



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

**“ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES 677T Y 1298C DEL GEN *MTHFR*
CON NIVELES DE HOMOCISTEÍNA, ÁCIDO FÓLICO Y VITAMINA B12
SÉRICOS EN EL DESARROLLO DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO”**

T E S I S

PARA OBTENER EL
TÍTULO DE ESPECIALISTA
EN:
GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

ISABEL DEL CARMEN CAMPUZANO ESTRADA

TUTOR DE TESIS:
DR. OSVALDO MÁXIMO MUTCHINICK BARINGOLTZ

COTUTOR DE TESIS:
Q.F.B MARÍA AURELIA LÓPEZ HERNÁNDEZ

COTUTOR DE TESIS:
DR. ADOLFO AGUAYO GÓMEZ





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.

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Osvaldo Mutchinick, al Dr. Adolfo Aguayo y a la Q.F.B. María López por todas sus valiosas enseñanzas, su paciencia y su apoyo incondicional durante este proceso. Asimismo, deseo manifestar mi gratitud hacia mis profesores de la especialidad, el Dr. Morales y la Dra. Arteaga, así como a todos los químicos y citogenetistas del Departamento de Genética por brindarme su tiempo y disposición para enseñarme.

Además, me gustaría extender mi agradecimiento a todos los participantes del protocolo "Asociación del consumo de fructosa, azúcares añadidos, grasas saturadas y grasas de consumo animal con la grasa corporal y hepática en individuos aparentemente sanos", especialmente a la Dra. Sophia E. Martínez, el Dr. Raymundo Valdez y el Dr. Luis Federico Uscanga, quienes me permitieron formar parte del proyecto y me brindaron su invaluable ayuda en la investigación.

No quiero dejar de agradecer a mis compañeros de residencia, Carlos, Pame, Dani y Vicky, por permitirme aprender y crecer junto a ustedes. Finalmente, mi gratitud más profunda va hacia mi familia, mis padres y mis hermanas, por su apoyo incondicional en cada paso de mi camino.

RESUMEN

Introducción: El hígado graso no alcohólico (HGNA) es la afección metabólico-hepática más común en todo el mundo. Se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado en ausencia de otras causas secundarias. El diagnóstico se hace mediante métodos de imagen como ultrasonido o *FibroScan*. Se asocia con factores de riesgo como obesidad, diabetes y dislipidemia. La patogénesis es multifactorial, involucrando la interacción de factores genéticos, ambientales y metabólicos. El gen *MTHFR* codifica una enzima clave en el metabolismo de los folatos, y las dos variantes más estudiadas son C677T y A1298C el homocigoto de ambos en particular el homocigoto 677TT provoca una actividad enzimática reducida, lo que puede conducir a niveles elevados de homocisteína y una menor disponibilidad de folatos en el plasma. Esto podría afectar la metilación del ADN, proceso que regula la expresión génica y la integridad genómica durante la diferenciación. El propósito de este trabajo fue investigar si existía una correlación entre dichas variantes y el HGNA.

Materiales y métodos: es un estudio observacional, descriptivo y transversal. Se incluyeron 268 trabajadores del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se evaluó la presencia de variantes genéticas del gen *MTHFR* en relación con el HGNA. Los criterios de inclusión fueron individuos mayores de 18 años, aparentemente sanos. Se excluyeron personas con patologías específicas. Los datos demográficos y clínicos, así como las variantes genéticas, fueron analizados estadísticamente para identificar posibles asociaciones significativas.

Resultados: Se encontró una prevalencia de esteatosis hepática en el 50.37% de los individuos, asociada significativamente con mayor edad y mayor IMC, siendo más común

en hombres que en mujeres. Se analizaron los genotipos de las variantes 677 y 1298 del gen *MTHFR*, encontrándose frecuencias alélicas en equilibrio de Hardy-Weinberg. Aunque no se hallaron diferencias significativas en la distribución de genotipos entre los grupos con y sin HGNA, al combinar ambas variantes se observó una asociación significativa entre el doble heterocigoto 677CT/1298AC y la presencia de esteatosis. Los niveles de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 no mostraron asociaciones significativas con la esteatosis hepática. No obstante, la presencia de esteatosis se asoció con resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia y valores elevados de AST, ALT, GGT y FA, lo que sugiere una implicación metabólica y hepática en esta condición. Además, se observó una mayor frecuencia de los genotipos AA y AC en individuos con grado de fibrosis hepática 0, mientras que los genotipos CT y TT mostraron una mayor distribución en los grados de fibrosis 2 y 3. Se observó una correlación entre los niveles de homocisteína con el ácido fólico, principalmente en el grupo de individuos con HGNA.

Conclusiones: Este estudio proporciona evidencia de la asociación entre las variantes genéticas del gen *MTHFR* y el riesgo de desarrollar HGNA. Los hallazgos sugieren que ciertos genotipos podrían estar relacionados con un mayor riesgo de HGNA y respaldan la importancia de la predisposición genética en la patogénesis de la enfermedad. Además, se observó una asociación entre los niveles de ácido fólico y homocisteína y la presencia de HGNA, lo que destaca la importancia de una adecuada ingesta de ácido fólico y la regulación de los niveles de homocisteína en la prevención y tratamiento del HGNA. Sin embargo, el estudio tiene limitaciones, como el tamaño muestral, la falta de inclusión de la variante rs738409 del gen *PNPLA3*, por lo que se requiere más investigación para confirmar y ampliar estos hallazgos.

ABREVIACIONES

ALT: Alanino aminotransferasa.

AST: Aspartato aminotransferasa.

CAP: Parámetro de atenuación controlada.

CT: Colesterol total.

DES: Diferencia estadísticamente significativa.

EHGNA: Enfermedad por hígado graso no alcohólico.

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica.

FA: Fosfatasa Alcalina.

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa.

Hcy: Homocisteína.

HDL: colesterol de alta densidad.

HGNA: Hígado graso no alcohólico.

HOMA: Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina.

IMC: Índice de masa corporal.

LDL: colesterol de baja densidad.

MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

TGD: Triglicéridos.

THF: Ácido tetrahidrofólico.

ÍNDICE

Introducción	10
1.1 Definición	10
1.2 Diagnóstico	10
1.3 Prevalencia e incidencia.....	12
1.4 Factores de riesgo.....	14
1.5 Gen <i>MTHFR</i>	17
1.6 Fisiopatología	22
Justificación y planteamiento del problema	27
Hipótesis	29
Objetivos	29
4.1 Objetivo general:.....	29
4.2 Objetivos específicos:	29
Metodología	30
5.1 Tipo de estudio.....	30
5.2 Muestra estudiada	30
5.3 Criterios de selección	30
5.3.1 Criterios de inclusión:.....	30
5.3.2 Criterios de no exclusión:	30
5.3.3 Criterios de exclusión:	30
5.4 Estudios moleculares.	31
Extracción de ADN.....	31
Genotipificación.	31
5.5 Características demográficas.....	33
5.6 Características clínicas.	33
5.7 Análisis estadístico.	34
Resultados	42
6.1 Análisis de las características demográficas y clínicas.	42
6.2 Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen <i>MTHFR</i>	47
6.3 Distribución de genotipos de las variantes de <i>MTHFR</i> de acuerdo con el grado de HGNA.	51
6.4 Análisis de edad, el sexo y el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con el genotipo agrupado heterocigoto y homocigoto de las variantes del gen <i>MTHFR</i>	59
6.5 Análisis de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12.	63
6.6 Análisis del perfil metabólico.	82
6.7 Análisis de marcadores de enfermedad hepática.	84

6.8 Análisis de las variantes de <i>MTHFR</i> de acuerdo con el grado de fibrosis hepática.	86
6.9 Análisis estratificado por sexo.....	88
6.10 Análisis multivariado.	92
<i>Discusión</i>	94
7.1 Características demográficas y clínicas.	94
7.2 Variantes genotípicas.....	95
7.3 Homocisteína, ácido fólico y vitamina B12.....	100
7.4 Perfil metabólico	106
7.5 Marcadores de función hepática.....	108
7.6 Fibrosis hepática.....	109
7.7 Análisis por sexo	111
7.8 Otros factores genéticos	113
<i>Conclusiones</i>	116
<i>Referencias</i>	119

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Datos demográficos de los individuos	45
Figura 1. Distribución del IMC en individuos con y sin HGNA.....	45
Figura 2. Comparación de los valores del IMC entre los grados de HGNA	46
.....	46
Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen <i>MTHFR</i>	49
Tabla 3. Distribución de genotipos de las variantes C677T y A1298C de <i>MTHFR</i> agrupados para el modelo dominante y compuestos.....	51
Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de <i>MTHFR</i> según el grado de esteatosis.....	56
Tabla 5. Distribución de frecuencias genotípicas de las variantes C677T y A1298C de <i>MTHFR</i> agrupados para el modelo dominante y compuestos de acuerdo con el grado de esteatosis hepática.	59
Tabla 6. Comparación de edad, el sexo y el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con la presencia de variantes en estado heterocigoto u homocigoto para la variante C677T de la <i>MTHFR</i>	62
Tabla 7. Comparación de edad, el sexo y el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con la presencia de variantes en estado heterocigoto u homocigoto para la variante A1298C de la <i>MTHFR</i>	62
Tabla 8. Comparación de concentraciones de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 entre casos con y sin HGNA.	64
Figura 3. Distribución de los niveles homocisteína en los grupos de individuos con y sin HGNA	65
Figura 4. Distribución de los niveles ácido fólico en los grupos de individuos con y sin HGNA	66
Figura 5. Distribución de los niveles de vitamina B12 en los grupos de individuos con y sin HGNA	66
Figura 6. Regresión lineal entre homocisteína y ácido fólico.	70
Figura 8. Variante C677T: Distribución y comparación de los niveles de ácido fólico entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos CC y CT o TT.....	74
Figura 9. Variante C677T: Distribución y comparación de los niveles de vitamina B12 entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos CC y CT o TT.....	75
Figura 11. Variante A1298C: Distribución y comparación de los niveles de homocisteína entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos AA y AC o CC.....	76
Figura 12. Variante A1298C: Distribución y comparación de los niveles de ácido fólico entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos AA y AC o CC.....	76
Figura 13. Variante A1298C: Distribución y comparación de los niveles de vitamina B12 entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos AA y AC o CC.....	77
Tabla 9. Resultados de la comparación del perfil metabólico entre casos con y sin HGNA.....	83
Tabla 10. Resultados de la comparación del perfil metabólico entre casos con y sin HGNA de acuerdo con el genotipo C677T.	84

Tabla 11. Resultados de la comparación del perfil metabólico entre casos con y sin HGNA de acuerdo con el genotipo A1298C.....	84
Tabla 12. Marcadores bioquímicos de enfermedad hepática.....	86

Introducción

1.1 Definición

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la afección metabólico-hepática más común en todo el mundo y se caracteriza por la presencia de más del 5% de esteatosis hepática en ausencia de otras causas secundarias, principalmente, el consumo excesivo de alcohol (30g/día para hombre y 20 g/día para las mujeres) o medicamentos (corticoesteroides, metotrexato, amiodarona, isoniazida, terapia antirretroviral, etc), hepatitis viral, hemocromatosis, enfermedad de Wilson y colestasis, las cuales presentan una histología similar (Perumpail et al., 2017; Younossi et al., 2015). El HGNA abarca una amplia variedad histológica, desde la simple acumulación de grasa en el hígado (llamada hígado graso no alcohólico o HGNA), hasta la inflamación necrótica o la fibrosis. La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y la cirrosis hepática criptogénica son formas avanzadas del HGNA. Además, el HGNA puede progresar a carcinoma hepatocelular. (Sazci et al., 2008)

El HGNA se refiere a la esteatosis hepática sin degeneración vacuolar hepatocelular mientras que el EHNA consiste en la hepatoesteatosis con inflamación lobular observada en la histopatología, degeneración vacuolar hepatocelular con o sin fibrosis. (Perumpail et al., 2017)

1.2 Diagnóstico

La enfermedad por HGNA generalmente se presenta de manera asintomática y los valores bioquímicos de las pruebas de función hepática no son útiles para el diagnóstico,

ya que el 50-80% de los pacientes tienen niveles normales de transaminasas. (Hashimoto & Tokushige, 2011)

El diagnóstico del HGNA puede realizarse por medio del *FibroScan*, un dispositivo médico utilizado para evaluar la rigidez hepática y el parámetro de atenuación controlada (CAP) como método no invasivo para detectar la esteatosis hepática y la fibrosis. Es una herramienta útil para monitorear la progresión de la enfermedad hepática y evaluar la efectividad del tratamiento. Según un metaanálisis de estudios sobre el *FibroScan*, la sensibilidad y especificidad agrupadas para detectar fibrosis significativa fueron del 0.78 y 0.76, respectivamente. La aplicabilidad se refiere al porcentaje de pacientes para los cuales se obtuvo una lectura válida del *FibroScan*, esta se reporta de 97% (404 de los 415 pacientes evaluados), Eddowes y colaboradores en 2019. En dicho estudio también se observó que los pacientes con menos de 9 mediciones válidas tenían un IMC significativamente más alto que los demás. (Eddowes et al., 2019)

La evaluación de la esteatosis por medio del CAP utiliza el *FibroScan* para medir la atenuación de las ondas de ultrasonido a medida que pasan a través del tejido hepático. El CAP es un método no invasivo para cuantificar la esteatosis hepática y se mide en decibeles por metro (dB/m). En el estudio mencionado anteriormente, 380 de los 415 pacientes tenían una biopsia hepática interpretable y valores de CAP válidos. Los valores de corte de CAP para diferenciar entre los distintos grados de esteatosis son: para diferenciar entre S0 (sin esteatosis) y S1-S3 (cualquier grado de esteatosis), un valor de corte de 248 dB/m tenía una sensibilidad del 77% y una especificidad del 72%. Para diferenciar entre S0-S1 (sin a esteatosis leve) y S2-S3 (esteatosis moderada a grave), un valor de corte de 268 dB/m tenía una sensibilidad del 70% y una especificidad del

75%. Para diferenciar entre S0-S2 (sin a esteatosis moderada) y S3 (esteatosis severa), un valor de corte de 280 dB/m tenía una sensibilidad del 71% y una especificidad del 80%. (Eddowes et al., 2019)

Otras técnicas que se pueden utilizar para diagnosticar la esteatosis incluyen pruebas de imagen como ultrasonido, tomografía computarizada y resonancia magnética. También se pueden utilizar las enzimas hepáticas (Obika & Noguchi, 2012). Sin embargo, actualmente se considera que la biopsia hepática es el estándar de oro para realizar el diagnóstico y evaluar la gravedad del HGNA. (Eddowes et al., 2019)

1.3 Prevalencia e incidencia

La incidencia mundial real del HGNA aún no se conoce con exactitud debido a las variaciones en las estimaciones de diferentes estudios poblacionales, que pueden estar influenciadas por factores como la etnia, el tamaño de la población estudiada y el método diagnóstico utilizado. Se estima que la prevalencia mundial de HGNA oscila entre el 20% y el 30% en países occidentales, mientras que en Asia se sitúa entre el 5% y el 18% (Satapathy & Sanyal, 2015). Se estima que la prevalencia varía entre el 17% y 46 % en población mexicana, aunque El Consenso mexicano de HGNA reporta que 62.9% de los participantes voluntarios estudiados con ultrasonido presentaban signos de esteatosis (De México Gastroenterología et al., 2019) En Estados Unidos, se estima que es la causa más común de enfermedad hepática crónica, afectando entre 80 y 100 millones de personas, de las cuales cerca del 25% progresan a EHNA. Medio Oriente y Sudáfrica presentan la mayor prevalencia con un 31% y 32% respectivamente mientras que la prevalencia más baja se encuentra en África con un 13.5%. (Perumpail et al., 2017)

En un estudio realizado por Satapathy y Sanyal en 2015, se encontró que los hispanos tienen una mayor predisposición a desarrollar esteatosis hepática, con una frecuencia de 45%, en comparación con los participantes de ascendencia europeo-americana, con una frecuencia del 33%, mientras que los afroamericanos presentaron la menor frecuencia, con un 24%. (Satapathy & Sanyal, 2015)

La presentación variable de la enfermedad y las limitaciones en los estudios para diagnosticar el HGNA influyen en la imposibilidad para determinar la incidencia y prevalencia exacta de la enfermedad. Sin embargo, se ha observado que la prevalencia del HGNA ha aumentado en los últimos 20 años (De Mexico Gastroenterologia et al., 2019). La discrepancia en los datos de la frecuencia de esta enfermedad puede ser explicadas por la sensibilidad del método diagnóstico utilizado, además de la biopsia, exigen algunas modalidades no invasivas que también son aceptadas para detectar la infiltración grasa hepática, como la ecografía hepática, la resonancia magnética y la tomografía computarizada. En estudios recientes, la ecografía hepática detectó desde el 17% de HGNA en la India hasta el 46% en Estados Unidos. (Perumpail et al., 2017)

La prevalencia de complicaciones asociadas al HGNA en México varía según los estudios y las características de las poblaciones estudiadas. Se ha observado que la EHNA afecta a aproximadamente el 10-30% de los pacientes con HGNA lo que indica una proporción significativa de individuos con riesgo de desarrollar enfermedad hepática progresiva. La fibrosis hepática, que es un indicador de daño hepático más avanzado, se observa con una prevalencia del 15-30% en pacientes con HGNA. (Hernández-Rocha C et al., 2015; Instituto Nacional de Salud Pública, 2012)

En relación a las complicaciones más graves, como la cirrosis hepática, los datos sobre su prevalencia específica en la población mexicana son limitados. Sin embargo, se estima que la cirrosis puede desarrollarse en aproximadamente el 20% de los casos de EHNA progresiva a lo largo de varios años. Además, la cirrosis hepática se asocia con un mayor riesgo de complicaciones, como la insuficiencia hepática, el cáncer de hígado y las complicaciones cardiovasculares. (Estes et al., 2018; Méndez-Sánchez et al., 2007)

Es importante destacar que el HGNA y sus complicaciones están relacionados con varios factores de riesgo, como la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2 y la dislipidemia. Estos factores están muy presentes en la población mexicana, lo que contribuye al aumento de la prevalencia del HGNA y sus complicaciones. (Estes et al., 2018; Méndez-Sánchez et al., 2007)

1.4 Factores de riesgo

Entre los principales factores de riesgo conocidos para desarrollar HGNA se encuentran la obesidad, la dislipidemia, la diabetes mellitus, el síndrome metabólico y los factores genéticos. Además, esta condición también puede estar asociada con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular a largo plazo. (Satapathy & Sanyal, 2015)

El HGNA tiene una mayor prevalencia en los hombres en comparación con las mujeres durante su periodo reproductivo, sin embargo, después de la menopausia, las mujeres pierden el efecto protector conferido por las hormonas sexuales femeninas (Mauvais-Jarvis et al., 2013) y la prevalencia de la enfermedad es similar a la de los hombres. Estas observaciones también son consistentes en los niños (Perumpail et al., 2017). Según los hallazgos de las clínicas en Japón, la prevalencia del HGNA en hombres

mayores de 30 años es de aproximadamente el 27%. En cambio, en las mujeres aumenta gradualmente desde el 7% a los 30 años hasta 23% después de los 60 años. (Hashimoto & Tokushige, 2011).

La edad es otro factor asociado con el HGNA, con una tendencia general de aumento de la prevalencia con la edad y un pico entre los 50-60 años en los hombres. En personas mayores de 80 años presentan una prevalencia más alta de lo habitual del 46%. (Perumpail et al., 2017)

Por otro lado, según los hallazgos de los chequeos médicos anuales en Japón, la prevalencia del HGNA aumenta con el índice de masa corporal (IMC); del 10 al 20% en personas no obesas, un 50% en aquellos con un IMC superior a 25 kg/m² y aproximadamente 80% en aquellos con un IMC superior a 30 kg/m². Wanless et al. reportan que la prevalencia en pacientes de Canadá era del 70% en pacientes obesos y del 35% en pacientes delgados, mientras que la fibrosis hepática era del 18.5% en obesos y del 2.7% en delgados. Además, la prevalencia de HGNA también aumenta con el deterioro de la homeostasis de la glucosa, pasando del 27% en aquellos con glucosa en ayunas normal al 43% en pacientes con niveles elevados de glucemia. (Hashimoto & Tokushige, 2011; Wanless & Lentz, 1990)

Por otro lado, también se ha observado que el riesgo de desarrollar DM2 y síndrome metabólico en pacientes con HGNA afecta en ambos sexos, pero las mujeres tienen un mayor riesgo: RM 14,5 (IC del 95%: 7-30.1) en mujeres y 4.8 (IC 95% 3-7.8) en hombres. (De Mexico Gastroenterologia et al., 2019). Asimismo, un estudio realizado en población

mexicana mostró que uno de cada tres pacientes con HGNA tenía un alto riesgo cardiovascular (CVR), y a mayor fibrosis, mayor era el CVR. (Alvarez et al., 2022)

A pesar de que ya se conocen algunos factores de riesgo como el estilo de vida, la obesidad y la resistencia a la insulina que participan en el desarrollo de el HGNA en una persona. También se ha observado que la enfermedad puede variar sustancialmente entre sujetos con impactos ambientales y anormalidades metabólicas similares (Bernal-Reyes et al., 2022). Esto indica que existen otros factores que pueden contribuir en la patogénesis. La heredabilidad y las variaciones interétnicas en la susceptibilidad sugieren que los factores genéticos pueden jugar un papel importante en la determinación de la manifestación fenotípica y el riesgo en general para el desarrollo de el HGNA. (Perumpail et al., 2017)

Los estudios familiares demuestran que los familiares de primer grado de pacientes con NAFLD tienen un riesgo mucho mayor de desarrollar la enfermedad en comparación con la población general. La asociación se da de forma independiente con la adiposidad y ha llevado a estimar que entre el 38% y el 100% del contenido de grasa hepática y la variabilidad de NAFLD son atribuibles a factores heredados. (Mohammed Eslam et al., 2018)

Respecto a los factores genéticos, se ha observado que el HGNA se presenta en familias portadores de ciertas variantes genéticas en *TM6SF2*, *PNPLA3*, *NCAN* y *PPP1R3B*. Dichas variantes pueden aumentar la presencia de HGNA hasta un 27% en de estas familias. Una de estas variantes es una mutación de sentido erróneo en el gen que contiene el dominio de fosfolipasa similar a la palatina 3 (*PNPLA3* [Ile148 → MET148.

(I148M)). Dicha variante influye de manera importante en la acumulación de grasa hepática y en la susceptibilidad a desarrollar daño hepático más grave a nivel histológico, independientemente del grado de obesidad o la presencia de diabetes mellitus. Esta variante se observó con mayor frecuencia en hispanos, seguida de blancos no hispanos y en menor medida en afroamericanos. En el mismo metaanálisis se encontró una variante en el gen *TM6SF2* que aumenta el riesgo de fibrosis hepática independientemente de la edad, obesidad, diabetes y el genotipo de *PNPLA3*. (Cai et al., 2011)

1.5 Gen *MTHFR*

El gen *MTHFR* (metilentetrahidratofolato reductasa) codifica para una enzima clave en el metabolismo de los folatos que cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5 metiltetrahidrofolato, cosustrato utilizado en la remetilación de homocisteína a metionina la cual mediante una reacción mediada por ATP se convierte en S-adenosil-metionina (SAM) donante universal de grupos metilos en las células. (Sazci et al., 2008)

El gen *MTHFR* se localiza en el cromosoma 1p36.3 y las dos variantes más frecuentemente estudiados son C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131) debido a su papel como factor de riesgo asociado a diversas enfermedades comunes del adulto, incluyendo trastornos cardiovasculares, enfermedades neuropsiquiátricas y complicaciones en el embarazo entre otras. (Catalano et al., 2014)

La variante *MTHFR* C677T se caracteriza por la substitución de citosina (C) por timina (T) en la posición 677 del gen, individuos con genotipo homocigoto *MTHFR* 677 TT produce una proteína termolábil con una actividad enzimática reducida de más del 50%

comparada con el genotipo silvestre *MTHFR* 677 CC. La deficiencia parcial de la proteína provoca niveles aumentados de homocisteína y menor disponibilidad de folatos en el plasma. Esta disminución en la actividad enzimática puede tener implicaciones en el metabolismo de los folatos y la metilación, procesos esenciales para el funcionamiento adecuado del organismo. (Mutchinick et al., 1999)

La variante *MTHFR* A1298C, resulta en un cambio de ácido glutámico por alanina en la posición 1298, y codifica para una proteína con una reducción del 30% de actividad enzimática. (Catalano et al., 2014)

La frecuencia del alelo 677T es relativamente alta alrededor del mundo y muestra variación regional y étnica. Wilken, et al. (2003) estudiaron la distribución de esta variante en recién nacidos de 16 regiones en Europa, América, Medio Oriente y Australia; observándose la mayor frecuencia del genotipo TT en México (32%), seguido del sur de Italia (26%) y el norte de China (20%), así como evidencia de gradientes geográficos en Europa (mayor de norte a sur) y en China (menor de norte a sur). En los recién nacidos de ascendencia africana la frecuencia del genotipo TT fue baja, intermedia en los de origen europeo y alta en los de ascendencia hispanoamericana. McAndrew, et al. (1996) encontraron que la frecuencia alélica de la forma termolábil c.677C>T en estado heterocigoto fue de 0.30 en caucásicos y 0.10 en afroamericanos. (B Wilcken et al., 2003)

En México, un estudio realizado por Mutchinick y colaboradores en 1999 reportó una prevalencia del genotipo heterocigoto para la variante 677 (CT) de 47.6% y de 34.8% para el genotipo homocigoto para la variante (TT) en 250 mujeres sanas estudiadas. (Mutchinick et al., 1999)

En la población mestiza mexicana la distribución de los genotipos C667T y 677TT del gen *MTHFR* varía en las diversas regiones geográficas del país. De acuerdo a Contreras-Cubas y colaboradores, un estudio realizado en 2016 en una población mestiza mexicana encontró que la frecuencia del genotipo C677T era del 39.7%, mientras que el genotipo T677T tenía una frecuencia del 7.6%. Esto indica que aproximadamente el 47.3% de la población tenía al menos una copia de la variante 677T. Es importante tener en cuenta que estas frecuencias pueden variar en diferentes grupos étnicos y poblaciones específicas dentro de México. Además, es posible que existan diferencias regionales en la distribución de estos genotipos. (Contreras-Cubas et al., 2016)

En la población mexicana, se ha observado que tanto los indígenas como los mestizos presentan variabilidad en las frecuencias de los alelos y genotipos relacionados con el gen *MTHFR*. En particular, se ha encontrado que los indígenas tienen una alta prevalencia del alelo 677T, así como del genotipo TT asociado a esta variante, con una frecuencia del 65% y 44,5%, respectivamente. Por otro lado, los mestizos también presentan una frecuencia alta, aunque menor que los indígenas, con un 52% para el alelo 677T y un 26% para el genotipo TT. (Contreras-Cubas et al., 2016)

Las comparaciones con estudios realizados en Holanda, Irlanda, Estados Unidos, Japón y otros grupos étnicos mostraron diferencias significativas, con una RM promedio de 5.8 (IC del 95%: 3.4-10.3) para un mexicano de ser homocigoto para la mutación 677T. (Rosa-Maria Guéant-Rodriguez et al., 2006)

Es importante destacar que estas frecuencias también pueden variar según la localización geográfica en México. Se ha observado un gradiente creciente del norte

hacia el sur en la frecuencia del alelo 677T, es decir, a medida que se avanza hacia el sur del país, la frecuencia de este alelo tiende a aumentar (Mutchinick y cols, en preparación)

Respecto a la variante A1298C del *MTHFR*, la frecuencia alélica de 1298C es muy variable y difiere entre poblaciones asiáticas (18%) y europeas (30%). La frecuencia del genotipo homocigótico 1298CC varía entre 3 y 11% en poblaciones caucásicas, entre 7% y 21% en poblaciones asiáticas, (Wu et al., 2013) y entre 1.6% y 6% en poblaciones hispanas. (Van Der Put et al., 1998)

Kumar, et al. (2005), en un grupo de 400 indios, determinaron que la frecuencia del genotipo 1298CC fue de 19.46%, lo cual fue mucho más alta que la reportada en población caucásica (9.4%), china (3.3%) y japonesa (1.6%). La frecuencia del alelo 1298C fue de 14.7% y del genotipo 1298CC de 2.3% en un estudio realizado en individuos residentes en la ciudad de México. (Rosa-Maria Guéant-Rodriguez et al., 2006)

Para el alelo 1298C y el genotipo CC, se han reportado diferencia entre mestizos e indígenas. Los mestizos muestran una frecuencia del 14% para el alelo 1298C y un 2% para el genotipo CC. En cambio, los indígenas presentan una frecuencia mucho más baja, con un 6% para el alelo 1298C y tan solo un 0,4% para el genotipo CC. mostrando un patrón inverso para el alelo 1298C, donde su frecuencia disminuye de norte a sur. (Contreras-Cubas et al., 2016)

La frecuencia del alelo 1298C en población mexicana es menor al 15% y el genotipo homocigoto para la variante es menor al 2%, sin embargo, estos datos pueden variar

según la localización geográfica (Rosa-Maria Guéant-Rodríguez et al., 2006). La prevalencia de la homocigosis TT de la variante 677 alcanza el 25% en China, mientras que, en Europa y América del Norte, varía entre el 5 y 15%. (Zeng et al., 2017)

Respecto al HGNA, algunos estudios han sugerido una posible asociación entre las variantes C677T y A1298C en el gen *MTHFR* y esta condición. Sin embargo, es importante mencionar que existen discrepancias en los resultados reportados por diferentes autores en diversas poblaciones. Siendo necesaria de mayor investigación para comprender mejor el papel de estas variantes en el HGNA y su relevancia clínica en la población mexicana. (Refsum et al., 2004)

En un estudio realizado por Zasci y colaboradores reportan en 57 pacientes con HGNA y 304 controles, una mayor prevalencia del alelo *MTHFR*-1298C (RM 2.48; CI 95% 1.28-4.78, p 0.006) y el homocigoto 1298CC (RM 2.97; CI 95% 1.02-8.84, p 0.037) en pacientes femeninas y el genotipo compuesto C677C/A1298C en pacientes masculinos (RM 2.21; CI 95% 1.003-4.90, p 0.046) asociados significativa con el HGNA. En dicho estudio, los autores no encontraron ninguna asociación significativa entre el alelo *MTHFR*-677T y el HGNA (Sazci et al., 2008) Por otro lado, en un estudio distinto realizado por Catalano y colaboradores en 2014, se observó que los niveles de ácido fólico y vitamina B12 se encontraban dentro de los parámetros normales, sin diferencia significativa en la presencia de la variante 1298AC versus el genotipo homocigoto 1298AA o genotipo silvestre. No obstante, se sugirió que la variante 1298AC podría ser un marcador de susceptibilidad para HGNA. Se encontró que la sensibilidad de la presencia la variante A1298C del gen *MTHFR* es del 77.8%. Esto significa que tiene una buena capacidad para identificar casos positivos de HGNA. Sin embargo, la especificidad

es del 32.7%, lo que indica que no identifica una considerable proporción de falsos positivos. La razón de verosimilitud positiva (RV+) es de 1.155, lo cual sugiere una evidencia débil para la asociación positiva, y la razón de verosimilitud negativa (RV-) es de 0.681, lo que indica una evidencia débil para descartar la asociación negativa. El valor predictivo positivo (VPP) es del 51.5%, lo cual significa que hay una probabilidad relativamente baja de que un resultado positivo sea ciertamente un caso de HGNA. Además, el valor predictivo negativo (VPN) es del 61.5%, lo que indica una probabilidad relativamente baja de que un resultado negativo descarte completamente la presencia de HGNA. Estos hallazgos resaltan la necesidad de considerar otros factores y pruebas adicionales para una evaluación precisa de la presencia de HGNA. (Catalano et al., 2014)

1.6 Fisiopatología

La patogénesis de el HGNA es de origen multifactorial y tiene un carácter progresivo. La literatura sugiere que los factores genéticos, los demográficos, clínicos y los ambientales, pueden influir en el desarrollo de dicha patología.

A una de las teorías propuestas para explicar la fisiopatogenia de la enfermedad, se le atribuye un papel fundamental a la metilación del ADN, proceso que regula la expresión génica y la integridad genómica durante la diferenciación celular. Existen reportes que indican una correlación directa entre la metilación genómica del ADN, el estatus de folato y una correlación inversa con los niveles plasmáticos de homocisteína. Las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* están asociados con niveles elevados de homocisteína y niveles bajos de folato, lo que puede afectar el estatus de la metilación del ADN a través de su interacción con el estatus de folato. Se sabe que la metilación anómala del ADN

genómico se asocia con múltiples enfermedades, incluyendo el cáncer. Friso, et al. (2002) estudiaron el efecto del folato en la metilación del DNA genómico encontrando correlación directa de la metilación del DNA con el nivel de folato e inversamente con los niveles plasmáticos de homocisteína. Los genotipos TT tienen un nivel de metilación de DNA disminuido en comparación con el genotipo CC, concluyendo que la variante 677C>T influye en la metilación del DNA a través de la interacción con el folato. (Zheng & Cantley, 2019)

La homocisteína es un aminoácido sulfurado que se produce durante el metabolismo de la metionina y funciona como intermediario en el metabolismo de los folatos. La principal vía de degradación de la homocisteína es a través de la síntesis de cisteína, la cual requiere de la transferencia de un grupo sulfhidrilo a la homocisteína. Esta reacción es catalizada por la enzima cistationina beta-sintasa y utiliza a la vitamina B6 como cofactor. Otra vía importante de degradación de la homocisteína es por medio de la remetilación, en la que se transfiere un grupo metilo de la 5-metiltetrahidratofolato (5-MTHF) a la homocisteína. La enzima que cataliza esta vía es la enzima metionina sintasa y requiere vitamina B12 como cofactor. Existe una vía alternativa para degradar la homocisteína, la cual implica la conversión de homocisteína en cistationina, que posteriormente se convierte en cisteína a través de la cistationina gamma-lisa. (Smith & Refsum, 2016; Stover, 2006; Zheng & Cantley, 2019)

La acumulación de homocisteína se ha asociado con daño tisular y endotelial a través de diversos mecanismos. Uno de los principales es a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la oxidación de lípidos y proteínas en las células. Los hepatocitos son particularmente susceptibles a la oxidación inducida por la homocisteína,

lo que puede resultar en daño celular, disfunción mitocondrial y apoptosis. Además, la homocisteína puede inducir inflamación y activación de las células estrelladas hepáticas, lo que contribuye a la fibrosis hepática y la cirrosis. La inflamación y la fibrosis hepática también pueden aumentar la producción de ROS y la oxidación celular. Finalmente, también puede causar disfunción endotelial al alterar la expresión de proteínas relacionadas con la regulación del flujo sanguíneo, como el óxido nítrico y la endotelina-1. (Perna et al., 2003; Z. Zhang et al., 2017)

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la homocisteína induce la peroxidación lipídica. Cuando la homocisteína se oxida al agregarse al plasma, durante la oxidación del grupo sulfhidrilo se generan radicales anión superóxido y peróxido de hidrógeno. El estrés oxidativo desencadena la peroxidación lipídica, un efecto que ocurre tanto en la superficie de la célula endotelial como en las partículas de lipoproteínas en el plasma. Cabe destacar que la peroxidación lipídica tiene un papel central en la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la cual está influenciada por factores genéticos. (Serin et al., 2007)

El ácido fólico se conoce también como vitamina B9 y es esencial para la síntesis de ADN. La deficiencia de folatos se ha asociado con varias patologías, incluyendo los defectos de cierre del tubo neural y la anemia. Si bien hay teorías que relacionan los niveles elevados de ácido fólico con la lesión hepática, hasta el momento no hay evidencia suficiente para respaldar dicha asociación. Algunos estudios han sugerido que las dosis altas de ácido fólico, en especial cuando se administra como suplemento, podrían tener efectos adversos en el hígado en algunos contextos específicos como en personas con enfermedad hepática preexistente o en combinación con otros fármacos,

sin embargo, no se ha establecido una relación causal definitiva. (Alkhoury et al., 2013; Molaqanbari et al., 2023)

El folato es esencial para una gran variedad de procesos metabólicos la síntesis de purinas, timidilato y la remetilación de la homocisteína a metionina. Es necesario para la síntesis de ADN y ARN, la metilación de proteínas, la estabilidad del genoma, la proliferación celular y la síntesis de muchos metabolitos. El metabolismo del folato es complejo y se encuentra altamente interconectado a diversas vías anabólicas y catabólicas (Field et al., 2018). Se refiere a un proceso que activa y transfiere unidades de carbono procesos biosintéticos, incluyendo la síntesis de purinas y timidina y la remetilación de la homocisteína. Implica la conversión de la forma inactiva del folato en la forma activa, el tetrahidrofolato (THF), por lo que sus productos incluyen la timidina y serina producidas por la 5, 10-metileno-THF y la metionina producida por la 5-metil-THF (Field et al., 2018; Kirac et al., 2013; Kraus et al., 2014). El folato funciona como un portador para las unidades del carbono, lo cual permite que se puedan manipular y ensamblar en otros procesos metabólicos. La Inhibición del metabolismo del folato bloquea la proliferación celular y se utiliza en antibióticos y quimioterapéuticos. (Kraus et al., 2014)

El hígado desempeña un papel crucial en el metabolismo de los folatos, incluyendo su activación y eliminación. El hígado es responsable de transformar a los folatos en su forma biológicamente activa, el ácido tetrahidrofólico (THF). Cuando existe una disminución de la función hepática, la eliminación de los folatos disminuye y como consecuencia pueden acumularse en la sangre. Por otro lado, el ácido fólico se correlaciona con la vitamina B12 en el metabolismo celular. La vitamina B12 participa en

la conversión del ácido fólico en el THF. Al existir una deficiencia de esta vitamina, secundario a la enfermedad hepática, puede ocasionar una interrupción en el metabolismo celular y posteriormente llevar a una acumulación de folatos en sangre. La deficiencia de vitamina B12 en pacientes con hepatopatía puede deberse a múltiples factores, como la mala absorción en el intestino, la reducción en la producción de factores intrínsecos necesarios para la absorción o el aumento de las pérdidas hepáticas. (Estes et al., 2018; García et al., 2019; Molaqanbari et al., 2023)

Se ha demostrado que la deficiencia de folato aumenta el riesgo de enfermedades, sin embargo, todavía no se comprende por completo la relación causal entre folatos y ciertas patologías como la enfermedad hepática. (Field et al., 2018)

Justificación y planteamiento del problema.

El HGNA es una enfermedad metabólica que se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado en ausencia de consumo excesivo del alcohol. Se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia y su asociación con enfermedades hepáticas más graves como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Se estima que aproximadamente el 30% de la población mexicana tiene HGNA, lo que indica la necesidad de investigar los factores que contribuyen a su desarrollo y progresión.

El HGNA es una enfermedad multifactorial en la que interactúan factores genéticos y ambientales. Entre los factores genéticos, se ha reportado que las variantes en el gen *MTHFR* pueden desempeñar un papel en el desarrollo y progresión del HGNA. El gen *MTHFR* codifica una enzima que juega un papel crucial en el metabolismo del folato y la metionina, y las variantes genéticas en este gen pueden afectar la actividad enzimática y la concentración de homocisteína en sangre.

Se han identificado varias variantes en el gen *MTHFR*, pero dos de las más frecuentes y estudiadas son los alelos 677T y 1298C. Estas variantes están asociadas con cambios en la actividad enzimática de la *MTHFR* y la concentración de homocisteína en sangre. La hiperhomocisteinemia se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, trombosis venosa profunda y enfermedades hepáticas, incluido el HGNA.

A pesar de la evidencia existente sobre la relación entre los alelos 677T y 1298C del gen *MTHFR* y el HGNA en diversas poblaciones, hay una falta de investigación específica en

la población mestiza. La población mestiza mexicana es una mezcla de ascendencia amerindia y europea, y representa una proporción significativa de nuestra población. Dada su importancia demográfica y la prevalencia creciente del HGNA en México, es importante investigar si estas variantes genéticas están asociadas con un mayor riesgo de desarrollar HGNA en México.

La identificación de marcadores genéticos asociados con el HGNA podría tener implicaciones clínicas importantes. Por un lado, permitiría entender la participación de algunos de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la enfermedad y por otro, implementar estrategias de prevención y terapéuticas más efectivas.

Hipótesis

Los individuos con diagnóstico de HGNA tendrán una mayor prevalencia de los genotipos heterocigoto y homocigoto para las variantes *MTHFR*-677T y/o *MTHFR*-1298C, niveles séricos más elevados de homocisteína y niveles séricos más bajos de ácido fólico y vitamina B12, en comparación con el grupo de individuos sin HGNA.

Objetivos

4.1 Objetivo general:

Investigar si las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* son factores de riesgo asociados al desarrollo del HGNA, y determinar la posible asociación de los diferentes genotipos de estas con los niveles de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12, y el desarrollo de esta hepatopatía.

4.2 Objetivos específicos:

1. Determinar las prevalencias alélicas y genotípicas para las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* en individuos con y sin HGNA.
2. Determinar los niveles de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 en individuos con y sin HGNA y su asociación con las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* de forma independiente y combinadas.

Metodología

5.1 Tipo de estudio

Es un estudio observacional, descriptivo y transversal

5.2 Muestra estudiada

Se incluyeron 268 trabajadores del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por medio del protocolo “Asociación del consumo de fructosa, azúcares añadidos, grasas saturadas y grasas de origen animal con la grasa corporal y hepática en individuos aparentemente sanos”.

5.3 Criterios de selección

5.3.1 Criterios de inclusión:

- Individuos mayores de 18 años de edad, aparentemente sanos.
- Cualquier sexo.

5.3.2 Criterios de no exclusión:

- Individuos con diabetes mellitus e hipertensión arterial sistémica controlada.

5.3.3 Criterios de exclusión:

- Personas con las siguientes patologías: diagnóstico de hígado graso, cáncer, enfermedades del corazón, cirrosis, hipertiroidismo, hipotiroidismo, enfermedades autoinmunes, insuficiencia renal, discapacidad motriz, amputaciones de miembros.
- Personas con antecedente de cirugía bariátrica, portadores de prótesis metálicas o marcapasos.
- Personas que utilicen medicamentos que modifiquen la composición corporal (esteroides, antipsicóticos, antidepresivos).

5.4 Estudios moleculares.

Extracción de ADN.

Posterior a la firma del consentimiento informado se obtuvo una muestra de 5ml de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA para extracción de ADN genómico por medio de la técnica *salting out*. La cuantificación, calidad y pureza del material genético se realizó mediante espectrofotometría de microvolumen utilizando un nanodrop y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Genotipificación.

Se realizó un estudio de discriminación alélica con sondas TaqMan® para las variantes 667T y 1298C del gen *MTHFR*.

Sondas TaqMan®

- *MTHFR*-C677T (rs1801133)

Secuencia:

GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG [G/A] CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA

- *MTHFR*-A1298C (rs1801131)

Secuencia:

AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCCCA

Procedimiento del ensayo

1. Alicuotar por duplicado 2 µL de ADN a 35ng/ µl (punto 4.2.1) de muestra problema y controles de genotipo conocidos (silvestre, heterocigoto, mutado), en tiras de PCR rotuladas, esperar a que se evapore la muestra.
2. Se descongeló y colocó la mezcla maestra de reacción de sonda TaqMan®.
3. Se descongeló la sonda TaqMan® y mantuvo en hielo protegida de la luz.
4. Se rotuló la tira de pozos.

5. Se preparó la mezcla de reacción para el número total de muestras a procesar y se mantuvo en hielo.
6. Se mezclaron los reactivos 4 veces por pipeteo.
7. Se alicuotaron 8 µL de la mezcla de reacción en tubos de tiras de PCR.
8. Se taparon herméticamente las tiras de PCR.
9. Se encendió el equipo de Tiempo Real.
10. Se abrió el programa y se seleccionó la aplicación Discriminación Alélica.
11. Se colocaron las muestras en el equipo e iniciar corrida.
12. Condiciones de PCR:
 - 1 ciclo 95°C por 10 minutos
 - 40 ciclos 92°C por 15 segundos, 60°C por 1 min
 - 1 ciclo 4°C
13. Se analizaron los genotipos mediante las gráficas de amplificación generadas para cada sonda alelo específica o utilizando el módulo de análisis de discriminación alélica disponible en el software del termociclador de Tiempo Real.

La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo con la siguiente tabla:

Correlación sonda/secuencia en la gráfica de discriminación alélica

FLUORESCENCIA DETECTADA (Tipo fluorocromo incorporado a la sonda)	GENOTIPO	LOCALIZACIÓN
VIC (Roja)	Homocigoto silvestre	Esquina inferior derecha
FAM (Azul)	Homocigoto mutante	Esquina superior izquierda
Ambas (Verde)	Heterocigoto	Esquina superior derecha
	Control negativo (sin muestra)	Esquina inferior izquierda

5.5 Características demográficas.

Se realizó cuestionario para obtener la información demográfica de los individuos, incluyendo, sexo y edad.

5.6 Características clínicas.

Se obtuvo información de las determinaciones de los niveles séricos del ácido fólico, la vitamina B12 y la homocisteína. Del mismo modo, el departamento de gastroenterología y nutriología clínica realizaron medidas antropométricas, incluyendo el IMC. Se utilizó la clasificación de la OMS para el IMC, considerándose normal de 18.5 a 24.9 kg/m², peso bajo un IMC <18.5 kg/m², sobrepeso entre 25 y 29.9 kg/m², y obesidad >30 kg/m².

Finalmente, se realizó un *FibroScan* para observar el grado de esteatosis hepática. Se utilizó el parámetro de atenuación controlada (CAP) para determinar los grados de esteatosis hepática. Considerando la ausencia de esteatosis (E0) con un CAP <248 dB/m, grado uno (E1) entre 248 y 268 dB/m, el grado dos (E2) con 269 a 280 dB/m y el grado tres (E3) un CAP >280 dB/m.

5.7 Análisis estadístico.

Análisis de variables continuas: Para el análisis de las variables continuas, se utilizaron medidas de resumen, como la mediana y los rangos intercuantiles, cuando las variables no presentaban una distribución normal. En caso de requerir la comparación de las distribuciones entre dos grupos, se optó por la prueba U de Mann-Whitney, dada por:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Donde,

n_1 = tamaño de la muestra del grupo 1.

n_2 = tamaño de la muestra del grupo 2.

R_1 = sumatoria de los rangos del grupo 1.

R_2 = sumatoria de los rangos del grupo 2.

En situaciones donde se precisaba la comparación entre tres o más grupos, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, definida por:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^g \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

Donde (n) es el número total de observaciones, (g) es el número de grupos, (R_i) es la suma de los rangos en el grupo (i), y (n_i) es el número de observaciones en el grupo (i).

Análisis de variables categóricas: Para las variables categóricas, se utilizaron medidas de resumen como las frecuencias simples, razones y proporciones. Las pruebas de *chi cuadrado* (χ^2) de *Pearson* o la *regresión logística* se emplearon para la comparación de estas variables. Para la prueba de χ^2 , la ecuación es:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

donde (O_i) son las frecuencias observadas y (E_i) son las frecuencias esperadas.

En el caso de la *regresión logística*, la relación entre las variables predictoras (X) y la variable de respuesta binaria (Y) se modela mediante la siguiente fórmula:

$$\log \left(\frac{p}{1-p} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p$$

donde (p) es la probabilidad de éxito ($Y = 1$), y los (β) son los coeficientes de regresión que se estiman a partir de los datos.

Análisis de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR*: Para el análisis de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR*, se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas, entre grupos mediante pruebas de χ^2 , prueba exacta de Fisher o regresión logística. Además, se confirmó que las variantes estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg en los grupos estudiados, de acuerdo con la ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

Donde,

- p representa la frecuencia del alelo "A" en la población.
- q representa la frecuencia del alelo "a" en la población.
- p^2 representa la frecuencia del genotipo homocigoto AA.
- q^2 representa la frecuencia del genotipo homocigoto aa.
- $2pq$ representa la frecuencia del genotipo heterocigoto Aa.

Para evaluar el posible efecto combinado de las variantes C677T y A1298C, se realizó comparación de frecuencias genotípicas bajo dos modelos de herencia: el dominante y un modelo de genotipos compuestos, que incluyó 6 combinaciones observadas en la muestra: CC₆₇₇-AA₁₂₉₈, CC₆₇₇-AC₁₂₉₈, CC₆₇₇-CC₁₂₉₈, CT₆₇₇-AA₁₂₉₈, CT₆₇₇-AC₁₂₉₈, TT₆₇₇-AA₁₂₉₈.

Para evaluar la asociación entre los genotipos o alelos de las variantes de *MTHFR* y el grado de esteatosis hepática, se empleó un análisis de regresión logística ordinal. Esta prueba estadística permite modelar la relación entre una variable de respuesta ordinal, es decir, una variable con categorías ordenadas, y un conjunto de variables predictoras. En este modelo, la variable de respuesta ordinal fue el grado de esteatosis hepática (sin esteatosis = 0, esteatosis grados = 1, 2 y 3). Los genotipos o los alelos de cada variante se incluyeron como variables predictoras.

El modelo de regresión logística ordinal se puede describir formalmente con la siguiente ecuación:

$$\log \left[\frac{P(\text{Esteatosis} \leq j|X)}{1 - P(\text{Esteatosis} \leq j|X)} \right] = \alpha_j - (\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_p x_p)$$

Donde, "Esteatosis" es la variable de respuesta ordinal, $j = 0, 1, 2, 3$ son las categorías de la variable de respuesta, $X = (x_1, x_2, \dots, x_p)$ son las variables predictoras que en este caso corresponden a los genotipos o alelos de cada variante, α_j son los umbrales de categoría que son específicos de cada categoría y β_i son los coeficientes de regresión que se estiman a través de la maximización de la función de verosimilitud. En este modelo, los coeficientes de regresión β_i se interpretan en términos de las probabilidades acumulativas en lugar de las probabilidades individuales.

La suposición básica de este modelo es la de las probabilidades proporcionales, también conocida como supuesto de regresión paralela. Esto implica que el efecto de cualquier predictor es el mismo en todos los niveles de la variable de respuesta. En el contexto de nuestro estudio, esto significa que la asociación entre los genotipos o alelos y la probabilidad de tener un grado mayor de esteatosis hepática se espera que sea la misma en todos los niveles de esteatosis. Este supuesto fue evaluado mediante la prueba de Brant. La elección de la regresión logística ordinal permite una evaluación robusta y detallada de la relación entre estas variantes genéticas y el grado de esteatosis hepática, tomando en cuenta el orden inherente de las categorías de esteatosis.

Análisis de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12: Para evaluar la asociación entre las concentraciones de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 con el HGNA se realizaron distintas pruebas estadísticas. Primero, se realizó un análisis de la distribución entre casos con HGNA y controles del grupo de comparación. Además, se realizaron

pruebas no paramétricas de igualdad de medianas para evaluar la frecuencia de individuos que presentaban valores por arriba y debajo de la mediana en los grupos estudiados. También, con el propósito de comparar el efecto de los extremos de la distribución de cada grupo se realizó la comparación de frecuencias de individuos con valores en los cuartiles superiores ($\geq P75$) e inferiores ($\leq P25$) para estas variables. Por otra parte, para evaluar las relaciones lineales entre estas variables se realizaron una serie de análisis de regresión lineal simple. Adicionalmente, para evaluar el posible efecto de las variantes del metabolismo de los folatos sobre las concentraciones séricas de estas variables se efectuaron comparaciones tanto inter como intragrupo para evaluar las posibles diferencias. Las comparaciones entre grupos examinaron las diferencias entre individuos (HGNA vs sin HGNA) que poseen los genotipos homocigotos silvestres y aquellos con genotipos heterocigotos o homocigotos para las variantes. Por otro lado, las comparaciones intragrupo se realizaron entre los individuos portadores de los distintos genotipos C677T (CC vs CT + TT) y A1298C (AA vs AC + CC) dentro de cada grupo de casos con y sin HGNA.

Análisis del perfil metabólico: Para evaluar el riesgo de HGNA en presencia de un cierto perfil metabólico, se incluyeron un grupo de variables conocidas como factores de riesgo y como marcadores de esteatosis hepática, tales como: el análisis el índice HOMA-IR, que es un indicador de resistencia a la insulina, los niveles de diferentes tipos de colesterol (total, LDL y HDL), y los niveles de triglicéridos (TGD). Los resultados se presentan en la Tabla 9. Adicionalmente, estas mismas variables se analizaron de acuerdo con los genotipos agrupados (C677T: CC vs CT+TT; y A1298C: AA vs AC+CC).

Análisis de marcadores de enfermedad hepática: Se llevó a cabo un análisis de marcadores de enfermedad hepática para evaluar su asociación con HGNA. Las variables analizadas fueron: enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT, FA), bilirrubinas (total [BT], directa [BD], e indirecta [BI]) proteínas séricas (albúmina y globulinas) y el recuento de plaquetas.

Análisis de asociación de variantes de MTHFR y fibrosis hepática: Se realizó un análisis de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* de acuerdo con el grado de fibrosis hepática. Este análisis incluyó tanto los genotipos individuales como los compuestos de las variantes, y comparó sus frecuencias en individuos con y sin HGNA, además estratificados según el grado de fibrosis hepática. Con este análisis se evaluó no solo la relación entre las variantes genéticas y el HGNA, sino también cómo estas variantes pueden estar asociadas con la gravedad o progresión de la fibrosis hepática en los individuos con HGNA.

Análisis estratificado por sexo: Para identificar y cuantificar las posibles diferencias en los factores de riesgo para el HGNA en las mujeres y los hombres de la población de estudio, se realizó un análisis estratificado de todas las variables previamente analizadas, pero ahora, agrupando por grupos de mujeres y hombres. Este análisis se realizó utilizando modelos de regresión logística.

Los análisis estadísticos descritos previamente, consideran la utilización de múltiples comparaciones, lo cual incrementa la probabilidad de errores de Tipo I (falsos positivos). Para contrarrestar este problema y ajustar la significancia estadística de los resultados, se utilizó la corrección del método de la Tasa de Falsos Descubrimientos (FDR, por sus siglas en inglés "False Discovery Rate"). Este método, propuesto por Benjamini y

Hochberg, controla la tasa esperada de falsos descubrimientos, es decir, el porcentaje esperado de rechazos incorrectos de la hipótesis nula entre todos los rechazos. Esta corrección es particularmente útil cuando se realizan múltiples pruebas simultáneas, como es el caso de nuestro estudio. La significancia estadística se estableció en un valor de p ajustado por FDR menor a 0.05, lo que indica que se espera que el 5% de los hallazgos significativos sean falsos positivos.

Finalmente, para la realización de todos los análisis estadísticos se utilizaron los programas STATA y R. STATA es un programa de software integrado que proporciona herramientas para la gestión de datos, el análisis estadístico y la generación de gráficos. Se seleccionó por su gran capacidad para manejar grandes bases de datos y por la variedad de comandos de análisis estadístico que permite utilizar. Por otro lado, R es un lenguaje de programación y un entorno de software para análisis estadístico y visualización de datos. Su flexibilidad, junto con su amplia gama de paquetes disponibles para análisis especializados, lo hicieron adecuado para el procesamiento de nuestros datos. Cabe señalar que todos los códigos utilizados para el procesamiento y análisis de datos han sido debidamente documentados en un documento escrito en formato *Rmarkdown* y se encuentran disponibles a solicitud, para garantizar la reproducibilidad de nuestro estudio y permitir futuras investigaciones basadas en nuestros resultados. Además, para facilitar la interpretación y presentación de los resultados emplearon técnicas de visualización gráfica. Específicamente, se generaron gráficos combinados de cajas y violines (Box/Violin plots) para las comparaciones entre grupos. Estos gráficos, producidos con el paquete [ggbetweenstats](#) de R, ofrecen una representación visual de la distribución y la dispersión de los datos, permitiendo un análisis descriptivo más

completo. El gráfico de caja muestra la mediana, los cuartiles y los valores atípicos de los datos, mientras que el gráfico de violín añade una estimación de la densidad de kernel, ofreciendo una visión más detallada de la distribución de los datos. Adicionalmente, se añadieron puntos aleteados (jittered) para proporcionar una visualización directa de cada observación. Los detalles estadísticos asociados a las comparaciones entre grupos se incluyeron en el gráfico como subtítulos, lo que facilita la interpretación y el análisis de los resultados obtenidos. Estos gráficos no solo proporcionaron una visualización efectiva de los datos, sino que también permitieron la identificación de posibles tendencias y anomalías.

Resultados

6.1 Análisis de las características demográficas y clínicas.

El presente estudio incluyó un total de 268 participantes, de los cuales, 133 (49.62%) individuos no presentaban esteatosis según los resultados del *FibroScan*, mientras que en 135 (50.37%) individuos se encontró algún grado de esteatosis hepática: 28 (20.74%) grado 1, 24 (17.52%) grado 2, y 83 (61.48%) grado 3.

De los 268 participantes, 162 fueron mujeres (60.45%) y 106 hombres (39.55%). Si bien, las mujeres tuvieron una mayor participación con una razón mujer a hombre (m:h) de 1.53:1, el análisis por grupos identificó diferencias en la proporción de hombres y mujeres. Así, mientras que en el grupo de afectados con HGNA la razón m:h se redujo a 1.11:1, en el grupo sin HGNA la razón se incrementó a 2.16:1. Esta diferencia es resultado de una mayor frecuencia de hombres (47.41%) en el grupo con HGNA que en el grupo de comparación (31.58%), con una razón de momios de 1.95 (IC 95% 1.19 - 3.22; $p = 0.008$) (Tabla 1).

Respecto a la edad de los participantes, la mediana fue de 38.5 años, con una edad mínima fue de 19 años y máxima de 77 años. Los individuos con HGNA presentaron una mediana de edad mayor que el grupo de individuos sin HGNA, 45 (Rango Intercuartil [RI] 31.5, 54) y 32 (RI 26, 53) años respectivamente. Para evaluar la relación de la edad con la presencia de HGNA, se realizó un análisis de regresión logística que mostró una razón de momios de 1.024 (IC 95%: 1.006 - 1.042, $p = 0.003$). Esto sugiere que, por cada año de edad la probabilidad de desarrollar HGNA aumenta un ~3% de forma significativa (Tabla 1).

En el total de la muestra, la mediana del Índice de Masa Corporal (IMC) fue de 26.47 kg/m² (RI 23.31, 30.15). Por su parte, los individuos afectados con HGNA presentaron una mediana de IMC superior 28.61 kg/m² (RI 26.07, 32.14) que aquellos sin HGNA con una mediana de IMC de 24.55 kg/m² (RI 22.08, 27.06). La comparación de la distribución del IMC en ambos grupos mostró diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney ($z = 7.578$, $p = 3.52 \times 10^{-14}$) (Gráfico 1). Y mediante el análisis de regresión logística se obtuvo una razón de momios de 1.27 (IC95% 1.18 - 1.36, $z = 6.67$, $p = 2.58 \times 10^{-11}$), lo que implica que, por cada unidad de incremento en el IMC la probabilidad de tener HGNA aumenta en un 27.05% (Tabla 1). En el gráfico 1 se muestra la distribución del IMC en ambos grupos.

Además, el IMC se clasificó siguiendo la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS): aquellos con un IMC < 18.5 se categorizaron como "Bajo peso", aquellos con un IMC entre ≥ 18.5 y <25 como "Peso normal", aquellos con un IMC entre ≥ 25 y <30 como "Sobrepeso" y, finalmente, aquellos con un IMC de 30 o más como "Obesidad". En el grupo de afectados con HGNA, la mayoría presentaron obesidad (55 individuos, 40.74%) y sobrepeso (58 individuos, 42.96%), mientras que solo el 16.30% (22 individuos) presentaron un peso normal. En contraste, en el grupo sin HGNA, la categoría más común fue el peso normal (67 individuos, 50.38%), seguido por sobrepeso (48 individuos, 36.09%), obesidad (14 individuos, 10.53%) y, por último, bajo peso (4 individuos, 3.01%) (Tabla 1).

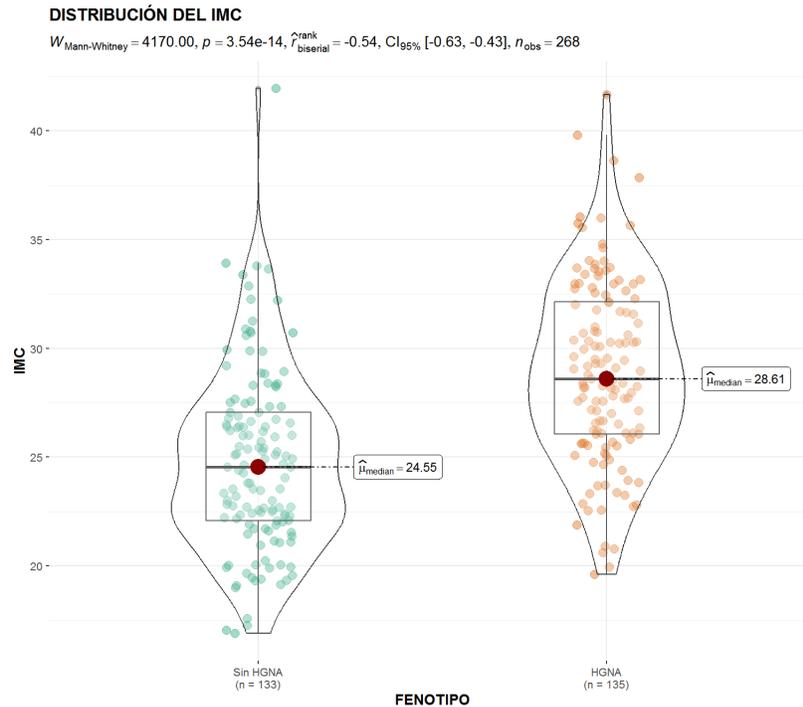
Con el propósito de analizar la frecuencia de individuos expuestos a un IMC ≥ 25 , se estratificó la población en dos grupos (Peso normal y Sobrepeso + Obesidad) excluyendo 4 individuos considerados como de bajo peso. En esta comparación se observó que los individuos con sobrepeso u obesidad tuvieron una prevalencia significativamente más alta de HGNA. De 175 individuos identificados con sobrepeso u obesidad, 113 (64.57%) fueron diagnosticados con HGNA. En contraste, solo 22 de 89 (24.72%) individuos con un IMC normal fueron diagnosticados con HGNA. Además, la comparación de frecuencias entre casos y controles mostró una asociación estadísticamente significativa entre el HGNA y la presencia de sobrepeso u obesidad, con una razón de momios de 5.55 (IC 95% 3.03 - 10.32), χ^2 37.50, p 9.15×10^{-10} . Esto demuestra que los individuos con sobrepeso u obesidad tienen una mayor probabilidad de desarrollar HGNA, más de cinco veces que aquellos con un peso corporal normal. Además, la fracción atribuible al grupo expuesto (AFE) es 0.82 (IC 95% 0.67 - 0.90), lo que sugiere que, si se eliminan la obesidad y el sobrepeso, se podría prevenir el 82% de los casos de HGNA en la población expuesta.

Tabla 1. Datos demográficos de los individuos

VARIABLE	TOTAL n = 268 ¹	HGNA n = 135 ¹	SIN HGNA n = 133 ¹	RM (IC 95%)	P ²
EDAD	38.5 (28, 54)	45 (31.5, 54)	32 (26, 53)	1.03 (1.01 - 1.04)	0.003
SEXO					
Femenino	162 (60.45%)	71 (52.59%)	91 (68.42%)	Referencia	
Masculino	106 (39.55%)	64 (47.41%)	42 (31.58%)	1.95 (1.19 - 3.22)	0.008
IMC					
Mediana (RI)	26.47 (23.31, 30.15)	28.61 (26.07, 32.14)	24.55 (22.08, 27.06)	1.27 (1.18 - 1.36)	2.58 x 10⁻¹¹
Categorías					
Normal	89 (33.21%)	22 (16.30%)	67 (50.38%)	Referencia	
Bajo peso	4 (1.49%)	0 (0.00%)	4 (3.01%)	-	
Sobrepeso	106 (39.55%)	58 (42.96%)	48 (36.09%)	3.93 (1.99 - 6.80)	0.00003
Obesidad	69 (25.75%)	55 (40.74%)	14 (10.53%)	11.65 (5.60 - 24.7)	1.47 x 10⁻¹⁰
Sobrepeso + Obesidad	175 (65.30%)	113 (83.70%)	62 (46.62%)	5.55 (3.03 - 10.32)	9.15 x 10⁻¹⁰
GRADO DE ESTEATOSIS					
E1	28 (20.74%)	28 (20.74%)	-		
E2	24 (17.78%)	24 (17.78%)	-		
E3	83 (61.48%)	83 (61.48%)	-		

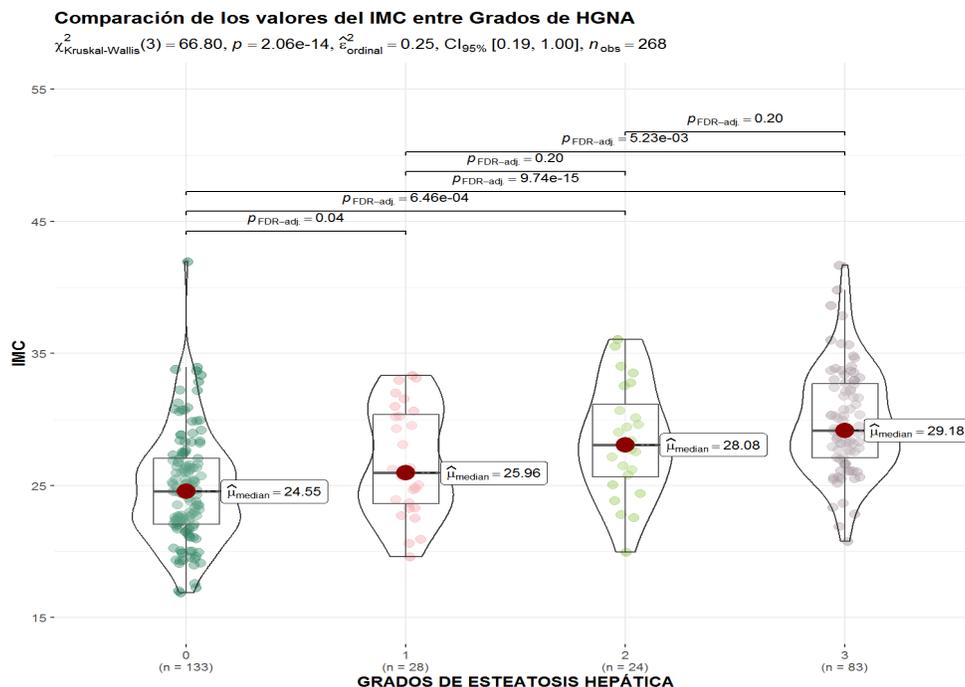
Mediana (RI [Rango intercuarti p25 - p75])^{*}. ¹ n (%). ² χ^2 de Pearson; Prueba exacta de Fisher

Figura 1. Distribución del IMC en individuos con y sin HGNA



Además, se evaluaron las diferencias de los valores del IMC de acuerdo con los grados de esteatosis hepática. En estos grupos, se observó que la mediana del IMC se incrementa con el grado de esteatosis hepática. En los individuos con esteatosis grado 1 la mediana de IMC fue de 25.96 kg/m² (RI 23.52, 30.45), en aquellos con esteatosis grado 2 de 28.08 kg/m² (RI 25.45, 31.62) y para quienes presentaron esteatosis grado 3 de 29.18 kg/m² (RI 27.02, 32.76). Mientras que para el grupo de individuos sin HGNA, la mediana fue de 24.55 kg/m² (RI 22.08, 27.06). La comparación del IMC en estos grupos mostró diferencias estadísticas significativas respecto al grupo de comparación, para los individuos con los tres grados de esteatosis: E1 ($p = 0.04$), E2 ($p = 6.46 \times 10^{-04}$) y E3 ($p = 9.74 \times 10^{-15}$). Además, se encontraron DES al comparar los valores del IMC entre el grado E1 con el E3 ($p = 5.23 \times 10^{-3}$). No se observaron DES entre los E1 y E2, así como entre los E2 y E3. En la figura 2 se muestra la distribución del IMC de los individuos de acuerdo con el grado de esteatosis hepática.

Figura 2. Comparación de los valores del IMC entre los grados de HGNA



6.2 Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen *MTHFR*.

En el presente estudio, se analizaron dos variantes del gen *MTHFR*, específicamente C677T y A1298C, debido a que han sido previamente reportadas en asociación con HGNA. El análisis de estas variantes incluye la descripción de las frecuencias genotípicas y alélicas, así como la evaluación de la asociación entre estas variantes y la presencia de esteatosis. La sección **6.2.1** presenta los resultados para la variante C677T, mientras que la sección **6.2.2** detalla los resultados de la variante A1298C. En la sección **6.2.3**, se evalúa la asociación entre los genotipos compuestos de las variantes C677T y A1298C con la presencia de HGNA.

6.2.1 Frecuencias alélicas y genotípicas para la variante C677T del gen *MTHFR*.

En los 268 individuos, los genotipos de la variante C677T se distribuyeron de la siguiente manera: 56 (20.90%) individuos homocigotos silvestres (CC), 141 (52.61%) heterocigotos (CT), y 71 (26.49%) homocigotos para la variante (TT). La comparación de frecuencias genotípicas en los individuos con y sin HGNA no mostró DES ($\chi^2_{[2 \text{ gl}]} = 0.40$, $p = 0.818$) (Tabla 2).

En cuanto a las frecuencias alélicas, en el total de la muestra el alelo T fue más prevalente con una frecuencia de 52.81%, mientras que la frecuencia del alelo C fue de 47.19%. Por grupos, la frecuencia de la variante también fue similar en los individuos con (51.09%) y sin HGNA (53.7%) ($\chi^2_{[1 \text{ gl}]} = 0.36$, $p = 0.546$). Además, la variante se encontró

¹ [gl] = Número de grados de libertad de la prueba χ^2 de Pearson.

en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos, valor p de 0.863 y 0.388, respectivamente (Tabla 2).

6.2.2 Frecuencias alélicas y genotípicas para la variante A1298C del gen *MTHFR*.

Para la variante A1298C, en los 268 individuos, las frecuencias genotípicas se distribuyeron de la siguiente forma: homocigotos silvestres (AA) 200 (74.63%), heterocigotos (AC) 61 (22.76%) y homocigotos para la variante (CC) 7 (2.61%) (Tabla 2). Similar a lo observado para la variante C677T, la comparación de las frecuencias genotípicas no mostró DES entre los grupos con y sin HGNA ($\chi^2_{[2\text{ gl}]} = 3.43$, $p = 0.180$).

En el total de la muestra, el alelo A de la variante A1298C tuvo una frecuencia del 86%, mientras que el alelo C se encontró en 14%. La comparación de frecuencias alélicas entre los individuos con y sin HGNA tampoco mostró DES ($\chi^2_{[1\text{ gl}]} = 0.31$, $p = 0.581$). Y la variante también se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg en ambos grupos, valor p = 0.737 y 0.051, respectivamente (Tabla 2).

La tabla 2 muestra la distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas en ambos grupos, además, se presentan los valores de la razón de momios (RM) con intervalo de confianza del 95% y los valores de p correspondientes para evaluar la significancia estadística de las asociaciones. Ninguna de estas observaciones alcanzó significancia estadística.

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen *MTHFR*.

VARIABLE	TOTAL n = 268 ¹	HGNA n = 135 ¹	SIN HGNA n= 133 ¹	RM (IC 95%)	P
VARIANTE C677T					0.818 ²
CC	56 (20.90%)	28 (20.74%)	28 (21.05%)	Referencia	
CT	141 (52.61%)	69 (51.11%)	72 (54.14%)	0.96 (0.52-1.78)	0.893 ⁴
TT	71 (26.49%)	38 (28.15%)	33 (24.81%)	1.15 (0.57-2.32)	0.693 ⁴
FRECUENCIA ALÉLICA					
C	253 (47.19%)	125 (46.30%)	128 (48.12%)	Referencia	
T	283 (52.81%)	145 (53.70%)	138 (51.88%)	1.10 (0.78-1.58)	0.546 ²
EHW		0.863	0.388		
VARIANTE A1298C					0.180 ²
AA	200 (74.63%)	97 (71.85%)	103 (77.44%)	Referencia	
AC	61 (22.76%)	36 (26.67%)	25 (18.80%)	1.53 (0.86-2.73)	0.152 ⁴
CC	7 (2.61%)	2 (1.48%)	5 (3.76%)	0.42 (0.08-2.24)	0.313 ⁴
FRECUENCIA ALÉLICA					
A	461 (86.00%)	230 (85.22%)	231 (86.80%)	Referencia	
C	75 (14.00%)	40 (14.78%)	35 (13.20%)	1.15 (0.68-1.93)	0.580 ²
EHW		0.737	0.051		

¹ n (%). ² χ^2 de Pearson 2x3 y 2x2; Prueba exacta de Fisher. ³ EHW valor p de la prueba de Equilibrio de Hardy Weinberg, prueba exacta. ⁴ Regresión logística.

6.2.3 Análisis de asociación de los genotipos compuestos de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR*.

Para evaluar el posible efecto combinado de las variantes C677T y A1298C en el gen *MTHFR*, se realizaron dos tipos de análisis de comparación de frecuencias genotípicas. El primer análisis, se basó en un modelo de herencia dominante en el que se comparó la frecuencia de los individuos con al menos un alelo de riesgo (es decir, los genotipos heterocigotos CT y homocigotos mutados TT) y aquellos portadores del genotipo homocigoto silvestre (CC) entre casos y controles. El segundo análisis examinó las diferentes combinaciones de genotipos (genotipos compuestos) en los individuos con y sin HGNA para explorar patrones de asociación más complejos.

La comparación de las frecuencias genotípicas, utilizando un modelo de herencia dominante entre individuos con y sin HGNA, no mostró DES para ninguna de las variantes de *MTHFR*. Para la variante C677T, en los individuos con y sin HGNA las frecuencias observadas fueron 79.26% y 78.95%, respectivamente ($p = 0.950$). De manera similar, para la variante A1298C no se observaron diferencias significativas en las frecuencias de los individuos con HGNA y el grupo de comparación, 28.15% y 22.56%, respectivamente ($p = 0.293$).

El análisis de los genotipos compuestos de las variantes C677T y A1298C, reveló un posible efecto de interacción génica de riesgo para HGNA. En el total de la muestra, el genotipo compuesto más frecuente fue CT₆₇₇-AA₁₂₉₈, observado en el 36.57% (n=98), seguido de las combinaciones TT₆₇₇-AA₁₂₉₈ y CT₆₇₇-AC₁₂₉₈ presentes en el 26.49% (n=71) y 16.04% (n=43) respectivamente. La combinación de genotipos homocigotos silvestres para ambas variantes CC₆₇₇-AA₁₂₉₈ tuvo una frecuencia baja observándose sólo en el 11.57% (n=31) de la muestra estudiada. Por otra parte, el genotipo doble homocigoto para ambas variantes no se encontró en ninguno de los individuos estudiados. Mediante el análisis de regresión logística se identificó una asociación de riesgo estadísticamente significativa en los portadores del genotipo heterocigoto compuesto CT₆₇₇-AC₁₂₉₈, con una RM de 2.25 (IC 95% 1.08 - 4.70, $z = 2.16$, $p = 0.031$), tomando como grupo de referencia a los individuos con la combinación más frecuente en la muestra estudiada (CT₆₇₇-AA₁₂₉₈). La frecuencia de este genotipo heterocigoto compuesto CT₆₇₇-AC₁₂₉₈ fue del 20% (n=27) en los casos con HGNA y 12.03% (n=16) en el grupo de comparación. El resto de los genotipos compuestos no mostraron DES entre los individuos con y sin HGNA.

Tabla 3. Distribución de genotipos de las variantes C677T y A1298C de *MTHFR* agrupados para el modelo dominante y compuestos.

GENOTIPO	TOTAL n = 268 ¹	HGNA n = 135 ¹	SIN HGNA n = 133 ¹	RM (IC95%)	P
GENOTIPO 677					
CC	56 (20.90%)	28 (20.74%)	28 (21.05%)	Referencia	
CT+TT	212 (79.10%)	107 (79.26%)	105 (78.95%)	1.02 (0.54 – 1.92)	0.950 ²
GENOTIPO 1298					
AA	200 (74.63%)	97 (71.85%)	103 (77.44%)	Referencia	
AC+CC	68 (25.37%)	38 (28.15%)	30 (22.56%)	1.35 (0.75 – 2.43)	0.293 ²
GENOTIPOS COMPUESTOS					
CC ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	31 (11.57%)	17 (12.59%)	14 (10.53%)	1.62 (0.72-3.65)	0.245 ³
CC ₆₇₇ -AC ₁₂₉₈	18 (6.72%)	9 (6.67%)	9 (6.77%)	1.33 (0.49-3.65)	0.575 ³
CC ₆₇₇ -CC ₁₂₉₈	7 (2.61%)	2 (1.48%)	5 (3.76%)	0.53 (0.10-2.88)	0.465 ³
CT ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	98 (36.57%)	42 (31.11%)	56 (42.11%)	Referencia	-
CT ₆₇₇ -AC ₁₂₉₈	43 (16.04%)	27 (20.00%)	16 (12.03%)	2.25 (1.08-4.70)	0.031³
TT ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	71 (26.49%)	38 (28.15%)	33 (24.81%)	1.54 (0.83-2.84)	0.171 ³

¹ n (%), ² χ^2 de Pearson, ³ Regresión logística.

6.3 Distribución de genotipos de las variantes de *MTHFR* de acuerdo con el grado de HGNA.

En la sección siguiente se presenta el análisis de la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen *MTHFR* en relación con el grado de HGNA estratificado de acuerdo con el resultado del *FibroScan*: Esteatosis hepática grado 1 (E1), grado 2 (E2) y grado 3 (E3). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Es importante señalar que existe un desbalance en el tamaño de muestra de los grupos de esteatosis, con un número menor de casos en E1 (n = 28) y E2 (n = 24) en comparación con E3 (n = 83) y el grupo sin HGNA (n = 133). Este desbalance en el tamaño de muestra podría afectar la probabilidad de observar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En cuanto a la variante C677T, la frecuencia de individuos con genotipo homocigoto silvestre CC fue similar en los grupos con y sin HGNA, 20.74% (n = 28) y 21.05% (n = 28), respectivamente. Incluso, en los subgrupos de esteatosis las frecuencias del genotipo CC también fueron similares: E1 (21.43%, n = 6), E2 (20.83%, n = 5) y E3 (20.48%, n = 17). Por otro lado, el genotipo heterocigoto CT también tuvo una frecuencia similar tanto en el grupo con y sin HGNA, 51.11% (n = 69) y 54.14% (n = 72), respectivamente. Si bien, al examinar los subgrupos de esteatosis, se observaron algunas diferencias en las frecuencias del genotipo CT entre los grupos: E1 39.29% (n = 11), E2 58.33% (n = 14) y E3 53.01% (n = 44), estas no alcanzaron significancia estadística (Tabla 4).

Respecto a las frecuencias alélicas, se observaron patrones similares a los de las frecuencias genotípicas en ambas variantes. Para la variante C677T, el alelo T fue ligeramente más frecuente en el grupo con HGNA (53.70%, n = 145) en comparación con el grupo sin HGNA (51.88%, n = 138) pero sin DES. En los subgrupos de esteatosis, tampoco se encontraron DES, el alelo T tuvo una frecuencia en el grupo E1 de 58.93% (n = 33), en E2 del 50.00% (n = 24) y en E3 del 53.01% (n = 88).

Para la variante A1298C, los resultados mostraron que el genotipo homocigoto silvestre AA fue el más frecuente tanto en el grupo con HGNA 71.85% (n = 135), como en el grupo sin HGNA 77.44% (n = 133). Al analizar los subgrupos de esteatosis, el genotipo AA también fue el más frecuente en E1 78.57% (n = 28), E2 70.83% (n = 24) y E3 69.88% (n = 83). Por otro lado, el genotipo heterocigoto AC presentó una mayor frecuencia en el grupo con HGNA 26.67% (n = 36) en comparación con el grupo sin HGNA 18.80% (n = 25) pero sin DES. Además, en los subgrupos de esteatosis el heterocigoto AC mostró

frecuencias del 21.43% (n = 6) en E1, del 29.17% (n = 7) en E2 y del 27.71% (n = 23) en E3, también sin DES. Por último, el genotipo homocigoto CC tuvo una baja frecuencia en ambos grupos (1.48% en HGNA, n = 2 y 3.76% en sin HGNA, n = 5). Finalmente, el genotipo CC sólo se observó en el grupo E3 2.41% (n = 2), y no se identificó ningún individuo con este genotipo en los otros subgrupos de esteatosis (E1 y E2).

Respecto a las frecuencias alélicas de la variante A1298C, el alelo A fue el más común tanto en el grupo con HGNA 85.19% (n = 230) como en el grupo sin HGNA 86.84% (n = 231). Al desglosar por subgrupos de esteatosis, el alelo A mantuvo su elevada frecuencia en los tres grupos: E1 89.29% (n = 50) E2 85.41% (n = 41) y E3 83.73% (n = 139). Por su parte, el alelo C fue menos frecuente en todos los grupos, con una ligera mayor frecuencia en el grupo con HGNA 14.81% (n = 40) comparado con el grupo sin HGNA 13.16% (n = 35). Además, en los subgrupos de esteatosis también fueron similares entre grupos: E1 10.71% (n = 6), E2 14.59% (n = 7) y E3 16.27% (n = 27).

Para evaluar la asociación entre los genotipos o alelos de las variantes de *MTHFR* de acuerdo con el grado de esteatosis hepática se realizó un análisis de regresión logística ordinal, herramienta estadística que permite modelar la relación entre una variable de respuesta ordinal, es decir, una variable con categorías ordenadas, y un conjunto de variables predictoras. La variable de respuesta ordinal se definió con base al grado de esteatosis hepática (sin esteatosis = 0, esteatosis grado = 1, 2 y 3). Por otro lado, como variables predictoras se incluyeron los genotipos o los alelos de cada variante, codificando los alelos silvestres y las variantes de riesgo de cada una. La regresión logística ordinal permite analizar si la probabilidad de tener un grado mayor de esteatosis hepática varía en función del genotipo o del alelo presente. Además, este análisis tiene

en cuenta el supuesto de regresión paralela, lo que significa que se espera que la relación entre cada par de resultados sea la misma. La evaluación de este supuesto se ha realizado mediante la prueba de Brant. De esta forma, este enfoque proporciona una evaluación robusta y detallada de la relación entre estas variantes genéticas y el grado de esteatosis hepática.

En cuanto a las frecuencias genotípicas, para la variante C677T, se encontró que la presencia de un genotipo heterocigoto (CT) o de un genotipo homocigoto para el alelo de riesgo (TT) no mostró una DES en el análisis de la probabilidad de esteatosis de acuerdo con el grado. El genotipo heterocigoto (CT) mostró una razón de momios (RM) de 1.002 (IC95% 0.56-1.80, $p=0.995$) y el genotipo homocigoto para la variante (TT) mostró una RM de 1.08 (IC95% 0.56-2.07, $p=0.826$). El pseudo R² para este modelo fue de 0.0001, lo que indica que la inclusión de los genotipos como predictores no mejoró significativamente el modelo.

Respecto al análisis de los alelos de la variante C677T, el análisis demostró que para el alelo T, la razón de momios (RM) fue de 1.04 (IC95% 0.75-1.43, $p=0.817$), sugerente de un ligero incremento en la probabilidad de desarrollar esteatosis hepática de mayor grado, aunque esta asociación no fue estadísticamente significativa. La prueba de Brant proporcionó un valor de χ^2 de 1.05 con un valor $p=0.592$, lo que indica que el supuesto de regresión paralela se mantiene para este modelo.

En el caso de la variante A1298C, los resultados sugieren un patrón distinto. El genotipo heterocigoto (AC) mostró una razón de momios (RM) de 1.52 (IC95% 0.89-2.60, $p=0.123$), indicando un aumento no significativo en la probabilidad de esteatosis de

grados mayores en comparación con el genotipo homocigoto silvestre (AA). En contraste, el genotipo homocigoto para la variante (CC) mostró una RM de 0.524 (IC95% 0.098-2.81, $p=0.452$), lo que indica una disminución no significativa en la probabilidad de esteatosis de grados mayores, que sin embargo carece de significancia estadística debido al reducido número de individuos con el genotipo CC en el grupo E3 ($n = 2$).

En cuanto al alelo C de la variante A1298C, se encontró una RM de 1.22 (IC95% 0.77-1.94, $p=0.391$) en la regresión logística ordinal, lo que indica un aumento no significativo en la probabilidad de tener esteatosis hepática de grados mayores. Aunque este resultado muestra una tendencia a un mayor riesgo con la presencia del alelo de riesgo, esta asociación tampoco alcanzó significancia estadística. El valor de la prueba de Brant fue de χ^2 de 0.76 con un valor $p=0.686$, respetando también el supuesto de regresión paralela.

En resumen, aunque las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* podrían estar asociadas con la esteatosis hepática, los resultados muestran que la relación no es estadísticamente significativa.

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de *MTHFR* según el grado de esteatosis.

VARIANTES	HGNA	SIN HGNA	E1	E2	E3	REGRESIÓN LOGÍSTICA ORDINAL	
	n = 135 [†]	n = 133 [†]	n = 28 [†]	n = 24 [†]	n = 83 [†]	RM (IC 95%)	P
C677T							
GENOTIPOS							
CC	28 (20.74%)	28 (21.05%)	6 (21.43%)	5 (20.83%)	17 (20.48%)	Referencia	
CT	69 (51.11%)	72 (54.14%)	11 (39.29%)	14 (58.33%)	44 (53.01%)	1.00 (0.56-1.80)	0.995
TT	38 (28.15%)	33 (24.81%)	11 (39.29%)	5 (20.83%)	22 (26.51%)	1.08 (0.56-2.07)	0.826
ALELOS							
C	125 (46.30%)	128 (48.12%)	23 (41.07%)	24 (50.00%)	78 (46.99%)	Referencia	
T	145 (53.70%)	138 (51.88%)	33 (58.93%)	24 (50.00%)	88 (53.01%)	1.04 (0.75-1.43)	0.817
EHW	0.863	0.388	0.432	0.683	0.662		
A1298C							
GENOTIPOS							
AA	97 (71.85%)	103 (77.44%)	22 (78.57%)	17 (70.83%)	58 (69.88%)	Referencia	
AC	36 (26.67%)	25 (18.80%)	6 (21.43%)	7 (29.17%)	23 (27.71%)	1.52 (0.89-2.60)	0.123
CC	2 (1.48%)	5 (3.76%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (2.41%)	0.52 (0.10-2.81)	0.452
ALELOS							
A	230 (85.19%)	231 (86.84%)	50 (89.29%)	41 (85.41%)	139 (83.73%)	Referencia	
C	40 (14.81)	35 (13.16%)	6 (10.71%)	7 (14.59%)	27 (16.27%)	1.22 (0.77-1.94)	0.391
EHW	0.737	0.050	1.000	1.000	1.000		

E1= esteatosis grado 1, E2= Esteatosis grado 2, E3= esteatosis grado 3.

Además, se examinó la distribución de los genotipos compuestos de acuerdo con los diferentes grados de esteatosis hepática (E1, E2 y E3). El genotipo compuesto CT₆₇₇-AA₁₂₉₈, que se utilizó como referencia, fue el más prevalente, con una frecuencia de 42.11% (n=56) de los individuos sin esteatosis, 21.43% (n=6) con esteatosis grado 1, 37.50% (n=9) con esteatosis grado 2, y 32.53% (n=27) con esteatosis grado 3.

Por otro lado, los genotipos compuestos CC₆₇₇-AA₁₂₉₈, CC₆₇₇-AC₁₂₉₈, y CC₆₇₇-CC₁₂₉₈ fueron los menos prevalentes. El genotipo CC₆₇₇-AA₁₂₉₈ estuvo presente en un 10.53% (n=14) de los individuos sin esteatosis, un 17.86% (n=5) con esteatosis grado 1, un 12.50% (n=3) con esteatosis grado 2, y un 10.84% (n=9) con esteatosis grado 3,

representando el 11.57% (n=31) del total de la población del estudio. El genotipo CC₆₇₇-AC₁₂₉₈, se encontró en un 6.77% (n=9) de los individuos sin esteatosis, un 3.57% (n=1) con esteatosis grado 1, un 8.33% (n=2) con esteatosis grado 2, y un 7.23% (n=6) con esteatosis grado 3, constituyendo el 6.72% (n=18) de la población total. En cuanto al genotipo y CC₆₇₇-CC₁₂₉₈, este fue el menos frecuente, hallándose solo en el 3.76% (n=5) de los individuos sin esteatosis y el 2.41% (n=2) con esteatosis grado 3, lo que corresponde al 2.61% (n=7) del total de la población del estudio.

El genotipo CT₆₇₇-AC₁₂₉₈ estuvo presente en un 12.03% (n=16) de los individuos sin esteatosis, un 17.86% (n=5) con esteatosis grado 1, un 20.83% (n=5) con esteatosis grado 2, y un 20.48% (n=17) con esteatosis grado 3, lo que representa el 16.04% (n=43) de la población total del estudio. Finalmente, el genotipo TT₆₇₇-AA₁₂₉₈ fue el segundo más prevalente después de CT₆₇₇-AA₁₂₉₈, encontrándose en un 24.81% (n=33) de los individuos sin esteatosis, un 39.29% (n=11) con esteatosis grado 1, un 20.83% (n=5) con esteatosis grado 2, y un 26.51% (n=22) con esteatosis grado 3, lo que equivale al 26.49% (n=71) del total de la población del estudio.

De la misma manera en la que se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de acuerdo con el grado de esteatosis, en el siguiente apartado se describirá el análisis que se realizó para evaluar las asociaciones de las variantes de *MTHFR* ahora utilizando modelos dominantes y de genotipos compuestos de acuerdo con el grado de esteatosis mediante análisis de regresión logística ordinal.

El modelo de regresión logística ordinal fue optimizado mediante iteraciones y los resultados muestran que la mejora del modelo, tras la inclusión de los genotipos compuestos, no fue estadísticamente significativa (Razón de verosimilitud $\chi^2_{[5 \text{ gl}]} = 4.96$, $p = 0.421$). Esto sugiere que los genotipos compuestos de las variantes genéticas no proporcionan una mejora considerable en la predicción de los grados de esteatosis hepática.

A pesar de esto, al examinar los efectos individuales de los genotipos compuestos, se encontró que el genotipo compuesto $CT_{677-AC_{1298}}$ presentó un efecto significativo en relación con el grado de esteatosis. Los individuos con este genotipo tuvieron 1.99 veces más probabilidades de presentar grados superiores de esteatosis hepática en comparación con el genotipo de referencia ($CT_{677-AA_{1298}}$), y esta asociación fue estadísticamente significativa (RM 1.99 IC95% (1.02-3.90), $p = 0.045$). Los hallazgos sugieren que el genotipo $CT_{677-AC_{1298}}$ puede estar asociado con un riesgo mayor de desarrollar esteatosis hepática más grave.

En contraste, los genotipos $CC_{677-AA_{1298}}$, $CC_{677-AC_{1298}}$, $CC_{677-CC_{1298}}$ y $TT_{677-AA_{1298}}$ no mostraron una asociación significativa con los grados de esteatosis hepática. Aunque se observaron razones de momios superiores a la unidad para $CC_{677-AA_{1298}}$, $CC_{677-AC_{1298}}$, y $TT_{677-AA_{1298}}$ y una razón de momios menor a la unidad para $CC_{677-CC_{1298}}$, ninguno de estos alcanzó significación estadística.

Tabla 5. Distribución de frecuencias genotípicas de las variantes C677T y A1298C de *MTHFR* agrupados para el modelo dominante y compuestos de acuerdo con el grado de esteatosis hepática.

GENOTIPOS	SIN HGNA	E1	E2	E3	REGRESIÓN LOGÍSTICA ORDINAL	
	n = 133 [†]	n = 28 [†]	n = 24 [†]	n = 83 [†]	RM (IC 95%)	P
C677T						
CC	28 (21.05%)	6 (21.43%)	5 (20.83%)	17 (20.48%)	Referencia	
CT+TT	105 (78.95%)	22 (78.57%)	19 (79.17%)	66 (79.52%)	1.03 (0.59-1.79)	0.925
A1298C						
AA	103 (77.44%)	22 (78.57%)	17 (70.83%)	58 (69.88%)	Referencia	
AC+CC	30 (22.56%)	6 (21.43%)	7 (29.17%)	25 (30.12%)	1.39 (0.83-2.34)	0.207
GENOTIPOS COMPUESTOS						
CC ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	14 (10.53%)	5 (17.86%)	3 (12.50%)	9 (10.84%)	1.35 (0.64-2.86)	0.435
CC ₆₇₇ -AC ₁₂₉₈	9 (6.77%)	1 (3.57%)	2 (8.33%)	6 (7.23%)	1.35 (0.52-3.54)	0.538
CC ₆₇₇ -CC ₁₂₉₈	5 (3.76%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (2.41%)	0.61 (0.11-3.38)	0.575
CT ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	56 (42.11%)	6 (21.43%)	9 (37.50%)	27 (32.53%)	Referencia	
CT ₆₇₇ -AC ₁₂₉₈	16 (12.03%)	5 (17.86%)	5 (20.83%)	17 (20.48%)	1.99 (1.02-3.90)	0.045
TT ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	33 (24.81%)	11 (39.29%)	5 (20.83%)	22 (26.51%)	1.34 (0.75-2.40)	0.317

E1= esteatosis grado 1. E2= esteatosis grado 2. E3= esteatosis grado 3. [†]n (%)

6.4 Análisis de edad, el sexo y el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con el genotipo agrupado heterocigoto y homocigoto de las variantes del gen *MTHFR*.

Para investigar el posible efecto de características clínicas y demográficas entre los portadores de los genotipos homocigotos silvestres y los portadores de los genotipos heterocigotos y homocigotos para las variantes C677T y A1298C de la *MTHFR*, se evaluaron los siguientes factores: la edad, el sexo y el índice de masa corporal (IMC). La comparación de estas variables se realizó considerando por separado el grupo de los casos afectados con esteatosis hepática no alcohólica (HGNA) y los controles sin evidencia de HGNA.

6.4.1 Variante C677T.

En los casos con HGNA, se observó una mediana de edad similar entre los portadores del genotipo CC (46 años, RI 33-55) y los portadores de los genotipos CT y TT (44 años, RI 31-53), sin una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.582$). En los controles sin HGNA, tampoco hubo una diferencia significativa en la edad entre los portadores del genotipo CC (37 años, RI 27-56) y los portadores de los genotipos CT y TT (32 años, RI 26-50) ($p = 0.486$) (Tabla 6).

Respecto al sexo, no se observaron DES entre los portadores del genotipo CC y los de CT y TT, tanto en los casos con HGNA ($p = 0.758$) como en los controles sin HGNA ($p = 0.399$). En los casos con HGNA, la proporción de mujeres y hombres fue muy similar en ambos grupos (CC: 50.00% mujeres y 50.00% hombres; CT+TT: 53.27% mujeres y 46.73% hombres). Entre los controles sin HGNA, la mayoría de los individuos eran mujeres, tanto en el grupo CC (75.00% mujeres y 25.00% hombres) como en el grupo CT+TT (66.67% mujeres y 33.33% hombres).

La distribución de IMC también fue similar entre los grupos genéticos, tanto en los casos con HGNA ($p = 0.491$) como en los controles sin HGNA ($p = 0.942$). En los casos con HGNA, la mayoría de los individuos en ambos grupos genéticos presentaban sobrepeso (CC: 46.43%; CT+TT: 42.06%) u obesidad (CC: 32.14%; CT+TT: 42.99%). Entre los controles sin HGNA, la mayoría de los individuos tenían un IMC normal (CC: 53.57%; CT+TT: 49.52%) o sobrepeso (CC: 35.71%; CT+TT: 36.19%).

6.4.2 Variante A1298C.

En cuanto a la variante A1298C, en los casos con HGNA, la mediana de edad fue similar entre los portadores del genotipo AA (45 años, RI 30-53) y los portadores de los genotipos AC y CC (43.5 años, RI 33-54), sin una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.619$). En los controles sin HGNA, tampoco hubo una diferencia significativa en la edad entre los portadores del genotipo AA (33 años, RI 27-54) y los portadores de los genotipos AC y CC (31 años, RI 25-52) ($p = 0.684$) (Tabla 7).

En cuanto al sexo, no se observaron diferencias significativas entre los portadores del genotipo AA y los portadores de los genotipos AC y CC, tanto en los casos con HGNA ($p = 0.706$) como en los controles sin HGNA ($p = 0.814$). En los casos con HGNA, la proporción de mujeres y hombres fue similar en ambos grupos genéticos (AA: 53.61% mujeres y 46.39% hombres; AC+CC: 50.00% mujeres y 50.00% hombres). Entre los controles sin HGNA, la mayoría de los individuos eran mujeres, tanto en el grupo AA (68.93% mujeres y 31.07% hombres) como en el grupo AC+CC (66.67% mujeres y 33.33% hombres).

Respecto al índice de masa corporal (IMC), no se encontraron diferencias significativas en su distribución entre los grupos de genotipos agrupados, tanto en los casos con HGNA ($p = 0.281$) como en los controles sin HGNA ($p = 0.396$). En los casos con HGNA, la mayoría de los individuos en ambos grupos genéticos presentaban sobrepeso (AA: 41.24%; AC+CC: 44.74%) u obesidad (AA: 38.14%; AC+CC: 44.74%). Mientras que entre los controles sin HGNA, la mayoría de los individuos tenían un IMC normal (AA:

51.46%; AC+CC: 53.33%) o presentaban sobrepeso (AA: 36.89%; AC+CC: 26.67%).

Estos resultados sugieren que, en la población de estudio, de forma aislada las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* no parecen estar asociadas de manera significativa con diferencias en la edad, el sexo o el IMC, tanto en individuos con HGNA como en aquellos sin esta afección.

Tabla 6. Comparación de edad, el sexo y el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con la presencia de variantes en estado heterocigoto u homocigoto para la variante C677T de la *MTHFR*.

VARIABLE	HGNA		P ²	SIN HGNA		P ²
	CC n = 28 ¹	CT+TT n = 107 ¹		CC n = 28 ¹	CT+TT n = 105 ¹	
EDAD	46 (33, 55)	44 (31, 53)	0.582	37 (27, 56)	32 (26, 50)	0.486
SEXO			0.758			0.399
Femenino	14 (50.00%)	57 (53.27%)		21 (75.00%)	70 (66.67%)	
Masculino	14 (50.00%)	50 (46.73%)		7 (25.00%)	35 (33.33%)	
IMC			0.491			0.942
Normal	6 (21.43%)	16 (14.95%)		15 (53.57%)	52 (49.52%)	
Peso bajo	0 (0.00%)	0 (0.00%)		1 (3.57%)	3 (2.86%)	
Sobrepeso	13 (46.43%)	45 (42.06%)		10 (35.71%)	38 (36.19%)	
Obesidad	9 (32.14%)	46 (42.99%)		2 (7.14%)	12 (11.43%)	

Mediana (RI)*. ¹ n (%) ² χ^2 de Pearson; Prueba exacta de Fisher

Tabla 7. Comparación de edad, el sexo y el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con la presencia de variantes en estado heterocigoto u homocigoto para la variante A1298C de la *MTHFR*.

VARIABLE	HGNA		p ²	SIN HGNA		p ²
	AA n = 97 ¹	AC+CC n = 38 ¹		AA n = 103 ¹	AC+CC n = 30 ¹	
EDAD*	45 (30, 53)	43.5 (33, 54)	0.619	33 (27, 54)	31 (25,52)	0.684
SEXO			0.706			0.814
Femenino	52 (53.61%)	19 (50.00%)		71 (68.93%)	20 (66.67%)	
Masculino	45 (46.39%)	19 (50.00%)		32 (31.07%)	10 (33.33%)	
IMC			0.281			0.396
Normal	20 (20.62%)	4 (10.53%)		53 (51.46%)	16 (53.33%)	
Peso bajo	0 (0.00%)	0 (0.00%)		3 (2.91%)	1 (3.33%)	
Sobrepeso	40 (41.24%)	17 (44.74%)		38 (36.89%)	8 (26.67%)	
Obesidad	37 (38.14%)	17 (44.74%)		9 (8.74%)	5 (16.67%)	

Mediana (RI)*. ¹ n (%) ² χ^2 de Pearson ; Prueba exacta de Fisher

6.5 Análisis de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12.

Con el propósito de explorar la posible asociación de los niveles de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 con la presencia de esteatosis hepática no alcohólica (HGNA) se realizó el análisis de la distribución entre casos y controles. Para cada variable, se obtuvieron la mediana, los percentiles 25 y 75 (RI) y se utilizó la razón de momios (RM) con intervalos de confianza del 95% y el valor p para evaluar la asociación entre estas variables y la presencia de HGNA. La tabla 8 presenta un resumen de estos hallazgos.

6.5.1 Análisis de regresión logística.

En el grupo de casos afectados con HGNA la mediana de homocisteína fue de 8.30 $\mu\text{mol/L}$ (RI 6.87, 9.79), marginalmente más alta que el grupo sin HGNA, con una mediana de 7.85 $\mu\text{mol/L}$ (RI 6.64, 9.68). No obstante, tanto la prueba de Wilcoxon–Mann–Whitney, con un valor $z = -1.370$ y p de 0.170, como el análisis de regresión logística, RM 1.07, IC 95% (0.97-1.17) y p de 0.160 (Tabla 8), no mostraron DES entre ambos grupos.

En relación con el ácido fólico, no se observaron DES entre los grupos estudiados. En los casos con HGNA la mediana fue de 17.87 ng/mL (RI 13.72, 23.21), mientras que en el grupo de comparación la mediana fue de 18.44 ng/mL (RI 14.05, 21.53). De nuevo, tanto la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, con un valor $z = 0.005$ y p de 0.996, como la regresión logística no identificaron DES (RM = 1.00, IC 95% (0.96 - 1.04), $p = 0.954$).

Por último, para la vitamina B12 los niveles también fueron similares entre grupos y no se identificaron DES. En el grupo de pacientes con HGNA, la mediana fue de 303 pg/mL (RI 204, 427), mientras que para el grupo de comparación la mediana fue de 317 pg/mL

(RI 217, 438). Y al igual que con las variables anteriores, la prueba de Wilcoxon–Mann–Whitney, con un valor $z = 0.08$ y p de 0.937; y la regresión logística, RM 1.00, IC 95% (0.99 - 1.00), $p = 0.106$, mostraron DES en los grupos estudiados.

En resumen, si bien, por cada unidad de aumento en las concentraciones de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12, la probabilidad de HGNA aumentó 6.7%, 0.005% y 0.003% respectivamente, estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Además, en general estos modelos de regresión explicaron poco de la varianza en el HGNA (menos del 1.1% en todos los modelos).

Tabla 8. Comparación de concentraciones de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 entre casos con y sin HGNA.

	HGNA n = 135	SIN HGNA n = 134	RM (IC 95%) ²	p ²
Homocisteína¹	8.30 (6.87, 9.79)	7.85 (6.64, 9.68)	1.07 (0.97-1.17)	0.160
No especificados	16	11		
Ácido fólico¹	17.87 (13.72, 23.21)	18.44 (14.05, 21.53)	1.00 (0.96 - 1.04)	0.954
No especificados	24	19		
Vitamina B12¹	303 (204, 427)	317 (217, 438)	1.00 (0.99 - 1.00)	0.106
No especificados	17	12		

¹ Mediana (RI). ² Regresión logística.

6.5.2 Comparación de la distribución de valores de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 entre casos con HGNA y el grupo de comparación.

En la comparación de la distribución de valores entre casos con HGNA y el grupo de comparación, se observó un patrón distinto para la homocisteína, el ácido fólico y la vitamina B12. La homocisteína mostró niveles más altos en el grupo con HGNA, con un valor máximo de 30.52 $\mu\text{mol/L}$, comparado con 17.49 $\mu\text{mol/L}$ en el grupo sin HGNA (Figura

3). Aunque los individuos con HGNA mostraron una tendencia no significativa a presentar niveles más bajos de ácido fólico, las medianas fueron similares entre los grupos (Figura 4). Por otro lado, la vitamina B12 mostró valores mayores en el grupo con HGNA, especialmente en percentiles altos, aunque las medianas fueron también fueron similares en ambos grupos (Figura 5).

Figura 3. Distribución de los niveles homocisteína en los grupos de individuos con y sin HGNA

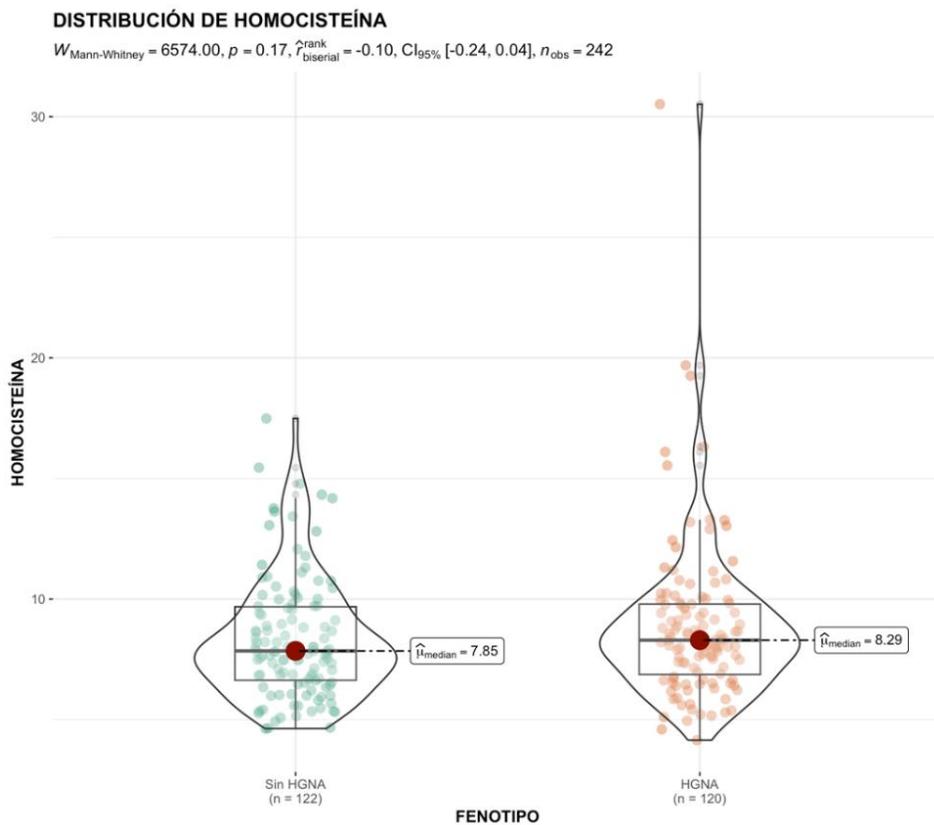


Figura 4. Distribución de los niveles ácido fólico en los grupos de individuos con y sin HGNA

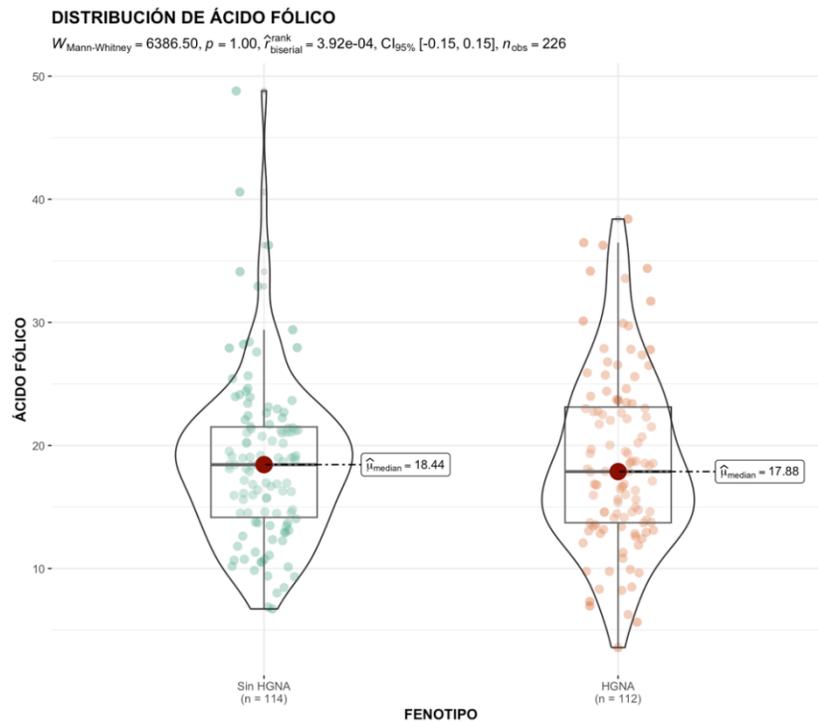
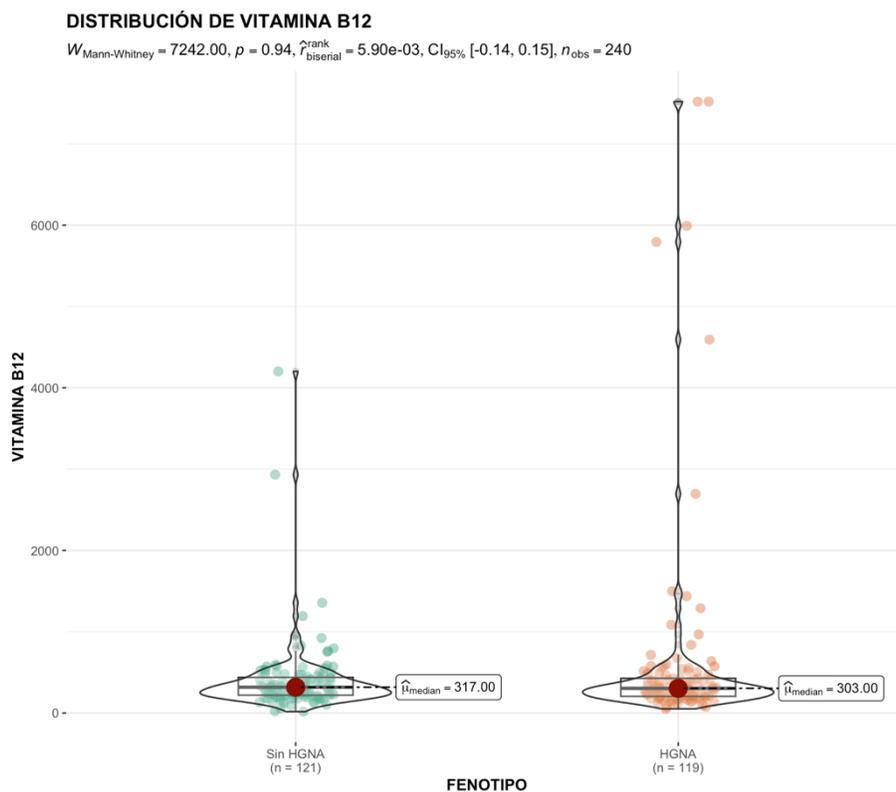


Figura 5. Distribución de los niveles de vitamina B12 en los grupos de individuos con y sin HGNA



6.5.3 Análisis no paramétrico de igualdad de medianas.

Se realizaron pruebas no paramétricas de igualdad de medianas para evaluar los valores de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 entre los grupos estudiados. Los resultados muestran que los niveles de homocisteína tienden a ser significativamente más altos en los casos con HGNA que en el grupo de comparación sin HGNA, cuando se compara la frecuencia de individuos con valores por arriba (56.67%) y debajo (42.62%) de la mediana de homocisteína en toda la población (P50 8.01) (χ^2 4.77, $p = 0.029$). Además, los casos con HGNA tienen 76% más probabilidad de tener niveles de homocisteína superiores a la mediana en comparación con el grupo sin HGNA, RM 1.76 (IC 95% 1.03-3.03). En el análisis de las concentraciones de ácido fólico y la vitamina B12 no se observaron DES en las pruebas de la mediana, valores p de 0.425 y 0.699, respectivamente.

6.5.4 Análisis de cuartiles superiores $>P75$ e inferiores $\leq P25$.

Para evaluar la posible asociación de los valores de homocisteína, el ácido fólico y la vitamina B12 con la presencia de HGNA, también se comparó la frecuencia de individuos con valores en los cuartiles superiores ($\geq P75$) e inferiores ($\leq P25$) para cada variable, tanto en casos con y sin HGNA.

Los resultados no mostraron DES entre los grupos de exposición para ninguna de las tres variables. Específicamente, la homocisteína mostró una RM de 1.41 (IC 95% 0.69-2.87, $p = 0.310$), para el ácido fólico la RM fue de 1.21 (IC 95% 0.60-2.47, $p = 0.5657$), y para la vitamina B12 la RM fue de 0.97 (IC 95%: 0.48-1.97, $p = 0.9298$). Los resultados

muestran que, en el rango de cuartiles analizados, los niveles de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 no están significativamente asociados con la presencia de HGNA.

6.5.5 Análisis de regresión lineal de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12.

6.5.5.1 Homocisteína y ácido fólico.

La siguiente sección examina las relaciones entre las concentraciones de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 por medio de análisis de regresión lineal, aunque estos análisis no forman parte de los objetivos principales del estudio, se consideró relevante su inclusión para tratar de entender la participación de estos factores en el desarrollo del HGNA. Por tal motivo, se realizaron una serie de análisis de regresión lineal simple con la intención de identificar posibles asociaciones entre estas variables y, de ser así, determinar si estos efectos diferían entre los casos con HGNA y el grupo de comparación.

El análisis de regresión lineal identificó una asociación estadística significativa entre los niveles de homocisteína y ácido fólico en el total de la muestra estudiada. El modelo demostró que existe una correlación inversa significativa entre la homocisteína y el ácido fólico, con un coeficiente β de regresión de -0.11 (IC 95% -0.16 a -0.06), $p = 4.95 \times 10^{-5}$, y sugiere que, por cada unidad de aumento en la concentración del ácido fólico, disminuye el nivel de homocisteína 0.11 unidades de forma significativa. Además, el coeficiente de determinación (R^2) de 0.0704 sugiere que el modelo explica alrededor del 7.04% de la variabilidad en los niveles de homocisteína.

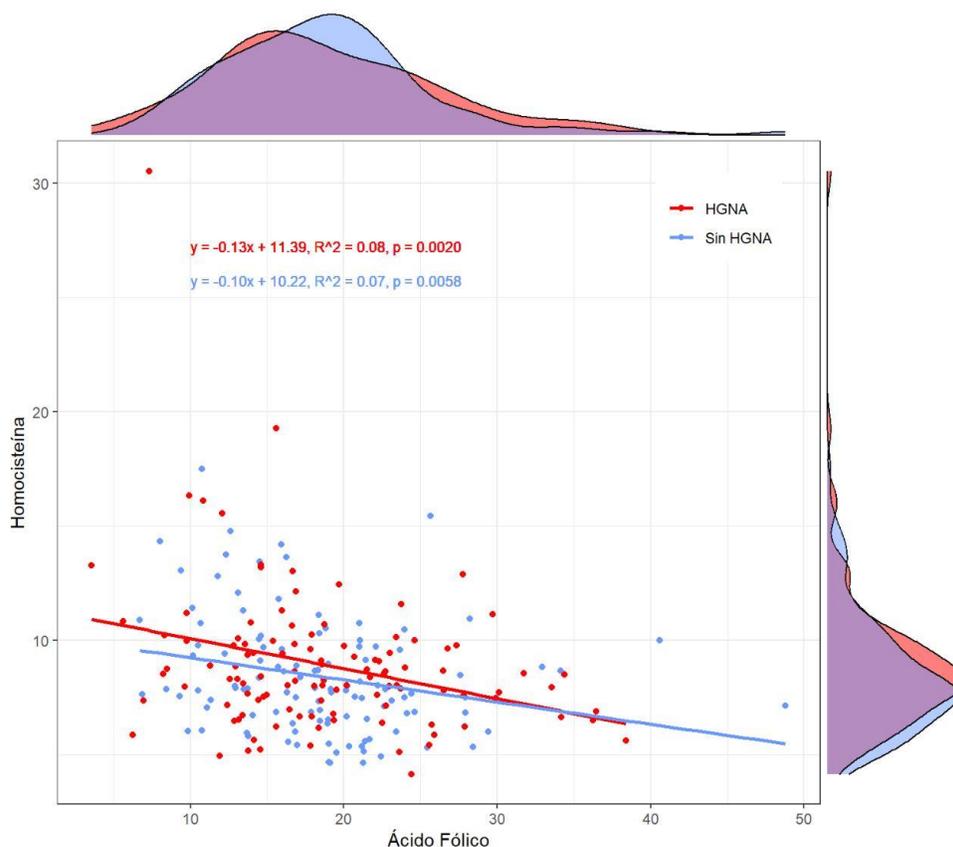
En los casos con HGNA, el coeficiente β de regresión para el ácido fólico fue de -0.131 (IC 95%: -0.213 a -0.049), $p = 0.002$. Esto sugiere que en los casos de HGNA, por cada

unidad de aumento en el ácido fólico, los niveles de homocisteína disminuyen significativamente 0.131 unidades. Sin embargo, el R^2 ajustado de 0.0754 indica que, en este grupo, alrededor del 7.54% de la variabilidad en los niveles de homocisteína puede ser explicada por la variación en los niveles de ácido fólico.

En cuanto al grupo de comparación sin HGNA, el coeficiente de regresión para el ácido fólico fue de -0.097 (IC 95%: -0.165 a -0.028), $p = 0.006$, lo que indica que, por cada unidad de aumento en el ácido fólico, se predice una disminución significativa de 0.097 unidades en los niveles de homocisteína. Sin embargo, el R^2 ajustado en este grupo fue menor que para los casos con HGNA, de 0.0577 y sugiere que solo el 5.77% de la variabilidad en los niveles de homocisteína puede ser explicada por la variación en los niveles de ácido fólico.

En conjunto los hallazgos sugieren que, aunque la dirección de la asociación entre la homocisteína y el ácido fólico es la misma en ambos grupos (casos de HGNA y el grupo de comparación), la fuerza de esta relación varía. En particular, la asociación parece ser ligeramente más fuerte en los casos con HGNA, ya que el coeficiente de regresión para el ácido fólico es mayor en este grupo. En la figura 6, se muestran de manera gráfica la distribución de estas variables y las líneas de la regresión lineal entre homocisteína y ácido fólico para los casos con HGNA (rojo) y el grupo de comparación (azul).

Figura 6. Regresión lineal entre homocisteína y ácido fólico.



6.5.5.2 Homocisteína y vitamina B12.

Con respecto a la vitamina B12, mediante el análisis de regresión lineal también se encontró una correlación inversa entre los valores de homocisteína y la vitamina B12. En el total de la muestra, el coeficiente β de la vitamina B12 fue de -0.00059 (IC 95% - 0.00097 a -0.00019), $p = 0.003$. Es decir, cada unidad de incremento en la vitamina B12 se asocia con una disminución de 0.00059 unidades en la homocisteína. Por su parte, en los casos con HGNA el coeficiente β de la vitamina B12 fue de -0.00063 (IC 95% - 0.00110 a -0.00015), $p = 0.010$. Por lo que, cada unidad de incremento en la vitamina B12 también se asocia con una disminución de 0.00063 unidades en la homocisteína en

este grupo. Por último, en el grupo de comparación, aunque la correlación también fue negativa esta no alcanzó significativa estadística, coeficiente β de la vitamina B12 - 0.00069 (IC 95% -0.00165 a 0.00027), $p = 0.158$.

6.5.6 Comparación de las distribuciones de homocisteína, ácido fólico, vitamina B12, e IMC, de acuerdo con el genotipo agrupado para las variantes C677T (CC vs CT + TT) y A1298C (AA vs AC + CC) de *MTHFR*.

A continuación, se presenta el análisis comparativo de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* y su relación con homocisteína, ácido fólico, vitamina B12 e IMC en individuos con y sin HGNA. Para este análisis, se efectuaron comparaciones tanto inter como intragrupo para evaluar las posibles diferencias en los niveles de homocisteína, ácido fólico, vitamina B12 y el IMC, considerando las distintas combinaciones de los genotipos agrupados para la variante (Figuras 7-22). Las **comparaciones entre grupos** examinaron las diferencias entre individuos (HGNA vs sin HGNA) que poseen los genotipos homocigotos silvestres y aquellos con genotipos heterocigotos o homocigotos para las variantes (Sección 6.5.6.1 y figuras 7-14). Por otro lado, las **comparaciones intragrupo** se realizaron entre los individuos portadores de los distintos genotipos C677T (CC vs CT + TT) y A1298C (AA vs AC + CC) dentro de cada grupo de casos con y sin HGNA (Sección 6.5.6.1 y figuras 15-22). Este análisis integrado y comparativo permitió identificar patrones y tendencias en relación con las variantes del gen *MTHFR* y los indicadores estudiados.

6.5.6.1 Comparaciones entre grupos.

Respecto a la variante C677T, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de homocisteína (Figura 7), ácido fólico (Figura 8) y vitamina B12 (Figura 9) entre los portadores de los genotipos CC y aquellos con genotipos CT o TT. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el índice de masa corporal (IMC) de los portadores de estos genotipos. Para los individuos con el genotipo CC, se registró una mediana de IMC mayor en los casos con HGNA (27.90) en comparación con el grupo sin HGNA (23.09), con un valor p en la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney de 3.89×10^{-4} y en la regresión logística la RM fue de 1.28 (IC95% 1.10-1.51), $p = 0.002$. En forma similar, entre los portadores de los genotipos CT o TT, la mediana de IMC fue mayor en los casos con HGNA (29.06) en comparación con el grupo sin HGNA (24.69), con un valor p de 1.29×10^{-11} (Figura 10) y en la regresión logística se obtuvo una RM de 1.27 (IC95% 1.17-1.37), $p = 2.72 \times 10^{-9}$.

En relación con la variante A1298C, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de homocisteína (Figura 11), ácido fólico (Figura 12) y vitamina B12 (Figura 13) entre los portadores de los genotipos AA y aquellos con genotipos AC o CC. No obstante, se observaron diferencias significativas en el IMC de estos grupos. Para los individuos con el genotipo AA, se observó una mediana de IMC mayor en los casos con HGNA (28.20) que en el grupo sin HGNA (24.69), con un valor p en la prueba de Wilcoxon Mann Whitney de 3.35×10^{-9} y una RM 1.23 (IC95% 1.14-1.34), $p = 1.65 \times 10^{-7}$. De forma similar, entre los portadores de los genotipos AC o CC, la mediana de IMC fue mayor en los casos con HGNA (29.59) en comparación con el

grupo sin HGNA (23.81), con un valor p de 5.33×10^{-6} (Figura 14) y la RM fue de 1.37 (IC95% 1.18-1.60), $p = 5.94 \times 10^{-5}$.

6.5.6.2 Comparaciones intragrupo.

En la comparación intragrupo para la variante C677T, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de homocisteína (Figura 15), vitamina B12 (Figura 17) y IMC (Figura 18) entre los portadores de los genotipos CC y aquellos con los genotipos CT o TT. Sin embargo, en los casos con HGNA, la mediana de ácido fólico fue significativamente menor en los portadores del genotipo CT o TT (16.79) en comparación con los individuos con el genotipo CC (21.38), con un valor p en la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney de 0.03 (Figura 16). Por su parte, en el análisis de regresión logística no se observaron DES, RM de 0.94 (IC95% 0.88-1.01), $p = 0.056$.

Para la variante A1298C, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de homocisteína (Figura 19), ácido fólico (Figura 20), vitamina B12 (Figura 21) e IMC (Figura 22) entre los portadores de los genotipos AA y aquellos con los genotipos AC o CC en la comparación intragrupo.

Figura 7. Variante C677T: Distribución y comparación de los niveles de homocisteína entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos CC y CT o TT.

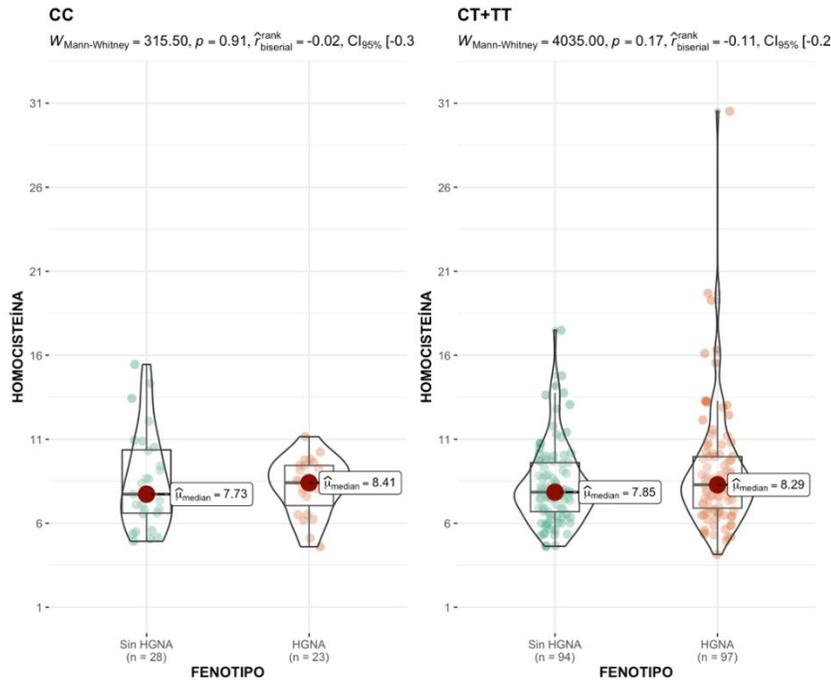


Figura 8. Variante C677T: Distribución y comparación de los niveles de ácido fólico entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos CC y CT o TT.

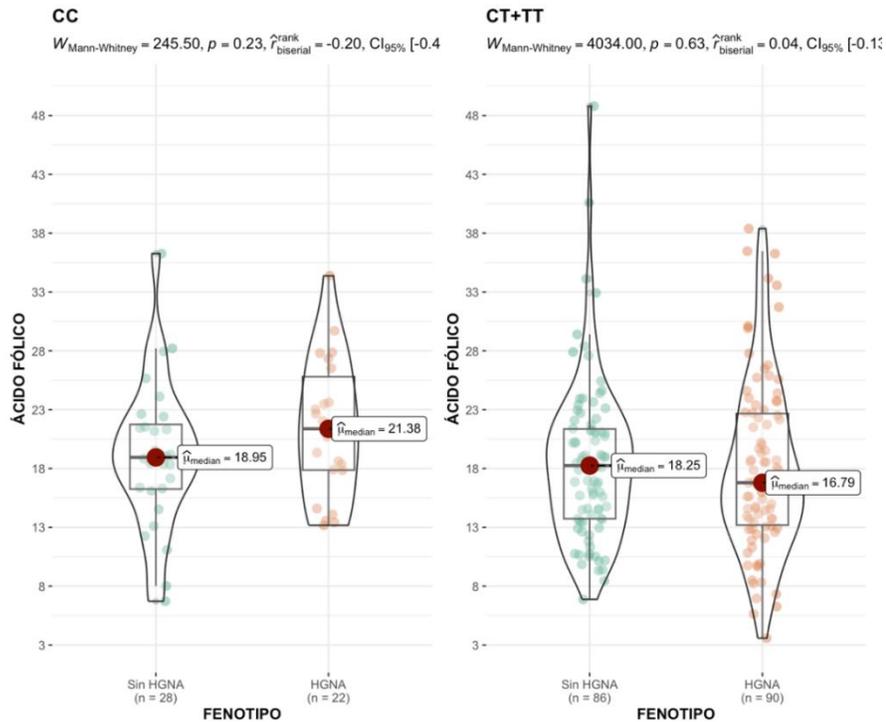


Figura 9. Variante C677T: Distribución y comparación de los niveles de vitamina B12 entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos CC y CT o TT.

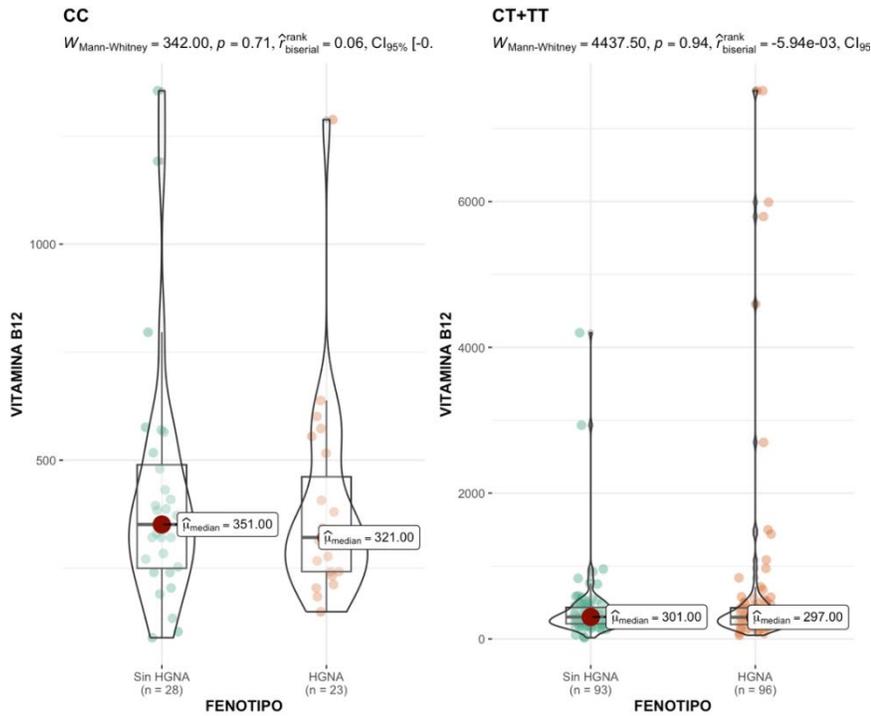


Figura 10. Variante C677T: Distribución y comparación de los valores del IMC entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos CC y CT o TT.

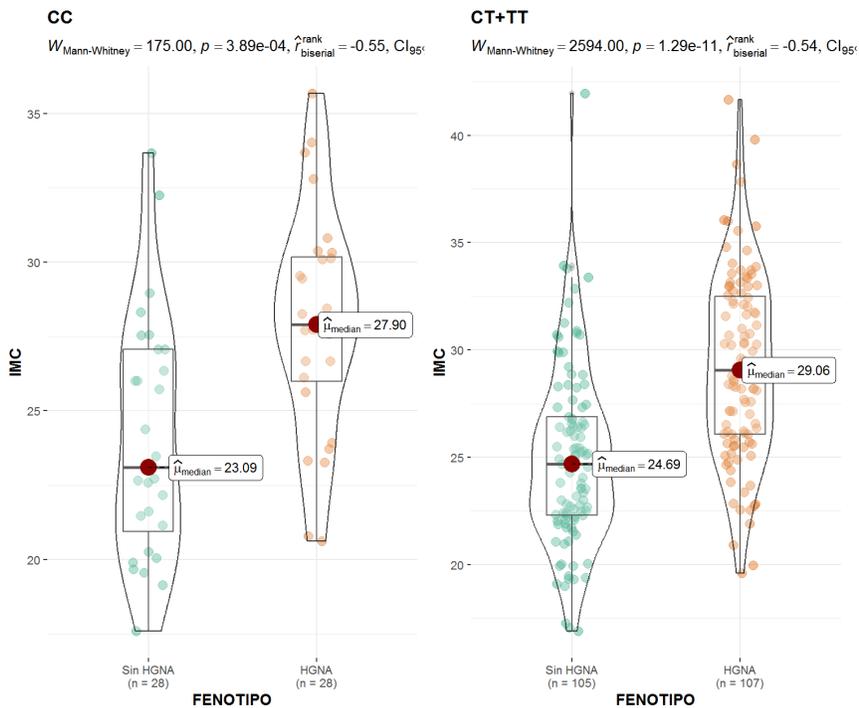


Figura 11. Variante A1298C: Distribución y comparación de los niveles de homocisteína entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos AA y AC o CC.

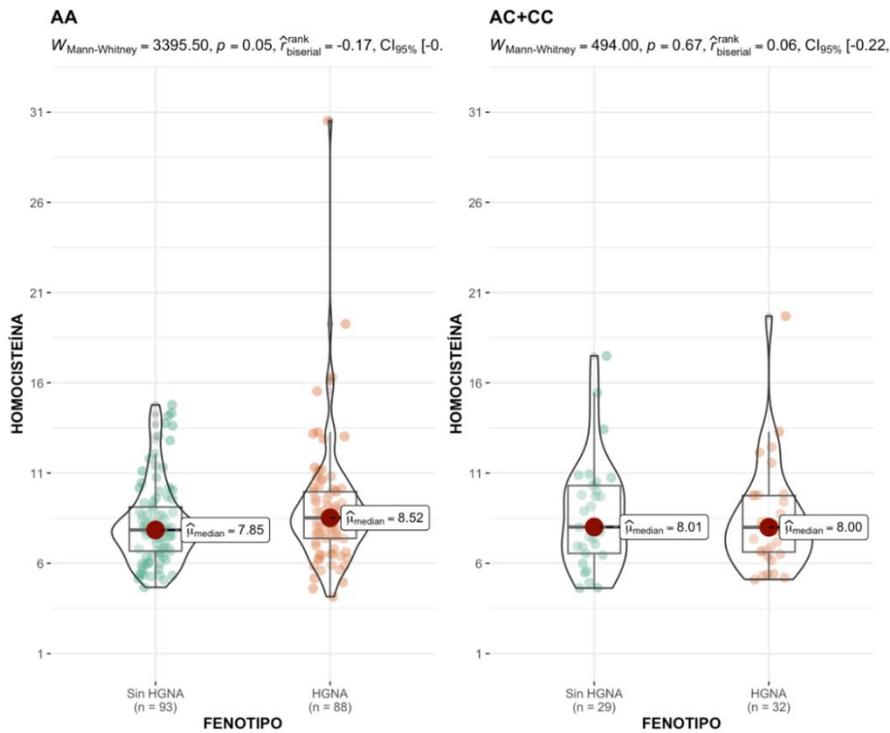


Figura 12. Variante A1298C: Distribución y comparación de los niveles de ácido fólico entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos AA y AC o CC.

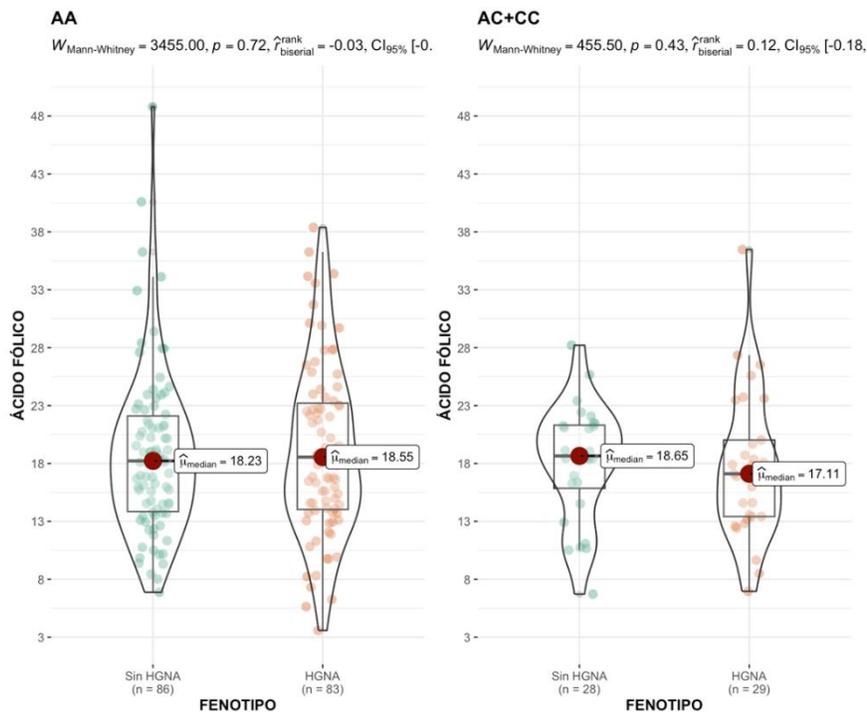


Figura 13. Variante A1298C: Distribución y comparación de los niveles de vitamina B12 entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos AA y AC o CC.

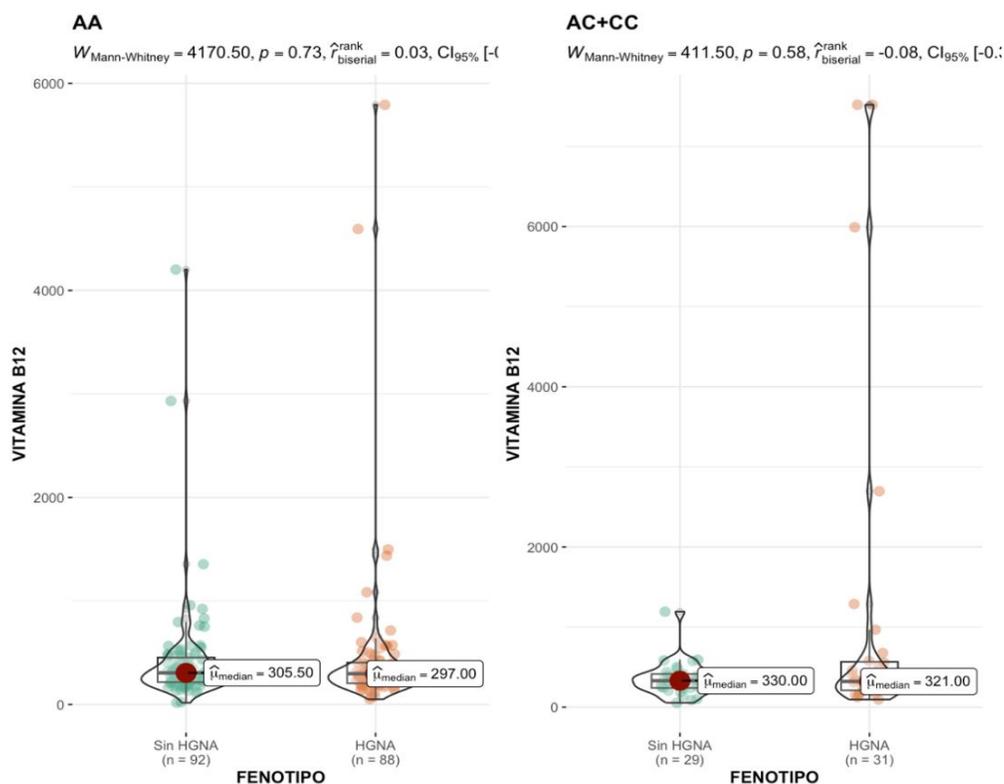


Figura 14. Variante A1298C: Distribución y comparación de los valores del IMC entre casos con y sin HGNA en los individuos con los genotipos AA y AC o CC.

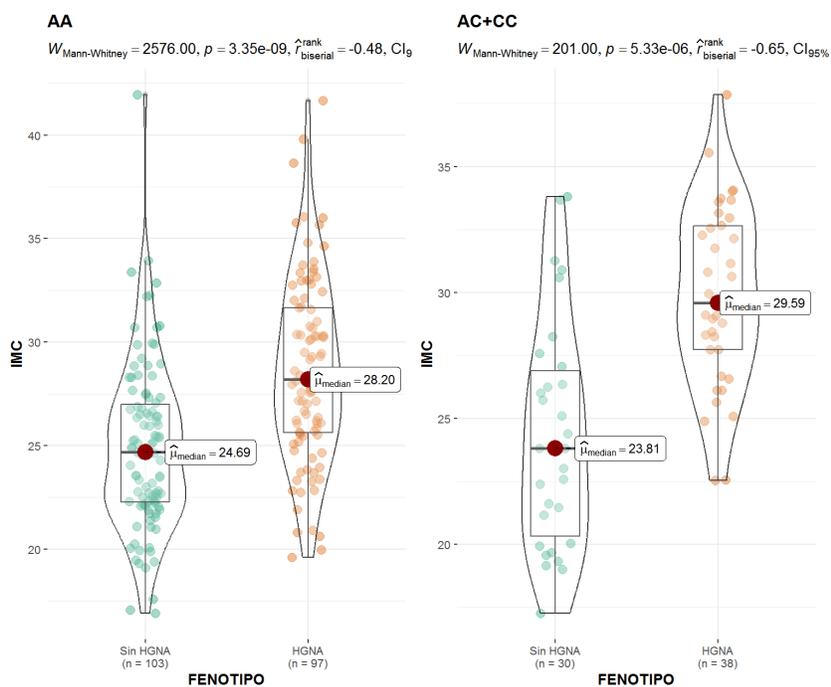


Figura 15. Variante C677T: Distribución y comparación intragrupo de los niveles de homocisteína entre en los individuos con los genotipos CC vs CT o TT.

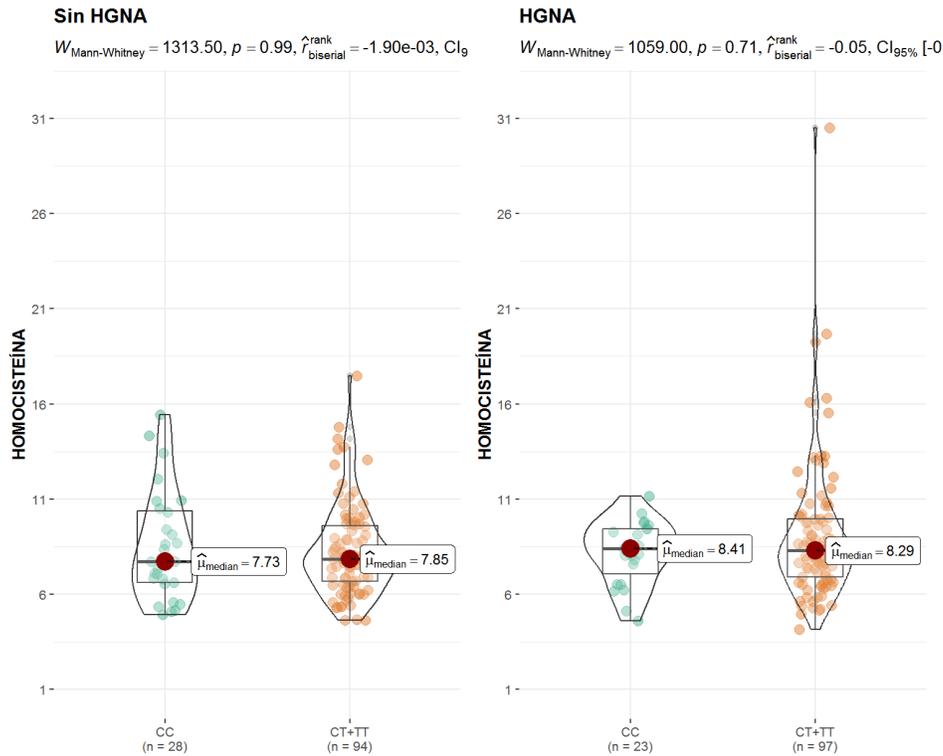


Figura 16. Variante C677T: Distribución y comparación intragrupo de los niveles de ácido fólico entre en los individuos con los genotipos CC vs CT o TT.

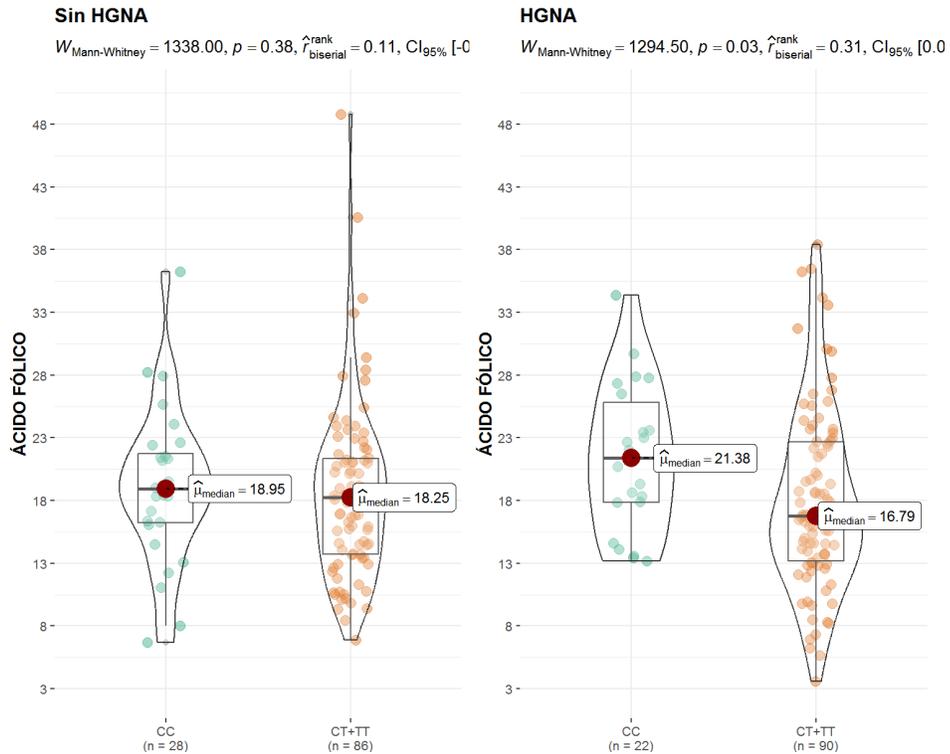


Figura 17. Variante C677T: Distribución y comparación intragrupo de los niveles de vitamina B12 entre en los individuos con los genotipos CC vs CT o TT.

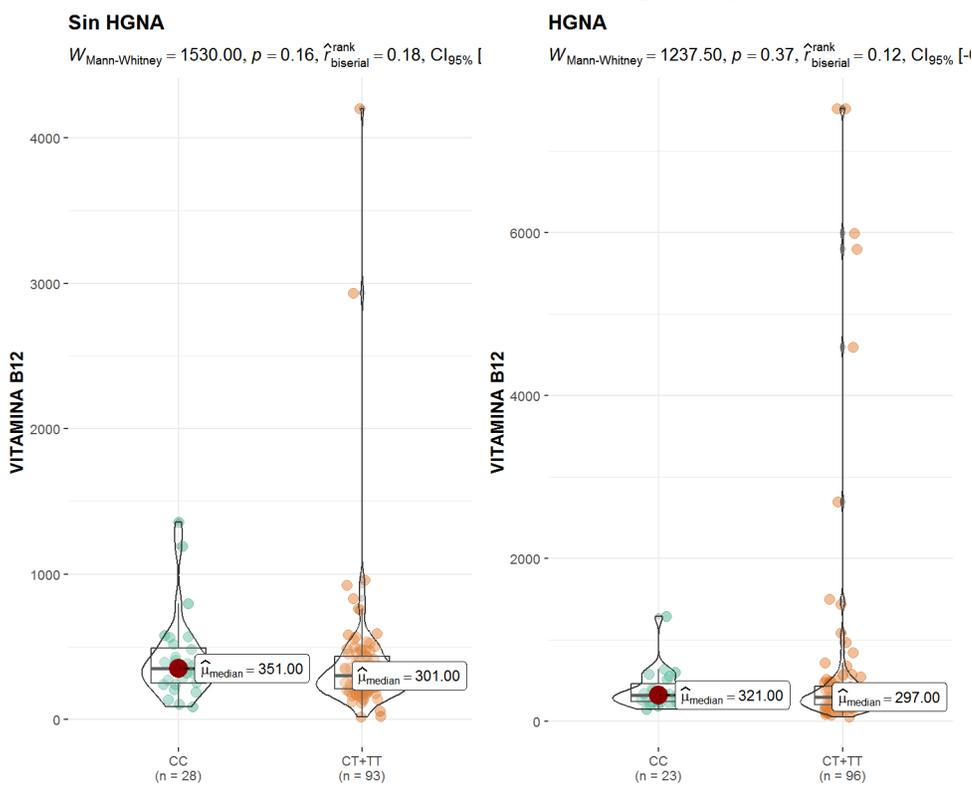


Figura 18. Variante C677T: Distribución y comparación intragrupo de los valores del IMC entre en los individuos con los genotipos CC vs CT o TT.

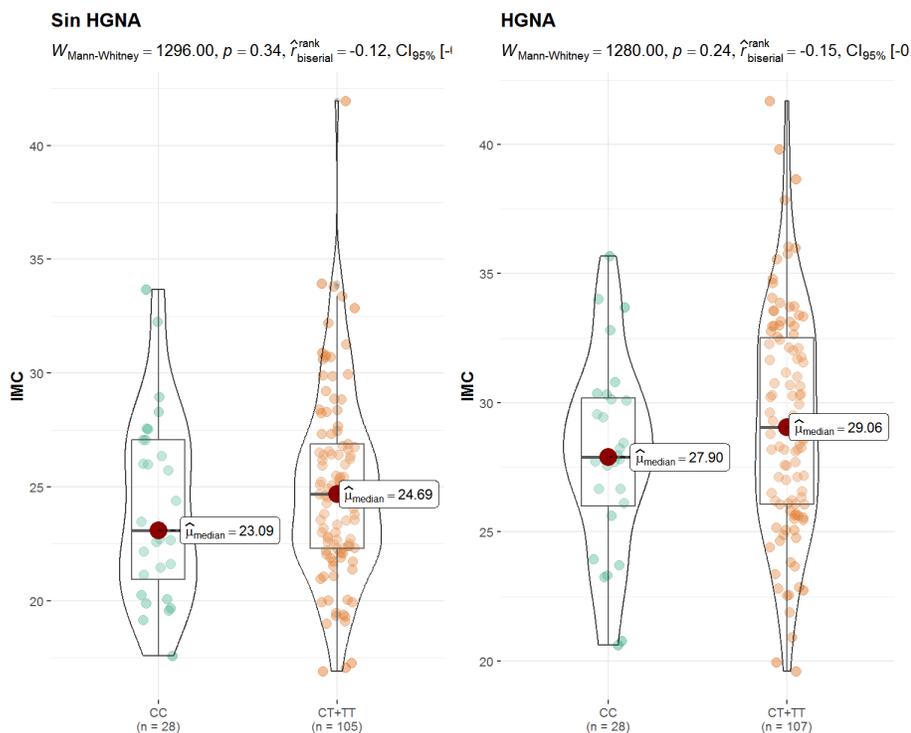


Figura 19. Variante A1298C: Distribución y comparación intragrupo de los niveles de homocisteína entre en los individuos con los genotipos AA vs AC o CC.

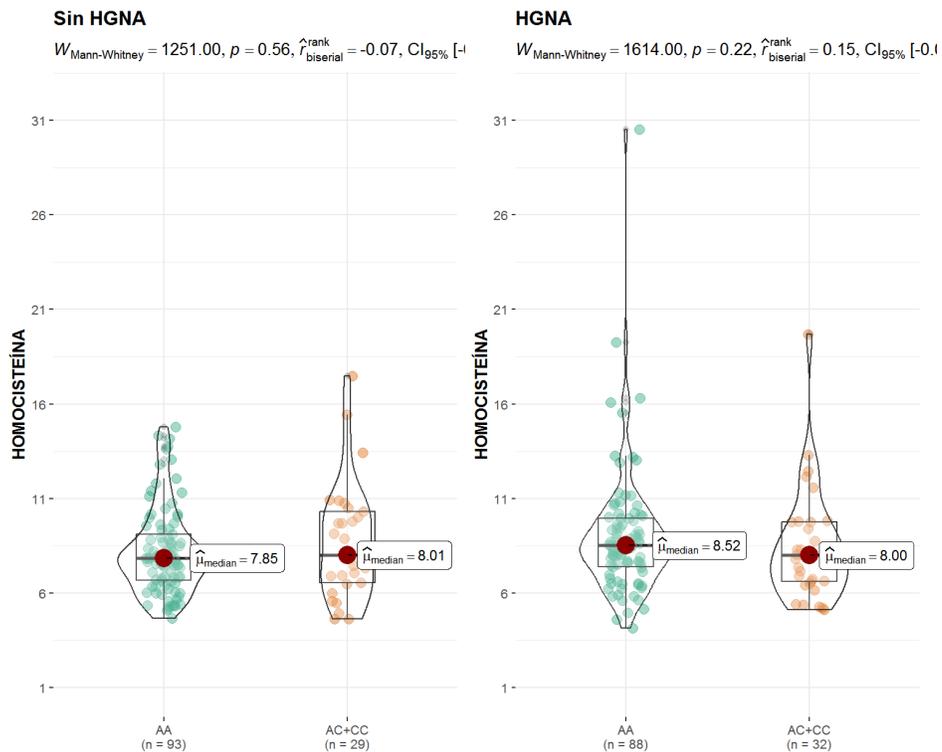


Figura 20. Variante A1298C: Distribución y comparación intragrupo de los niveles de ácido fólico entre en los individuos con los genotipos AA vs AC o CC.

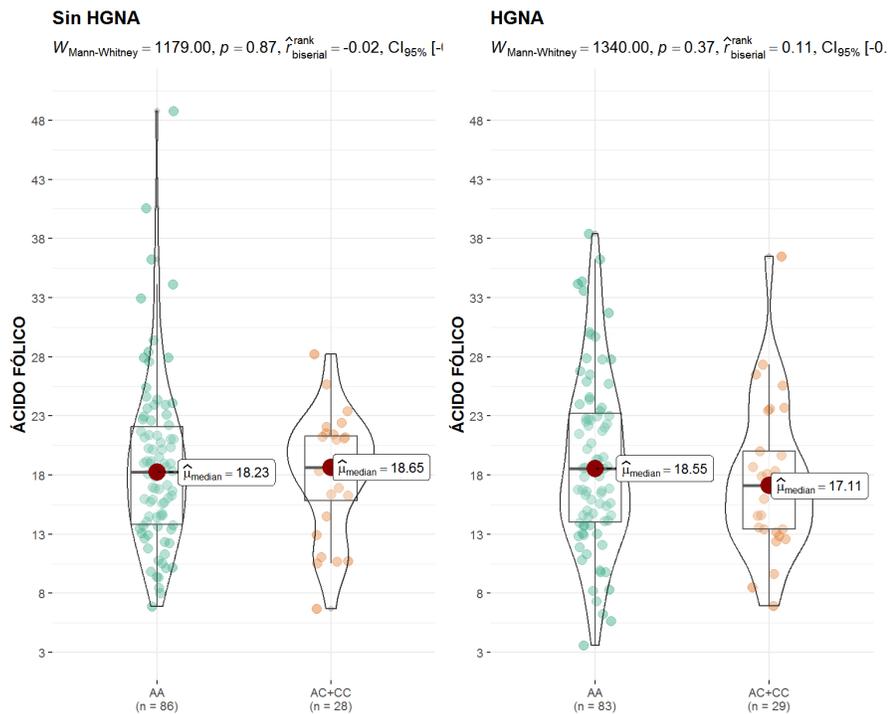


Figura 21. Variante A1298C: Distribución y comparación intragrupo de los niveles de vitamina B12 entre en los individuos con los genotipos AA vs AC o CC.

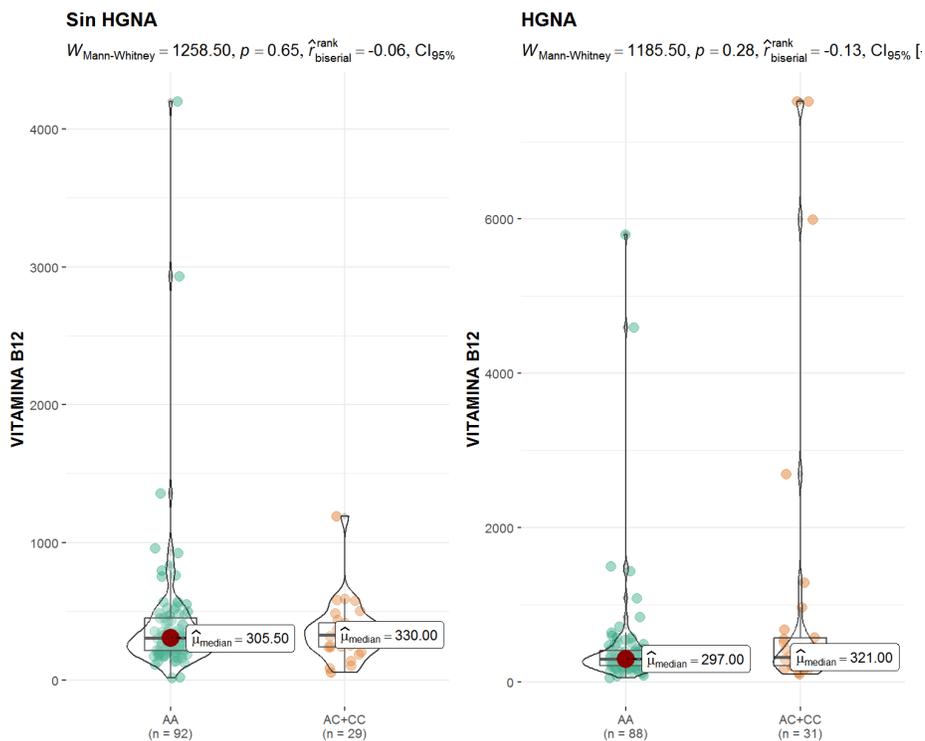
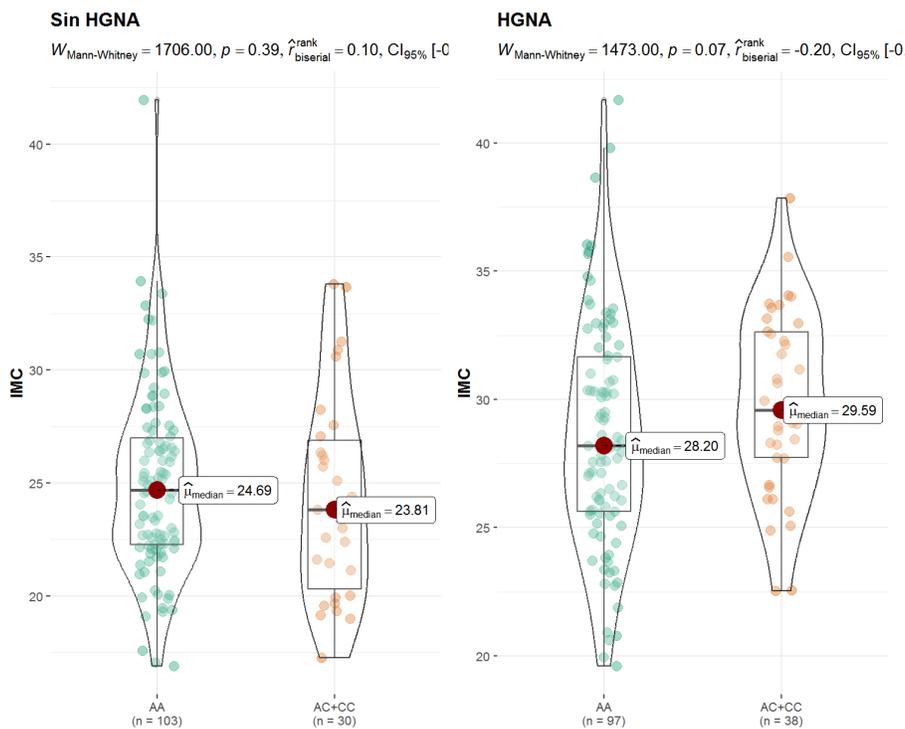


Figura 22. Variante A1298C: Distribución y comparación intragrupo de los valores del IMC entre en los individuos con los genotipos AA vs AC o CC.



6.6 Análisis del perfil metabólico.

En esta sección, se presentan los resultados del análisis del perfil metabólico de los participantes del estudio, con y sin HGNA. Se realizó la exploración de las diferencias entre grupos en relación los factores de riesgo conocidos que contribuyen al desarrollo del HGNA. Entre estos factores, se incluyeron el índice HOMA-IR, que sirve como un indicador de resistencia a la insulina, los niveles de diferentes tipos de colesterol (total, LDL y HDL), y los niveles de triglicéridos (TGD). Los resultados se presentan en la Tabla 9.

En primer lugar, se analizó el índice HOMA-IR, un marcador reconocido de resistencia a la insulina. Se observó que los individuos con HGNA presentaban una mediana de HOMA-IR de 1.81 (RI 1.23, 2.80), notablemente superior a la de aquellos sin HGNA, cuya mediana era de 1.12 (RI 0.75, 1.57), diferencia que fue estadísticamente significativa (Wilcoxon $p = 2.60 \times 10^{-9}$). Además, en el análisis de regresión logística la RM fue de 1.62 (IC95% 1.29-2.03), $p = 3.00 \times 10^{-5}$, lo que sugiere una asociación entre la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática.

Además, se determinaron los niveles de colesterol total, CLDL (colesterol LDL) y CHDL (colesterol HDL). En los casos con HGNA se observaron medianas ligeramente superiores tanto en colesterol total (184.50, RI 158.25, 214.00) como en CLDL (1101.50, RI 87.50, 132.75) en comparación con los participantes sin HGNA, que registraron valores de 176.00 (RI 153.00, 202.00) y 104.00 (RI 84.25, 123.00), respectivamente. Sin embargo, sólo CLDL mostró DES en la prueba de Wilcoxon ($p = 0.038$) y en la regresión logística con la RM fue de 1.009 (1.001-1.018), $p = 0.021$. En contraste, el colesterol HDL mostró niveles significativamente menores en los casos con HGNA comparados con el

grupo de referencia, en casos con HGNA la mediana fue de 43.00 (RI 38.00, 51.00) y en el grupo de comparación fue de 50.50 (RI 44.00, 60.00), Wilcoxon $p = 4.22 \times 10^{-4}$ y en la regresión logística, la RM fue de 0.95 (IC95% 0.93-0.98), $p = 4.90 \times 10^{-5}$.

Finalmente, se evaluaron los niveles de triglicéridos (TGD), un indicador de dislipidemia. Los individuos con HGNA presentaron una mediana de TGD de 136.00 (RI 107.00, 208.00), marcadamente mayor que en los individuos sin HGNA, cuya mediana era de 97.00 (RI 73.50, 139.75). Esta diferencia fue estadísticamente significativa en las pruebas de Wilcoxon ($p = 2.39 \times 10^{-9}$) y regresión logística ($p = 1.45 \times 10^{-4}$) lo que señala una asociación entre la esteatosis hepática y la hipertrigliceridemia.

Tabla 9. Resultados de la comparación del perfil metabólico entre casos con y sin HGNA.

VARIABLE	HGNA n = 135 ¹	SIN HGNA n = 134 ¹	p ²	REGRESIÓN LOGÍSTICA IC 95%	P ³
HOMA-IR	1.81 (1.23, 2.80)	1.12 (0.75, 1.57)	2.60x10⁻⁹	1.62 (1.29-2.03)	3.00 x 10⁻⁵
Colesterol					
Total	184.50 (158.25, 214.00)	176.00 (153.00, 202.00)	0.052	1.01 (1.00-1.01)	0.065
CLDL	111.50 (87.50, 132.75)	104.00 (84.25, 123.00)	0.038	1.009 (1.001-1.018)	0.021
CHDL	43.00 (38.00, 51.00)	50.50 (44.00, 60.00)	4.22 x 10⁻⁴	0.95 (0.93-0.98)	4.90 x 10⁻⁵
Triglicéridos	136.00 (107.00, 208.00)	97.00 (73.50, 139.75)	2.39 x 10⁻⁹	1.007 (1.003-1.011)	1.45 x 10⁻⁴

¹Mediana (RI). ² Wilcoxon-Mann-Whitney. ³Regresión logística.

Adicionalmente, se realizaron comparaciones de acuerdo con los genotipos agrupados (Para la variante C677T: CC vs CT + TT y A1298C: AA vs AC +CC). En estas comparaciones no se observaron DES entre los los individuos con HGNA y sin HGNA. Las tablas 10 y 11 muestran los resultados de las comparaciones mencionadas.

Tabla 10. Resultados de la comparación del perfil metabólico entre casos con y sin HGNA de acuerdo con el genotipo C677T.

VARIABLE	HGNA			SIN HGNA		
	CC n = 28 ¹	CT+TT n = 107 ¹	p ²	CC n = 28 ¹	CT+TT n = 105 ¹	p ³
HOMA-IR	1.8 (1.2, 3.3)	1.8 (1.3, 2.7)	0.811	0.9 (0.7, 1.6)	1.1 (0.7, 1.6)	0.606
Colesterol						
Total	177.5 (146.5, 207.7)	186.5 (160.5, 216.2)	0.442	182.5 (162.2, 208)	174 (153, 198.7)	0.179
CLDL	97.5 (83.5, 128.2)	114 (94, 133)	0.247	107 (83.5, 135)	103.5 (85, 122.7)	0.330
CHDL	42.5 (40.7, 49.5)	43 (38, 51)	0.630	55 (45, 59.2)	50 (43, 60.7)	0.193
Triglicéridos	112 (98.5, 233.5)	140 (116, 207)	0.229	95.5 (81.5, 120.5)	104.5 (70.7, 141.7)	0.554

¹ Mediana (RI) ² Prueba de Wilcoxon. ³ Regresión logística.

Tabla 11. Resultados de la comparación del perfil metabólico entre casos con y sin HGNA de acuerdo con el genotipo A1298C.

VARIABLE	HGNA			SIN HGNA		
	AA N = 97 ¹	AC+CC n = 38 ¹	P ²	AA n = 103 ¹	AC+CC n = 30 ¹	p ³
HOMA-IR	1.8 (1.2, 2.7)	2.1 (1.3, 2.8)	0.404	1.1 (0.7, 1.6)	1.2 (0.8, 1.7)	0.522
Colesterol						
Total	188 (166, 213)	164 (146, 222)	0.233	176.5 (155, 202)	170 (147.3, 201.5)	0.516
CLDL	115 (94, 134)	100 (84, 125)	0.121	106 (85.7, 123.2)	101.5 (75, 122)	0.746
CHDL	43 (38, 51)	42 (37, 49)	0.318	50 (43, 59.2)	55 (46.5, 61.5)	0.254
Triglicéridos	149 (107, 208)	120 (105, 208)	0.409	106.5 (75, 142)	86.5 (70, 124.8)	0.213

¹ Mediana (RI) ² Prueba de Wilcoxon. ³ Regresión logística.

6.7 Análisis de marcadores de enfermedad hepática.

A continuación, se presentan los resultados del análisis comparativo de marcadores de enfermedad hepática entre los individuos con y sin HGNA. Este análisis incluye enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT, FA), bilirrubina, proteínas séricas y recuento de plaquetas. Los resultados se expresan como medianas con rangos intercuartilares (RI) (Tabla 12).

La enzima alanina aminotransferasa (ALT) mostró una mediana significativamente mayor en el grupo con HGNA 25.00 U/L (RI 17.43, 40.00) en comparación con el grupo sin HGNA 18.00 U/L (RI 13.93, 24.88), resultando en un valor p <0.001. De la misma manera, la aspartato aminotransferasa (AST) y la gamma glutamiltransferasa (GGT) también exhibieron medianas significativamente superiores en el grupo con HGNA AST 21.20 U/L

(RI 17.30, 26.80); GGT 26.60 U/L (RI 19.33, 41.30); mientras que en el grupo de comparación se observaron menores concentraciones de estas enzimas, AST 18.70 U/L (RI 17.03, 22.80); GGT 16.90 U/L (RI 12.20, 25.03), con valores p de 0.021 y <0.001 respectivamente.

Por otro lado, la fosfatasa alcalina (FA) también registró una mediana significativamente más alta en el grupo con HGNA 75.50 U/L (RI 63.25, 91.00) que en el grupo sin HGNA 70.50 U/L (RI 57.25, 81.75), con un valor p de 0.009. En contraste, la albúmina (ALB), una proteína producida por el hígado tuvo una mediana considerablemente menor en el grupo con HGNA [4.45 g/dL (RI 4.27, 4.62)] que en el grupo sin HGNA [4.52 g/dL (RI 4.35, 4.65)], con un valor p de 0.033.

Para las restantes variables evaluadas, incluyendo bilirrubina total (BT), bilirrubina directa (BD), bilirrubina indirecta (BI), globulinas y plaquetas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con y sin HGNA.

Tabla 12. Marcadores bioquímicos de enfermedad hepática.

VARIABLE	HGNA n = 135 ¹	Sin HGNA n = 133 ¹	P
BT	0.64 (0.52, 0.85)	0.64 (0.49, 0.87)	0.673
BD	0.12 (0.09, 0.15)	0.12 (0.09, 0.16)	0.430
BI	0.52 (0.43, 0.70)	0.53 (0.40, 0.72)	0.464
ALT	25.00 (17.43, 40.00)	18.00 (13.93, 24.88)	<0.001
AST	21.20 (17.30, 26.80)	18.70 (17.03, 22.80)	0.021
GGT	26.60 (19.33, 41.30)	16.90 (12.20, 25.03)	<0.001
FA	75.50 (63.25, 91.00)	70.50 (57.25, 81.75)	0.009
ALB	4.45 (4.27, 4.62)	4.52 (4.35, 4.65)	0.033
Globulinas	2.73 (2.53, 2.99)	2.76 (2.57, 2.90)	0.929
Plaquetas	241.50 (204.00, 286.75)	250.00 (211.25, 294.25)	0.267

¹Mediana (RI). ² Prueba de Wilcoxon. BT= bilirrubina total. BD= bilirrubina directa. BI= bilirrubina indirecta. ALT= alanino aminotransferasa. AST = Aspartato aminotransferasa. GGT= gamma glutamil transpeptidasa. FA= fosfatasa alcalina. ALB = albúmina.

6.8 Análisis de las variantes de *MTHFR* de acuerdo con el grado de fibrosis hepática.

En la siguiente sección, se describen los resultados del análisis de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* de acuerdo con el grado de fibrosis hepática. Este análisis incluye tanto los genotipos individuales como los compuestos de las variantes, y compara sus frecuencias en individuos con y sin HGNA, además estratificados según el grado de fibrosis hepática. Este análisis nos permitió evaluar no solo la relación entre las variantes genéticas y el HGNA, sino también cómo estas variantes pueden estar asociadas con la gravedad o progresión de la fibrosis hepática en los individuos con HGNA (Tabla 13).

Entre los casos con diagnóstico de HGNA, se identificó algún grado de fibrosis hepática en sólo 13 individuos (grados 1 a 4), lo que representa el 9.63% de este grupo. Sin embargo, la mayor proporción de casos de HGNA (90.37%, n=122) no presentaron

fibrosis hepática. En contraste, dentro del grupo de comparación, compuesto por individuos sin esteatosis hepática, sólo 3 (2.26% del grupo) individuos, presentaron fibrosis hepática de grados 2 y 3. Estos datos están de acuerdo con lo esperado, considerando que los individuos en este grupo de comparación fueron seleccionados como grupo de referencia en ausencia de esteatosis hepática.

Con respecto a la variante C677T, llama la atención que el 84.62%, 11 de los 13 individuos con fibrosis en el grupo con HGNA tuvieron genotipos heterocigotos (CT) y homocigotos para la variante (TT) en grados más altos de fibrosis, desde el grado 1 al 4 (Tabla 13). A pesar del reducido número de individuos en estas categorías, estos resultados podrían sugerir cierta participación de la variante C677T en la progresión de la fibrosis hepática en individuos con HGNA.

Para la variante A1298C, 8 de los 13 casos (61.54%) con HGNA y fibrosis hepática, tuvieron un genotipo homocigoto silvestre (AA), concentrados en mayor medida en los grados 2 y 3, con 4 y 2 casos respectivamente. Por su parte, 5 de los 13 (38.46%) casos con fibrosis fueron heterocigotos AC, distribuidos en los grados 2 y 3 (Tabla 13).

Finalmente, el análisis de los genotipos compuestos también mostró variación. En los casos con HGNA, 11 de los 13 casos (84.62%) identificados con fibrosis tuvieron alguno de los siguientes genotipos compuestos CT₆₇₇-AA₁₂₉₈ (3 casos), CT₆₇₇-AC₁₂₉₈ (2 casos), o TT₆₇₇-AA₁₂₉₈ (4 casos). Para los genotipos compuestos CT₆₇₇-AA₁₂₉₈ y CT₆₇₇-AC₁₂₉₈, los casos se distribuyeron entre los grados 2 (4 casos) y 3 (3 casos) de fibrosis hepática. Por último, 4 de los 13 (30.77%) individuos con fibrosis fueron también portadores del

genotipo compuesto TT₆₇₇-AA₁₂₉₈, se encontraron en cada uno de los grados de fibrosis hepática (Tabla 13).

Tabla 13. Frecuencias genotípicas de las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* en individuos con y sin HGNA, clasificadas según el grado de fibrosis hepática.

GENOTIPOS	HGNA					Total n=135 [†]	SIN HGNA			Total n=133 [†]
	SIN FIBROSIS n=122 [†]	FIBROSIS GRADO 1 n=1 [†]	FIBROSIS GRADO 2 n=6 [†]	FIBROSIS GRADO 3 n=5 [†]	FIBROSIS GRADO 4 n=1 [†]		SIN FIBROSIS n=130 [†]	FIBROSIS GRADO 2 n=2 [†]	FIBROSIS GRADO 3 n=1 [†]	
C677T										
CC	26 (21.31%)		1 (16.67%)	1 (20.00%)		28 (20.74%)	27 (20.77%)	1 (50.00%)		28 (21.05%)
CT	62 (50.82%)		4 (66.67%)	3 (60.00%)		69 (51.11%)	71 (54.62%)	1 (50.00%)		72 (54.14%)
TT	34 (27.87%)	1 (100.00%)	1 (16.67%)	1 (20.00%)	1 (100.00%)	38 (28.15%)	32 (24.62%)		1 (100.00%)	33 (24.81%)
A1298C										
AA	89 (72.95%)	1 (100.00%)	4 (66.67%)	2 (40.00%)	1 (100.00%)	97 (71.85%)	101 (77.69%)	1 (50.00%)	1 (100.00%)	103 (77.44%)
AC	31 (25.41%)		2 (33.33%)	3 (60.00%)		36 (26.67%)	25 (19.23%)			25 (18.8%)
CC	2 (1.64%)					2 (1.48%)	4 (3.08%)	1 (50.00%)		5 (3.76%)
GENOTIPOS COMPUESTOS										
CC ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	16 (13.11%)		1 (16.67%)			17 (12.59%)	14 (10.77%)			14 (10.53%)
CC ₆₇₇ -AC ₁₂₉₈	8 (6.56%)			1 (20.00%)		9 (6.67%)	9 (6.92%)			9 (6.77%)
CC ₆₇₇ -CC ₁₂₉₈	2 (1.64%)					2 (1.48%)	4 (3.08%)	1 (50.00%)		5 (3.76%)
CT ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	39 (31.97%)		2 (33.33%)	1 (20.00%)		42 (31.11%)	55 (42.31%)	1 (50.00%)		56 (42.11%)
CT ₆₇₇ -AC ₁₂₉₈	23 (18.85%)		2 (33.33%)	2 (40.00%)		27 (20.00%)	16 (12.31%)			16 (12.03%)
TT ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈	34 (27.87%)	1 (100.00%)	1 (16.67%)	1 (20.00%)	1 (100.00%)	38 (28.15%)	32 (24.62%)		1 (100.00%)	33 (24.81%)

[†] n (%)

6.9 Análisis estratificado por sexo.

La siguiente sección se dedica a la presentación de los resultados del análisis de las características clínicas, genéticas y bioquímicas obtenidas en nuestro estudio y estratificadas por sexo. El propósito de este análisis fue el de identificar y cuantificar las posibles diferencias en factores de riesgo para el hígado graso no alcohólico (HGNA) en los hombres y mujeres de la población de estudio. Para este análisis se utilizó la

regresión logística con el propósito de identificar asociaciones y cuantificar la probabilidad de HGNA. Los resultados son presentados en la Tabla 14.

Con respecto a la edad, en el grupo de las mujeres se observó que por cada año se incrementa la probabilidad de HGNA de forma significativa, con una RM de 1.04 (IC 95% 1.01-1.06) y un valor q ajustado de 0.009 tras la corrección para múltiples pruebas FDR². De manera que, con cada año de aumento en la edad, el riesgo de HGNA aumenta en un 4% en las mujeres. Sin embargo, esta asociación no fue significativa en los hombres, lo que puede sugerir que otros factores pueden ser más importantes en este grupo.

El Índice de Masa Corporal (IMC) fue un importante factor de riesgo tanto en mujeres como en hombres, pero las mujeres mostraron un mayor efecto de riesgo, RM 1.32, (IC 95% 1.20-1.46), $q = 6.47 \times 10^{-7}$, que en el grupo de los hombres, RM 1.18, (IC 95% 1.07-1.33), $q = 0.033$. Esto indica que el incremento en el IMC es un predictor más fuerte de HGNA en las mujeres que en los hombres.

En este análisis estratificado por sexo, las variantes genéticas C677T y A1298C del gen *MTHFR* no mostraron DES en los grupos estudiados, tanto en el análisis individual de los genotipos, como en los genotipos agrupados, ni en los genotipos compuestos.

Con respecto a las variables bioquímicas, Homocisteína, Ácido Fólico y Vitamina B12 no mostraron diferencias significativas en los grupos estudiados. Esto puede indicar que estos biomarcadores no están fuertemente asociados con HGNA en esta población de estudio.

² Corrección de múltiples pruebas por el método de FDR (False Discovery Rate)

Finalmente, se identificó un grupo de variables que mostraron asociaciones estadísticas significativas sólo en el grupo de mujeres. Específicamente, un aumento en la resistencia a la insulina medido a través del índice HOMA-IR, Colesterol, CLDL, TG, ALT, GGT, y FA se asociaron con un incremento en el riesgo de tener HGNA. En contraste, niveles altos de CHDL, BD y Albumina se asociaron con una disminución significativa en el riesgo de HGNA. Estas diferencias por sexo en la asociación de factores de riesgo con HGNA resaltan la importancia de considerar el sexo en la evaluación de la probabilidad de HGNA.

En resumen, estos resultados sugieren que en mujeres la edad 1.04 (IC 95% 1.01-1.06), el IMC (sobrepeso RM 4.55; y obesidad RM 15.4) y ciertos biomarcadores como el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) 1.80 (IC95% 1.33-2.58), el colesterol total 1.01 (IC95% 1.00-1.02), el colesterol CLDL 1.02 (IC95% 1.01-1.03), los triglicéridos, 1.02 (IC95% 1.01-1.03), enzima hepáticas como: ALT 1.02 (IC95% 1.01-1.04), GGT 1.03 (IC95% 1.01-1.06) y fosfatasa alcalina (FA) 1.02 (IC95% 1.01-1.04); podrían estar asociados con un incremento de riesgo de HGNA y la magnitud de su efecto es diferente entre hombres y mujeres.

Tabla 14. Comparación de las características clínicas, genéticas y bioquímicas entre casos con y sin HGNA estratificadas por sexo por medio de regresión logística.

CARACTERÍSTICA	MUJERES					HOMBRES				
	N	RM ¹	IC 95% ¹	p	q ²	N	RM ¹	IC 95% ¹	p	q ²
Edad (años)	162	1.04	1.01, 1.06	0.002	0.009	106	1.00	0.98, 1.03	0.799	0.988
IMC (kg/m ²)	162	1.32	1.20, 1.46	1.90x10⁻⁸	6.47x10⁻⁷	106	1.18	1.07, 1.33	0.002	0.033
Categorías	162					106				
Peso normal		—	Referencia				—	Referencia		
Sobrepeso		4.55	2.06, 10.6	2.57x10⁻⁴	0.002		2.24	0.85, 6.10	0.106	0.426
Obesidad		15.4	5.90, 44.6	9.37x10⁻⁸	1.59x10⁻⁶		6.93	2.21, 24.4	0.001	0.033
C677T	162					106				
CC		—	Referencia				—	Referencia		
CT		1.16	0.53, 2.62	0.710	0.863		0.67	0.22, 1.90	0.464	0.790
TT		1.36	0.54, 3.44	0.514	0.729		0.79	0.24, 2.50	0.693	0.953
GENOTIPOS AGRUPADOS	162					106				
CC		—	Referencia				—	Referencia		
CT+TT		1.22	0.57, 2.66	0.607	0.825		0.71	0.25, 1.90	0.512	0.790
A1298C	162					106				
AA		—	Referencia				—	Referencia		
AC		1.37	0.64, 2.94	0.423	0.713		1.69	0.68, 4.53	0.276	0.606
CC		0.91	0.12, 5.68	0.920	0.990		0.00		0.988	0.988
GENOTIPOS AGRUPADOS	162					106				
AA		—	Referencia				—	Referencia		
AC+CC		1.30	0.63, 2.68	0.480	0.713		1.35	0.56, 3.38	0.507	0.790
GENOTIPO COMPUESTO	162					106				
CC ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈		1.01	0.35, 2.81	0.980	0.990		4.76	1.04, 34.3	0.067	0.426
CC ₆₇₇ -AC ₁₂₉₈		1.01	0.24, 3.91	0.985	0.990		1.76	0.37, 9.69	0.480	0.790
CC ₆₇₇ -CC ₁₂₉₈		1.01	0.13, 6.53	0.989	0.990		0.00		0.988	0.988
CT ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈		—	Referencia				—	Referencia		
CT ₆₇₇ -AC ₁₂₉₈		1.80	0.70, 4.71	0.226	0.452		2.96	0.92, 10.8	0.080	0.426
TT ₆₇₇ -AA ₁₂₉₈		1.38	0.62, 3.07	0.435	0.713		1.68	0.63, 4.55	0.302	0.622
Homocisteína	150	1.05	0.92, 1.20	0.482	0.713	92	1.03	0.91, 1.19	0.642	0.921
Ácido Fólico	139	1.01	0.96, 1.06	0.709	0.863	87	1.01	0.94, 1.08	0.848	0.988
Vitamina B12	148	1.00	1.00, 1.00	0.122	0.258	92	1.00	1.00, 1.00	0.918	0.988
HOMA-IR	162	1.80	1.33, 2.58	5.04x10⁻⁴	0.003	106	1.37	1.06, 1.92	0.037	0.305
Colesterol	159	1.01	1.00, 1.02	0.012	0.034	105	1.00	0.99, 1.01	0.983	0.988
CLDL	159	1.02	1.01, 1.03	0.002	0.009	105	1.00	0.99, 1.01	0.850	0.988
CHDL	159	0.95	0.92, 0.98	0.001	0.006	105	0.97	0.93, 1.01	0.204	0.593
TG	159	1.02	1.01, 1.03	3.59x10⁻⁶	4.07x10⁻⁵	105	1.00	1.00, 1.01	0.252	0.593
BT	159	0.32	0.08, 1.08	0.080	0.181	105	2.04	0.64, 7.60	0.250	0.593
BI	159	1.08	0.96, NA	0.473	0.713	105	2.32	0.61, 10.8	0.245	0.593
BD	159	0.00	0.00, 0.03	0.006	0.021	105	16.1	0.02, 28.84	0.445	0.790
ALT	159	1.02	1.01, 1.04	0.020	0.049	105	1.02	1.00, 1.05	0.116	0.426
AST	159	1.00	0.99, 1.02	0.659	0.862	105	1.01	0.98, 1.06	0.527	0.790
GGT	159	1.03	1.01, 1.06	0.003	0.012	105	1.02	1.00, 1.05	0.037	0.305
FA	159	1.02	1.01, 1.04	0.009	0.028	105	1.00	0.98, 1.02	0.787	0.988
ALB	159	0.25	0.07, 0.78	0.020	0.049	105	0.29	0.06, 1.28	0.108	0.426
Globulinas	159	1.49	0.60, 3.80	0.391	0.713	105	1.07	0.27, 4.31	0.919	0.988
Plaquetas	159	1.00	1.00, 1.01	0.790	0.926	105	1.00	0.99, 1.00	0.170	0.561

¹RM = Razón de Momios, IC = Intervalo de confianza al 95%.

² Corrección de múltiples pruebas por el método de FDR (False Discovery Rate)

BT= bilirrubina total. BD= bilirrubina directa. BI= bilirrubina indirecta. ALT= alanino aminotransferasa. AST = Aspartato aminotransferasa. GGT= gamma glutamil transpeptidasa. FA= fosfatasa alcalina. ALB = albúmina. Asociaciones significativas de riesgo (ROJO), asociaciones significativas de reducción del riesgo (AZUL).

6.10 Análisis multivariado.

Finalmente, se realizó un análisis multivariado por medio de regresión logística para examinar la relación entre las variables predictoras y la variable desenlace HGNA. Se incorporaron en este análisis una serie de variables, incluyendo biomarcadores, aspectos clínicos y características demográficas. Los resultados de este análisis se han ilustrado detalladamente en la Tabla 15.

El modelo demostró un nivel de poder explicativo considerable, evidenciado por un R^2 de Tjur de 0.33. No obstante, la multitud de variables incluídas, sólo el índice de masa Corporal demostró tener una asociación estadística significativa con el HGNA, con una RM de 1.23 (IC 95% 1.11 - 1.38) y un valor p de 1.47×10^{-4} . Esta asociación sugiere que por cada incremento unitario en el IMC conlleva un aumento significativo en la probabilidad de tener esteatosis hepática, incluso ajustado por múltiples comparaciones ($q = 0.004$).

Es de importante mencionar que, a pesar de las expectativas, variables de interés como la edad, sexo, las variantes genéticas C677T y A1298C de *MTHFR*, y otras medidas bioquímicas y de salud, no revelaron un efecto significativo para el HGNA dentro del marco de este modelo en particular. Este resultado sugiere que la relación entre el HGNA y estas variables puede ser compleja, posiblemente modulada por la interacción otras de variables no consideradas en el presente modelo.

En resumen, los resultados de este análisis multivariado señalan que únicamente el Índice de Masa Corporal (IMC) mostró una correlación significativa con la presencia de HGNA. El resto de las variables consideradas en este estudio, que incluyen biomarcadores, variables clínicas y características demográficas, no presentaron asociaciones significativas en este estudio.

Tabla 15. Resultados del análisis de regresión logística multivariada.

CARACTERÍSTICA	RM ¹	IC 95% ¹	p	q ²
Edad	0.99	0.96, 1.02	0.400	0.667
Sexo				
Mujeres	—	Referencia		
Hombres	1.16	0.52, 2.59	0.716	0.894
IMC (kg/m ²)	1.23	1.11, 1.38	1.47x10⁻⁴	0.004
C677T				
CC	—	Referencia		
CT	0.58	0.19, 1.69	0.313	0.659
TT	0.99	0.31, 3.21	0.989	0.989
A1298C				
AA	—	Referencia		
AC	0.79	0.15, 3.85	0.772	0.894
CC	0.42	0.04, 3.06	0.410	0.667
Homocisteína	1.11	0.95, 1.31	0.211	0.659
Ácido fólico	1.06	1.01, 1.12	0.030	0.396
Vitamina B12	1.00	1.00, 1.00	0.103	0.638
HOMA-IR	1.14	0.89, 1.54	0.316	0.659
Colesterol	0.98	0.95, 1.01	0.274	0.659
CLDL	1.02	0.99, 1.06	0.272	0.659
CHDL	1.00	0.96, 1.05	0.828	0.897
TG	1.00	1.00, 1.01	0.248	0.659
T	5.38		0.332	0.659
BI	1.20	0.98, NA	0.734	0.894
BD	0.00	0.00, NA	0.355	0.659
ALT	1.00	0.96, 1.04	0.923	0.960
AST	1.01	0.96, 1.04	0.791	0.894
GGT	1.02	1.00, 1.04	0.123	0.638
ALP	1.00	0.98, 1.01	0.701	0.894
ALB	0.61	0.14, 2.52	0.491	0.751
Globulinas	1.79	0.59, 5.70	0.315	0.659
Plaquetas	0.99	0.99, 1.00	0.072	0.620
Interacción				
C677T*A1298C				
CT * AC	1.78	0.27, 12.1	0.546	0.789

¹RM = Razón de Momios, IC = Intervalo de confianza al 95 %.

² Corrección de múltiples pruebas por el método de FDR (False Discovery Rate)

Discusión

El presente estudio describe algunas características clínicas y bioquímicas de un grupo de 135 individuos con HGNA, así como de un grupo de 133 individuos sin HGNA. La información demográfica y clínica de estos individuos fue recabada de un protocolo de investigación del departamento de gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán “Asociación del consumo de fructosa, azúcares añadidos, grasas saturadas y grasas de origen animal con la grasa corporal y hepática en individuos aparentemente sanos”. El principal objetivo de esta investigación fue determinar la asociación de las variantes T₆₇₇ y C₁₂₉₈ del gen *MTHFR* con el HGNA para lo cual se realizó una genotipificación mediante un ensayo de discriminación alélica.

Respecto a las variables analizadas, se incluyeron factores de riesgo previamente conocidos para el desarrollo de hígado graso no alcohólico, como el índice de masa corporal, la dislipidemia, la resistencia a la insulina, la edad y el sexo masculino. Del mismo modo, también se incluyeron variables bioquímicas asociadas al daño hepático como las pruebas de función hepática y las plaquetas.

7.1 Características demográficas y clínicas.

El primer aspecto a destacar es la distribución del sexo en los participantes. Aunque la mayoría de los estudios han sugerido una mayor prevalencia de HGNA en hombres, este estudio encontró que las mujeres tuvieron una mayor participación en la muestra, con una razón mujer a hombre de 1.53:1. Sin embargo, al analizar por grupos, se observó que la razón m:h se redujo en el grupo con HGNA (1.11:1) y se incrementó en el grupo sin HGNA (2.16:1). Esto se debió a una mayor frecuencia de hombres en el grupo con

HGNA en comparación con el grupo de comparación. Estos resultados son consistentes con algunos estudios que han reportado una asociación entre el sexo masculino y un mayor riesgo de HGNA (2 a 3 veces más que en el sexo femenino). (Hashimoto & Tokushige, 2011).

En cuanto a la edad, se encontró que los individuos con HGNA tenían una mediana de edad mayor que aquellos sin HGNA. Además, el análisis de regresión logística mostró una relación significativa entre la edad y la probabilidad de desarrollar HGNA, con un aumento del ~3% en la probabilidad por cada año de edad. Estos resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado que la edad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de HGNA, particularmente después de los 50 años de edad, posiblemente debido a cambios en el metabolismo y el estilo de vida a medida que envejecemos (Perumpail et al., 2017), así como por los cambios hormonales en las mujeres después de la menopausia (Mauvais-Jarvis et al., 2013).

7.2 Variantes genotípicas

Se han realizado análisis de frecuencias genotípicas y alélicas para dos variantes genéticas, la variante C677T y la variante A1298C. En relación con la variante C677T, en los 268 individuos se observaron frecuencias genotípicas del 20.90% para CC₆₇₇, 52.61% para CT₆₇₇ y 26.49% para TT₆₇₇ (56, 141 y 71 individuos, respectivamente). Estos resultados muestran diferencias en comparación con los hallazgos de Mutchinick y colaboradores, quienes encontraron una mayor frecuencia del genotipo TT₆₇₇ (34.8%) y frecuencias menores para los genotipos CC₆₇₇ (17.6%), y CT₆₇₇ (47.6%). En cuanto a las

frecuencias alélicas, también se encontraron resultados distintos, el alelo C se encontró frecuencia del 47.19%, mientras que el alelo T presentaba una frecuencia del 52.81%, comparado con lo reportado por los autores previamente mencionados quienes reportaron una frecuencia de 41.4% para el alelo C y 58.6% para el alelo T en la población mexicana (Mutchinick et al., 1999).

Con respecto a relación a la variante A1298C, se observó que el genotipo silvestre tenía una frecuencia del 74.63%, el heterocigoto presentaba una frecuencia del 22.76%, y el homocigoto para la variante tenía una frecuencia del 2.61%. La frecuencia alélica del alelo A fue del 86%, mientras que el alelo C presentaba una frecuencia del 14%. Estos resultados son similares a los reportados previamente por Guéant-Rodriguez y colaboradores, quienes encontraron una frecuencia del genotipo CC de 2.3% y una frecuencia alélica del alelo C de 14.7% en la población mexicana. (Rosa-Maria Guéant-Rodriguez et al., 2006)

La alta prevalencia del alelo T₆₇₇ y del genotipo TT₆₇₇ y la baja frecuencia del alelo C₁₂₉₈ y el genotipo CC₁₂₉₈ encontradas en esta muestra de individuos se encuentran en relación con un estudio realizado por Wilcken y colaboradores, en el que se incluyó a distintos países y se compararon frecuencias de las variantes del gen *MTHFR*. En México, se observaron las frecuencias más altas y más bajas, respectivamente (B Wilcken et al., 2003). La alta prevalencia del alelo T en comparación con otros países, también ha sido reportada previamente por Mutchinick y colaboradores en 1999, en el que México presentaba la frecuencia más alta (59%) vs Italia y Japón (40 y 42% respectivamente) y

el doble de la frecuencia que se encontraba en Estados Unidos (21%), Irlanda (28%) y Holanda (26%). (Mutchinick et al., 1999)

Los resultados del análisis de los genotipos heterocigotos o homocigotos para las variantes, en comparación con los genotipos silvestre, ya sea de manera individual o combinada no mostraron DES. Sin embargo, al comparar el genotipo doble heterocigoto (CT₆₇₇-AC₁₂₉₈) con el genotipo silvestre para la variante 677 y heterocigoto para la variante 1298 (CC₆₇₇-AC₁₂₉₈), se encontró una mayor cantidad de individuos con HGNA en el grupo del genotipo doble heterocigoto. Esto resultó en una razón de momios de 2.25 (IC 95% 1.08 - 4.70), lo cual fue estadísticamente significativo ($p = 0.031$) (Tabla 3). Se debe tener precaución al interpretar este resultado, ya que el tamaño de la muestra para este genotipo fue relativamente pequeño ($n=27$ [20%] en el grupo con HGNA y $n=16$ [12.03%] en el grupo de comparación). Se necesitarían estudios adicionales con muestras más grandes para confirmar este hallazgo. Es importante tener en cuenta que las frecuencias genotípicas y alélicas pueden variar entre diferentes poblaciones y grupos étnicos. Por lo tanto, es fundamental replicar estos resultados en otras poblaciones para establecer conclusiones más generales sobre la asociación entre las variantes del gen *MTHFR* y la HGNA.

Además, aunque el análisis de las variantes individuales no mostró una asociación significativa con HGNA en esta población, es posible que otros factores genéticos o ambientales interactúen con las variantes del gen *MTHFR* para influir en el riesgo de desarrollar la enfermedad. Por lo tanto, estudios futuros podrían investigar interacciones gen-gen y gen-ambiente para comprender mejor la base genética de la HGNA.

Es importante mencionar que estos resultados podrían estar influenciados por el tamaño de la muestra, especialmente en el caso de la variante 1298, debido a la baja frecuencia del alelo C en la población estudiada (13.2% para individuos sin HGNA y 14.8% para el grupo con esteatosis).

Estos hallazgos sugieren una tendencia en la cual la variante C₁₂₉₈ está asociada con el HGNA, como han propuesto otros estudios. Autores como Catalano y colaboradores sugieren que esta variante podría ser un marcador de susceptibilidad, aunque la evidencia es débil. Del mismo modo, Zasci y colaboradores encontraron una mayor prevalencia del alelo *MTHFR*-1298C en individuos con HGNA, con una razón de momios de 2.48 (CI 95% 1.28-4.78, p = 0.006). Además, encontraron una asociación del genotipo 1298CC (razón de momios 2.97; CI 95% 1.02-8.84, p = 0.037) en mujeres y el genotipo compuesto C677C/A1298C en hombres (razón de momios 2.21; CI 95% 1.003-4.90, p = 0.046). (Catalano et al., 2014; Sazci et al., 2008)

Por otro lado, la variante 677T no mostró asociación con el HGNA en este estudio, lo cual respalda los hallazgos previamente publicados por los grupos de autores mencionados anteriormente.

Adicionalmente, se observó que los genotipos que presentaban las variantes T y C de las variantes 677 y 1298, respectivamente, eran más prevalentes en los grados 2 y 3 de esteatosis hepática en comparación al grado 1. Estos resultados sugieren una tendencia a desarrollar HGNA en individuos con la variante. Sin embargo, no se pudieron evaluar

estas diferencias dado el reducido tamaño de muestra en los grupos. Incluso, es importante señalar que el tamaño desigual de la muestra entre los grupos con diferentes grados de esteatosis hepática (E1, E2 y E3) puede haber influido en la falta de diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas. Esta disparidad en el tamaño de la muestra puede afectar la probabilidad de detectar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo que debe tenerse en cuenta al interpretar los resultados.

Por su parte, el análisis de regresión logística ordinal realizado para evaluar la asociación entre los genotipos y alelos de las variantes de *MTHFR* con el grado de esteatosis hepática tampoco mostró asociaciones estadísticamente significativas. Es decir, la presencia de los genotipos heterocigotos o homocigotos para el alelo de riesgo (CT y TT para C677T, y AC y CC para A1298C) no se asoció significativamente con un mayor grado de esteatosis hepática en comparación con los genotipos homocigotos silvestres (CC para C677T y AA para A1298C). No obstante, se observó una asociación significativa con el genotipo compuesto CT677-AC1298 y un mayor riesgo de desarrollar esteatosis hepática más grave. Los individuos con este genotipo presentaron aproximadamente el doble de probabilidades de tener grados superiores de esteatosis hepática en comparación con el genotipo de referencia CT₆₇₇-AA₁₂₉₈. Es importante destacar es necesario realizar estudios adicionales para confirmar este hallazgo, ya que el tamaño de la muestra para este genotipo compuesto fue relativamente pequeño.

Se debe de tomar en consideración que este es un estudio transversal por lo que el análisis de estos resultados se limita al momento en que se realizaron los estudios y, por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que los participantes de esta investigación

desarrollen HGNA en años posteriores, tomando en cuenta que la mediana de edad de la muestra fue de 38 años.

En cuanto a los datos demográficos, no se encontraron diferencias significativas en la edad, el sexo y el IMC entre los portadores de los genotipos homocigotos silvestres y los portadores de los genotipos heterocigotos y homocigotos para las variantes C677T y A1298C en los casos con HGNA y los controles sin HGNA. Estos hallazgos sugieren que las variantes C677T y A1298C del gen *MTHFR* no están asociadas con diferencias importantes en características clínicas y demográficas en esta población.

7.3 Homocisteína, ácido fólico y vitamina B12

En primer lugar, en el análisis de regresión logística se observó que las concentraciones de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12 no mostraron asociaciones significativas con el HGNA. Además, los modelos de regresión explicaron poco de la varianza en el HGNA, lo que sugiere que otros factores pueden estar influyendo en el desarrollo de la enfermedad.

En segundo lugar, en la comparación de la distribución de valores entre los casos con HGNA y el grupo de comparación, se observó que la homocisteína mostró niveles más altos en el grupo con HGNA en comparación con el grupo sin HGNA. Aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística, es interesante notar que los niveles máximos de homocisteína fueron más elevados en el grupo con HGNA, lo que podría sugerir una tendencia hacia una mayor concentración de homocisteína en casos más graves de la enfermedad. Sin embargo, se necesitarían estudios adicionales con una muestra más grande para confirmar esta posible asociación.

La medición de los niveles de homocisteína es relevante en el contexto del HGNA debido a su implicación en la fisiopatología de la enfermedad. La exposición crónica a niveles elevados de homocisteína se ha asociado con el estrés oxidativo y la toxicidad a los hepatocitos, lo que puede contribuir al desarrollo y progresión de la esteatosis hepática. Las medianas de homocisteína se encontraron dentro de los rangos de referencia establecidos para hombres y para mujeres, en ambos grupos de estudio. Para adultos, los niveles normales de homocisteína en la sangre suelen considerarse menores a 15 micromoles por litro ($\mu\text{mol/L}$). Según un estudio realizado en México, se observaron los siguientes rangos de referencia para la población mexicana adulta: Hombres: 5.8 a 17.5 $\mu\text{mol/mL}$ y mujeres: 4.2 a 16.4 $\mu\text{mol/mL}$. La exposición crónica a niveles elevado de homocisteína, a pesar de no ser valores extremos pudieran participar en la toxicidad a los hepatocitos por medio del estrés oxidativo y de esta manera contribuir a la fisiopatología de la esteatosis hepática (Allen & Rosado, 1995; Paul F Jacques et al., 2018; Refsum et al., 2004). En esta investigación, el grupo de individuos con HGNA presentó niveles más elevados de homocisteína en comparación al grupo de individuos sin HGNA. Los niveles por arriba de 10 $\mu\text{mol/L}$ se observaron a partir del percentil 90 en individuos si HGNA y a partir del percentil 75 el grupo con HGNA. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la homocisteína puede desempeñar un papel relevante en la patogénesis del HGNA.

Un estudio realizado en pacientes con HGNA encontró que aquellos con HGNA avanzada presentaban niveles significativamente más altos de homocisteína en comparación con aquellos con HGNA leve. Además, se ha sugerido que la homocisteína

puede desempeñar un papel en la progresión de la esteatosis hepática a través de su efecto proinflamatorio y prooxidante en el hígado. (Kim & Min, 2020a; B. Zhang et al., 2023).

Para poder sustentar esta teoría, necesitamos confirmar la exposición crónica a niveles elevados de homocisteína, sin embargo, al ser un estudio transversal, no se conocen los valores de homocisteína que han presentado los individuos previos a que se realizara esta investigación. Se sugiere para futuras investigaciones, considerar un seguimiento con dichas mediciones.

Por otro lado, tanto el ácido fólico como la vitamina B12 mostraron niveles similares entre los grupos con y sin HGNA. A pesar de que se observó una tendencia no significativa a presentar niveles más bajos de ácido fólico en los casos con HGNA, las medianas de ambas variables fueron prácticamente iguales en ambos grupos. Esto sugiere que, en esta población estudiada, los niveles de ácido fólico y vitamina B12 no parecen estar directamente relacionados con la presencia de esteatosis hepática.

En el estudio realizado por Wilcken, las concentraciones plasmáticas de Hcy, folato y vitamina B12 mostraron variaciones en diferentes áreas geográficas. México tuvo la concentración más alta de folato. Se observó una deficiencia más baja en México. Por otro lado, se reportó una baja concentración de vitamina B-12 en un porcentaje significativamente más alto de los sujetos de México en comparación con Francia, Italia y los países africanos. En el análisis de regresión múltiple, el folato fue un predictor independiente significativo de Hcy en todas las áreas, y Hcy también se asoció con la vitamina B-12 en sicilianos y mexicanos (B Wilcken et al., 2003).

En este estudio, al realizar una regresión lineal entre la homocisteína y el ácido fólico, se observó una correlación inversa significativa entre ambas variables en toda la muestra estudiada. A medida que aumentan los niveles de ácido fólico, disminuyen los niveles de homocisteína con un coeficiente beta de ácido fólico mayor en el grupo de individuos con HGNA que en el grupo de comparación (-0.13, vs -0.09), lo cual se traduce en que por cada unidad que aumenta el ácido fólico, la homocisteína disminuye 0.13 y 0.09 unidades respectivamente. Esta asociación también se observó en el grupo de comparación. Estos resultados respaldan la idea de que el ácido fólico juega un papel importante en el metabolismo de la homocisteína, y que niveles adecuados de esta vitamina podrían tener un efecto protector contra la esteatosis hepática y plantean la posibilidad de que la administración de ácido fólico pueda tener un impacto positivo en la reducción de los niveles de homocisteína en pacientes con HGNA.

Otros estudios han concluido que la suplementación de ácido fólico puede ayudar a tratar la enfermedad del hígado graso al reducir los niveles de triglicéridos hepáticos y aliviar la esteatosis hepática. La activación de LKB1/AMPK/ACC y el aumento de SAM en el hígado pueden inhibir la lipogénesis hepática, lo que contribuye al efecto protector de la suplementación de ácido fólico. En otras palabras, el ácido fólico puede ayudar a regular el metabolismo de los lípidos en el hígado, previniendo la acumulación de grasa y reduciendo el riesgo de enfermedad del hígado. El estudio investigó los efectos de la suplementación de ácido fólico en ratas alimentadas con alto contenido de fructosa y los comparó con un grupo de control. Las ratas alimentadas con alto contenido de fructosa fueron divididas en dos grupos, uno recibiendo suplementación de ácido fólico y el otro sin recibir suplementación de ácido. Se encontró que la suplementación de ácido fólico

tiene un efecto protector contra la esteatosis hepática, como se evidencia por los niveles más bajos de triglicéridos hepáticos en el grupo que recibió ácido fólico en comparación con el grupo de alto contenido de fructosa. Si bien el estudio sugiere que la suplementación de ácido fólico puede tener un efecto protector contra la enfermedad del hígado graso no alcohólico, no está claro si puede utilizarse como un tratamiento independiente o si debe combinarse con otras intervenciones. Se requiere más investigación para determinar el uso óptimo de la suplementación de ácido fólico en el tratamiento del HGNA. (Kim & Min, 2020b)

Respecto a la vitamina B12, también se encontró una correlación inversa con los niveles de homocisteína en la muestra total. Sin embargo, esta correlación no alcanzó significancia estadística en el grupo de comparación. Esto sugiere que la relación entre vitamina B12 y homocisteína puede no ser tan relevante en individuos sin HGNA, pero podría estar más presente en aquellos con la enfermedad. Esta observación es interesante y podría indicar que la vitamina B12 juega un papel más destacado en el contexto de la HGNA, posiblemente como un factor modificador de la relación entre homocisteína y la enfermedad hepática.

Por otro lado, al realizar comparaciones de los niveles de estas tres variables entre los grupos de individuos con HGNA y sin HGNA y de acuerdo con su genotipo, únicamente se encontraron diferencias significativas para los niveles de ácido fólico entre ambos grupos de pacientes portadores del alelo mutante de la variante 677 (CT + TT) $p= 0.026$ y para los niveles de homocisteína de los individuos con el genotipo silvestre para la variante 1298 ($p= 0.05$). Dichos hallazgos son relevantes y podrían tener implicaciones

importantes en la comprensión de la relación entre la genética y la HGNA. El hecho de que solo se encontraran diferencias significativas en dos de las tres variables estudiadas sugiere que el ácido fólico y la homocisteína podrían desempeñar un papel importante en la patogénesis del HGNA. Estos hallazgos respaldan la interrelación entre el metabolismo del folato, la vitamina B-12 y la homocisteína, y sugieren que el ácido fólico podría desempeñar un papel importante en la regulación de los niveles de homocisteína.

Algunos estudios han demostrado que la deficiencia de ácido fólico está relacionada con un aumento en los niveles de homocisteína, lo que puede conducir a daño hepático. Un estudio realizado en pacientes con enfermedad hepática crónica encontró que aquellos con niveles bajos de ácido fólico presentaban mayores niveles de homocisteína en comparación con aquellos con niveles adecuados de ácido fólico. Además, se observó una correlación negativa entre los niveles de ácido fólico y los marcadores de daño hepático, como las enzimas hepáticas ALT y AST. Esto sugiere que la deficiencia de ácido fólico puede contribuir al daño hepático a través del aumento de los niveles de homocisteína. (Castro et al., 2003; Loomba et al., 2013; Sid, 2018; B. Zhang et al., 2023)

Otro estudio realizado por Savin-Hartwig y colaboradores, reportó que, el suplemento de micronutrientes que contiene ácido fólico y cobalamina funciona aumentando la disponibilidad de estas vitaminas en el cuerpo, lo que a su vez ayuda a reducir los niveles de homocisteína. Los posibles beneficios de reducir los niveles de homocisteína en los adultos mayores incluyen un menor riesgo de enfermedad cardiovascular y deterioro cognitivo. El estudio también sugiere que incluso las personas mayores sanas pueden beneficiarse al tomar este suplemento, independientemente de su estado de vitamina B.

El estudio encontró que el suplemento de micronutrientes fue efectivo para reducir los niveles de homocisteína (Hcy) en sujetos de edad avanzada. Los sujetos tratados mostraron una reducción estadísticamente significativa en los niveles de Hcy en comparación con el grupo placebo, con una reducción media de $3,6 \pm 5,7 \mu\text{mol/L}$. El efecto de reducción de Hcy dependió de los niveles iniciales de Hcy, y el estudio sugiere que los niveles elevados de Hcy en sujetos de edad avanzada pueden reducirse independientemente del estado inicial de cobalamina y folato. (Savic-Hartwig et al., 2023)

7.4 Perfil metabólico

En relación con el IMC, se ha encontrado una asociación consistente entre la obesidad y una mayor prevalencia de HGNA. Nuestro estudio confirma estos hallazgos, demostrando una asociación significativa entre el IMC elevado y la presencia de HGNA. Específicamente, el IMC mostró una fuerte asociación con el HGNA con una razón de momios de 3.93 (IC 95%: 2.12 - 7.27; $p < 0.001$) para sobrepeso y de 11.65 (IC 95%: 5.48 - 24.74; $p < 0.001$) para individuos con obesidad (IMC mayor a 30). También se pudo observar que a medida que aumentaba el grado de esteatosis hepática observado en el *FibroScan*, también aumentaba el IMC de los pacientes, observándose DES entre los individuos con esteatosis grado 1 con una mediana de 25.96 kg/m^2 (RI 23.52, 30.45), y los individuos con esteatosis grado 3 con una mediana de 29.18 kg/m^2 (RI 27.02, 32.76). ($p = 5.23 \times 10^{-03}$). Esto podría respaldar la teoría de que el IMC participa tanto en el desarrollo del HGNA como en la progresión de la enfermedad, debido a un estado inflamatorio crónico y a su estrecha asociación con la dislipidemia y el síndrome metabólico. (Bedogni et al., 2005; Chen et al., 2022; Lonardo et al., 2015)

Los resultados presentados en la tabla 9 sugieren que la presencia de esteatosis hepática está asociada con un mayor índice de resistencia a la insulina, niveles más altos de colesterol total, CLDL y triglicéridos, así como niveles más bajos de CHDL. Estas asociaciones pueden ser indicativas de alteraciones metabólicas y dislipidemia en los individuos con HGNA.

Los resultados de esta investigación respaldan los datos encontrados en la literatura científica que señalan al sobrepeso, la obesidad, la dislipidemia y la resistencia a la insulina como factores de riesgo importantes para el desarrollo de HGNA. Nuestro estudio ha demostrado una asociación significativa entre el HGNA y la resistencia a la insulina, la dislipidemia y el índice de masa corporal. (Fabbrini et al., 2010; Rinella, 2015)

La resistencia a la insulina, que se caracteriza por una disminución en la respuesta de los tejidos a la insulina, se ha identificado como un factor clave en el desarrollo y progresión del HGNA. La alteración en la sensibilidad a la insulina puede contribuir a la acumulación de grasa en el hígado y a la inflamación hepática, promoviendo así la aparición de la enfermedad. (Marchesini et al., 1999; Targher et al., 2007)

Además, la dislipidemia, que implica cambios en los niveles de lípidos en la sangre, como el aumento de los triglicéridos y la disminución del colesterol HDL, se ha observado de manera consistente en pacientes con HGNA. Estos cambios lipídicos anormales pueden contribuir a la acumulación de grasa en el hígado y al daño oxidativo, desempeñando un papel importante en la progresión de la patología. (Kanwar et al., 2016; Loomba et al., 2014)

Estos resultados respaldan la idea de que el HGNA es una enfermedad multifactorial que implica una interacción compleja entre la acumulación de grasa hepática, la resistencia a la insulina, los trastornos metabólicos y el estado de peso corporal. Es fundamental seguir investigando y comprendiendo estos mecanismos para desarrollar estrategias de prevención y tratamiento efectivas para el HGNA.

7.5 Marcadores de función hepática

Las enzimas hepáticas se han utilizado como marcadores de daño hepático. En esta investigación, la ALT y la AST presentaron una asociación significativa con la presencia de HGNA. El HGNA es la causa más común de niveles elevados de ALT en suero en Estados Unidos (Wong et al., 2010). En el pasado, el nivel de ALT en suero se ha utilizado como un marcador de la gravedad de la enfermedad en el HGNA. Los niveles de ALT parecen estar correlacionados con la grasa visceral, los triglicéridos intrahepáticos, la esteatosis, la inflamación y la fibrosis en pacientes japoneses y asiáticos con HGNA. Sin embargo, hasta el 37,5% al 59% de los pacientes con niveles normales de ALT son diagnosticados con HGNA o fibrosis avanzada. Un estudio en Estados Unidos encontró poco valor diagnóstico o pronóstico de un nivel normal de ALT en suero al evaluar a pacientes con EHGNA, ya que casi cuatro quintas partes (79%) de los sujetos con HGNA tenían niveles normales de ALT en suero. Incluso cuando se utilizaron criterios más estrictos (ALT > 30 U/L en hombres y > 19 U/L en mujeres), la mayoría de los sujetos con HGNA (54%) tenían niveles normales de ALT en suero. Un estudio en Japón encontró fibrosis avanzada (etapa 3-4) en el 16.1% de los pacientes japoneses con HGNA y niveles normales de ALT. Otro estudio reciente en Japón encontró que la falta de reducción de los niveles de ALT en al menos un 30% se

correlaciona con la progresión histológica en biopsias. Los resultados de estos estudios transversales sugieren que los niveles de ALT en suero no pueden predecir la gravedad histológica en pacientes con HGNA. Por lo tanto, los niveles de ALT en suero parecen ser un marcador insensible tanto para la esteatosis hepática como para el HGNA. Aunque el monitoreo de los niveles de ALT en suero es útil y puede predecir el resultado histológico, su uso como marcador sustituto para evaluar los cambios histológicos no es lo confiable. (Berger et al., 2019; Tapper et al., 2016; Wong et al., 2010; Zeng et al., 2017)

7.6 Fibrosis hepática

Se observó que, dentro del grupo de individuos diagnosticados con HGNA, solo un pequeño porcentaje (9.63%) presentó algún grado de fibrosis hepática (grados 1 a 4), mientras que la gran mayoría (90.37%) no mostró evidencia de fibrosis hepática. Esto es coherente con la selección de este grupo de individuos sin esteatosis hepática como un grupo de referencia para comparar con los casos de HGNA.

La baja prevalencia observada en este estudio se encuentra en relación con lo reportado previamente, ya que solo el 40% de los pacientes con HGNA progresan la enfermedad a fibrosis y de ellos, solo el 5% fallecen secundario a causas hepáticas. (Mohammed Eslam et al., 2018)

En cuanto a la variante C677T, se destaca que la mayoría de los individuos (84.62%) con fibrosis hepática en el grupo con HGNA tuvieron genotipos heterocigotos (CT) y homocigotos (TT) para esta variante. Estos genotipos se observaron en grados más altos de fibrosis hepática, desde el grado 1 hasta el grado 4. Aunque el número de individuos en estas categorías es limitado, estos resultados podrían sugerir una posible

participación de la variante C677T en la progresión de la fibrosis hepática en individuos con HGNA.

Por otro lado, la variante A1298C también mostró cierta asociación con la fibrosis hepática en el grupo con HGNA. Los individuos homocigotos para el genotipo silvestre (AA) representaron el 61.54% de los casos con HGNA y fibrosis hepática, concentrándose en mayor medida en los grados 2 y 3 de fibrosis. Los individuos heterocigotos (AC) representaron el 38.46% de los casos con fibrosis, distribuidos principalmente en los grados 2 y 3.

Además, la distribución de los genotipos compuestos también mostró variaciones interesantes. En los casos con HGNA y fibrosis, los genotipos compuestos CT677-AA1298, CT677-AC1298 y TT677-AA1298 fueron los más frecuentes. Estos genotipos se distribuyeron entre los grados 2 y 3 de fibrosis hepática. Esto sugiere que la combinación de las variantes C677T y A1298C podría estar relacionada con la gravedad de la fibrosis hepática en individuos con HGNA, principalmente la variante 677T.

Es importante considerar que estas observaciones no pudieron ser analizadas por pruebas estadísticas debido al tamaño limitado de la muestra. Asimismo, debe de considerarse que, al ser un estudio transversal, se desconoce que porcentaje de individuos con HGNA vayan a desarrollar fibrosis hepática.

Por otro lado, en estudios de gemelos se ha reportado que la fibrosis hepática puede explicarse por factores hereditarios en 50% de los individuos (Mohammed Eslam et al., 2018), por lo que estudiar estas variantes con un mayor número de muestra, así como otros marcadores genéticos puede ser de utilidad para comprender la variabilidad en la progresión de esta enfermedad.

En conclusión, este estudio proporciona información de la asociación entre las variantes genéticas C677T y A1298C del gen *MTHFR* y la fibrosis hepática en individuos con HGNA. Aunque se requieren estudios adicionales, prospectivos y con muestras más grandes para confirmar estos hallazgos, estos resultados sugieren que estas variantes pueden jugar un papel importante en la progresión de la fibrosis hepática en el contexto de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

7.7 Análisis por sexo

En este estudio, realizamos un análisis estratificado por sexo con el objetivo de identificar y cuantificar posibles diferencias en factores de riesgo para el desarrollo de HGNA en hombres y mujeres de nuestra población de estudio.

En cuanto a la edad, observamos que, en el grupo de mujeres, por cada año de aumento en la edad, la probabilidad de HGNA aumenta significativamente en un 4% (RM 1.04, IC 95% 1.01-1.06). Sin embargo, esta asociación no fue significativa en los hombres, sugiriendo que otros factores podrían ser más relevantes para el HGNA en este grupo. Esto implica que el efecto de la edad en el riesgo de HGNA es diferente entre hombres y mujeres.

El IMC resultó ser un importante factor de riesgo tanto en mujeres como en hombres, pero encontramos que las mujeres mostraron un mayor efecto de riesgo asociado con el IMC que los hombres. Específicamente, el riesgo de HGNA aumenta en un 32% por cada unidad de aumento en el IMC en mujeres (RM 1.32, IC 95% 1.20-1.46), mientras que, en hombres, el riesgo aumenta en un 18% por cada unidad de aumento en el IMC (RM 1.18,

IC 95% 1.07-1.33). Esto sugiere que el IMC es un predictor más fuerte de HGNA en mujeres que en hombres.

En cuanto a las variantes genéticas C677T y A1298C del gen *MTHFR*, no encontramos asociaciones significativas con HGNA en ambos sexos, tanto en el análisis individual de los genotipos como en los genotipos agrupados o compuestos. Del mismo modo, la Homocisteína, el Ácido Fólico y la Vitamina B12 tampoco mostraron DES en los grupos estudiados, lo que sugiere que estas variables no están fuertemente asociadas con HGNA en nuestra población.

Sin embargo, se identificó un grupo de variables que mostraron DES en el grupo de mujeres. Un aumento en la resistencia a la insulina, medida a través del índice HOMA-IR, así como niveles elevados de Colesterol, LDL, Triglicéridos, ALT, GGT y Fosfatasa Alcalina, se asociaron con un incremento en el riesgo de tener HGNA en mujeres. Por otro lado, niveles altos de Colesterol HDL, se asociaron con una disminución significativa en el riesgo de HGNA en mujeres. Estas asociaciones específicas en el grupo de mujeres resaltan la importancia de considerar el sexo al evaluar los factores de riesgo para HGNA.

Estos hallazgos pudieran estar en relación con que el sexo masculino es un factor de riesgo intrínseco independiente, por lo tanto, se podría inferir que las mujeres necesitan una mayor exposición a factores externos o ambientales para desarrollar la enfermedad o que estos factores influyen en mayor proporción en la fisiopatología de HGNA en las mujeres.

Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar el sexo como un factor clave al evaluar la probabilidad de desarrollar HGNA. Nuestro estudio proporciona información relevante para el diseño de estrategias de prevención y tratamiento más personalizadas y específicas según el sexo en pacientes con HGNA. Sin embargo, es importante tener en cuenta que se requieren más investigaciones y estudios prospectivos para validar y confirmar estos resultados.

7.8 Otros factores genéticos

Algunos estudios en gemelos han reportado una heredabilidad del 35 al 61% para el HGNA, utilizando la elevación de enzimas hepáticas sugerentes de esta patología (ALT y GGT) (Mohammed Eslam et al., 2018). Por lo que, además de los resultados obtenidos en este estudio sobre la asociación entre la HGNA y las variantes genéticas del gen *MTHFR*, es importante considerar otras variantes genéticas relevantes en la patogénesis de esta enfermedad. Entre ellas, destaca la variante en el gen *PNPLA3*, que ha sido ampliamente estudiado y demostrado su asociación con el HGNA. Este estudio no incluyó la genotipificación del gen *PNPLA3*, también conocido como adiponutrina, un miembro de la familia de fosfolipasas tipo patatina. La variante de un solo nucleótido (SNP) rs738409 C > G, que codifica la variante proteica Ile 148Met de *PNPLA3*, es un determinante genético bien descrito de la esteatosis hepática en población mexicana. Varios estudios han establecido una fuerte conexión entre *PNPLA3* y el desarrollo de HGNA. Un metaanálisis reciente de 23 estudios de casos y controles que involucraron a 6,071 pacientes con HGNA y 10,366 controles mostró una asociación significativa entre la variante rs738409 y el riesgo de HGNA y fibrosis hepática. La variante rs738409 de

PNPLA3 no solo se asocia con HGNA, sino también con la gravedad de los cambios necroinflamatorios de manera independiente de los factores metabólicos. *PNPLA3* se asocia con un mayor riesgo de fibrosis avanzada en pacientes con diversas enfermedades hepáticas y es un factor de riesgo independiente para el hepatocarcinoma en pacientes con HGNA o cirrosis relacionada con el alcohol (Tian et al., 2009). Otro metaanálisis ha demostrado que el rs738409 ejerce una fuerte influencia no solo en la acumulación de grasa en el hígado (los homocigotos GG mostraron un contenido de grasa lipídica un 73% mayor en comparación con los homocigotos CC), sino también en la susceptibilidad de una enfermedad más agresiva (los homocigotos GG tenían un riesgo 3.24 veces mayor de tener puntajes necroinflamatorios más altos y un riesgo 3.2 veces mayor de desarrollar fibrosis en comparación con los homocigotos CC). Aunque su función biológica exacta se debate, *PNPLA3* se expresa en gran medida en la superficie de los lípidos de los hepatocitos y el tejido adiposo. La variante rs738409 parece interferir con la exportación de lipoproteínas y favorecer la actividad lipogénica sobre la actividad de las lipasas, lo que conduce a la acumulación de grasa hepática. (Satapathy & Sanyal, 2015; Tian et al., 2009)

En este estudio en particular, no se incluyó la variable del genotipo de *PNPLA3*, lo cual representa una limitación importante. La omisión de esta variable puede limitar la comprensión completa de las interacciones genéticas y su contribución conjunta a la susceptibilidad y desarrollo de la HGNA. Por lo tanto, para futuras investigaciones, se propone analizar la presencia de la variante *PNPLA3* y explorar la posible existencia de sinergia entre las variantes genéticas analizadas en el gen *MTHFR* y la variante en el gen *PNPLA3*. La inclusión del genotipo de *PNPLA3* en estudios futuros permitiría

examinar de manera más completa y precisa la influencia combinada de múltiples factores genéticos en la patogénesis de la HGNA. Esta información adicional ayudaría a obtener una imagen más completa de la base genética de la enfermedad y a identificar posibles interacciones entre diferentes variantes genéticas.

Conclusiones

En conclusión, este estudio aporta evidencia sólida sobre la asociación entre las variantes genéticas del gen *MTHFR* y el riesgo de desarrollar HGNA. Los hallazgos sugieren que los genotipos heterocigoto y homocigoto para la variante 677, así como el genotipo silvestre para la variante 1298, podrían estar relacionados con un mayor riesgo de HGNA. Estos resultados respaldan la importancia de la predisposición genética en la patogénesis de la enfermedad y enfatizan la necesidad de considerar el perfil genético individual al evaluar el riesgo de HGNA.

Además, se observó una asociación significativa entre los niveles de ácido fólico y la presencia de HGNA en pacientes portadores del alelo mutante de la variante 677. Esto sugiere que el ácido fólico puede desempeñar un papel protector en el desarrollo de la enfermedad y destaca la importancia de la adecuada ingesta de esta vitamina. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado la influencia del ácido fólico en la función hepática y su relación con la homeostasis del folato.

Por otro lado, se encontró una asociación significativa entre los niveles de homocisteína y el genotipo silvestre para la variante 1298 en individuos con HGNA. Esto indica que los niveles elevados de homocisteína podrían estar relacionados con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en individuos con este genotipo. Estos hallazgos respaldan la importancia de la regulación de los niveles de homocisteína como un posible objetivo terapéutico en la prevención y tratamiento del HGNA.

Es importante destacar que este estudio tiene algunas limitaciones. La falta de inclusión del genotipo de *PNPLA3* representa una limitación importante, ya que esta variante ha

sido ampliamente estudiada y se ha demostrado su asociación con el HGNA. La inclusión de esta variable en futuras investigaciones permitiría una comprensión más completa de las interacciones genéticas y su impacto en el desarrollo de la enfermedad.

Además, se debe tener en cuenta que la muestra utilizada en este estudio es limitada y representa una población específica. Por lo tanto, los resultados pueden no ser generalizables a otras poblaciones o regiones geográficas. Se requieren estudios adicionales con muestras más grandes y diversificadas para confirmar y ampliar estos hallazgos.

A pesar de estas limitaciones, los resultados obtenidos son prometedores y brindan información importante sobre los factores genéticos y metabólicos involucrados en el HGNA. Estos hallazgos pueden tener implicaciones clínicas significativas al informar estrategias de prevención personalizadas y el desarrollo de terapias dirigidas específicamente a los pacientes con mayor riesgo genético de HGNA.

Igualmente, se destaca la importancia de considerar otros factores de riesgo y variables clínicas en la evaluación del HGNA, como el índice de masa corporal, la resistencia a la insulina y la dislipidemia. Estos factores han demostrado estar estrechamente relacionados con la enfermedad y pueden ser objetivos adicionales para la prevención y manejo del HGNA.

En general, este estudio contribuye al creciente cuerpo de evidencia que respalda la influencia de la genética y los factores metabólicos en el desarrollo del HGNA. Los resultados resaltan la importancia de una aproximación integral en la comprensión de la

enfermedad y subrayan la necesidad de enfoques personalizados en el diagnóstico, prevención y tratamiento del HGNA.

En conclusión, los hallazgos de este estudio respaldan la asociación entre las variantes genéticas del gen *MTHFR* y el HGNA, así como la influencia de los niveles de homocisteína y ácido fólico en la enfermedad. Sin embargo, se requiere más investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes y las interacciones genéticas en el HGNA. Estos resultados pueden tener implicaciones clínicas significativas al informar estrategias de prevención personalizadas y el desarrollo de terapias dirigidas específicamente a los pacientes con mayor riesgo genético de HGNA. Se necesita continuar investigando para desarrollar un enfoque integral y efectivo en el manejo del HGNA, considerando tanto los factores genéticos como los metabólicos, con el objetivo de mejorar los resultados clínicos y reducir la carga de esta enfermedad en la población.

Referencias

1. Alkhouri, R. H., Hashmi, H., Baker, R. D., Gelfond, D., & Baker, S. S. (2013). Vitamin and mineral status in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(1), 89–92. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31826a105d>
2. Allen, L. H., & Rosado, J. L. (1995). *Vitamin B-12 deficiency and malabsorption are highly prevalent in rural Mexican communities*13 (Vol. 62). <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/62/5/1013/4651750>
3. Alvarez, G. A. S., Galvez, S. M. P., Mora, U. G., Contreras, A. D. C., Rosas, C. D., Priego-Parra, B. A., Romero, A. T., Balmori, M. A., Dietlen, F. R., Vazquez, S. E. M., Guerrero, I. O. M., Chi-Cervera, L. A., Reyes, R. B., Roriguez, L. A. M., Chavez, M. E. I., & Troche, J. M. R. (2022). Higher cardiovascular risk scores and liver fibrosis risk estimated by biomarkers in patients with metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 14(8), 1633–1642. <https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i8.1633>
4. B Wilcken, F Bamforth, Z Li, H. Z., A Ritvanen, M Redlund, C Stoll, Y Alembik, B Dott, A E Czeizel, Z Gelman-Kohan, G Scarano, S Bianca, G Ettore, R Tencioni, S Bellato, I Scala, O M Mutchinick, M A López, H de Walle, ... L D Botto*. (2003). Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J MedGenet*, 40, 619–625.
5. Bedogni, G., Miglioli, L., Masutti, F., Tiribelli, C., Marchesini, G., & Bellentani, S. (2005). Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*, 42(1), 44–52. <https://doi.org/10.1002/hep.20734>
6. Berger, A., Shili, S., Zuberbuhler, F., Hiriart, J. B., Lannes, A., Chermak, F., Hunault, G., Foucher, J., Oberti, F., Fouchard-Hubert, I., Cales, P., De Ledinghen, V., & Boursier, J. (2019). Liver stiffness measurement with fibroscan: Use the right probe in the right conditions! *Clinical and Translational Gastroenterology*, 10(4). <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000023>
7. Bernal-Reyes, R., Icaza-Chávez, M. E., Chi-Cervera, L. A., Remes-Troche, J. M., Amieva-Balmori, M., Priego-Parra, B. A., Martínez-Vázquez, S., Méndez-Guerrero, I. O., Martínez-Rodríguez, L., Barranca-Enríquez, A., Palmeros-Exsome, C., Cano-Contreras, A. D., & Triana-Romero, A. (2022). Prevalence and clinical-epidemiologic characteristics of a Mexican population with metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease: An open population study. *Revista de Gastroenterología de México*. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2021.09.002>
8. Cai, T., Dufour, J. F., Muellhaupt, B., Gerlach, T., Heim, M., Moradpour, D., Cerny, A., Malinverni, R., Kaddai, V., Bochud, M., Negro, F., & Bochud, P. Y. (2011). Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MBOAT7, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *Journal of Hepatology*, 55(3), 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.020>
9. Castro, R., Rivera, I., Ravasco, P., Jakobs, C., Blom, H. J., Camilo, M. E., & de Almeida, I. T. (2003). 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C →

- T and 1298A → C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 96(4), 297–303. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcg039>
10. Catalano, D., Trovato, G. M., Ragusa, A., Martines, G. F., Tonzuso, A., Pirri, C., Buccheri, M. A., Trovato, F. M., & Trovato, G. M. (2014). *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and MTHFR 1298A > C gene polymorphism*.
 11. Chen, X., Shi, F., Xiao, J., Huang, F., Cheng, F., Wang, L., Ju, Y., Zhou, Y., & Jia, H. (2022). Associations Between Abdominal Obesity Indices and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Chinese Visceral Adiposity Index. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.831960>
 12. Contreras-Cubas, C., Sánchez-Hernández, B. E., García-Ortiz, H., Martínez-Hernández, A., Barajas-Olmos, F., Cid, M., Mendoza-Caamal, E. C., Centeno-Cruz, F., Ortiz-Cruz, G., Jiménez-López, J. C., Córdova, E. J., Salas-Bautista, E. G., Saldaña-Alvarez, Y., Fernández-López, J. C., Mutchinick, O. M., & Orozco, L. (2016). Heterogenous distribution of MTHFR gene variants among mestizos and diverse amerindian groups from Mexico. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163248>
 13. De Mexico Gastroenterología, R. DE, Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M., García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I., Ballesteros-Amozurrutia, M., Bosques-Padilla, F., Castillo-Barradas, M., Chávez-Barrera, J., Cisneros-Garza, L., Flores-Calderón, J., García-Compeán, D., Gutiérrez-Grobe, Y., Higuera de la Tijera, M., ... Velarde-Ruiz Velasco, J. (2019). The Mexican consensus on nonalcoholic fatty liver disease. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 84, Issue 1). www.elsevier.es/rgmx
 14. Eddowes, P. J., Sasso, M., Allison, M., Tsochatzis, E., Anstee, Q. M., Sheridan, D., Guha, I. N., Cobbold, J. F., Deeks, J. J., Paradis, V., Bedossa, P., & Newsome, P. N. (2019). Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 156(6), 1717–1730. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.042>
 15. Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., & Sanyal, A. J. (2018). Modeling the Epidemic of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Demonstrates an Exponential Increase in Burden of Disease A HE STUDY OF LIVER D I S E ASES T MERICAN ASSOCIATION FOR. *HEPATOLOGY*, 67(1). <https://doi.org/10.1002/hep.29466/supinfo>
 16. Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. In *Hepatology* (Vol. 51, Issue 2, pp. 679–689). <https://doi.org/10.1002/hep.23280>
 17. Field, M. S., Kamynina, E., Chon, J., & Stover, P. J. (2018). *Annual Review of Nutrition Nuclear Folate Metabolism*. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714>
 18. García, D. S., Saturansky, E. I., Poncino, D., Martínez-Artola, Y., Rosenberg, S., Abritta, G., Ascimani-Peña, C., & Cravero, A. (2019). “Hepatic toxicity by

- methotrexate with weekly single doses associated with folic acid in rheumatoid and psoriatic arthritis. What is its real frequency?" *Annals of Hepatology*, 18(5), 765–769. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.01.011>
19. Hashimoto, E., & Tokushige, K. (2011). Prevalence, gender, ethnic variations, and prognosis of NASH. *Journal of Gastroenterology*, 46(SUPPL. 1), 63–69. <https://doi.org/10.1007/s00535-010-0311-8>
 20. Hernández-Rocha C, Vargas-Alarcón G, & Gamboa-Domínguez A. (2015). Patogenia y manejo de la esteatohepatitis no alcohólica. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 53(2), 233–240.
 21. Instituto Nacional de Salud Pública. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*.
 22. Kanwar, P., Nelson, J. E., Yates, K., Kleiner, D. E., Unalp-Arida, A., & Kowdley, K. V. (2016). Association between metabolic syndrome and liver histology among NAFLD patients without diabetes. *BMJ Open Gastro*. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2016>
 23. Kim, H., & Min, H. (2020a). Folic acid supplementation prevents high fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease by activating the ampk and lkb1 signaling pathways. *Nutrition Research and Practice*, 14(4), 309–321. <https://doi.org/10.4162/nrp.2020.14.4.309>
 24. Kim, H., & Min, H. (2020b). Folic acid supplementation prevents high fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease by activating the ampk and lkb1 signaling pathways. *Nutrition Research and Practice*, 14(4), 309–321. <https://doi.org/10.4162/nrp.2020.14.4.309>
 25. Kirac, D., Negis, Y., & Ozer, N. K. (2013). Vitamin E attenuates homocysteine and cholesterol induced damage in rat aorta. *Cardiovascular Pathology*, 22(6), 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2013.03.007>
 26. Kraus, D., Yang, Q., Kong, D., Banks, A. S., Zhang, L., Rodgers, J. T., Pirinen, E., Pulinilkunnil, T. C., Gong, F., Wang, Y. C., Cen, Y., Sauve, A. A., Asara, J. M., Peroni, O. D., Monia, B. P., Bhanot, S., Alhonen, L., Puigserver, P., & Kahn, B. B. (2014). Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. *Nature*, 508(7495), 258–262. <https://doi.org/10.1038/nature13198>
 27. Lonardo, A., Bellentani, S., Argo, C. K., Ballestri, S., Byrne, C. D., Caldwell, S. H., Cortez-Pinto, H., Grieco, A., Machado, M. V., Miele, L., & Targher, G. (2015). Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Digestive and Liver Disease*, 47(12), 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.08.004>
 28. Loomba, R., Sirlin, C. B., Ang, B., Bettencourt, R., Jain, R., Salotti, J., Soaft, L., Hooker, J., Kono, Y., Bhatt, A., Hernandez, L., Nguyen, P., Noureddin, M., Haufe, W., Hooker, C., Yin, M., Ehman, R., Lin, G. Y., Valasek, M. A., ... Richards, L. (2014). *Ezetimibe for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis: Assessment by Novel Magnetic Resonance Imaging and Magnetic Resonance Elastography in a Randomized Trial (MOZART Trial)*. <https://doi.org/10.1002/hep.27647/supinfo>
 29. Loomba, R., Yang, H. I., Su, J., Brenner, D., Barrett-Connor, E., Iloeje, U., & Chen, C. J. (2013). Synergism between obesity and alcohol in increasing the

- risk of hepatocellular carcinoma: A prospective cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 177(4), 333–342. <https://doi.org/10.1093/aje/kws252>
30. Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E., Mccullough, A. J., Forlani, G., & Melchionda, N. (1999). *Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Insulin Resistance*.
 31. Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D. J., & Hevener, A. L. (2013). The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. In *Endocrine Reviews* (Vol. 34, Issue 3, pp. 309–338). <https://doi.org/10.1210/er.2012-1055>
 32. Méndez-Sánchez, N., Arrese, M., Zamora-Valdés, D., & Uribe, M. (2007). Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. In *Liver International* (Vol. 27, Issue 4, pp. 423–433). <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01483.x>
 33. Mohammed Eslam, Luca Valenti, & Stefano Romeo. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol*, 68(2), 268–279.
 34. Molaqanbari, M., Zarringol, S., Talari, H., Taghizadeh, M., Bahmani, F., Moh-tashamian, A., Ebrahimzadeh, A., & Sharifi, N. (2023). Effects of folic acid supplementation on liver enzymes, lipid profile, and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Advanced Biomedical Research*, 12(1), 103. https://doi.org/10.4103/abr.abr_90_22
 35. Mutchinick, O. M., López, M. A., Luna, L., Waxman, J., Babinsky, V. E., & Collaborative Group, R. (1999). *High Prevalence of the Thermolabile Methyl-enetetrahydrofolate Reductase Variant in Mexico: A Country with a Very High Prevalence of Neural Tube Defects*. <http://www.idealibrary.com>
 36. Obika, M., & Noguchi, H. (2012). Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. In *Experimental Diabetes Research* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/145754>
 37. Paul F Jacques, Irwin H Rosenberg, Gail Rogers, Jacob Selhub, Barbara A Bowman, Elaine W Gunter, Jacqueline D Wright, & Clifford L Johnson. (2018). Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *AJCN*.
 38. Perna, A. F., Ingrosso, D., & De Santo, N. G. (2003). Homocysteine and oxidative stress. In *Amino Acids* (Vol. 25, Issues 3–4, pp. 409–417). <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0026-8>
 39. Perumpail, B. J., Khan, M. A., Yoo, E. R., Cholankeril, G., Kim, D., & Ahmed, A. (2017). Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 23, Issue 47, pp. 8263–8276). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i47.8263>
 40. Refsum, H., Smith, A. D., Ueland, P. M., Nexø, E., Clarke, R., McPartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., McPartlin, C., & Scott, J. M. (2004). Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion. In *Clinical Chemistry* (Vol. 50, Issue 1, pp. 3–32). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.021634>

41. Rinella, M. E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease a systematic review. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 313, Issue 22, pp. 2263–2273). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>
42. Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Jean-Louis Guéant, Renée Debard, Sylvie Thirion, Lu Xiao Hong, Jean-Pierre Bronowicki, Fare`s Namour, Nicodème W Chabi, Ambaliou Sanni, Guido Anello, Paolo Bosco, Corrado Romano, Emile Amouzou, Heidy R Arrieta, Beatriz E Sa´nchez, Antonino Romano, Bernard Herbeth, Jean-Claude Guillard, & and Osvaldo M Mutchinick. (2006). Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations¹. *Am J Clin Nutr* 2, 83(7), 1–7.
43. Satapathy, S. K., & Sanyal, A. J. (2015). Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In *Seminars in Liver Disease* (Vol. 35, Issue 3, pp. 221–235). Thieme Medical Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562943>
44. Savic-Hartwig, M., Kerlikowsky, F., Van De Flierdt, E., Hahn, A., & Schuchardt, J. P. (2023). A micronutrient supplement modulates homocysteine levels regardless of vitamin B biostatus in elderly subjects. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000777>
45. Sazci, A., Ergul, E., Aygun, C., Akpınar, G., Senturk, O., & Hulagu, S. (2008). Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Cell Biochemistry and Function*, 26(3), 291–296. <https://doi.org/10.1002/cbf.1424>
46. Serin, E., Güçlü, M., Ataç, F. B., Verdi, H., Kayaselçuk, F., Özer, B., Bilezikçi, B., & Yılmaz, U. (2007). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(5), 1183–1186. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9565-7>
47. Sid, V. (2018). *THE ROLE OF FOLATE IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE*.
48. Smith, A. D., & Refsum, H. (2016). Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment. In *Annual Review of Nutrition* (Vol. 36, pp. 211–239). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-050947>
49. Stover, P. J. (2006). Physiology of Folate and Vitamin B₁₂ in Health and Disease. *Nutrition Reviews*, 62(6), 3–12. <https://doi.org/10.1301/nr.2004.jun.s3-s12>
50. Tapper, E. B., Challies, T., Nasser, I., Afdhal, N. H., & Lai, M. (2016). The performance of vibration controlled transient elastography in a US cohort of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Gastroenterology*, 111(5), 677–684. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.49>
51. Targher, G., Bertolini, L., Padovani, R., Rodella, S., Tessari, R., Zenari, L., Day, C., & Arcaro, G. (2007). *Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Its Association With Cardiovascular Disease Among Type 2 Diabetic Patients*. <https://doi.org/10.2337/dc06>

52. Tian, C., Stokowski, R. P., Kershenobich, D., Ballinger, D. G., & Hinds, D. A. (2009). *Variation in PNPLA3 is associated with outcomes in alcoholic liver disease*. <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
53. Van Der Put, N. M. J., Gabreëls, F., Stevens, E. M. B., Smeitink, J. A. M., Trijbels, F. J. M., Eskes, T. K. A. B., Van Den Heuvel, L. P., & Blom, H. J. (1998). A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 62). <http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/irx/cgi-bin/>
54. Wanless, I. R., & Lentz, J. S. (1990). Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: An autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*, *12*(5), 1106–1110. <https://doi.org/10.1002/hep.1840120505>
55. Wong, V. W. S., Vergniol, J., Wong, G. L. H., Foucher, J., Chan, H. L. Y., Le Bail, B., Choi, P. C. L., Kowo, M., Chan, A. W. H., Merrouche, W., Sung, J. J. Y., & De Ledinghen, V. (2010). Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *51*(2), 454–462. <https://doi.org/10.1002/hep.23312>
56. Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2015). *Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes*. <https://doi.org/10.1002/hep.28431/supinfo>
57. Zeng, Q., Li, F., Xiang, T., Wang, W., Ma, C., Yang, C., Chen, H., & Xiang, H. (2017). Influence of food groups on plasma total homocysteine for specific MTHFR C677T genotypes in Chinese population. *Molecular Nutrition and Food Research*, *61*(2). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600351>
58. Zhang, B., Cao, J. C., Liu, F. R., Deng, Z., Chen, C. J., & Sun, Y. Y. (2023). Folate intake and non-alcoholic fatty liver disease in US adults. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *32*(1), 158–167. [https://doi.org/10.6133/apjcn.202303_32\(1\).0019](https://doi.org/10.6133/apjcn.202303_32(1).0019)
59. Zhang, Z., Wei, C., Zhou, Y., Yan, T., Wang, Z., Li, W., & Zhao, L. (2017). Homocysteine induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells via mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5736506>
60. Zheng, Y., & Cantley, L. C. (2019). Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 216, Issue 2, pp. 253–266). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20181965>