B=0.33$, $p=0.002$), balonamiento hepatocelular ($B=0.23$, $p=0.02$) y puntaje de actividad del HGNA ($B=0.85$, $p=9.6 \times 10^{-4}$). No se observó ninguna asociación significativa del resto de variantes con los rasgos histológicos de la EHGNA. De manera interesante, después de incluir la concentración de prolina como variable de ajuste, la asociación de *PRODH* con la EHGNA permaneció significativa para tres de los cuatro rasgos evaluados, grado de esteatosis ($B=0.22$, $p=0.05$), inflamación lobular ($B=0.31$, $p=0.001$), balonamiento ($B=0.14$, $p=0.09$) y puntaje de actividad del HGNA ($B=0.67$, $p=0.003$).

Tabla 9. Variantes genéticas relacionadas con los niveles de metabolitos y su asociación con los rasgos histológicos de la EHGNA.

SNP	Gen	Metabolito modulado	Grado de esteatosis			Inflamación lobular			Balonamiento hepatocelular			Puntaje de actividad del HGNA		
			B	SE	p	B	SE	p	B	SE	p	B	SE	p
rs5747933	<i>PRODH</i>	Pro	0.30	0.10	0.02	0.33	0.09	2.4E-03	0.23	0.08	0.02	0.85	0.21	9.6E-04
rs1168067	<i>CABP1</i>	C4	-0.19	0.08	0.06	0.07	0.07	0.53	-0.10	0.06	0.34	-0.22	0.16	0.46
rs2066938	<i>UNC119B</i>	C4	0.08	0.08	0.53	-0.08	0.07	0.53	0.08	0.06	0.46	0.09	0.17	0.83
rs1799958	<i>ACADS</i>	C4	0.11	0.08	0.46	-0.09	0.07	0.46	0.06	0.06	0.53	0.08	0.17	0.83
rs62440901	<i>SLC22A1</i>	C8:1	0.08	0.09	0.58	-0.02	0.08	0.92	0.00	0.07	0.98	0.07	0.18	0.85

Regresión lineal asumiendo un modelo aditivo, ajustando por edad, sexo, IMC y matriz de semejanza genética. Abreviaciones: SNP, Polimorfismo de un solo nucleótido; b, valor de beta de la regresión lineal; SE, error estándar de la regresión lineal. Valor de *P* ajustado por el método de comparaciones múltiples.

6.2 Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos

Además del modelo de Estimación Métodos Causales, el análisis de AM se llevó a cabo a través de otro modelo denominado de Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos (2SLS), incluyendo en el análisis las variantes asociadas significativamente ($p < 10^{-8}$) con los metabolitos de la EHGNA. Similar a lo observado en el modelo de Estimación de Métodos Causales, el análisis de AM por 2SLS mostró que la variante rs5747933 en el gen *PRODH* es la única con una asociación positiva con el puntaje de actividad del HGNA ($\beta\hat{\chi}_Y = 0.037$, $p=0.002$), sugiriendo que los niveles elevados de prolina pueden participar en el desarrollo y progresión de la EHGNA. El análisis para el resto de variantes genéticas no presentó asociaciones significativas con la EHGNA (Tabla 10).

Tabla 10. Modelo de Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos para evaluar la causalidad de metabolitos en la EHGNA

SNP	Gen	Metabolito	$\beta\hat{\chi}_Y$	se	p
rs5747933	<i>PRODH</i>	Pro	0.037	0.012	0.002
rs1168067	<i>CABP1</i>	C4	4.321	11.087	0.697
rs2066938	<i>UNC119B</i>	C4	2.054	8.304	0.805
rs1799958	<i>ACADS</i>	C4	0.783	7.264	0.914
rs62440901	<i>SLC22A1</i>	C8:1	-6.498	12.240	0.990

Estimación de Cuadrados Mínimos en Dos Pasos. Variables de ajuste incluidas en el modelo: edad, sexo, IMC y primeros dos componentes de matriz de semejanza genética. $\beta\hat{\chi}_Y$, Efecto estimado causal; se, error estándar.

7. Relación de *PRODH* con la EHGNA

7.1 Contenido hepático de lípidos y variantes en *PRODH*

Dado que la variante en *PRODH* fue la única en tener una relación con la EHGNA, se buscó identificar si el contenido hepático de lípidos era mayor en presencia de la variante en *PRODH*. En un subgrupo de individuos en los que se cuantificó el contenido hepático de lípidos, se observó que aquellos individuos portadores del alelo menor (A) de rs5747933 en *PRODH* tenían un mayor contenido hepático de triglicéridos (TG), colesterol total (CT), colesterol libre (CL) y fosfolípidos, en comparación con los sujetos homocigotos para el alelo silvestre (CC) (Fig. 12)

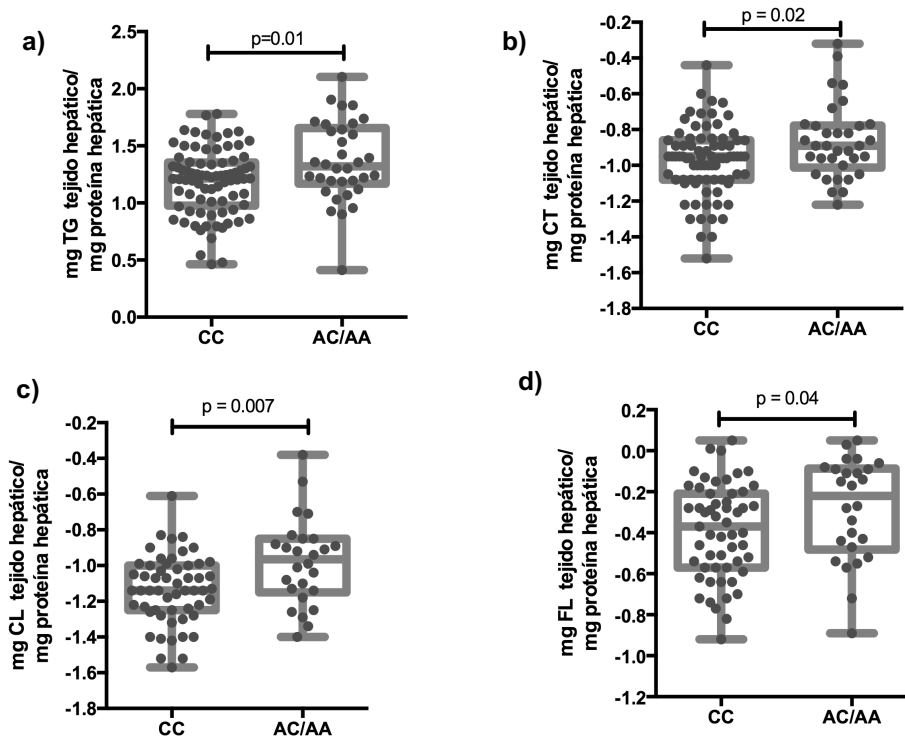


Figura 12. Contenido hepático de lípidos en función del genotipo en *PRODH*. A) Contenido hepático de triglicéridos (TG). B) Contenido hepático de colesterol total (CT). C) Contenido hepático de colesterol libre (CL). C) Contenido hepático de fosfolípidos (FL). CC, n= 81; CA/AA, n=34. Prueba estadística: U de Mann-Whitney. Para su aproximación a distribución normal, los valores de lípidos hepáticos fueron transformados por raíz cúbica (TG) o logaritmo base 10 (CT, CL y FL). Estos valores transformados son los que se presentan en las gráficas.

7.2 Evaluación de la expresión hepática de *PRODH*

Debido a que la variación genética en *PRODH* fue la única en asociarse significativamente con la EHGNA, los esfuerzos se centraron en analizar los posibles mecanismos por los que la variante rs5747933 podría estar asociada con los niveles de prolina y con el fenotipo de HGNA. Con este fin, se cuantificó la expresión de *PRODH* en muestras de tejido hepático en un subgrupo de 151 individuos.

En primer lugar, se buscó identificar si la expresión hepática de *PRODH* correlacionaba con los niveles séricos de prolina. Se observó una tendencia a que una menor expresión hepática de *PRODH* correlacionaba con una mayor concentración sérica de prolina, aunque ésta no fue estadísticamente significativa ($r=-0.12$, $p=0.18$; Figura 13)

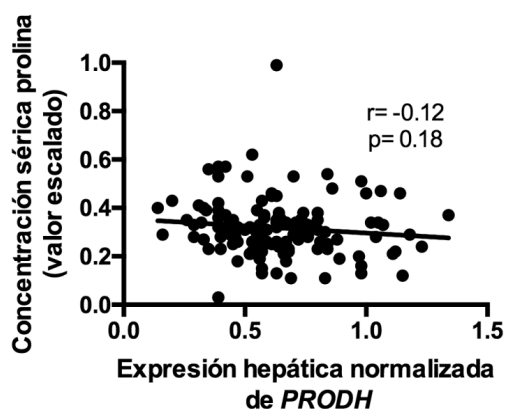


Figura 13. Relación de la expresión hepática de *PRODH* con los niveles séricos de prolina. Correlación ajustada por la edad, el sexo y el IMC.

7.2.1 Efectos de rs5747933 en la expresión de *PRODH*

Debido a que el SNP rs5747933 se localizaba en desequilibrio de ligamiento alto con las variantes intrónicas, rs2238732 y rs759404 ($r^2=0.99$ y $r^2=0.98$, respectivamente; Fig. 10), que podrían estar influyendo en la tasa de expresión del gen, se buscó identificar si la presencia del SNP rs5747933 se asociaba con cambios en la expresión génica de *PRODH*. Del subgrupo de sujetos con evaluación de la expresión hepática, solo dos fueron homocigotos para el alelo menor (A), 32 fueron heterocigotos (CA) y 105 fueron homocigotos silvestres (CC). Por esta razón, se empleó un modelo dominante para el análisis de la expresión génica, comparando sujetos homocigotos silvestres con los portadores de la variante. Los individuos portadores de la variante rs5747933 mostraron una tendencia a presentar mayor expresión hepática de *PRODH* que aquellos individuos sin la variante, aunque esta diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa ($p=0.07$) (Figura 14a).

7.2.2 Expresión de *PRODH* en la EHGNA

Dada la asociación identificada de la variante rs5747933 en el gen *PRODH* con el riesgo de EHNA (vs grupos control y ES) (Tabla 8), se analizó si existían diferencias en la expresión hepática de *PRODH* entre los sujetos con EHNA y los individuos sin EHNA (control y ES). Se observó que los individuos con EHNA tenían una expresión hepática de *PRODH* 18% menor que el grupo control ($p=0.05$) y 12% menor que el grupo con ES, aunque esta última comparación no alcanzó significancia estadística (Fig. 13b). Por último, se evaluó si la expresión de *PRODH* se asociaba con los rasgos histológicos de la HGNA. De manera interesante, se observó que una menor expresión de *PRODH* se correlacionó con mayores grados de esteatosis ($r=-0.19$, $p=0.03$), balonamiento hepatocelular ($r=-0.31$, $p=3.6 \times 10^{-4}$) y puntaje de actividad del HGNA ($r=-0.21$, $p=0.02$).

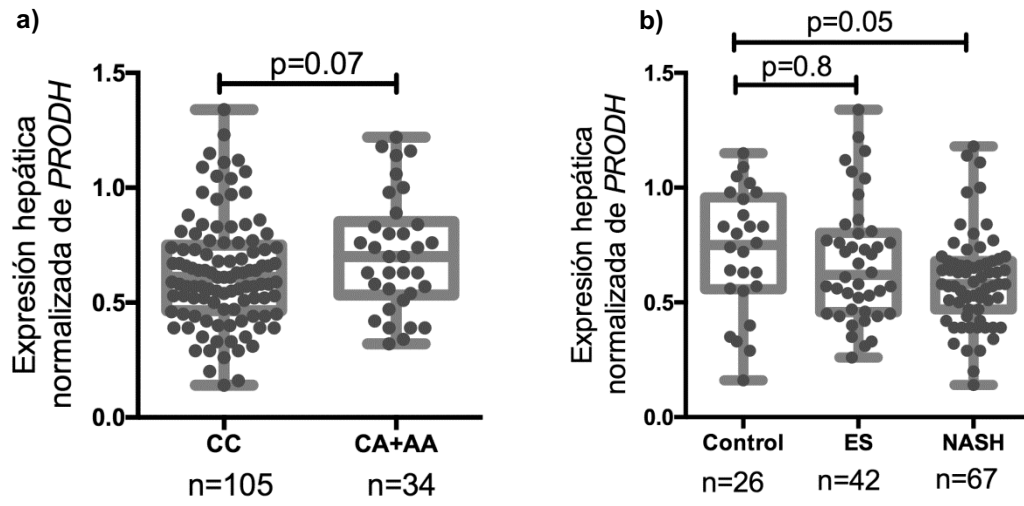


Figura 14. Expresión hepática de PRODH. a) en función del genotipo de PRODH. b) en función de la severidad de la EHNA. Prueba estadística t de student.

VII. DISCUSIÓN

1. Frecuencia de la EHGNA y aspectos bioquímicos

La prevalencia de la EHGNA ha incrementado considerablemente en los últimos años, siendo la obesidad el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EHGNA (Than, 2015). En este estudio, la frecuencia de la EHGNA fue del 91%, similar a lo reportado para sujetos de origen hispanoamericano con obesidad mórbida (Younossi, 2016; Machado, 2006). De éstos, un 78% presentaron esteatohepatitis no alcohólica, la etapa más severa de la EHGNA, siendo este porcentaje más elevado que el 26-58% reportado para pacientes con EHGNA de origen hispano (López-Velázquez, 2014; Williams, 2011). En consistencia con la evidencia existente, los individuos con EHGNA presentaron niveles mayores de triglicéridos circulantes y de enzimas transaminasas (ALT, AST y GGT), en comparación con los sujetos sin EHGNA (Sattar, 2014).

Diversos reportes indican que la prevalencia de DT2 en individuos con obesidad mórbida varía de un 15% a un 30% (Bray, 2006; Buchwald, 2009; Vinciguerra, 2013). En el presente estudio, la frecuencia de DT2 en el grupo sin EHGNA fue del 14%, acorde a lo reportado en pacientes con obesidad mórbida. La frecuencia de DT2 fue mayor en los sujetos con esteatosis simple (ES), incrementando aún más en los sujetos con EHGNA, lo cual confirma la relación propuesta entre la presencia de DT2 y la severidad de la EHGNA (Goh, 2014).

2. Asociación de metabolitos con la EHGNA

2.1 Aminoácidos de cadena ramificada (BCAA)

Estudios de la EHGNA, tanto en modelos murinos como en humanos, han presentado que los aminoácidos leucina, isoleucina y valina de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés) se asocian consistentemente con el desarrollo y progresión de la EHGNA (Lake, 2015; Gaggini, 2018; Zhang, 2016; Kalhan, 2011). En el presente estudio los niveles séricos de los BCAA fueron más altos en presencia de ES y EHGNA, en comparación con los sujetos sin EHGNA, pero fueron similares entre el grupo con ES y con EHGNA. Debido a que los BCAA no se correlacionaron significativamente con ninguno de los rasgos histológicos de la EHGNA, se sugiere que su incremento está relacionado con la acumulación hepática de lípidos (1ª agresión para la EHGNA) y permanecen elevados una vez establecida la EHGNA (Kalhan, 2011).

El primer paso en el catabolismo de los BCAA se lleva a cabo en los tejidos periféricos (excepto en hígado) por la acción de la enzima mitocondrial BCATm. El segundo paso de su catabolismo sucede por la acción del complejo mitocondrial BCKD y tiene lugar principalmente en el hígado y tejido adiposo (Adams, 2011). Estudios *in vivo* han mostrado que una dieta alta en grasa (HFD, por sus siglas en inglés) puede disminuir la actividad del complejo BCKD en hígado y tejido adiposo, ocasionando que disminuya el catabolismo de los BCAA y éstos incrementen en la circulación (Zhang, 2016). Por otra parte, se ha planteado que los BCAA podrían ser agentes causales en el desarrollo de esteatosis hepática. En un trabajo realizado en roedores donde se administró una dieta HFD en conjunto con BCAA, se observó una mayor activación de AMPK, resultando en el incremento de lipólisis del tejido adiposo, mayor liberación de AGL a la circulación y su consecuente deposición en el hígado (Zhang, 2016). La administración de la HDF + BCAA también se relacionó con una mayor activación de mTOR, la cual resultó en la inhibición de la reesterificación de los AGL a triglicéridos en los hepatocitos, permitiendo así que el efecto lipotóxico de los AGL ocasionara una mayor producción de citosinas pro-inflamatorias, peroxidación lipídica y apoptosis en hepatocitos, rasgos distintivos de la EHGNA. De esta forma, en un escenario de alto riesgo para la EHGNA, como lo es la obesidad mórbida, es posible que la ingesta excesiva de grasas conduzca a una menor actividad del complejo BCKD, encargado de catabolizar los BCAA. Como resultado, estos AA incrementan en la circulación, promoviendo a la acumulación hepática de lípidos por medio del aumento de la lipólisis del tejido adiposo.

2.2 Aminoácidos relacionados con los BCAA

Uno de los aminoácidos subproducto del catabolismo de los BCAA es alanina (Figura 3), la cual también se asoció con la EHGNA, teniendo los sujetos con EHNA niveles más altos de alanina en comparación con los sujetos control y ES, además de que este aminoácido fue el único que se correlacionó con todos los rasgos histológicos de la EHGNA. A pesar de que alanina no se ha asociado con la EHGNA de manera tan consistente como los BCAA, un estudio en un modelo murino de esteatosis hepática inducida por HFD presentó que los roedores con esteatosis presentaron tienen mayores niveles circulantes de alanina, lactato y piruvato, reflejando un incremento en la disponibilidad de sustratos gluconeogénicos y un consecuente incremento en la gluconeogénesis (Toye, 2017). Alanina es un aminoácido gluconeogénico no polar, que puede ser sintetizado a partir de piruvato y del catabolismo de otros aminoácidos tales como los BCAA (Figura 3). En estados de ayuno prolongado, alanina es liberada del músculo e ingresa al hígado, donde la enzima ALT transfiere el grupo amino de alanina al α -cetoglutarato (α -KG) para formar glutamato y piruvato, el cual es un sustrato gluconeogénico (Felig, 1971; Bröer, 2017; Tamarappoo, 1993).

Se ha reportado que en la EHGNA existe un incremento en la tasa de gluconeogénesis, y la mayor síntesis de glucosa se relaciona con mayor severidad de la EHGNA (Sunny, 2011). En este sentido, un trabajo realizado en sujetos con sobrepeso y obesidad, mostró que los niveles plasmáticos de glucosa y piruvato eran más altos en los individuos con EHNA en comparación con el grupo control (Kalhan, 2011). Por lo que, es posible que los niveles elevados de alanina en presencia de EHNA se deban a una mayor liberación de alanina por parte del músculo, para posteriormente ingresar al hígado y así cumplir con las elevadas tasas de gluconeogénesis que ocurren en la EHGNA.

El hecho de que solo los sujetos con DT2 mostraron mayores niveles de alanina en presencia de EHNA, sugiere que mecanismos moleculares que ocurren en presencia de la DT2 son necesarios para observar la asociación de alanina con la EHGNA. La relación existente entre la EHGNA y la regulación de gluconeogénesis en DT2 forma parte de un mecanismo de retroalimentación positiva. Por un lado, en pacientes con DT2 existe un fallo de insulina de suprimir la producción hepática de glucosa, condición asociada con la severidad de la EHGNA (Sunny, 2011). Por otra parte, uno de los factores que contribuyen al incremento en la gluconeogénesis es el aumento de la concentración hepática de precursores gluconeogénicos, tales como los AGL (Petersen, 2017). Por lo anterior, la presencia de ambas patologías, DT2 y EHGNA, contribuye a un incremento considerable de gluconeogénesis hepática, lo cual se ve reflejado en el incremento de la biodisponibilidad de alanina para ingresar al hígado y fungir como un sustrato gluconeogénico.

2.3 Aminoácidos aromáticos (AAA)

Después de los BCAA, los AA asociados con la EHGNA de forma más consistente han sido los aminoácidos aromáticos (AAA) tirosina y fenilalanina (Kaikkonen, 2017; Kalhan, 2011; Lake, 2015; Gaggini, 2018). Aun cuando fenilalanina no mostró asociación, tirosina se asoció con la EHGNA, mostrando la correlación más alta con los grados de esteatosis hepática, balonamiento hepatocelular y puntaje de actividad, además de presentar una mayor concentración en presencia de EHNA. En estudios donde se han evaluado enfermedades hepáticas severas, como hepatitis y cirrosis, los niveles de tirosina incrementan considerablemente en circulación (Fulenwider, 1978). Debido a que los AAA se metabolizan principalmente en el hígado, el daño hepatocelular que ocurre en enfermedades hepáticas severas ocasiona que disminuya el metabolismo de los AAA y estos sean liberados en mayor cantidad a la circulación (Morgan, 1982; Dejong, 2007; O'Keefe, 1981). Por lo anterior, el incremento en los niveles de tirosina podría ser un indicador del daño hepático.

De manera interesante, tanto en sujetos diabéticos como no diabéticos, los niveles de tirosina se asociaron con los rasgos histológicos de la EHGNA, consistente con la asociación reportada de este aminoácido con la RI (Hellmuth, 2016). Un estudio en adolescentes hispanos identificó un mayor grado de esteatosis hepática en los sujetos con mayores niveles de tirosina, incluso después de ajustar por la presencia de RI (Jin, 2016). Tirosina, al ser un aminoácido cetogénico, puede ser degradado directamente a acetil-CoA y entrar en la ruta de biosíntesis de triglicéridos en el hígado (Figura 15), por lo que elevados niveles elevados de tirosina pueden promover a la activación de lipogénesis de novo hepática (Hellmuth, 2016).

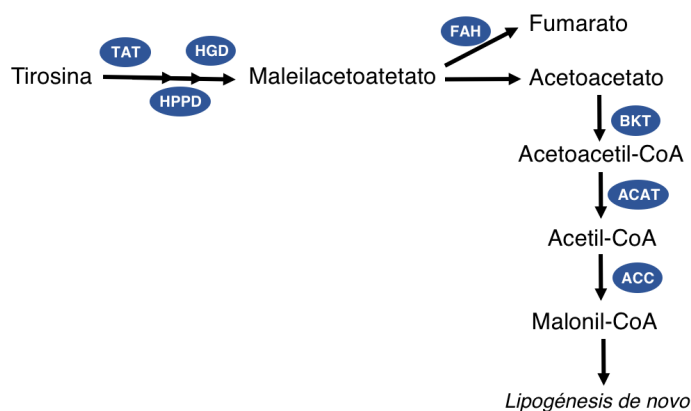


Figura 15. Metabolismo de tirosina y su relación con la lipogénesis de novo. Abreviaturas: TAT, tirosina aminotransferasa; HPPD, 4-hidroxi-fenilpiruvato dioxigenasa; HGD, homogentisato dioxigenasa; FAH, fumarilacetatoacetasa; BKT, β cetotioliasa; ACAT, Acetil-CoA acetiltransferasa; ACC, Acetil-CoA carboxilasa. Modificado de Chakrapani, 2012.

2.4 Otros aminoácidos

Un resultado novedoso del presente estudio fue la asociación de prolina con la EHGNA, pues son escasos los estudios dirigidos a la EHGNA donde hayan cuantificado este AA. Uno de ellos se llevó a cabo en población asiática, el cual identificó que los sujetos con esteatosis hepática tenían niveles más altos de prolina que los sujetos control (Chen, 2016). En el presente trabajo, los sujetos con EHGNA mostraron niveles más altos de prolina que los individuos con ES y sin EHGNA. Además, prolina se relacionó con mayores grados de esteatosis hepática, inflamación lobular y de puntaje de actividad de la EHGNA.

Prolina (junto con su derivado, hidroxiprolina) constituye >30% de la colágena, la proteína más abundante en el organismo, presente en la matriz extracelular (MEC), cicatrices tisulares y lesiones fibróticas (Wu, 2011; Szoka, 2017; Barbul, 2008). Se ha reportado que pacientes con EHGNA manifiestan un incremento en la síntesis de colágena, resultando en su deposición en el hígado. Este incremento es proporcional a la severidad de la enfermedad, alcanzando su

mayor nivel en los pacientes que desarrollan fibrosis (Murawaki, 1991). En la EHNA existe una alta prevalencia de fibrosis hepática, evento que se relaciona con una alta tasa de mortalidad (Wree, 2013). Es probable que en los sujetos con EHNA, prolina se esté liberando en mayor cantidad de la MEC de tejidos extrahepáticos para así aumentar su biodisponibilidad para la síntesis hepática de colágena. En este sentido, un estudio mostró que pacientes con cirrosis tenían un mayor contenido hepático de prolina libre y este incremento correlacionaba con la síntesis de colágena (Kershenobich, 1970). La reserva hepática de prolina es abastecida únicamente de la prolina que ingresa al hígado, pues este órgano no sintetiza prolina (Aral, 1997; Adams, 1980)

Prolina es un aminoácido no esencial que posee un anillo pirrolidina en su estructura (Figura 16), por lo que confiere rigidez y estabilidad a la estructura tridimensional de las proteínas. Debido a estas características estructurales, el primer paso en su catabolismo está constituido por un proceso de oxidación llevado a cabo por la enzima mitocondrial prolina oxidasa (POX). Esta reacción produce moléculas de aniones superóxido (O_2^-) y Δ^1 -Pirrolina 5-carboxilato (P5C) (Figura 16; Pandhare, 2009). Se ha reportado que el incremento en la concentración de aniones superóxido puede estimular la expresión de la enzima prolil hidroxilasa (encargada de sintetizar hidroxiprolina a partir de prolina) y, en consecuencia, promover la síntesis de colágena en el hígado (Hussain, 1987), por lo cual entre mayores sean los niveles de prolina, se estaría generando en mayor cantidad moléculas de aniones O_2^- y éstas estimularían la síntesis de colágena, su deposición en el hígado y favoreciendo el desarrollo de fibrosis.

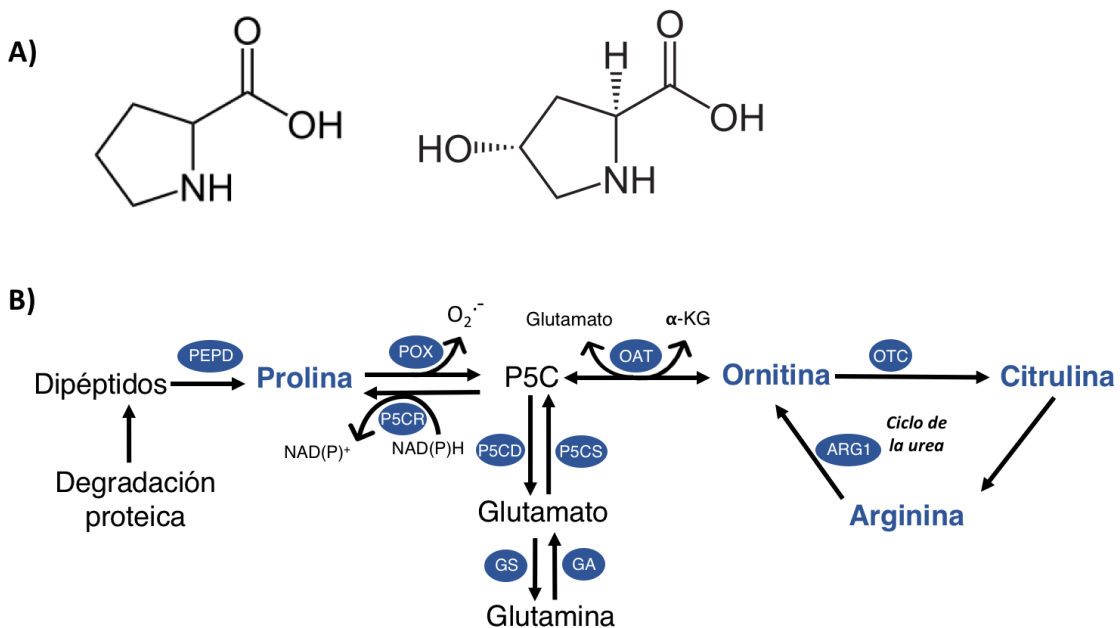


Figura 16. Estructura y metabolismo de prolina. a) Estructura de prolina e hidroxiprolina. b) Biosíntesis y metabolismo de prolina y sus subproductos catabólicos. Abreviaturas: POX, prolina oxidasa; P5C, pirrolina 5-carboxilato; P5CR, pirrolina 5-carboxilato reductasa; P5CD, pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa; P5CS, pirrolina 5-carboxilato sintetasa; GA, glutaminasa; GS, Glutamina sintetasa; OAT, Ornitina aminotransferasa; OTC, Ornitina trans-carbamoilasa; CPS1, Carbamoil fosfato sintasa 1; ARG1, arginasa1; PEPD, prolidasa. En azul se resaltan los metabolitos cuantificados en el presente estudio. Referencias: Adams, 1980; Aral, 1997; Wu, 2011; Barbul, 2008; Pandhare, 2009; Watford, 2018.

En la célula existen dos fuentes de prolina: 1) su biosíntesis, a partir de glutamato y arginina, siendo P5C el intermediario metabólico de la reacción (Figura 16), y 2) como producto de la degradación de proteínas, en forma de dipéptidos que contienen en el C-terminal prolina o hidroxiprolina (Szoka, 2017), en donde la enzima prolidasa se encarga de degradar los dipéptidos que contienen prolina y de esta forma mantener los niveles fisiológicos de prolina, tanto en circulación como en la MEC. Es posible que el incremento en los niveles de prolina observados en la EHGNA también pueda ser ocasionado por un incremento en la actividad de la enzima prolidasa, pues un estudio en pacientes con EHGNA mostró que la actividad enzimática de prolidasa en suero es mayor en los pacientes con EHNA, en comparación con sujetos con esteasosis simple y sin EHGNA, además de que la actividad de prolidasa se correlaciona con mayores grados de esteasosis hepática, inflamación lobular y puntaje de actividad del HGNA (Kayadibi, 2009).

Por otra parte, dado que al estratificar la población de estudio por el estatus de DT2, únicamente en los sujetos con diabetes permaneció significativa la asociación de prolina con la EHGNA, es posible que la presencia de DT2 aunada a los altos niveles de prolina promueva un mayor daño hepático. Se sabe que los altos niveles de glucosa en circulación pueden inducir la producción de colágena a través de distintos mecanismos, tales como:

1) *La generación de productos avanzados de glicación.* La glucosilación noenzimática de las proteínas presentes en la MEC produce entrecruzamientos que culminan en alteraciones estructurales de la MEC, las cuales son capaces de interferir en las interacciones matriz-matriz y matriz-célula, contribuyendo al desarrollo de procesos fibrogénicos (Ban, 2008). Además, los productos avanzados de glicación desempeñan un rol importante en la señalización celular, pues interactúan con receptores de productos avanzados de glicación y activan la liberación de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, contribuyendo de esta forma a las complicaciones patogénicas de la DT2.

2) *La estimulación de factores de crecimiento.* La MEC experimenta un continuo recambio, donde existe un balance en su tasa de síntesis y de degradación, para mantener la correcta

estructura y funcionalidad de los órganos. Las moléculas que regulan el recambio de la MEC incluyen diferentes factores de crecimiento como lo son TGF- β , Factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Factor de crecimiento epidermal (EGF). La presencia de DT2 contribuye a una mayor expresión y bioactividad de estos factores, contribuyendo así a un desbalance del recambio de la MEC y a una mayor producción de colágena (Kolm, 1996; Qi, 2005).

Por lo anterior, es posible que los niveles elevados de prolina, en conjunto con niveles altos de glucosa, incrementen la producción de colágena en el hígado y promuevan a la EHNA.

2.5 Acilcarnitinas de cadena corta

De acuerdo con su longitud, las AC se clasifican en AC de cadena corta, cadena media y cadena larga. Las AC de cadena media y larga son productos del metabolismo de los ácidos grasos, mientras que las de cadena corta son productos del metabolismo de aminoácidos (Rinaldo, 2008; Schooneman, 2013). Estudios han mostrado que pacientes con EHNA presentan mayores niveles de AC, tanto en tejido hepático como en la circulación, en comparación con individuos sin EHNA (Kalhan, 2011; Lake, 2015). En este estudio, las AC C3 y C4, productos del metabolismo de los BCAA, se asociaron con un mayor grado de esteatosis hepática, aunque solo los niveles de C3 fueron estadísticamente más altos en el grupo con EHNA que en el grupo control.

La AC C3 (propionil carnitina) se genera a partir de propionil-CoA, un metabolito producido en el catabolismo de valina e isoleucina, por lo que a propionil carnitina se le considera un reflejo de la reserva intracelular de propionil-CoA (Newgard, 2012). En un estudio previo se observó que los niveles en tejido hepático de C3 eran más altos en sujetos con EHNA, en comparación con sujetos sin EHNA (Lake, 2015). Es posible que los niveles más elevados de BCAA observados en los pacientes con EHNA, conduzcan a una mayor producción de propionil-CoA y, consecuentemente, una mayor producción de C3. Además, C3 se asoció con un mayor grado de esteatosis hepática y de puntaje de actividad del HGNA. El mecanismo por el cual C3 estaría asociada con la EHNA no se conoce, pero estudios *in vitro* señalan que la acumulación intracelular de su precursor, propionil-CoA, inhibe la actividad de las enzimas piruvato deshidrogenasa (PDH) y α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KDH), participantes en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA, por sus siglas en inglés; Figura 17) y reduce la síntesis de citrato, GTP y ATP (Schwab, 2006; Fenton, 2001), por lo que la acumulación de propionil-CoA

contribuiría a la disfunción mitocondrial, característica relacionada con la fisiopatología de la EHGNA (Lee, 2018).

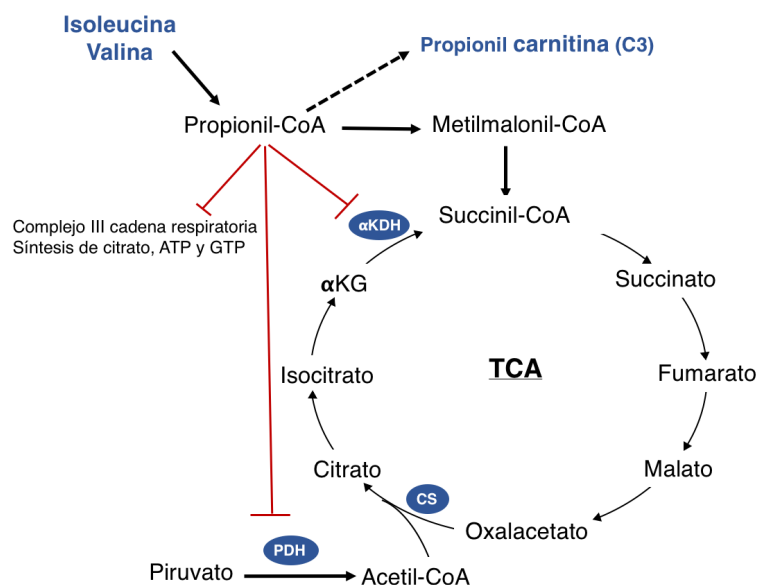


Figura 17. Metabolismo de propionil carnitina y propionil-CoA. Modificado de Wongkittichote, 2017. Schwab, 2006; Fenton, 2001. En azul se resaltan los metabolitos cuantificados en el presente estudio. Abreviaturas: αKDH, α-cetoglutarato deshidrogenasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; CS: citrato sintasa; TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

El hecho de que los BCAA no se asociaran con los rasgos histológicos de la EHGNA, pero sí su subproducto metabólico (propionil carnitina), sugiere que no solo los BCAA tienen un papel fundamental en el desarrollo de la EHGNA, sino que también sus metabolitos podrían estar involucrados en la fisiopatología de la EHGNA, incluso en mayor proporción que los mismos BCAA. Es probable que en pacientes con EHGNA y obesidad mórbida, la presencia de RI contribuya al incremento en los niveles circulantes de BCAA y estos se metabolizan en una mayor cantidad dentro del hígado, generando así un aumento en los niveles de sus productos metabólicos como propionil-CoA y propionil carnitina (C3), los cuales tendrían efectos adversos en el metabolismo energético, un rasgo íntimamente relacionado con el desarrollo y progresión de la EHGNA (Lee, 2018).

Los niveles de la AC C4 también se asociaron con el grado de esteatosis hepática. La AC C4 representa dos isómeros, butiril e isobutiril carnitina (Koeberl, 2003), siendo esta última un derivado de isobutiril-CoA, una molécula producida en el catabolismo de valina (Figura 3). Es probable que mayores niveles de valina estén dando lugar a una mayor producción de α-cetoisovalerato y su ingreso al hígado, conduciendo a una mayor producción de isobutiril-CoA

y acumulación de isobutiril carnitina (C4). Por otra parte, el incremento en la concentración intramitocondrial de propionil-CoA reflejado por mayores niveles de C3, podría ocasionar que isobutiril-CoA se acumule y salga de la mitocondria en forma de isobutiril carnitina (Figura 3), explicando los niveles elevados de la AC C4 en presencia de la EHGNA

2.6 Acilcarnitinas de cadena media y larga

A pesar de que estudios en modelos murinos han mostrado que el incremento en las concentraciones de AC de cadena larga se asocia con la EHGNA (Han, 2017; Lake, 2015), no se observaron diferencias significativas de éstas a través de los distintos grupos de EHGNA. Caso contrario para las AC de cadena media, pues los sujetos con ES y EHNA presentaron mayores niveles de octeonil carnitina (C8:1) que los individuos control, además de que C8:1 también se asoció con un mayor grado de esteatosis, balonamiento hepatocelular y puntaje de actividad del HGNA. Estos resultados son consistentes con la hipótesis que establece que un mayor ingreso de lípidos a los hepatocitos en la EHGNA, rebasaría la capacidad oxidante de la mitocondria, por lo que los intermediarios del metabolismo de lípidos, tales como las AC, se acumularían en la mitocondria en la circulación, resultando en los niveles elevados observados en presencia de la EHGNA (McCoin, 2015).

El hecho de que la concentración de la AC C8:1 también se relacionara con un mayor grado de balonamiento hepatocelular y con mayor puntaje de actividad del HGNA sugiere que esta AC no solo está relacionada con la acumulación hepática de lípidos (1ª agresión desencadenante de la EHNGA), sino que también podría estar participando en la progresión de ES a EHNA (2ª agresión desencadenante de la EHGNA). Algunos estudios señalan que además de ser intermediarios metabólicos, las AC también son moléculas bioactivas con propiedades pro-inflamatorias (McCoin, 2015). En modelos *in vitro*, la administración de AC de cadena media y larga indujo la activación de NF- κ B, un factor de transcripción participante en respuestas pro-inflamatorias (Adams, 2009). Dado que la activación de moléculas pro-inflamatorias es una característica central de la progresión de esteatosis simple a EHNA (Than, 2015; Buzzetti, 2016), es probable que el incremento de la AC C8:1 una consecuencia de la acumulación de lípidos y la disfunción mitocondrial, pero participe desarrollo de procesos inflamatorios.

3. Variación genética asociada con los metabolitos de la EHGNA

Si bien la identificación de metabolitos asociados con la EHGNA y sus rasgos histológicos provee información valiosa acerca de las rutas metabólicas y moleculares implicadas en esta

patología, no se puede establecer qué eventos moleculares ocasionan el incremento en los niveles de estos metabolitos, ni tampoco si éstos se modifican como una consecuencia de la EHGNA o si tienen un papel causal en el desarrollo de la misma. Para tener un mejor entendimiento de estas interrogantes, se procedió a identificar variantes genéticas relacionadas con los cambios observados en los niveles de los metabolitos asociados con la EHGNA y, por medio de un modelo de Aleatorización Mendeliana (AM), evaluar la causalidad de los metabolitos en la EHGNA.

3.1 Variantes asociadas con los niveles de acilcarnitinas

La asociación de variantes genéticas en *ACADS* con cambios en la concentración de isobutirilcarnitina y butirilcarnitina (C4) ha sido reportada en estudios de GWAS dirigidos a metabolitos en circulación (Tabla 2; Illig, 2009; Suhre, 2011; Shin, 2014) En todos los casos, los SNPS identificados en *ACADS* se han relacionado con mayores niveles circulantes de C4. El gen *ACADS* (acyl-CoA dehydrogenase short chain) codifica para la enzima deshidrogenasa de acil-CoA de cadena corta (SCAD), localizada en la matriz mitocondrial y que participa en la β -oxidación, catalizando la deshidrogenación de ácidos grasos de 4 y 6 carbonos (Corydon, 2001).

La variante identificada en *ACADS*, rs1799958, codifica para un cambio de aminoácido de glicina a serina en la posición 209 de la proteína SCAD (p.Gly209Ser, c.625G>A) y se predice como benigna por el programa PolyPhen. Se ha señalado que el cambio p.Gly209Ser es un causante de deficiencia moderada de SCAD, ya que estudios *in vitro* mostraron que la inserción de la variante produjo un 15% de menor actividad enzimática de SCAD en comparación con el alelo silvestre (Corydon, 2001). De esta manera, una menor actividad de SCAD causaría una acumulación de ácidos grasos de 4 y 6 carbonos (butiril y hexanoil, respectivamente), los cuales saldrían de la mitocondria y se acumularían en la circulación en forma de sus respectivas AC, siendo butiril carnitina (C4) una de ellas, explicando así por qué los sujetos portadores de la variante p.Gly209Ser en *ACADS* presentaron mayores niveles de C4.

A pesar de que la concentración de C4 se correlacionó con un mayor grado de esteatosis, y de que la variante p.Gly209Ser se asoció con mayor concentración de C4, esta variante del gen *ACADS* no se asoció con el grado de esteatosis ni con un mayor riesgo de EHGNA o de EHNA. De acuerdo con el modelo de Aleatorización Mendeliana (AM), es factible que la acumulación en suero de C4 (Figura 18), no sea un factor causal en el desarrollo de esteatosis hepática o de progresión a EHNA.

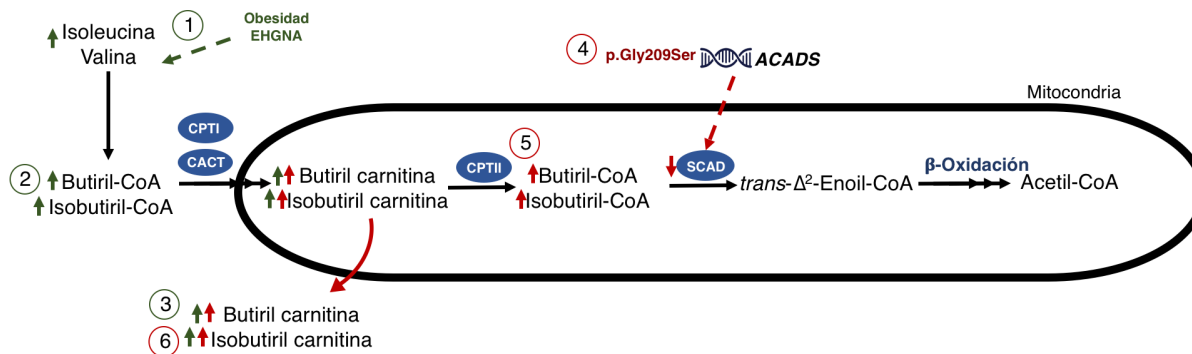


Figura 18. Efecto de la variante en ACADS en los niveles de AC C4. Modificada de Lehninger, 2008. 1) La presencia de obesidad y EHGNA conducen a elevados niveles de BCAA. 2) Como resultado, incrementan productos metabólicos como butiril-CoA e isobutiril-CoA. 3) La AC C4 se acumula dentro de la mitocondria y posteriormente sale a circulación. 4) La variante en ACADS ocasiona una menor actividad de SCAD. 5) Como consecuencia, disminuye la oxidación de butiril-CoA e isobutiril-CoA y éstas se acumulan dentro de la mitocondria. 6) Incremento en los niveles circulantes de C4, adicionales a aquellos producidos por la presencia de obesidad y EHGNA. Abreviaturas: CPT1, carnitina-O-palmitoil transferasa 1. CPT2, carnitina-O-palmitoil transferasa 2. CACT, translocasa de carnitinas-acilcarnitinas; SCAD, deshidrogenasa de acil-CoA de cadena corta; ACADS, acyl-CoA dehydrogenase short chain.

Los niveles de octenoilcarnitina (C8:1) se asociaron con un SNP ubicado en el intrón 8 del gen *SLC22A1* (Solute Carrier Family 22 Member 1) el cual codifica para el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1). Este transportador se expresa principalmente en el hígado y se localiza en la membrana basolateral de los hepatocitos (Kim, 2017). Los sustratos de OCT1 incluyen una variedad de moléculas endógenas y fármacos que poseen una amina cuaternaria en su estructura, tal como las AC (Nigam, 2018). En un estudio en modelo murino se identificó que el silenciar el gen *Slc22a1*, incrementaba la concentración hepática de las AC de cadena corta y disminuía su concentración en circulación (Km, 2017), por lo que se propuso su participación en el eflujo de AC, permitiendo el transporte de AC desde el hígado hacia la circulación.

La variante identificada en *SLC22A1*, rs62440901, se asoció con menores niveles circulantes de octenoilcarnitina (C8:1), pues los sujetos homocigotos para la variante mostraron una disminución en suero del 22% de C8:1, en comparación con los no portadores. A la fecha no existen reportes acerca de los efectos que esta variante podría estar ejerciendo en la expresión y/o funcionalidad del transportador OCT1, pero el hecho de que el SNP rs62440901 se hubiese asociado con menores niveles de C8:1 en suero sugiere que esta variante puede estar relacionada con una disminución de la capacidad de OCT1 de transportar las AC fuera del hígado, condicionando así a menores niveles circulantes de la carnitina C8:1 y, posiblemente, a mayores niveles dentro del hígado.

De acuerdo con el modelo de AM, dado que el gen *SLC22A1* no se asoció con el riesgo de EHGNA ni con sus rasgos histológicos, se puede proponer que la AC C8:1 no tiene un efecto causal en el desarrollo de la EHGNA, sino que su concentración incrementa como un resultado de la presencia de esta patología (Figura 19).

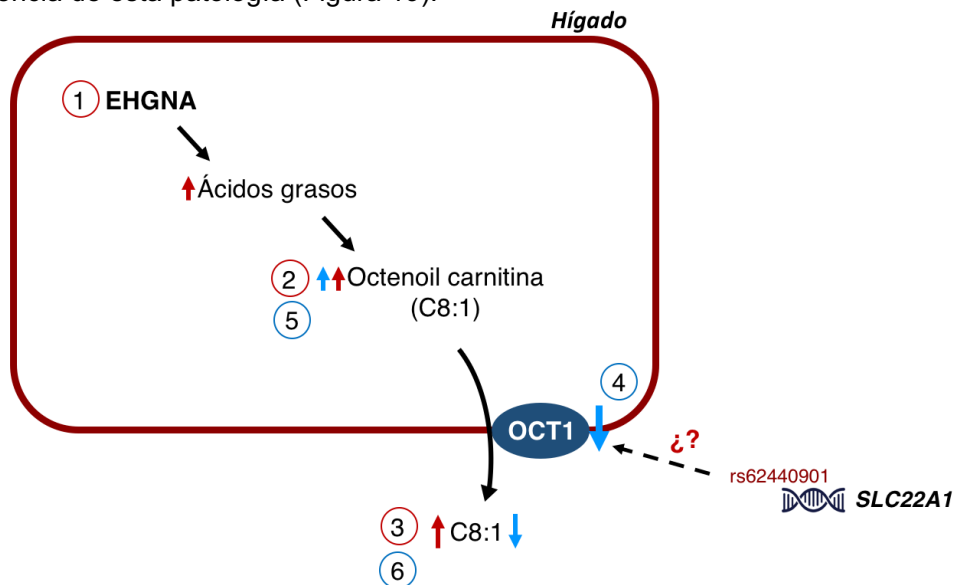


Figura 19. Efecto de la variante en *SLC22A1* en los niveles de AC C8:1. Ref. Kim, 2017. 1) En la EHGNA existe una acumulación excesiva de ácidos grasos libres (AGL) en el hígado. 2) El exceso de AGL conduce a un incremento en la concentración de AC de cadena media, como C8:1. 3) El exceso de C8:1 sale del hígado a través de OCT1. 4) A través de mecanismos desconocidos, la variante rs62440901 disminuye la capacidad de OCT1 de transportar el exceso de C8:1 fuera del hígado. 5) En consecuencia, existe una mayor acumulación de C8:1 dentro del hígado. 6) La disminución del transporte a través de OCT1 se ve reflejado como menores niveles circulantes de C8:1. Abreviaturas: OCT1, transportador de cationes orgánicos 1; *SLC22A1*, Solute Carrier Family 22 Member 1.

Es importante señalar que, a pesar de que la variación en *SLC22A1* no se asoció con el riesgo o los rasgos histológicos de la EHGNA, existe la posibilidad de que este gen tenga un papel relevante en la EHGNA. Un estudio previo en modelo murino identificó que los roedores deficientes para *SLC22A1* presentan una menor acumulación de lípidos hepáticos en comparación con los roedores silvestres (Chen, 2014). Este efecto era ocasionado porque la ausencia del transportador OCT1 impedía la entrada de tiamina, promoviendo la fosforilación de AMPK y su blanco Acetil-CoA carboxilasa (ACC), inhibiendo su actividad e impidiendo que se llevara a cabo la síntesis de novo de ácidos grasos. De tal forma que la posible menor actividad de OCT1 en presencia de la variante rs62440901, podría tener un efecto positivo para la EHGNA. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para evaluar esta posibilidad.

3.2 Variantes asociadas con los niveles de aminoácidos

La asociación de la variante rs5747933 en *PRODH* con mayores niveles de prolina ya ha sido reportada previamente (Demirkan, 2015; Koshiba, 2016). *PRODH* codifica para la enzima prolina oxidasa/deshidrogenasa (POX/PRODH), localizada en la membrana interna de la mitocondria y que lleva a cabo el primer paso en el catabolismo de prolina, oxidándola a Δ^1 -Pirrolina 5-carboxilato (P5C) (Phang, 2015; Pandhare, 2009). El SNP rs5747933 codifica para un cambio de aminoácidos de treonina a asparagina en la posición 275 de la proteína POX (Thr275Asn, 824C>A). Esta variante es mucho más frecuente en la población nativo americana (20%) que en otras poblaciones como africanos (0%) y europeos (5%), razón por la cual no se identificó en ninguno de los estudios de GWAS conducidos en poblaciones europeas, sino hasta la aplicación de otras estrategias como secuenciación de exomas y de genomas completos (Demirkan, 2015; Koshiba, 2016)

Análisis estructurales *in silico* del homólogo de POX en *E.coli* indican que la variante Thr275Asn se localiza en el extremo del dominio deshidrogenasa/oxidasa (Figura 20), y se ha propuesto que podría estar afectando la estabilidad de la enzima (Koshiba, 2016). De esta forma, la presencia de la variante Thr275Asn podría disminuir la eficiencia catalítica de POX, provocando una menor tasa metabólica de prolina y, en consecuencia, su acumulación en circulación. Esta evidencia es consistente con el incremento observado de los niveles séricos de prolina en los sujetos portadores de la variante Thr275Asn: en comparación con los no portadores, los sujetos heterocigotos para la variante tuvieron una concentración de prolina 10% más alta, y los sujetos homocigotos 38% más alta.

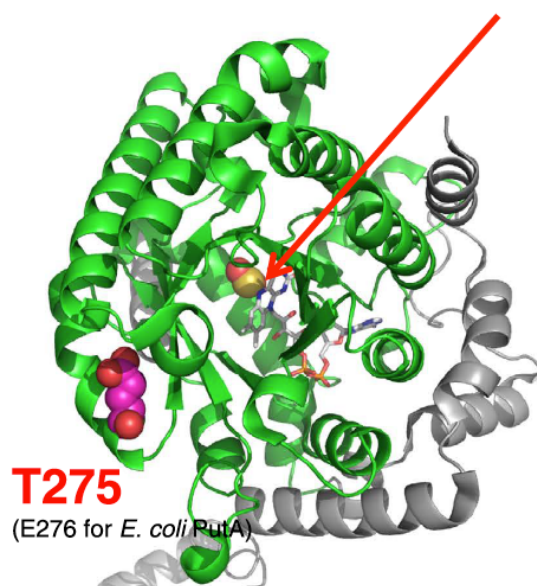


Figura 20. Localización de la variante Thr275Asn en POX. Ref. Koshiba, 2016. Representación de la estructura de la proteína *PutA*, homóloga de POX en *E. coli*. La variante E276 es homóloga a la variante Thr275Asn. En verde se resalta el dominio catalítico. El sitio catalítico está indicado por una flecha roja. La variante genética se representa en modelo esférico color magenta.

No se observaron cambios significativos de la expresión de *PRODH* a nivel de mRNA en función de la variante Thr275Asn, lo cual apoya la idea de que el efecto de la variante sobre POX es a nivel de actividad enzimática. La expresión hepática de *PRODH* tuvo una correlación negativa con los niveles de prolina, implicando que, a menores niveles hepáticos de *PRODH*, existe una mayor acumulación de prolina en circulación. No obstante, esta correlación no fue significativa, lo cual sugiere que el hígado no es el principal contribuidor al metabolismo de prolina y que otros órganos como el riñón y el intestino podrían tener un mayor efecto en el metabolismo de este aminoácido (Barbato, 2016; Adams, 1980). Por otra parte, fue interesante observar que los sujetos con EHNA, quienes presentan niveles mayores de prolina, tuvieron también una expresión hepática más alta de *PRODH*, lo cual sugiere que la sobre-expresión de *PRODH* podría ser un mecanismo de compensación para suplir la disminución en la actividad de POX (El-Brosloy, 2017).

4. Participación de prolina y *PRODH* en la EHGNA

De manera interesante, únicamente *PRODH* se asoció con mayor riesgo de EHNA, con los rasgos histológicos de la EHGNA y con la acumulación hepática de lípidos. De acuerdo con el modelo de AM, estos resultados sugieren que prolina podría estar participando tanto en el desarrollo de esteatosis, como en la progresión a esteatohepatitis.

No existen reportes acerca de la participación que prolina podría tener en la EHGNA y de cómo la actividad de POX podría contribuir a esta relación. Un estudio en fibroblastos mostró que la adición de prolina al medio de cultivo, induce la síntesis de colágena, activa la expresión de p53, del factor inducible por hipoxia 1 ($HIF-1\alpha$), y la señalización por Akt (Szoka, 2017). El gen *p53* tiene un papel importante en la activación de rutas relacionadas con apoptosis celular y arresto del ciclo celular (Yan, 2018). Además, algunos trabajos lo han vinculado con el metabolismo de lípidos y con mecanismos de daño hepatocelular relacionados con esteatosis. Aunado a ello, un estudio en modelo murino mostró que la inhibición de p53 atenuaba la esteatosis y el daño hepático (Derdak, 2013; Yahagi, 2003; Goldstein, 2012). Por su parte, se sabe que la vía PI3K/Akt tiene un papel importante en la señalización celular en la EHGNA (Matsuda, 2013). De esta forma, el incremento en los niveles circulantes de prolina, además de promover la síntesis

de colágena y la activación de procesos fibrogénicos en el hígado, podrían activar vías de señalización como las de p53 y Akt, que podrían estar participando en el desarrollo de la EHNA.

Por otra parte, el metabolismo de prolina está íntimamente relacionado con el metabolismo de otros aminoácidos como glutamina y glutamato, ya que prolina puede ser sintetizada a partir de glutamina y glutamato, a través de la acción de las enzimas glutaminasa (GA) y P5C sintetasa/reductasa (P5CS/P5CR), respectivamente (Figura 16B; Watford, 2018). Un estudio mostró que la reserva intracelular de prolina aumenta durante el proceso de activación de las células estrelladas hepáticas (CES), resultando en un incremento en la síntesis de prolina a partir de glutamina y glutamato (Li, 2017). La activación de las CES es un factor clave en la progresión de ES a EHNA ya que estas células son sintetizadoras de colágeno y, por lo tanto, se relacionan con el desarrollo de lesiones fibróticas (Byrne, 2015).

Con base en lo anterior, es posible que en los sujetos con EHNA exista un aumento en la síntesis de prolina a partir de glutamina y glutamato, ocasionando así una menor disponibilidad de glutamato para la síntesis de glutatión (GSH), la principal molécula intracelular con capacidad antioxidante (Lushchak 2012). En este sentido, estudios han mostrado que los pacientes con EHNA presentan menores niveles de GSH en circulación, sensibilizando al hígado ante el daño producido por la acumulación de ROS (Masarone, 2018). Por lo tanto, adicionalmente al menor catabolismo de prolina ocasionado por una menor actividad de POX, es posible que los altos niveles de prolina en la EHNA sean generados por su síntesis a partir de glutamato, el cual deja de ser utilizado para sintetizar GSH. Es necesario realizar más estudios donde se cuantifiquen los niveles circulantes de glutamato, glutamina y GSH para confirmar esta hipótesis.

VIII. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio realizado en población mexicana que evalúa un perfil metabolómico asociado con la EHGNA. Este trabajo permite concluir que en presencia de la EHGNA existen niveles séricos elevados de los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, tirosina, prolina, metionina y alanina, así como de las acilcarnitinas C0, C3, C4 y C8:1. Algunos de estos metabolitos también se asociaron con mayores grados de esteatosis hepática, inflamación lobular, balonamiento hepatocelular y con el puntaje de actividad del HGNA. La presencia de DT2 es un factor clave en la relación de estos metabolitos con la EHGNA. Se sabe que presentar DT2 aumenta el riesgo de desarrollar EHNA, por lo que la identificación de metabolitos asociados con la EHNA únicamente en los sujetos con DT2, sugiere que la alteración en las rutas metabólicas donde participan estos metabolitos podría ser un mecanismo por el que DT2 aumenta el riesgo de desarrollar EHNA. Las diferencias en los niveles de metabolitos asociados con la EHGNA se explicaron, en parte, por variantes genéticas localizadas en los genes *PRODH*, *ACADS* y *SLC22A1*, los cuales codifican para proteínas participantes en las rutas metabólicas de prolina, C4 y C8:1, respectivamente. De estos tres loci, únicamente *PRODH* se asoció con la EHGNA. Por consiguiente, al aplicar el modelo de AM como una aproximación para evaluar causalidad, se observó que el incremento en los niveles de prolina es un factor que conduce al desarrollo de EHNA. En conjunto, estos hallazgos contribuyen a un mejor entendimiento en la fisiopatología de la EHGNA y sitúan a las alteraciones en el metabolismo de prolina como un factor implicado en el desarrollo de EHNA.

IX. PERSPECTIVAS

Si bien se replicó la asociación reportada de la variante Thr275Asn en *PRODH* con los niveles circulantes de prolina, a la fecha no existen estudios funcionales acerca del efecto que esta variante tiene en la actividad de POX. Por ello, se requiere evaluar por medio de inmunoensayos si esta variante modula la concentración de la proteína en hígado y/o si afecta su localización celular. Asimismo, será importante evaluar en modelos murinos si el silenciamiento de *PRODH* en hígado tiene un efecto en la acumulación de lípidos o en el desarrollo de procesos inflamatorios o de fibrosis.

Este estudio aporta información valiosa acerca de la contribución que la DT2 tiene en los niveles de metabolitos asociados con el riesgo de EHNA. Sin embargo, dado el diseño transversal del mismo, es necesario conducir estudios longitudinales para evaluar si los sujetos con DT2 y niveles elevados de tirosina, alanina y prolina progresan en mayor proporción a EHNA que sus contrapartes sin DT2.

X. REFERENCIAS

- Abu Bakar MH, Sarmidi MR, Cheng KK, Ali Khan A, Suan CL, Zaman Huri H, et al. (2015). Metabolomics - the complementary field in systems biology: a review on obesity and type 2 diabetes. *Mol. Biosyst.* 11:1742–1774.
- Adams E, Frank L. (1980). Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Ann. Rev. Biochem.* 49:1005-61
- Adams LA, Feldstein AE. (2010). Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors and diagnosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 4(5):623-35.
- Adams SH, Hoppel CL, Lok KH, Zhao L, Wong SW, Minkler PE, et al. (2009). Plasma Acylcarnitine Profiles Suggest Incomplete Long-Chain Fatty Acid -Oxidation and Altered Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Type 2 Diabetic African-American Women. *J. Nutr.* 139:1073–1081.
- Adams SH. (2011). Emerging Perspectives on Essential Amino Acid Metabolism in Obesity and the insulin resistant state. *Am. Soc. Nutr. Adv nutr.* 2:445–456.
- Alkhoury N & Feldstein AE. (2016). Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet? *Metabolism: Clinical and Experimental.* 65(8):087–095.
- Alves TC, Befroy DE, Kibbey RG, Kahn M, Codella R, Carvalho RA, et al. (2011). Regulation of hepatic fat and glucose oxidation in rats with lipid-induced hepatic insulin resistance. *Hepatology.* 53(4):1175-81.
- Anderson SG, Dunn WB, Banerjee M, Brown M, Broadhurst DI, Goodacre R, et al. (2014). Evidence that multiple defects in lipid regulation occur before hyperglycemia during the prodrome of type-2 diabetes. *PLoS One.* 9(9):e103217.
- Anstee QM, Targher G, Day CP. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10:330–344.
- Aral B, Kamoun P. (1997). The proline biosynthesis in living organisms. *Amino Acids.* 13:189–217.
- Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. (2014). Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 59:1174–1197.
- Asrih M, Jornayvaz FR. (2015). Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol. Cell. Endocrinol.* 418:55–65.
- Ballestri S, Nascimbeni F, Baldelli E, Marrazzo A, Romagnoli D, Targher G, et al. (2017). Ultrasonographic fatty liver indicator detects mild steatosis and correlates with metabolic/histological parameters in various liver diseases. *Metabolism: Clinical and Experimental.* 72:57–65.
- Ban CR, Twigg SM. (2008). Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc. Health Risk Manag.* 4:575–596.

- Barbato DL, Aquilano K, Baldelli S, Cannata SM, Bernardini S, Rotilio G, *et al.* (2016). Proline oxidase – adipose triglyceride lipase pathway restrains adipose cell death and tissue inflammation. *Cell Death Differ.* 21:113–123.
- Barbul A. (2008). Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis. *J. Nutr.* 138:2021S–2024S.
- Bataller R, & Brenner, DA. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation.* 115(2),209–218.
- Bazick J, Donithan M, Neuschwander-Tetri BA, Kleiner D, Brunt EM, Wilson L, *et. al.* (2015). Clinical model for NASH and advanced, fibrosis in adult patients with diabetes and NAFLD: guidelines for referral in NAFLD *Diabetes Care.* 38(7):1347-55.
- Bell FP, DeLucia A, Bryant LR, Patt CS, Greenberg HS. (1982). Carnitine metabolism in *Macaca arctoides*: the effects of dietary change and fasting on serum triglycerides, unesterified carnitine, esterified (acyl) carnitine, and beta-hydroxybutyrate. *Am J Clin Nutr.* 36(1):115-121.
- Bray GA, Bellanger T. (2006). Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine.* 29:109–117.
- Bröer S & Bröer A. (2017). Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem J.* 474(12): 1935–1963
- Brown GT, Kleiner DE. (2016) Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism.* 65:1080–1086.
- Buchwald H, Estok R, Fahrenbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, *et al.* (2009). Weight and Type 2 Diabetes after Bariatric Surgery: Systematic Review and Meta-analysis. *Am. J. Med.* 122:248–256.e5.
- Bumgarner R. (2013). Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Current protocols in molecular biology.* Chapter 22, Unit 22.1.
- Burgess S, Small DS, Thompson SG. (2017). A review of instrumental variable estimators for Mendelian randomization. *Stat. Methods Med. Res.* 26:2333–2355.
- Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: Clinical and Experimental.* 65:1038–1048.
- Byrne CD, Targher G. (2015). NAFLD: A multisystem disease. *J. Hepatol.* 62:S47–S64.
- Camps J, Joven J. (2016). Metabolite profiling can change health-care delivery to obese patients with fatty liver disease: the search for biomarkers. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55:501–506.
- Cantoral A, Contreras-Manzano A, Luna-Villa L, Batis C, Roldán-Valadez EA, Ettinger AS. (2019). Dietary Sources of Fructose and Its Association with Fatty Liver in Mexican Young Adults. *Nutrients.* 11(3):E522.

- Chen L, Shu Y, Liang X, Chen EC, Yee SW, Zur AA, *et al.* (2014). OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:9983–9988.
- Chen Y, Li C, Liu L, Guo F, Li S, Huang L, *et al.* Serum metabolomics of NAFLD plus T2DM based on liquid chromatography – mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 49:962–966.
- Cheng S, Wiklund P, Autio R, Borra R, Ojanen X, Xu L, *et al.* (2015). Adipose tissue dysfunction and altered systemic amino acid metabolism are associated with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 10:1–17.
- Corydon MJ, Vockley J, Rinaldo P, Rhead WJ, Kjeldsen M, Winter V, *et al.* (2001). Role of common gene variations in the molecular pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res.* 49:18–23.
- Cusi K. (2009). Role of insulin resistance and lipotoxicity in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 13(4):545-63.
- Cusi K. (2012). Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 142:711–725.
- Day CP & James OF. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 114(4):842-5.
- Dejong C, van de Poll M, Soeters P, Jalan R, Damink S. (2007). Aromatic amino acid metabolism during liver failure. *J Nutr.* 137(6):1579S-1585S.
- DeMaria EJ. (2007). Bariatric Surgery for Morbid Obesity. *N Engl J Med.* 356:2176-2183
- Demirkan A, Henneman P, Verhoeven A, Dharuri H, Amin N, van Klinken JB, *et al.* (2015). Insight in Genome-Wide Association of Metabolite Quantitative Traits by Exome Sequence Analyses. *PLoS Genet.* 11(1):e10044835.
- Derdak Z, Villegas KA, Harb R, Wu AM, Sousa A, Wands JR. (2013). Inhibition of p53 attenuates steatosis and liver injury in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 58(4):785–791.
- Dharuri H, Demirkan A, van Klinken JB, Mook-Kanamori DO, van Duijn CM, 't Hoen PAC, *et al.* (2014). Genetics of the human metabolome, what is next? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842:1923–1931.
- Draisma HHM, Pool R, Kobl M, Jansen R, Petersen A-K, Vaarhorst AAM, *et al.* (2015). Genome-wide association study identifies novel genetic variants contributing to variation in blood metabolite levels. *Nat. Commun.* 6:7208.
- Dumas ME, Kinross J, Nicholson JK. (2014). Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. *Gastroenterology.* 146:46–62.

- El-Brolosy MA, Stainier DYR. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.* 13:1–17.
- Felig P & Wahren J. (1971) Amino acid metabolism in exercising man. *J. Clin. Invest.* 50(12):2703-14.
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS, Scriver CR, Beaudert AL, Sly WS, *et al.* (2001). Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease.* 2165–2193.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stalney GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18(6):499-502.
- Fulenwider JT, Nordlinger BM, Faraj BA, Ivey GL, Rudman D. (1978). Deranged Tyrosine Metabolism in Cirrhosis. *Yale J Biol Med.* 51(6):625–633.
- Gaggini M, Carli F, Rosso C, Buzzigoli E, Marietti M, Della Latta V, *et al.* (2018). Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatology.* 67:145–158.
- Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, Hrabce M, Kronenberg F, Meltinger T, *et al.* (2008). Genetics Meets Metabolomics : A Genome-Wide Association Study of Metabolite Profiles in Human Serum. *PLoS Genetics.* 4(11):e100282.
- Goh GB & McCullough AJ. (2006). Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences.* 61(5):1226-33
- Goh GB, Pagadala MR, Dasarathy J, Unalp-Arida A, Sargent R, Hawkins C. *et al.* (2014). Clinical spectrum of non-alcoholic fatty liver disease in diabetic and non-diabetic patients. *BBA Clin.* 3:141–145.
- Goldstein I, Rotter V. (2012). Regulation of lipid metabolism by p53 - fighting two villains with one sword. *Trends Endocrinol. Metab.* 23:567–575.
- Haas JT, Francque SM, Staels B. (2016). Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 78:18.1-18.25.
- Han J, Dzierlenga AL, Lu Z, Billheimer DD, Torabzadeh E, Lake AD, *et al.* (2017). Metabolomic Profiling Distinction of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression from a Common Rat Model. *Obesity (Silver Spring).* 25(6):1069-1076.
- Hannah WN Jr & Harrison SA. (2016). Noninvasive imaging methods to determine severity of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 64(6):2234-2243.

- Hellmuth C, Kirchberg FF, Lass N, Harder U, Peissner W, Koletzko B, *et al.* (2016). Tyrosine Is Associated with Insulin Resistance in Longitudinal Metabolomic Profiling of Obese Children. *J. Diabetes Res.* 2016:2108909
- Hernández-Avila M, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, *et al.* Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016: Resultados ponderados. Instituto Nacional de Salud Pública. 14 de diciembre de 2016.
- Holmes M V., Ala-Korpela M, Smith GD. (2017). Mendelian randomization in cardiometabolic disease: Challenges in evaluating causality. *Nat. Rev. Cardiol.* 14:577–599.
- Hussain MZ, Watson JA, Bhathgar Rs. (1987). Increased prolyl hydroxylase activity and collagen synthesis in hepatocyte cultures exposed to superoxide. *Hepatology.* 7:502-507.
- Illig T, Gieger C, Zhai G, Römisch-margl W, Wang-sattler R, Prehn C, *et al.* (2009). A genome-wide perspective of genetic variation in human metabolism. *Nat. Genet.* 42:137–141.
- Iwasa M, Ishihara T, Mifuji-Moroka R, Fujita N, Kobayashi Y, Hasegawa H, *et al.* (2015). Elevation of branched-chain amino acid levels in diabetes and NAFL and changes with antidiabetic drug treatment. *Obes. Res. Clin. Pract.* 9:293–297.
- Jeong SH, Kim HB, Kim MC, Lee JM, Lee JH, Kim JH, *et al.* (2018). Hippo-mediated suppression of IRS2/AKT signaling prevents hepatic steatosis and liver cancer. *J. Clin. Invest.* 128:1010–1025.
- Jin R, Banton S, Tran VT, Konomi J V., Li S, Jones DP, *et al.* (2016). Amino acid metabolism is altered in adolescents with nonalcoholic fatty liver disease - An untargeted, high resolution metabolomics study. *J. Pediatr.* 172:14–19e5.
- Juárez-Hernández E, Chávez-Tapia NC, Brizuela-Alcántara DC, Uribe M, Ramos-Ostos MH, Nuño-Lámbarrri N. (2018). Association Between Serum Hemoglobin Levels and Non Alcoholic Fatty Liver Disease in a Mexican Population. *Annals of Hepatology.* 17(4):577-584.
- Lohman TG, Roche AG, Martorell R. (1988). Anthropometric standardization reference manual. Champaign, IL: Human Kinetics Book.
- Lotta LA, Scott RA, Sharp SJ, Burgess S, Luan J, Tillin T, *et al.* (2016). Genetic Predisposition to an Impaired Metabolism of the Branched-Chain Amino Acids and Risk of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomisation Analysis. *PLoS Med.* 13:1–22.
- Kaikkonen JE, Würtz P, Suomela E, Lehtovirta M, Kangas AJ, Jula A, *et al.* (2017). Metabolic profiling of fatty liver in young and middle-aged adults: Cross-sectional and prospective analyses of the Young Finns Study. *Hepatology.* 65:491–500.
- Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, *et al.* (2011). Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 60:404–413.
- Kayadibi H, Gültepe M, Yasar B, Ince AT, Ozcan O, Ipcioglu OM, *et al.* (2009). Diagnostic value of serum prolidase enzyme activity to predict the liver histological lesions in non-

alcoholic fatty liver disease: A surrogate marker to distinguish steatohepatitis from simple steatosis. *Dig. Dis. Sci.* 54:1764–1771.

Kershenovich D, Fierro FJ, Rojkind M. (1970). The relationship between the free pool of proline and collagen content in human liver cirrhosis. *Journal of Clinical Investigation.* 49:2246-2249.

Kettunen J, Tukiainen T, Sarin AP, Ortega-Alonso A, Tikkanen E, Lytykäinen LP, *et al.* (2012). Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels. *Nat. Genet.* 44:269–276.

Kettunen J, Demirkan A, Würtz P, Draisma HHM, Haller T, Rawal R, *et al.* (2016). Genome-wide study for circulating metabolites identifies 62 loci and reveals novel systemic effects of LPA. *Nat. Commun.* 7:1–9.

Kim HI, Raffler J, Lu W, Lee JJ, Abbey D, Saleheen D, *et al.* (2017). Fine Mapping and Functional Analysis Reveal a Role of SLC22A1 in Acylcarnitine Transport. *Am J Hum Genet.* 101(4):489-502.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, *et al.* (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 41:1313–1321.

Koeberl DD, Young SP, Gregersen N, Vockley J, Smith WE, Benjamin DK, *et al.* (2003). Rare disorders of metabolism with elevated butyryl- and isobutyryl-carnitine detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *Pediatr. Res.* 54:219–223.

Kolm V, Sauer U, Olgemöller B, Schleicher ED. (1996). High glucose-induced TGF-beta 1 regulates mesangial production of heparan sulfate proteoglycan. *Am J Physiol.* 270(5):F812-F821.

Koshiha S, Motoike I, Kojima K, Hasegawa T, Shirota M, Saito T, *et al.* (2016). The structural origin of metabolic quantitative diversity. *Sci. Rep.* 6:1–14.

Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson DG, Reily MD, *et al.* (2015). Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids.* 47(3):603-15.

Lanthier N. (2015). Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? *World J Hepatol.* 7(9):8–88.

Lallukka S, Yki-Järvinen H. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30:385–395.

Lee K, Haddad A, Osme A, Kim C, Borzou A, Ilchenko S. *et al.* (2018). Hepatic Mitochondrial Defects in a Nonalcoholic Fatty Liver Disease Mouse Model Are Associated with Increased Degradation of Oxidative Phosphorylation Subunits. *Mol Cell Proteomics.* 17(12):2371-2386

Levene AP, Goldin RD. (2012). The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology.* 61(2):141-52.

- Li J, Ghazwani M, Liu K, Huang Y, Chang N, Fan J, *et al.* (2017). Regulation of hepatic stellate cell proliferation and activation by glutamine metabolism. *PLoS One*. 12:1–17.
- Liu Q, Bengmark S, Qu S. (2010). The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis*. 9:42.
- Liu W, Baker R, Bhatia T, Zhu L, Baker S. (2016). Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sci*. 73(10):1969-87.
- Lizardi-Cervera J, Laparra DI, Chávez-Tapia NC, Ostos ME, Esquivel MU. (2006). Prevalence of NAFLD and metabolic syndrome in asymptomatic subjects. *Rev Gastroenterol Mex*. 71(4):453-9.
- Long T, Hicks M, Yu H-C, Biggs WH, Kirkness EF, Menni C, *et al.* (2017). Whole-genome sequencing identifies common-to-rare variants associated with human blood metabolites. *Nat. Genet*. 49:568–578.
- López-Velázquez JA, Silva-Vidal KV, Ponciano-Rodríguez G, Chávez-Tapia NC, Arrese M, Uribe M, *et al.* (2014). The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann Hepatol*. 13(2):166-78
- Lu J, Xie G, Jia W, Jia W. (2013). Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids. *Front Med*. 7(1):53-9.
- Lushchak VI. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012:736837.
- Lynch CJ & Adams SH. (2014). Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol*. 10:723–736.
- Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. (2006). Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J. Hepatol*. 45:600–606.
- Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C, *et al.* (2018). Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2018:9547613.
- Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419.
- Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y. (2013). Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Endocrinol*. 2013:1–7.
- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 116(6):1413-1419.
- McCoin CS, Knotts TA, Adams SH. (2015). Acylcarnitines--old actors auditioning for new roles in metabolic physiology. *Nat. Rev. Endocrinol*. 11:617–25.

- Milić S, Lulić D, Štimac D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J. Gastroenterol.* 20:9330–9337.
- Moreno-del Castillo MC, Sánchez-Rodríguez A, Hernández-Buen Abad JJ, Aguirre-Valadez J, Ruiz I, García-Buen Abad R, *et. al.* (2018). Importance of Evaluating Cardiovascular Risk and Hepatic Fibrosis in Patients With Newly Diagnosed Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 17(5):997-999.
- Morgan MY, Marshall AW, Milsom JP, Sherlock S. (1982). Plasma amino-acid patterns in liver disease. *Gut.* 23(5):362–370.
- Mu WC, Vanhoosier E, Elks CM, Grant RW. (2018). Long-term effects of dietary protein and branched-chain amino acids on metabolism and inflammation in mice. *Nutrients.* 10(7).pii: E918.
- Murawaki Y, Kato S, Hirayama C. (1991). Hepatic collagen synthesis in patients with alcoholic and nonalcoholic liver disease. *Gastroenterol. Jpn.* 26(4):465–471.
- Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, *et al.* (2009). A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab.* 9:311–326.
- Newgard CB. (2012). Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metabolism.* 5(5):606–6.
- Nigam SK. (2018). The SLC22 Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58:663–87.
- Noland RC, Koves TR, Seiler SE, Lum H, Lust RM, Ilkayeva O. (2009). Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J Biol Chem.* 284(34):22840-52.
- O’Keefe SJD, Abraham R, Marshall W, Davis M, Williams R. (1981). Increased Plasma Tyrosine Concentrations in Patients with Cirrhosis and Fulminant Hepatic Failure Associated with Increased Plasma Tyrosine Flux and Reduced Hepatic Oxidation Capacity. *Gastroenterology.* 81:1017–1024.
- Pandhare J, Donald SP, Cooper SK, Phang JM. (2009). Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress. *J. Cell. Biochem.* 107:759–768.
- Patterson RE, Kalavalapalli S, Williams CM, Nautiyal M, Mathew JT, Martinez J, *et al.* (2016). Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 310:E484–E494.
- Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 13(10):572–587.
- Phang JM, Liu W, Hancock CN, Fischer JW. (2015). Proline metabolism and cancer: Emerging links to glutamine and collagen. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 18:71–77.

- Pochini L, Oppedisano F, Indiveri C. (2004). Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1661(1):78-86.
- Reccia I, Kumar J, Akladios C, Viridis F, Pai M, Habib N, et al. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 72:94–108.
- Reid DT, Reyes JL, McDonald BA, Vo T, Reimer RA, Eksteen B. (2016). Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. *PLoS One*. 11(7):e0159524.
- Rhee EP, Ho JE, Chen MH, Shen D, Cheng S, Larson MG, et al. (2013). A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort. *Cell Metab*. 18:130–143.
- Rhee EP, Yang Q, Yu B, Liu X, Cheng S, Deik A, et al. (2016). An exome array study of the plasma metabolome. *Nat. Commun*. 7:1–7.
- Rinaldo P, Cowan TM, Matern D. (2008). Acylcarnitine profile analysis. 10:151–156.
- Rinella ME. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 313(22):2263-73.
- Qi W, Twigg S, Chen X, Polhill TS, Poronnik P, Gilbert RE, et al. (2005). Integrated actions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288(4):F800-9.
- Sattar N, Forrest E, Preiss D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ*. 29;349:g4596.
- Schooneman MG, Vaz FM, Houten SM, Soeters MR. (2013). Acylcarnitines: Reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes*. 62:1–8.
- Sookoian S, Pirola CJ. (2017). Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 23(1):1-12.
- Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, Van den Heuvel LP, et al. (2006). Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem. J*. 398:107–112.
- Shah SH, Hauser ER, Bain JR, Muehlbauer MJ, Haynes C, Stevens RD, et al. (2009). High heritability of metabolomic profiles in families burdened with premature cardiovascular disease. *Mol. Syst. Biol*. 5:258.
- Shin SY, Fauman EB, Petersen AK, Krumsiek J, Santos R, Huang J, et al. (2014). An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nat Genet*. 46:543–550.
- Suhre K, Shin SY, Petersen AK, Mohny RP, Meredith D, (2011). Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature*. 477(7362):54-60.
- Suhre K, Raffler J, Kastenmüller G. (2016). Biochemical insights from population studies with genetics and metabolomics. *Arch. Biochem. Biophys*. 589:168–176.

- Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC. (2011). Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 14:804–810.
- Sunny NE, Kalavalapalli S, Bril F, Garrett TJ, Nautiyal M, Mathew JT, *et al.* (2015). Cross-talk between branched-chain amino acids and hepatic mitochondria is compromised in nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309:E311-9.
- Szoka L, Karna E, Hlebowicz-Sarat K, Karaszewski J, Palka JA. (2017). Exogenous proline stimulates type I collagen and HIF-1 α expression and the process is attenuated by glutamine in human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 435:197–206.
- Takahashi Y, Fukusato T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* 20:15539–15548.
- Tamarappoo BK, Nam M, Kilberg MS, Welbourne TC. (1993). Glucocorticoid regulation of splanchnic glutamine, alanine, glutamate, ammonia, and glutathione fluxes. *Am J Physiol.* 264(4):E526-33.
- Teumer A. (2018). Common Methods for Performing Mendelian Randomization. *Front. Cardiovasc. Med.* 5:1–7.
- Than NN, Newsome PN. (2015) A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis.* 239:192–202.
- Tilg H, Moschen AR. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 52:1836–1846.
- Tilg H, Moschen AR, Roden M. (2017). NAFLD and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14:32–42.
- Toye AA, Dumas ME, Blancher C, Rothwell AR, Fearnside JF, Wilder SP, *et. al.* (2017). Subtle metabolic and liver gene transcriptional changes underlie diet-induced fatty liver susceptibility in insulin-resistant mice. *Diabetologia.* 50(9):867-879.
- Vinciguerra F, Baratta R, Farina MG, Tita P, Padova G, Vigneri R, *et al.* (2013). Very severely obese patients have a high prevalence of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Acta Diabetol.* 50:443–449.
- Voiculescu M, Nanau RM, Neuman MG. (2014). Non-invasive biomarkers in non-alcoholic steatohepatitis-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis.* 23(4):425-9.
- Watford M. (2018). Glutamine Metabolism and Function in Relation to Proline Synthesis and the Safety of Glutamine and Proline Supplementation. *J. Nutr.* 138:2003S–2007S.
- Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DN, Shaw J, Contreras M, *et. al.* (2011). Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology.* 140(1):124-31.

- Wong VW-S, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GL-H, Sookoian S. (2018). Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15:461–478.
- Wongkittichote P, Ah Mew N, Chapman KA. (2017). Propionyl-CoA carboxylase – A review. *Mol. Genet. Metab.* 122:145–152.
- Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. (2013). From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10:627–636.
- Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, *et al.* (2011). Proline and hydroxyproline metabolism: Implications for animal and human nutrition. *Amino Acids.* 40:1053–1063.
- Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Sekiya M, Najima Y, Okazaki S, *et al.* (2004). p53 Involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* 279:20571–20575.
- Yan Z, Miao X, Zhang B, Xie J. (2018). P53 As a Double-Edged Sword in the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Life Sci.* 215:64–72.
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 64:73–84.
- Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, *et al.* (2018). Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15:11–20.
- Yu B, Zheng Y, Alexander D, Morrison AC, Coresh J, Boerwinkle E. (2014). Genetic Determinants Influencing Human Serum Metabolome among African Americans. *PLoS Genet.* 10:1–8.
- Yu J, Shen J, Sun TT, Zhang X, Wong N. (2013). Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 23(6 Pt B):483-91.
- Zhang F, Zhao S, Yan W, Xia Y, Chen X, Wang W, *et al.* (2016). Branched Chain Amino Acids Cause Liver Injury in Obese/Diabetic Mice by Promoting Adipocyte Lipolysis and Inhibiting Hepatic Autophagy. *EBioMedicine.* 13:157–167.

XI. ANEXOS

Tabla suplementaria 1. Lista de metabolitos séricos cuantificados por espectrometría de masas en tándem.

Nombre	Clasificación	Nomenclatura	Estándar interno
AMINOÁCIDOS			
Alanina	No polares	Ala	² H ₄ -Ala
Arginina	No polares	Arg	² H ₄ , ¹³ C-Arg
Glicina	No polares	Gly	² N, ² - ¹³ C-Gly
Metionina	No polares	Met	² H ₃ -Met
Prolina	No polares	Pro	¹³ C ₅ -Pro
Fenilalanina	No polares/ Aromáticos	Phe	¹³ C ₆ -Phe
Tirosina	Polares/ Aromáticos	Tyr	¹³ C ₅ -Tyr
Leucina/ Isoleucina	No polares/ de cadena ramificada	Leu/Ileu	² H ₃ -Leu
Valina	No polares/de cadena ramificada	Val	² H ₈ -Val
Citrulina	No proteicos	Cit	² H ₂ -Cit
Ornitina	No proteicos	Orn	² H ₆ -Orn
ACILCARNITINAS			
Carnitina libre		C0	² H ₉ -C0
Acetil carnitina	Cadena corta	C2	² H ₃ -C2
Propionil carnitina	Cadena corta	C3	² H ₃ -C3
Malonil/3-hidroxi-butil carnitina	Cadena corta	C3DC/C4OH	² H ₃ -C4
Butiril carnitina	Cadena corta	C4	² H ₃ -C4
Methylmalonil/ 3-hidroxi-isovaleril carnitina	Cadena corta	C4DC/C5OH	² H ₃ -C5
Isovaleril carnitina	Cadena corta	C5	² H ₉ -C5
Tigilil carnitina	Cadena corta	C5:1	² H ₉ -C5
Glutaril/3-Hidroxi-hexanoil carnitina	Cadena corta	C5DC/C6OH	² H ₆ -C5DC
Hexanoil carnitina	Cadena media	C6	² H ₃ -C6
Adipil carnitina	Cadena media	C6DC	² H ₆ -C5DC
Octanoil carnitina	Cadena media	C8	² H ₃ -C8
Octenoil carnitina	Cadena media	C8:1	² H ₃ -C8
Decanoil carnitina	Cadena media	C10	² H ₃ -C10
Decenoil carnitina	Cadena media	C10:1	² H ₃ -C10
Decadienoil carnitina	Cadena media	C10:2	² H ₃ -C10
Dodecanoil carnitina	Cadena media	C12	² H ₃ -C12

Dodecenoil carnitina	Cadena media	C12:1	² H ₃ -C12
Tetradecanoil (Miristoil) carnitina	Cadena larga	C14	² H ₃ -C14
Tetradecenoil carnitina	Cadena larga	C14:1	² H ₃ -C14
Tetradecadienoil carnitina	Cadena larga	C14:2	² H ₃ -C14
3-Hidroxi-tetradecanoil carnitina	Cadena larga	C14OH	² H ₃ -C14
Hexadecanoil (Palmitoil) carnitina	Cadena larga	C16	² H ₃ -C16
Hexadecenoil carnitina	Cadena larga	C16:1	² H ₃ -C16
3-Hidroxi-hexadecanoil carnitina	Cadena larga	C16OH	² H ₃ -C16
3-hidroxi-hexadecenoil carnitina	Cadena larga	C16:1OH	² H ₃ -C16
Octadecanoil (stearoil) carnitina	Cadena larga	C18	² H ₃ -C18
Octadecenoil (Oleil) carnitina	Cadena larga	C18:1	² H ₃ -C18
Octadecadienoil (Linoleil) carnitina	Cadena larga	C18:2	² H ₃ -C18
3-Hidroxi-octadecanoil carnitina	Cadena larga	C18OH	² H ₃ -C18
3-Hidroxi-octadecenoil carnitina	Cadena larga	C18:1OH	² H ₃ -C18

Los metabolitos sombreados en gris son aquellos cuyas concentraciones cuantificadas estuvieron por debajo del límite de detección en más del 50% de los sujetos.

Tabla Suplementaria 2. Correlaciones de niveles séricos de metabolitos con determinaciones bioquímicas

Metabolito	Glucosa		Insulina		HOMA-IR		HbA1c		TG		CT		C-HDL	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Leu	-0.26	5.8E-07	-0.03	0.67	-0.04	0.64	-0.01	0.99	0.10	0.11	0.14	0.02	0.08	0.19
Val	-0.28	2.3E-07	-0.05	0.46	-0.11	0.21	0.03	0.73	0.13	0.02	0.19	4.6E-04	0.14	0.02
Ala	-0.06	0.32	0.05	0.50	0.01	0.95	0.08	0.29	0.26	6.8E-07	0.15	0.01	0.07	0.29
Tyr	-0.14	0.02	0.11	0.08	0.06	0.50	0.04	0.57	0.27	4.2E-07	0.19	7.3E-04	0.08	0.19
Pro	-0.12	0.04	0.04	0.60	0.06	0.50	-0.05	0.50	0.23	1.4E-05	0.11	0.05	0.04	0.57
Met	-0.19	4.6E-04	0.04	0.56	0.01	0.91	-0.01	0.99	0.12	0.03	0.09	0.16	0.12	0.04
C0	-0.10	0.09	0.04	0.57	-0.02	0.83	0.06	0.41	0.24	5.2E-06	0.19	4.6E-04	0.21	8.0E-05
C3	-0.15	0.01	-0.07	0.29	-0.20	0.02	-0.09	0.20	0.13	0.02	0.08	0.19	0.05	0.40
C4	-0.12	0.05	0.01	0.95	-0.06	0.54	0.00	0.99	0.13	0.03	0.06	0.35	0.13	0.03
C8:1	-0.06	0.38	0.05	0.47	-0.01	0.95	0.11	0.10	0.38	2.7E-14	0.19	4.6E-04	0.06	0.35

continuación

Metabolito	C-LDL		ALT		AST		GGT		Leptina		Adiponectina	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Leu	0.12	0.05	0.14	0.02	0.13	0.02	0.10	0.10	-0.21	4.6E-04	-0.05	0.50
Val	0.15	0.01	0.12	0.03	0.04	0.54	0.14	0.02	-0.19	2.8E-03	-0.04	0.57
Ala	0.06	0.36	0.25	2.7E-06	0.27	3.4E-07	0.17	2.0E-03	-0.06	0.38	-0.07	0.32
Tyr	0.11	0.06	0.18	1.3E-03	0.13	0.02	0.19	4.6E-04	0.05	0.47	-0.09	0.19
Pro	0.05	0.43	0.10	0.10	0.13	0.03	0.09	0.15	-0.05	0.53	-0.04	0.54
Met	0.03	0.68	0.18	1.1E-03	0.20	4.6E-04	0.09	0.12	-0.05	0.53	-0.04	0.57
C0	0.09	0.14	0.02	0.70	-0.07	0.24	0.12	0.03	0.08	0.21	0.15	0.02
C3	0.03	0.66	0.12	0.05	0.10	0.09	0.10	0.08	-0.10	0.15	-0.03	0.68
C4	-0.01	0.95	0.12	0.04	0.07	0.24	0.12	0.04	0.01	0.99	0.03	0.67
C8:1	0.06	0.32	-0.02	0.74	-0.04	0.57	0.14	0.02	-0.01	0.99	-0.02	0.80

Tabla suplementaria 3. Correlaciones de niveles séricos de metabolitos con los rasgos histológicos de la EHGNA, estratificando por estatus de DT2.

Metabolito	Estatus DMT2	Grado de esteatosis		Inflamación lobular		Balonamiento hepatocelular		Puntaje de actividad del HGNA		
		r	p	r	p	r	p	r	p	
BCAA y aminoácidos relacionados con su catabolismo										
Leu	sin DMT2	0.05	0.74	0.001	1.00	-0.03	0.86	0.01	0.93	
	con DMT2	0.22	0.09	0.09	0.53	0.06	0.73	0.16	0.23	
Val	sin DMT2	0.09	0.42	-0.02	0.88	-0.02	0.92	0.03	0.86	
	con DMT2	0.20	0.11	0.03	0.87	0.05	0.78	0.12	0.41	
Ala	sin DMT2	0.10	0.40	0.05	0.73	0.15	0.13	0.13	0.26	
	con DMT2	0.30	0.01	0.35	3.0E-03	0.33	4.6E-03	0.41	2.6E-04	
AA aromáticos y otros aminoácidos										
Phe	sin DMT2	0.08	0.50	-0.001	0.99	0.09	0.40	0.07	0.54	
	con DMT2	0.19	0.13	0.24	0.06	0.15	0.25	0.24	0.06	
Tyr	sin DMT2	0.25	1.7E-03	0.05	0.73	0.23	4.4E-03	0.23	4.4E-03	
	con DMT2	0.29	0.02	0.28	0.02	0.23	0.07	0.33	4.2E-03	
Pro	sin DMT2	0.12	0.30	-0.02	0.91	0.11	0.31	0.09	0.40	
	con DMT2	0.40	2.6E-04	0.35	3.0E-03	0.31	0.01	0.44	7.1E-05	
Arg	sin DMT2	0.08	0.50	-0.01	0.94	-0.02	0.91	0.03	0.86	
	con DMT2	-0.04	0.80	-0.08	0.62	-0.16	0.22	-0.11	0.44	
Met	sin DMT2	0.13	0.25	0.01	0.93	0.12	0.27	0.12	0.30	
	con DMT2	0.27	0.03	0.22	0.09	0.21	0.09	0.29	0.01	
Gly	sin DMT2	-0.16	0.09	-0.09	0.40	-0.06	0.67	-0.14	0.20	
	con DMT2	0.10	0.48	0.21	0.09	0.20	0.11	0.21	0.09	
Cit	sin DMT2	0.03	0.86	-0.07	0.54	0.04	0.84	-0.001	1.00	
	con DMT2	0.12	0.40	0.14	0.30	0.04	0.80	0.13	0.36	
Orn	sin DMT2	0.001	1.00	0.01	0.99	0.05	0.73	0.02	0.88	
	con DMT2	0.19	0.13	0.16	0.21	0.24	0.06	0.24	0.06	
Acilcarnitinas										
C0	sin DMT2	0.12	0.30	-0.001	0.99	0.11	0.35	0.10	0.40	
	con DMT2	0.12	0.42	0.21	0.10	0.07	0.66	0.17	0.20	
C2	sin DMT2	-0.06	0.63	0.001	0.99	0.10	0.40	0.01	0.97	
	con DMT2	-0.08	0.60	0.13	0.33	0.04	0.80	0.04	0.80	
C3	sin DMT2	0.21	0.01	0.02	0.89	0.07	0.56	0.14	0.17	
	con DMT2	0.20	0.11	0.02	0.87	0.11	0.42	0.14	0.30	
C4	sin DMT2	0.16	0.09	-0.05	0.73	0.06	0.63	0.09	0.44	
	con DMT2	0.20	0.11	-0.03	0.86	0.05	0.78	0.09	0.53	
C5	sin DMT2	0.16	0.09	-0.05	0.73	0.09	0.40	0.10	0.40	

	con DMT2	0.03	0.86	0.09	0.53	0.03	0.86	0.06	0.68
C5OH/ C4DC	sin DMT2	0.04	0.77	-0.03	0.86	0.03	0.85	0.02	0.86
	con DMT2	0.10	0.49	0.17	0.19	-0.04	0.80	0.10	0.48
C5DC/ C6OH	sin DMT2	0.04	0.83	-0.04	0.82	0.06	0.67	0.02	0.86
	con DMT2	0.20	0.11	0.22	0.09	0.10	0.51	0.22	0.09
C6DC	sin DMT2	-0.10	0.40	-0.06	0.66	-0.07	0.61	-0.10	0.40
	con DMT2	0.001	0.98	0.25	0.06	0.14	0.31	0.16	0.22
C8	sin DMT2	-0.01	0.94	-0.04	0.81	-0.03	0.86	-0.03	0.86
	con DMT2	0.01	0.95	0.01	0.94	-0.06	0.74	-0.01	0.95
C8:1	sin DMT2	0.26	1.1E-03	0.03	0.85	0.18	0.07	0.21	0.01
	con DMT2	0.17	0.19	0.22	0.08	0.05	0.78	0.19	0.13
C10	sin DMT2	-0.03	0.86	-0.06	0.63	-0.02	0.90	-0.05	0.75
	con DMT2	-0.09	0.53	0.02	0.89	-0.11	0.43	-0.07	0.64
C10:1	sin DMT2	-0.02	0.86	-0.01	0.94	-0.04	0.82	-0.03	0.86
	con DMT2	-0.001	0.98	-0.09	0.56	0.01	0.94	-0.03	0.84
C12	sin DMT2	-0.06	0.63	0.05	0.73	-0.04	0.80	-0.03	0.86
	con DMT2	-0.02	0.93	0.18	0.17	0.08	0.57	0.10	0.48
C12:1	sin DMT2	-0.10	0.40	0.07	0.58	-0.08	0.50	-0.05	0.72
	con DMT2	0.04	0.80	0.001	0.99	0.02	0.87	0.03	0.87
C14	sin DMT2	0.03	0.86	-0.08	0.50	0.09	0.44	0.02	0.91
	con DMT2	0.05	0.78	0.14	0.30	0.17	0.19	0.15	0.27
C14:1	sin DMT2	0.001	1.00	0.13	0.22	0.06	0.67	0.08	0.54
	con DMT2	0.09	0.56	0.05	0.78	0.12	0.39	0.10	0.48
C14:2	sin DMT2	0.09	0.43	0.09	0.40	0.03	0.85	0.09	0.40
	con DMT2	0.04	0.80	0.13	0.38	0.05	0.78	0.09	0.53
C18:1	sin DMT2	0.12	0.30	0.07	0.57	0.01	0.93	0.09	0.41
	con DMT2	0.08	0.62	-0.07	0.66	-0.001	0.98	0.001	0.99

Tabla suplementaria 4. Resultados del estudio de asociación de genoma completo, de variantes genéticas asociadas con los niveles séricos de metabolitos relacionados con la EHGNA

Metabolito asociado	Chr	SNP	Variante	Gen más cercano	bp	A1	A2	Freq	Cohorte obesos mórbidos (n=431)			Grupo de validación (n=245)			Meta-análisis		
									b	se	p	b	se	p	b	se	p
Variantes asociadas con metabolitos relacionados con el catabolismo de BCAA																	
LEU	3	rs16829702	intronic	<i>ARHGAP31</i>	119052488	G	C	0.08	0.88	0.17	1.2E-07	-0.21	0.30	0.48	0.62	0.14	1.9E-05
	3	rs9835104	intronic	<i>ARHGAP31</i>	119056040	A	G	0.11	0.67	0.14	2.9E-06	-0.18	0.28	0.51	0.49	0.13	1.2E-04
	4	rs62336240	intronic	<i>ANXA10</i>	169081038	C	A	0.06	-0.86	0.18	2.2E-06	-0.17	0.39	0.65	-0.74	0.16	7.7E-06
	8	rs11776675	intronic	<i>CDH17</i>	95176015	G	A	0.17	-0.54	0.12	7.2E-06	-0.16	0.22	0.47	-0.45	0.11	1.7E-05
	8	rs2340029	intronic	<i>CDH17</i>	95183490	G	A	0.22	-0.47	0.11	9.0E-06	-0.05	0.20	0.82	-0.38	0.09	5.1E-05
	8	rs2613217	intronic	<i>CDH17</i>	95199215	G	A	0.24	-0.48	0.10	3.7E-06	-0.05	0.20	0.81	-0.39	0.09	2.5E-05
	8	rs10956904	intronic	<i>CDH17</i>	95205117	A	C	0.23	-0.51	0.11	2.5E-06	0.08	0.20	0.69	-0.38	0.10	7.8E-05
	8	rs3886489	intronic	<i>CDH17</i>	95208323	A	C	0.28	-0.52	0.10	6.2E-07	-0.04	0.19	0.82	-0.41	0.09	6.9E-06
	9	rs17051885	intronic	<i>LOC102724080</i>	89035877	G	A	0.37	0.43	0.09	2.8E-06	0.17	0.16	0.30	0.36	0.08	4.6E-06
VAL	2	rs219158	intronic	<i>LTBP1</i>	33218037	G	A	0.20	-9.95	2.13	2.9E-06	-1.86	7.01	0.79	-9.27	2.04	5.3E-06
	3	rs16829702	intronic	<i>ARHGAP31</i>	119052488	G	C	0.08	14.68	2.98	8.7E-07	-0.04	9.82	1.00	13.44	2.86	2.5E-06
	8	rs3886489	intronic	<i>CDH17</i>	95208323	A	C	0.28	-8.40	1.87	7.1E-06	0.74	6.37	0.91	-7.68	1.80	1.9E-05
	9	rs17051885	intronic	<i>LOC102724080</i>	89035877	G	A	0.37	7.50	1.65	5.6E-06	5.16	5.33	0.33	7.30	1.58	3.7E-06
	10	rs2236723	intronic	<i>GDF10</i>	48429650	G	A	0.19	9.70	2.15	6.6E-06	-0.17	6.67	0.98	8.77	2.05	1.9E-05
	12	rs1858881	intronic	<i>CCDC63</i>	111334117	G	A	0.39	7.70	1.67	3.8E-06	-1.29	5.62	0.82	6.97	1.60	1.3E-05
	12	rs6489821	intronic	<i>CCDC63</i>	111334318	G	A	0.39	7.70	1.67	3.8E-06	-1.29	5.62	0.82	6.97	1.60	1.3E-05
	12	rs6489822	intronic	<i>CCDC63</i>	111334375	A	G	0.39	7.58	1.66	5.1E-06	-1.29	5.62	0.82	6.87	1.59	1.7E-05
	12	rs11610779	intronic	<i>CCDC63</i>	111336560	A	T	0.39	7.50	1.67	6.7E-06	-1.40	5.63	0.80	6.78	1.60	2.2E-05
	12	rs10774610	intronic	<i>CCDC63</i>	111340243	G	A	0.39	7.80	1.65	2.4E-06	-1.29	5.62	0.82	7.07	1.59	8.3E-06

	12	rs11065766	intronic	<i>MYL2</i>	111349849	G	A	0.39	7.36	1.66	9.2E-06	-1.30	5.62	0.82	6.66	1.59	2.8E-05
ALA	9	rs12002026	Intergénica	<i>LOC107987084</i>	83383795	A	C	0.06	0.16	0.03	3.5E-06	-	0.04	0.93	0.09	0.03	0.001
	9	rs7021691	Intergénica	<i>LOC107987084</i>	83387016	A	G	0.06	0.16	0.03	3.5E-06	-	0.04	0.93	0.09	0.03	0.001
Variantes asociadas con aminoácidos aromáticos y otros aminoácidos																	
TYR	4	rs598364	Intrónica	<i>LOC105377441</i>	137989392	G	A	0.29	-0.22	0.05	2.7E-06	-0.09	0.10	0.37	-0.20	0.04	3.5E-06
	1	rs6691316	Intrónica	<i>KCNN3</i>	154754194	C	T	0.33	0.38	0.08	6.0E-06	-0.02	0.21	0.94	0.33	0.08	2.9E-05
	12	rs10770618	Intergénica	<i>LOC105369686</i>	20327408	G	A	0.24	-0.44	0.09	3.8E-06	-0.01	0.22	0.97	-0.37	0.09	2.0E-05
	12	rs1427981	Intergénica	<i>LOC105369686</i>	20328707	A	G	0.24	-0.42	0.09	6.0E-06	-0.01	0.22	0.96	-0.36	0.09	2.9E-05
PRO	12	rs2042880	Intergénica	<i>LOC105369686</i>	20330651	A	G	0.24	-0.44	0.09	3.8E-06	-0.01	0.22	0.96	-0.37	0.09	2.0E-05
	12	rs1593844	Intergénica	<i>LOC105369686</i>	20331233	A	C	0.24	-0.44	0.09	2.4E-06	-0.09	0.22	0.70	-0.39	0.09	7.1E-06
	12	rs6487068	Intergénica	<i>LOC105369687</i>	20378156	C	A	0.34	-0.41	0.08	8.9E-07	-0.29	0.22	0.18	-0.39	0.08	3.9E-07
	22	rs5747933	Sentido erróneo	<i>PRODH</i>	18910355	A	C	0.15	0.61	0.11	5.2E-08	1.54	0.25	4.8E-10	0.76	0.10	5.6E-14
	22	rs2238732	Intrónica	<i>PRODH</i>	18915347	A	G	0.15	0.62	0.11	1.3E-08	1.60	0.24	5.6E-11	0.78	0.10	4.0E-15
	22	rs759404	Intrónica	<i>PRODH</i>	18916180	A	G	0.16	0.56	0.11	1.1E-07	1.10	0.23	1.5E-06	0.66	0.10	8.1E-12
MET	11	rs4755737	Intrónica	<i>HSD17B12</i>	43791865	A	G	0.36	-0.09	0.02	7.0E-06	-0.01	0.02	0.59	-0.06	0.01	1.5E-04
	12	rs6487068	Intergénica	<i>LOC105369687</i>	20378156	C	A	0.34	-0.09	0.02	3.5E-06	-	0.03	0.66	-0.06	0.02	7.3E-05
Variantes asociadas con metabolitos relacionados con el metabolismo de lípidos																	
	1	rs891526	intronic	<i>GNG12-AS1</i>	68651948	G	A	0.30	0.21	0.05	9.7E-06	0.02	0.08	0.79	0.16	0.04	6.4E-05
	2	rs62178271	intergenic	<i>LOC105373899</i>	222475510	A	G	0.07	-0.39	0.08	2.1E-06	-0.14	0.15	0.34	-0.33	0.07	4.0E-06
	2	rs13403047	intergenic	<i>LOC105373899</i>	222478526	C	A	0.07	-0.39	0.08	1.4E-06	-0.16	0.14	0.25	-0.33	0.07	2.0E-06
CO	2	rs17300372	intergenic	<i>LOC105373897</i>	222479220	A	G	0.08	-0.38	0.08	2.5E-06	-0.16	0.14	0.26	-0.32	0.07	3.1E-06
	2	rs6748185	intergenic	<i>LOC105373899</i>	222491734	G	A	0.08	-0.37	0.08	2.4E-06	-0.16	0.14	0.26	-0.32	0.07	2.9E-06
	4	rs73876336	intergenic	<i>LOC102723906</i>	187733807	A	T	0.06	0.40	0.09	5.1E-06	-0.36	0.18	0.04	0.25	0.08	1.6E-03
	11	rs238926	intronic	<i>ZBTB16</i>	113975210	G	A	0.47	-0.19	0.04	8.8E-06	0.03	0.08	0.70	-0.14	0.04	2.4E-04
	18	rs16962757	intergenic	<i>LINC01900</i>	19650234	G	A	0.45	0.20	0.04	3.7E-06	0.07	0.08	0.36	0.17	0.04	7.6E-06

	18	rs16962762	intergenic	<i>LINC01900</i>	19650364	A	T	0.45	0.20	0.04	3.7E-06	0.09	0.08	0.24	0.17	0.04	4.2E-06
	18	rs4800353	intergenic	<i>LINC01900</i>	19654137	G	A	0.45	0.20	0.04	3.6E-06	0.08	0.08	0.28	0.17	0.04	5.0E-06
	18	rs10853629	intronic	<i>DCC</i>	50889886	A	G	0.33	0.21	0.05	9.5E-06	-0.07	0.08	0.34	0.13	0.04	9.4E-04
C3	2	rs12986480	Intergénica	<i>LINC01878</i>	213646473	A	C	0.43	0.13	0.03	2.5E-06	0.04	0.05	0.39	0.11	0.02	5.8E-06
	2	rs12995424	Intergénica	<i>LINC01878</i>	213656187	C	T	0.42	0.13	0.03	5.7E-06	0.04	0.05	0.41	0.11	0.02	1.3E-05
	2	rs11693864	Intergénica	<i>LINC01878</i>	213657426	A	G	0.42	0.13	0.03	5.7E-06	0.04	0.05	0.42	0.11	0.02	1.3E-05
	3	rs161449	Intergénica	<i>GRM7</i>	7829411	A	G	0.11	0.21	0.04	3.0E-06	0.06	0.08	0.50	0.17	0.04	9.0E-06
	3	rs9823495	Intergénica	<i>LINC01991</i>	187645566	A	G	0.17	0.18	0.04	7.1E-07	0.01	0.06	0.92	0.13	0.03	1.9E-05
	4	rs2920232	Intergénica	<i>OTOP1</i>	4230212	C	G	0.23	0.14	0.03	9.7E-06	0.06	0.06	0.27	0.12	0.03	1.0E-05
	9	rs7021223	Intergénica	<i>PUM3</i>	2909883	C	A	0.07	-0.25	0.06	8.7E-06	0.00	0.10	1.00	-0.19	0.05	1.1E-04
C4	1	rs4908360	Intergénica	<i>FAM76A</i>	28028200	A	G	0.07	0.23	0.05	4.2E-07	-0.04	0.07	0.63	0.16	0.04	5.4E-05
	1	rs4908335	Intergénica	<i>FAM76A</i>	28028261	A	C	0.07	0.23	0.05	4.2E-07	-0.04	0.07	0.63	0.16	0.04	5.4E-05
	1	rs6670793	Intrónica	<i>FAM76A</i>	28060574	G	A	0.06	0.26	0.05	1.4E-07	-0.05	0.07	0.46	0.16	0.04	8.5E-05
	1	rs10902667	Intrónica	<i>FAM76A</i>	28062107	G	C	0.06	0.26	0.05	1.4E-07	-0.05	0.07	0.46	0.16	0.04	8.5E-05
	1	rs76390622	Intrónica	<i>FAM76A</i>	28068408	A	G	0.06	0.26	0.05	1.4E-07	-0.05	0.07	0.46	0.16	0.04	8.5E-05
	1	rs1569432	Intrónica	<i>FAM76A</i>	28071836	A	G	0.06	0.26	0.05	1.4E-07	-0.05	0.07	0.46	0.16	0.04	8.5E-05
	1	rs10902670	Intrónica	<i>FAM76A</i>	28084571	A	G	0.06	0.26	0.05	1.4E-07	-0.05	0.07	0.46	0.16	0.04	8.5E-05
	1	rs10794504	Intrónica	<i>FAM76A</i>	28084735	A	G	0.06	0.26	0.05	1.4E-07	-0.05	0.07	0.46	0.16	0.04	8.5E-05
	1	rs2072750	utr 5'	<i>PPP1R8</i>	28157871	G	A	0.06	0.26	0.05	1.8E-07	-0.02	0.07	0.79	0.17	0.04	3.1E-05
	3	rs28513561	Intrónica	<i>THRB</i>	24285539	G	A	0.13	-0.15	0.03	7.1E-06	0.03	0.05	0.61	-0.10	0.03	4.5E-04
	3	rs73188631	Intrónica	<i>LOC107986166</i>	187722136	C	A	0.20	0.13	0.03	4.6E-06	-0.02	0.03	0.47	0.07	0.02	2.2E-03
	9	rs12342716	Intrónica	<i>LRRC37A5P</i>	114371624	A	C	0.43	-0.11	0.02	7.1E-06	-0.03	0.03	0.32	-0.08	0.02	3.5E-05
	9	rs75913393	Intrónica	<i>LRRC37A5P</i>	114374613	A	T	0.43	-0.11	0.02	2.9E-06	-0.03	0.03	0.28	-0.08	0.02	1.6E-05
	9	rs10817197	Intergénica	<i>LOC107987116</i>	114382444	G	A	0.30	-0.12	0.03	7.8E-06	-0.05	0.04	0.21	-0.09	0.02	1.2E-05
	9	rs7875749	Intergénica	<i>LOC107987116</i>	114387135	A	G	0.30	-0.12	0.03	7.8E-06	-0.05	0.04	0.20	-0.09	0.02	1.1E-05
10	rs10788187	Intergénica	<i>LOC105378396</i>	85449661	G	A	0.09	-0.18	0.04	7.0E-06	-0.02	0.06	0.71	-0.13	0.03	9.3E-05	
12	rs10774563	Intergénica	<i>LOC101928300</i>	121060780	G	A	0.42	0.13	0.02	7.2E-09	0.12	0.03	4.9E-05	0.13	0.02	9.3E-05	

12	rs4767921	Intrónica	<i>LOC101928300</i>	121069201	A	G	0.37	-0.11	0.02	1.0E-06	-0.10	0.03	1.0E-03	-0.11	0.02	4.0E-09
12	rs1616213	Intrónica	<i>CABP1</i>	121077508	G	A	0.33	0.13	0.02	4.2E-08	0.11	0.03	5.0E-04	0.13	0.02	9.2E-11
12	rs693074	Intrónica	<i>CABP1</i>	121077728	A	C	0.33	0.13	0.02	4.2E-08	0.11	0.03	5.0E-04	0.13	0.02	9.2E-11
12	rs1168067	Intrónica	<i>CABP1</i>	121082469	A	G	0.41	-0.12	0.02	9.9E-08	-0.12	0.03	8.3E-05	-0.12	0.02	3.5E-11
12	rs526007	Intrónica	<i>CABP1</i>	121085884	G	A	0.38	-0.12	0.02	2.6E-07	-0.10	0.03	1.0E-03	-0.11	0.02	1.2E-09
12	rs555379	Intrónica	<i>CABP1</i>	121090498	A	C	0.39	-0.12	0.02	3.7E-07	-0.10	0.03	1.3E-03	-0.11	0.02	2.1E-09
12	rs1151874	Intrónica	<i>CABP1</i>	121092555	A	G	0.34	0.14	0.02	7.9E-09	0.10	0.03	3.7E-03	0.12	0.02	1.7E-10
12	rs2686555	Intrónica	<i>CABP1</i>	121095172	G	A	0.46	-0.10	0.02	8.4E-06	-0.07	0.03	0.02	-0.09	0.02	6.8E-07
12	rs10431384	Intrónica	<i>MLEC</i>	121127347	G	A	0.43	0.14	0.02	4.0E-09	0.05	0.03	0.09	0.10	0.02	1.7E-08
12	rs2005455	Intrónica	<i>MLEC</i>	121128699	G	A	0.48	0.12	0.02	2.7E-07	0.04	0.03	0.13	0.09	0.02	9.8E-07
12	rs10431386	Intrónica	<i>MLEC</i>	121128926	A	G	0.43	0.14	0.02	4.0E-09	0.05	0.03	0.09	0.10	0.02	1.7E-08
12	rs7976497	utr 3'	<i>MLEC</i>	121135467	A	G	0.36	-0.12	0.03	4.2E-06	-0.05	0.03	0.07	-0.09	0.02	2.6E-06
12	rs55652244	Intergénica	<i>UNC119B</i>	121145503	A	T	0.38	-0.12	0.03	1.3E-06	-0.07	0.03	0.02	-0.10	0.02	2.6E-07
12	rs695949	Intrónica	<i>UNC119B</i>	121149736	A	G	0.45	-0.15	0.02	1.5E-09	-0.06	0.03	0.02	-0.11	0.02	1.3E-09
12	rs696337	utr 3'	<i>UNC119B</i>	121159380	A	G	0.36	-0.12	0.03	4.2E-06	-0.05	0.03	0.07	-0.09	0.02	2.6E-06
12	rs2066938	utr 3'	<i>UNC119B</i>	121160615	G	A	0.32	0.21	0.03	2.1E-16	0.14	0.03	7.2E-06	0.18	0.02	2.7E-20
12	rs2239760	Intergénica	<i>ACADS</i>	121163518	A	C	0.47	0.13	0.02	7.1E-08	0.04	0.03	0.11	0.09	0.02	2.7E-07
12	rs3914	Sinónima	<i>ACADS</i>	121174899	A	G	0.37	-0.13	0.02	5.1E-07	-0.06	0.03	0.05	-0.10	0.02	2.9E-07
12	rs1799958	Sentido erróneo	<i>ACADS</i>	121176083	A	G	0.37	0.23	0.02	1.8E-20	0.15	0.03	7.3E-07	0.20	0.02	4.5E-25
12	rs9204	utr 3'	<i>ACADS</i>	121177778	A	G	0.51	-0.15	0.02	1.6E-10	0.07	0.03	0.01	-0.06	0.02	8.6E-04
12	rs10849784	Intergénica	<i>SPPL3</i>	121194350	A	G	0.22	-0.14	0.03	1.0E-06	-0.07	0.03	0.05	-0.11	0.02	6.3E-07
12	rs7300695	Intergénica	<i>SPPL3</i>	121197629	A	G	0.16	-0.16	0.03	1.2E-06	-0.08	0.04	0.04	-0.12	0.02	5.9E-07
12	rs668622	Intergénica	<i>SPPL3</i>	121198299	G	A	0.30	-0.14	0.03	1.1E-07	-0.10	0.03	3.0E-03	-0.12	0.02	1.9E-09
12	rs13746	utr 3'	<i>SPPL3</i>	121201167	G	A	0.33	-0.14	0.03	4.5E-08	-0.10	0.03	1.4E-03	-0.12	0.02	3.5E-10
12	rs9431	utr 3'	<i>SPPL3</i>	121202664	A	C	0.33	-0.14	0.03	3.2E-08	-0.10	0.03	1.4E-03	-0.12	0.02	2.6E-10
12	rs4767935	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121216531	A	G	0.49	-0.17	0.02	3.9E-13	0.09	0.03	1.3E-03	-0.06	0.02	4.2E-04
12	rs7137504	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121221628	G	A	0.35	-0.14	0.02	4.4E-08	-0.09	0.03	4.2E-03	-0.12	0.02	1.5E-09

	12	rs1039302	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121236258	A	G	0.18	-0.16	0.03	1.5E-07	-0.08	0.04	0.02	-0.13	0.02	4.2E-08
	12	rs3883901	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121256520	A	G	0.35	-0.14	0.02	4.6E-08	-0.09	0.03	4.3E-03	-0.12	0.02	1.6E-09
	12	rs531782	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121273247	G	A	0.33	-0.13	0.03	1.3E-07	-0.10	0.03	1.4E-03	-0.12	0.02	9.2E-10
	12	rs625228	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121278266	A	G	0.30	-0.14	0.03	1.2E-07	-0.10	0.03	3.0E-03	-0.12	0.02	2.1E-09
	12	rs145692756	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121299414	A	G	0.19	0.19	0.03	1.2E-10	0.12	0.04	4.9E-04	0.16	0.02	6.8E-13
	12	rs57697145	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121333552	A	C	0.35	-0.14	0.02	4.6E-08	-0.09	0.03	2.8E-03	-0.12	0.02	9.7E-10
	12	rs4767941	Intrónica	<i>SPPL3</i>	121359586	G	A	0.39	-0.11	0.02	1.5E-06	-0.06	0.03	0.03	-0.09	0.02	3.5E-07
	2	rs139709288	Intergénica	<i>LOC105373896</i>	221595042	G	A	0.22	0.11	0.03	6.8E-06	0.01	0.04	0.74	0.08	0.02	8.6E-05
	6	rs456598	Intergénica	<i>SLC22A1</i>	160538921	A	G	0.27	-0.11	0.02	4.8E-06	-0.06	0.04	0.07	-0.09	0.02	1.6E-06
C8:1	6	rs662138	Intrónica	<i>SLC22A1</i>	160564476	C	G	0.29	-0.11	0.02	2.5E-06	-0.06	0.03	0.07	-0.09	0.02	9.8E-07
	6	rs62440901	Intrónica	<i>SLC22A1</i>	160569068	A	G	0.25	-0.11	0.02	1.3E-06	-0.09	0.04	0.01	-0.11	0.02	7.4E-08
	6	rs11753995	Intrónica	<i>SLC22A1</i>	160575366	A	G	0.26	-0.11	0.02	6.7E-06	-0.06	0.03	0.07	-0.09	0.02	2.1E-06