



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Ciencias de la Salud

SNP'S ASOCIADOS CON ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO EN
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
MANUEL BAÑUELOS MORENO

TUTORES
JORGE SALMERÓN CASTRO
Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud, IMSS

RAFAEL VELAZQUEZ CRUZ
Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN

MÉXICO D.F. NOVIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

I. ANTECEDENTES	3
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	27
V. HIPÓTESIS	27
VI. OBJETIVO	27
VII. VARIABLES	28
VIII. METODOLOGÍA	28
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
X. RESULTADOS	35
XI. DISCUSIÓN	46
XII. CONCLUSIONES	49
XII. REFERENCIAS	51

I. ANTECEDENTES

Los triglicéridos (TG) son lípidos que se almacenan en las células nucleadas y que en función de su disponibilidad, satisfacen las fluctuaciones de demanda de energía del organismo.

La selección evolutiva de los TG como forma de almacenamiento se atribuye principalmente a dos características: proveen 9 kcal/g mientras que los carbohidratos y las proteínas 4.5 y 4 kcal/g respectivamente¹; son y a que los TG son insolubles en agua, por lo tanto se pueden acumular en grandes cantidades sin que esto afecte el equilibrio osmótico de las células².

En algunos organismos avanzados como aves migratorias o mamíferos que hibernan, los TG son almacenados en sus hepatocitos. En los seres humanos se forman depósitos de TG en los hepatocitos, siendo esta última una mala adaptación que puede conllevar a una afección definida por la acumulación excesiva de grasa en forma de triglicéridos en el hígado, conocida como Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA).

1.1 Epidemiología de la EHGNA

La EHGNA es una enfermedad presente en la población general a nivel mundial³. En la actualidad se considera como la manifestación hepática del síndrome metabólico ya que frecuentemente se presenta asociada a obesidad, dislipidemias y resistencia a la insulina⁴. La EHGNA es la causa más común de alteración de los niveles séricos de aminotransferasas, así como la enfermedad crónica hepática más frecuente en países occidentales⁵. Su incidencia y prevalencia van en aumento debido al incremento de los niveles de obesidad y diabetes tipo 2 a nivel mundial. Su prevalencia varía dependiendo del país en el que se determine, por ejemplo, en EU⁶ país conocido por tener la prevalencia mas alta con un 35% donde además una tercera parte de su población padece obesidad, la prevalencia en Europa es de 20-30%, en tanto que en representa Japón el 15% y 30% en China^{7,8}. Variando además estas prevalencias dependiendo si se trata de regiones

urbanas o rurales dentro de cada país, lo que es muy evidente en el caso de India que cuenta con prevalencias que varían del 16 al 32% en poblaciones urbanas debido presumiblemente a la adopción de un estilo de vida más occidentalizado en contraste, con prevalencias inferiores al 9% en regiones rurales donde la población mantiene una dieta y estilo de vida más tradicionales³.

En América la mayoría de los estudios se han enfocado en grupos específicos, y existen muy pocos estudios que reporten la cifra por países o regiones de la zona⁹. La prevalencia de la EHGNA en Latinoamérica se espera que esté en aumento debido principalmente a la transición socioeconómica y demográfica de los últimos 20 años asociados^{10,11} a los hábitos dietéticos y estilos de vida más urbanizados

A pesar de la falta de información en la zona, algunos autores han intentado estimar la prevalencia de la enfermedad encontrando valores que van del 15 a 20% en Centroamérica, 24% en Venezuela y Chile, 20% en Uruguay, 18% en Guyana, Paraguay y Ecuador y con prevalencias menores al 16% en los países restantes¹⁰. En México, la transición demográfica ha sido marcada por el aumento en la mortalidad y el envejecimiento poblacional, donde el estado nutricional se ha desplazado de una alta prevalencia de la desnutrición (esto no es totalmente cierto) se puede decir que en nuestro país está prevaleciendo una situación un tanto ambigua y dependiendo de el estrato etario del que se trate, el predominio de las enfermedades crónicas relacionadas con la dieta podrían tal vez alterar las observaciones mencionadas, pero esto no significa que la desnutrición, sobretodo infantil, ha disminuido (sugiero una revisión más puntual sobre este tema). Estos cambios están asociados a los rápidos procesos de urbanización y el crecimiento económico debido principalmente a cambios e innovaciones tecnológicas que han conducido a la reducción de los niveles de actividad física, a cambios en los patrones alimenticios y la ingesta alimentaria, incluido el consumo de alimentos procesados con alto valor energético¹². En México no se cuentan con datos confiables que reporten dicha cifra pero se sabe que existe una alta prevalencia de los factores relacionados como dislipidemias, resistencia a la insulina y la

obesidad¹³, enfermedad que en 2013 alcanzó una prevalencia en adultos de nuestro país de 32.8% siendo este el mayor índice de obesidad de los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE)¹⁴. Para conocer esta cifra se han realizado diversos estudios encontrando valores que varían ampliamente. Desde los estudios regionales en entidades federativas que han reportado valores desde 15.7% en Veracruz y 17% en un medio hospitalario de la ciudad de México^{15,16}; hasta prevalencias de 82.9 y 62% en estudios realizados en población con Síndrome metabólico y con ovarios poliquísticos^{17,18}. Si se considera que la prevalencia de Síndrome Metabólico en nuestro país va desde el 26.6 al 49.8%¹⁹ es de suponerse que la prevalencia de la EHGNA en nuestro país podría ser comparable a la de los países con las prevalencias más altas.

La EHGNA es actualmente la patología más comúnmente atendida en la práctica de la hepatología, la prevalencia mundial de la enfermedad es desconocida aunque se especula que actualmente en el mundo mil millones de individuos padecen EHGNA³. El espectro de la EHGNA varía desde esteatosis simple a Esteatohepatitis No Alcohólica (ENA) la cual se caracteriza por tener inclusiones lipídicas en los hepatocitos (EHGNA), acompaña con respuesta inflamatoria y diversos grados de fibrosis²⁰, que pueden llegar a representar desde el 10 hasta 25% de los casos de cirrosis²¹. Además se ha observado que la EHGNA puede evolucionar a carcinoma hepatocelular incluso en ausencia de ENA o cirrosis²².

La prevalencia de ENA es difícil de determinar ya que el diagnóstico por biopsia sigue siendo el estándar de oro y al ser una técnica invasiva está limitado su uso. Aún así diversos estudios han intentado conocer la prevalencia de esta forma encontrando que una buena opción es en los sujetos que acuden a cirugía bariátrica. De esta forma, una revisión que analiza todos estos acercamientos en EUA¹⁶, encontró que la prevalencia de EHGNA es de 76%, ENA 37%, Algún grado de fibrosis 23% y 5.8% tuvieron cirrosis por esta causa²³. De tal manera que la

EHGNA continúa en aumento y se espera que para el año 2020 la ENA sea la primera causa de trasplante hepático en EUA²⁴.

Es importante hacer notar que en los últimos 30 años^{4,8}, la obesidad, principal factor de riesgo para EHGNA, ha estado y continua en aumento a nivel mundial habiéndose duplicado en algunas regiones e incluso triplicado en Europa, Asia y Latinoamérica.

1.2 Definición

Le EHGNA se define como la evidencia de esteatosis diagnosticada mediante métodos bioquímicos, imagenología e histopatología, sin antecedentes de ingesta de alcohol, o medicamentos hepatotóxicos, ni presencia de enfermedades hereditarias⁴, con datos bioquímicos e histológicos compatibles con hepatitis alcohólica.

La EHGNA es un término que se usa para describir un espectro de afecciones relacionadas. La etapa más tempral ana es la esteatosis, caracterizada por el depósito de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos. La esteatosis es definida como la presencia de TG a un nivel superior al percentil 95 del parénquima hepático o como la presencia de inclusiones de TG en el citoplasma en más del 5% de los hepatocitos³⁰.

Cuando existe daño en el hepatocito del tipo “balonamiento” con o sin fibrosis⁴ que puede ser estadificada de acuerdo a las característica enumeradas en la tabla 1. Se trata de Esteatohepatitis no Alcohólica (ENA) como una progresión evolutiva de la EHGNA.

Componentes del Score de Actividad para EHGNA			
Item	Score	Extensión	Definición y Comentarios
Esteatosis	0	<5%	Se refiere al área de superficie comprometida por la esteatosis evaluada con bajo o mediano poder; la mínima esteatosis (<5%) recibe un score de 0 para evitar dar un exceso de peso a biopsias con muy pocos cambios grasos
	1	5-33%	
	2	>33-66%	
	3	>66%	
Inflamación Lobular	0	No focos	Cuerpos acidófilos no son incluidos en esta ed medvaluación, ni tampoco inflamación portal
	1	<2 focos/200x	r
	2	2-4 focos/200x	
	3	>4 focos/200x	
Balonamiento del hepatocito	0	No	
	1	Pocas células balón	El término "poco" es raro pero define hepatocitos balonados así como también los casos en el que el diagnóstico es borderline
	2	Muchas células/ balonamiento prominente	La mayoría de los casos con balonamiento prominente tienen también cuerpos de Mallory, pero los cuerpos de Mallory no presentan puntuación por separado
Estadio de Fibrosis (Evaluado separadamente para ENA)			
Fibrosis	0	No	
	1	Perisinusoidal o periportal	
	1A	Leve, zona 3, perisinusoidal	Fibrosis "delicada"
	1B	Moderada, zona 3, perisinusoidal	fibrosis "densa"
	1C	Portal/periportal	En esta categoría se incluyen casos con fibrosis portal y/o periportal sin fibrosis pericelular/perisinusoidal acompañante
	2	Perisinusoidal y portal/periportal	
	3	Puentes fibrosos	
	4	Cirrosis	

Tabla 1 Componentes del Score de Actividad para EHGNA y Estadios Clínicos de Fibrosis de Esteatohepatitis No Alcohólica⁶².

1.3 Fisiopatología

La esteatosis hepática surge como un desajuste en el metabolismo de los TG en donde hay más ganancia que degradación de estos.

Los ácidos grasos usados para la formación de TG provienen de tres fuentes: a) dieta, b) síntesis *de novo*, c) tejido adiposo. Los ácidos grasos de esta forma tienen tres posibles desenlaces. Ser metabolizados por B oxidación (B-OX) en la mitocondria, ser esterificados y almacenados como TG en inclusiones intracelulares en el hepatocito para ser usados para formar otros lípidos, y para

ser almacenados con apoB en lipopolisacáridos de muy baja densidad (VLDL) y ser secretados al torrente sanguíneo.

Durante el ayuno los niveles séricos de insulina disminuyen mientras que los niveles de glucagón y epinefrina aumentan estimulando la hidrólisis de TG en los adipocitos. El primer paso en esta hidrólisis es catalizada por la enzima hidrolasa de TG del adipocito (ATGL).

Los ácidos grasos (AG) en el hígado son utilizados para formar fosfolípidos y otros lípidos. El flujo de AG es sustraído en un 20% por el hígado y otra cantidad igual (20g/día) es captada por el tejido adiposo constituyendo esto el total del contenido de TG hepático²⁴.

Aún así la fisiopatología de la EHGNA no ha sido determinada por completo, tomando en consideración los múltiples factores que intervienen en su desarrollo. Hasta ahora la explicación más aceptada de la patogénesis de la EHGNA es la de concurrencia de múltiples estímulos estresantes al parénquima hepático llamados “hits”. Los “hits” o estímulos estresantes son una serie de sucesos complejos que surgen por la interacción de distintos factores tales como ambientales, participación de la microbiota intestinal y genotipo de la persona^{26, 27}. Es en dicha interacción de estos factores lo que da como resultado esteatosis, respuesta inmune con inflamación y muerte celular con el consecuente daño hepático²⁸.

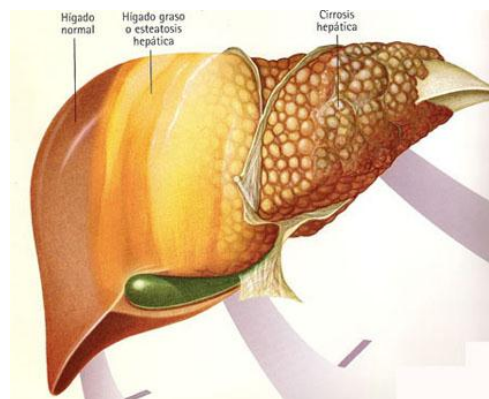


Figura 1. Evolución de la EHGNA (tomado de Netter)

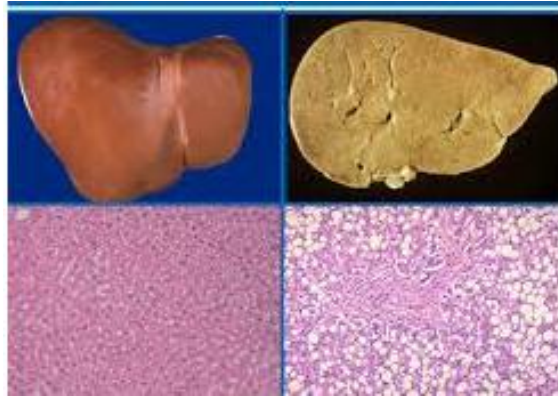


Figura 2. Comparación de cortes histológicos, A la izquierda un hígado normal, a la derecha uno con EHGA

Hasta ahora la explicación más aceptada de la patogénesis de la EHGA es el modelo de “doble golpe” (o de dos “hits”) propuesto por Day y James. El primer golpe al hepatocito está relacionado con la desregulación del metabolismo de los ácidos grasos, y el segundo está dado por alteraciones genéticas o ambientales que provocan inflamación, necrosis y activación de la cascada fibrogénica. Al incrementar el aporte de AGL al hígado, estos actúan como ligandos para el factor de transcripción PPAR- α , y aumenta la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, microsomas peroxisomas; los productos de la oxidación de AGL, (peróxido de hidrógeno, superóxido y peróxidos lipídicos) generan peroxidación lipídica y estrés oxidativo. El estrés oxidativo genera disminución de 50% en la actividad enzimática de la cadena respiratoria incrementando la relación ADP/ATP, lo que la peroxidación lipídica. Algunos productos intermedios de la peroxidación lipídica (malonilaldehído y 4-hidroxinoneal) son quimiotácticos de neutrófilos, estimulan las células estelares hepáticas y aumentan la secreción del factor transformador de crecimiento beta (TGF- β), provocando inflamación y fibrosis (figura 3).

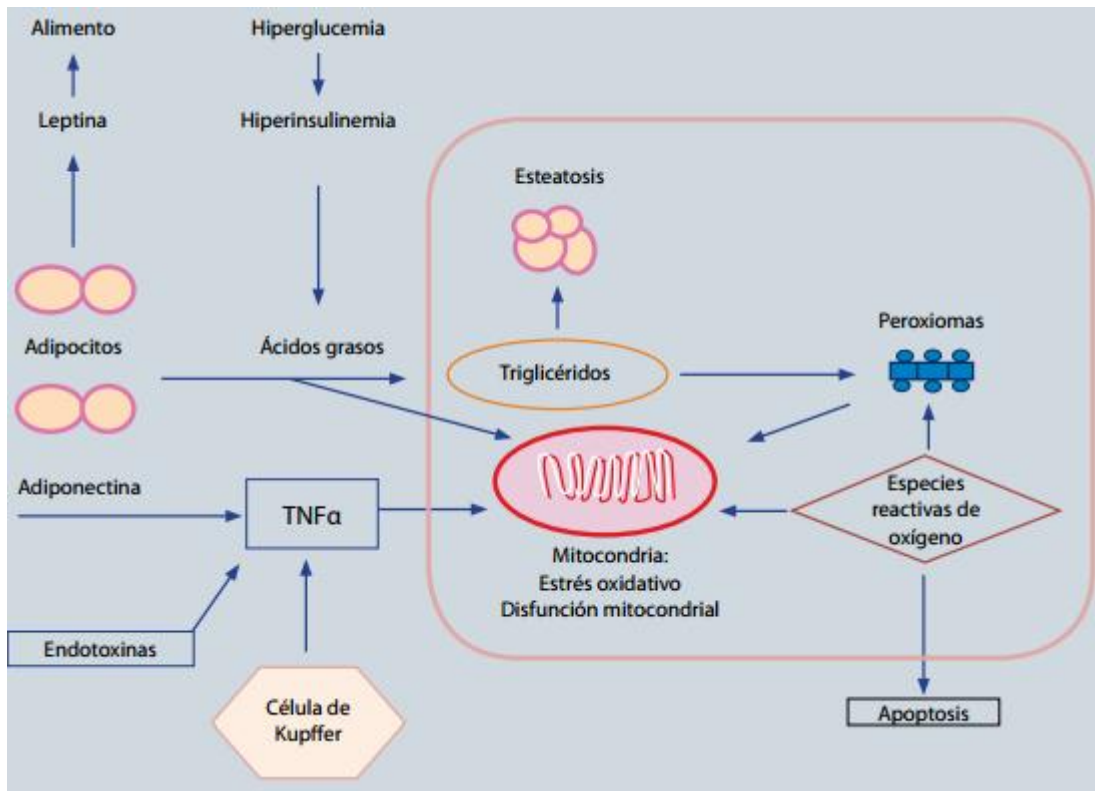


Figura 3. Fisiopatología de la EHNA y ENA

Los pacientes con HGNA presentan menor capacidad para generar antioxidantes y sistemas de depuración de especies reactivas de oxígeno (ERO). Además, tienen menor secreción de apoB postprandial y defectos en la lipidación de esta lipoproteína, lo que aumenta su susceptibilidad a la hepatotoxicidad inducida por amiodarona o tetraciclina. En situaciones de estrés biológico (exceso de lípidos, hipoxia, hiperinsulinemia), existe una respuesta del retículo endoplásmico que incluye activación de proteínas que causan resistencia a la insulina, apoptosis mediada por caspasa⁴, inflamación mediada por el factor nuclear kB (NF-kB) y disfunción mitocondrial. La deficiencia de ácido pantoténico, el consumo excesivo de alcohol y la deficiencia de coenzima A (que puede ocasionarse por ácido valproico o aspirina) dan lugar a una beta oxidación defectuosa de los AGL. La malnutrición proteica, la deficiencia de colina o abetalipoproteinemia generan defectos en la secreción o síntesis de LMBD. La resistencia a la insulina incrementa la lipólisis periférica, síntesis de triglicéridos, y captación hepática de ácidos grasos⁴. En pacientes con EHNA, se ha documentado menor supresión de la producción de glucosa y ácidos grasos en respuesta a la insulina, independientemente del IMC o la grasa corporal total.⁵

Al comparar el HGNA con los criterios ATP-III para SM, indicadores de SM, el HGNA tiene una sensibilidad de 73%, valor predictivo positivo de 81% y negativo de 87%.⁶ La insulina puede tener efectos nocivos al hígado al generar estrés oxidativo, aumentar la expresión de una proteína lipogénica llamada SREBP (sterol regulatory element-binding protein) y estimular el desarrollo de tejido conectivo, en presencia de hiperglicemia. El tejido adiposo secreta hormonas y citocinas que modulan la resistencia a la insulina y cascada inflamatoria, en el EHGNA.⁷

El primer golpe surge cuando con la presencia de resistencia a la insulina, se liberan mayores porcentajes de glicerol, promoviendo la acumulación hepática de AG libres (AGL) que son esterificados disminuyendo la síntesis ApoB-100 y estimulando la lipogénesis²⁹.

El segundo surge cuando la excesiva acumulación de lípidos hepáticos hace que se genere una respuesta de estrés oxidativo en el retículo endoplásmico (RE). El retículo endoplásmico ensambla y transporta proteínas al exterior de la célula y para esta función son necesarias grandes cantidades de calcio dentro del RE. La acumulación de AGL, colesterol no esterificado induce la disminución de las concentraciones de calcio, provocando estrés dentro del RE y promoviendo apoptosis y reclutamiento de macrófagos hepáticos o células de Kupffer. Los altos niveles séricos de AGL activan la cetogénesis y oxidación microsomal y mitocondrial, siendo estas las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno que además en la ENA³⁰, provocan apoptosis y daño al DNA mitocondrial.

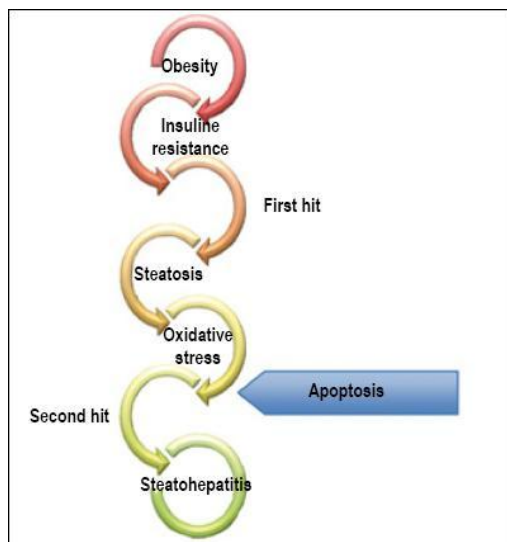


Figura 1 teoría de los dos “hits”

1.4 Etiología

1.4.0 Factores ambientales

Para comprender la etiología de la EHGNA se debe comprender la enfermedad con un enfoque multifactorial en el que influyen factores dietéticos y hábitos nutricios junto con la interacción entre la genética del individuo y los factores ambientales. Estos se manifestarán en asociación con el papel que desempeña la activación de la inmunidad innata y mediadores de inflamación con efecto en el daño hepatocelular y la muerte celular en la progresión de la EHGNA³¹.

1.4.1 Síndrome Metabólico

Numerosos estudios han observado la asociación de cambios en el parénquima hepático con los componentes del síndrome metabólico como resistencia a la insulina, obesidad visceral, dislipidemia, intolerancia a la glucosa e hipertensión y se ha encontrado que la esteatosis hepática está estrechamente relacionada con la obesidad central^{32,33}. De forma individual los componentes del síndrome metabólico se han visto asociados a fibrosis hepática. Es de resaltar el hecho que

diversos autores sugieren que el EHGNA constituye la manifestación hepática del síndrome metabólico³⁴.

1.4.2 Dieta

Los principales factores de riesgo para desarrollar EHGNA guardan relación estrecha con malnutrición y resistencia a la insulina. El consumo de dietas hipercalóricas ricas en lípidos y obesogénicos, que dan por resultado resistencia a la insulina, son factores bien conocidos como eventos iniciales en el desarrollo de EHGNA³⁵. Estas repitiendo lo mismo. Así como la EHGNA y los otros componentes del síndrome metabólico están fuertemente asociados con la obesidad, la pérdida de peso constituye la clave principal en el tratamiento de la enfermedad.

Existen estudios que describen que los pacientes con EHGNA consumen mayores cantidades de proteína y grasas saturadas en comparación con individuos sanos⁶³ y se ha visto que estas variantes en la dieta influyen directamente en el contenido de TG intrahepáticos. Más aún, en un estudio donde se evaluó la dieta entre pacientes con EHGNA y pacientes con ENA, reportó que el segundo grupo consumía mayores calorías provenientes de este tipo de grasas, a pesar de que consumían menor cantidad de calorías totales⁶⁴.

Alternativamente, es importante hacer notar, que la pérdida de peso a través de métodos quirúrgicos, o cambios en los patrones alimenticios, ha tenido éxito en la reducción de la progresión de la EHGNA^{65,66}.

1.4.2.1 PUFAs

Los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) han mostrado tener un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad ya que pueden tener tanto propiedades proinflamatorias como antiinflamatorias, dependiendo de su estructura. Los PUFAs n-6 como el ácido linoléico y el ácido araquidónico son precursores de potentes eicosanoides proinflamatorios en tanto que los PUFAs n-3, como el alfa-ácido linoléico, el ácido eicosapentaenoico y el ácido

docosaheptaenoico, además de disminuir la lipogénesis y aumentar la oxidación de ácidos grasos tienen un rol antiinflamatorio³⁶

De esta forma, se ha demostrado que los pacientes con EHGNA tienen un menor consumo de pescado y PUFAs-n-3 en comparación con aquellos sin EHGNA

Así mismo se ha demostrado que la presencia y severidad de EHGNA están asociadas a un alto ratio entre n-6 y n-3 tanto en suero como en hígado.³⁵

1.4.2.2 Fructosa

Es un componente común presente en bebidas endulzadas en general y su consumo en exceso ha demostrado en diversos estudios, una asociación con el incremento en los niveles séricos de TG así como el aumento de depósitos de grasa intrahepática por lipogénesis *de novo*³⁷ provocando EHGNA^{38,42}.

1.4.2.3 Inmunidad innata e inflamación

En el hígado la activación de la respuesta inmune innata tiene un papel fundamental en la homeostasis y en la regeneración hepática. La respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral generada a través de mecanismos moleculares, contra estímulos nocivos, como los DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) y PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos). Ambos mecanismos están presentes en el desarrollo de la EHGNA y son reconocidos por cuatro principales receptores, PRR (pattern-recognition receptor), TLRs (Toll-like receptors), NOD (nucleotide binding oligomerization domain) y NLRs (leucine-rich-repeat containing receptors) que junto con el resto de los elementos de inmunidad innata como infiltración de células NK, macrófagos etc, activación de la cascada del complemento y presencia de proteínas de fase aguda, confluyen en la progresión de la enfermedad mediada por inflamación³¹.

La muerte del hepatocito, evento central en el desarrollo de la EHGNA, se presenta finalmente durante el proceso inflamatorio mediante tres mecanismos líticos: a) necroptosis, b) piroptosis y c) necrosis, o incluso, en ausencia de inflamación mediante la apoptosis y por autofagia.

Aun así todos estos factores de riesgo asociados en el desarrollo de EHGNA, no son suficientes para explicar del todo la enfermedad, por lo que se ha postulado el estudio del componente genético de esta patología que en combinación con los factores ambientales antes detallados debe de explicar la susceptibilidad.

1.4.3 Factores genéticos

La EHGNA es una enfermedad compleja y diversos estudios reportan el resultado de exposición a factores ambientales que actúan en un trasfondo poligénico que comprende modificadores de la enfermedad, múltiples e independientes. En este sentido existen tres evidencias principales que sugieren un componente heredable de la EHGNA: agregación familiar, estudios en gemelos y diferencias en la susceptibilidad en diferentes poblaciones⁴⁰.

La EHGNA, es causada por el efecto conjunto de distintos genes, así como de su interacción con factores ambientales tales como la actividad física, flora intestinal, hábitos dietéticos, patrones de consumo etc. Los modelos de investigación de la EHGNA intentan relacionar el papel conjunto de varios genes sobre la enfermedad a través de las funciones conocidas de los mismos. El estudio de las bases moleculares de la EHGNA consiste en la búsqueda e identificación de polimorfismos genéticos (SNP, por sus siglas en inglés).

Después de la publicación del borrador de la secuencia del genoma humano hace una década, el siguiente paso fue caracterizar y catalogar patrones de variación considerando todo el genoma y de esta forma fueron descritos 10 millones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el que ambos alelos tuvieran una frecuencia en la población, convencionalmente un MAF (Minor allele frequency, por sus siglas en inglés) mayor a 1%, es decir, que el alelo que se presente con menor frecuencia debe de ser mayor a 1%⁴¹.

Los SNPs son sustituciones de un solo nucleótido en el DNA que pueden dar por resultado la expresión alterada de un gen en particular, o la función alterada de una proteína expresada.

El riesgo de presentar la enfermedad relacionado a un solo SNP es generalmente bajo, la mayoría de los estudios de genes candidatos reportan riesgos relativos de 1.1 a 1.5 y es probable que el defecto en múltiples SNPs y su coexistencia pueden generar la enfermedad. Pueden ser variaciones genéticas que predispongan directamente a la enfermedad junto con alteraciones indirectas que afecten el metabolismo de los lípidos o, que condicionen la resistencia a la insulina^{40,41}.

El proyecto Internacional de HapMap ha hecho del dominio público, información de una densa gama de polimorfismos que ayudan al desarrollo de los GWAS enfocándose en 3.1 millones de SNPs en cuatro poblaciones étnicas ASW (Ancestría Africana en el Suroeste de EEUU), CEU (Ancestría del Norte y Oeste de Europa en residentes de Utah provenientes de CEPH), YRI (Yoruba en Ibadan, Nigeria), MEX (Ancestría Mexicana ancestry en Los Angeles, California). Posteriormente determinaron patrones de asociación que fundamentaron la gran variedad de estudios (de asociación) que prosiguieron y que ahora continúan para ayudar al entendimiento de enfermedades complejas como el EHGNA. De esta manera, se consideraría erróneo suponer que existen mecanismos idénticos entre los distintos grupos étnicos para el desarrollo de EHGNA dadas las diferencias en dieta y nivel socio cultural^{3,40}.

Estudios de genética humana han brindado nuevos acercamientos a la EHGNA y han demostrado que es una enfermedad heredable ($h^2=0.26-0.27$) en cohortes con participantes con ancestría europea⁴³. En estudios de asociación de genoma amplio (GWAS, por sus siglas en inglés) en el consorcio GOLD (genética de hígado graso relacionado a obesidad, por sus siglas en inglés) identificó variantes genéticas que se asociaron con esteatosis hepática en o cerca de los genes *PNPLA3*, *LYPLA1*, *PPP1R3B*, *NCAN* y *GCKR*⁴³. Aunado a esto se ha encontrado

que la prevalencia de EHGNA y de las enfermedades metabólicas varía según las poblaciones. En particular, los hispanos tienen la prevalencia más alta de la enfermedad mientras que los Afroamericanos tienen la más baja⁴⁴.

En el caso del alelo C230 del gen *ABCA1*, relacionado con bajos niveles de colesterol HDL, el cual se ha demostrado su ausencia total en poblaciones caucásicas, asiáticas, africanas e incluso en poblaciones del pacífico sur, presentándose este casi exclusivamente en población nativa de América⁴⁵ (Figura 1). Lo que denota un fenómeno de selección positiva que explica ciertas variaciones de la prevalencia de la enfermedad entre las poblaciones del mundo

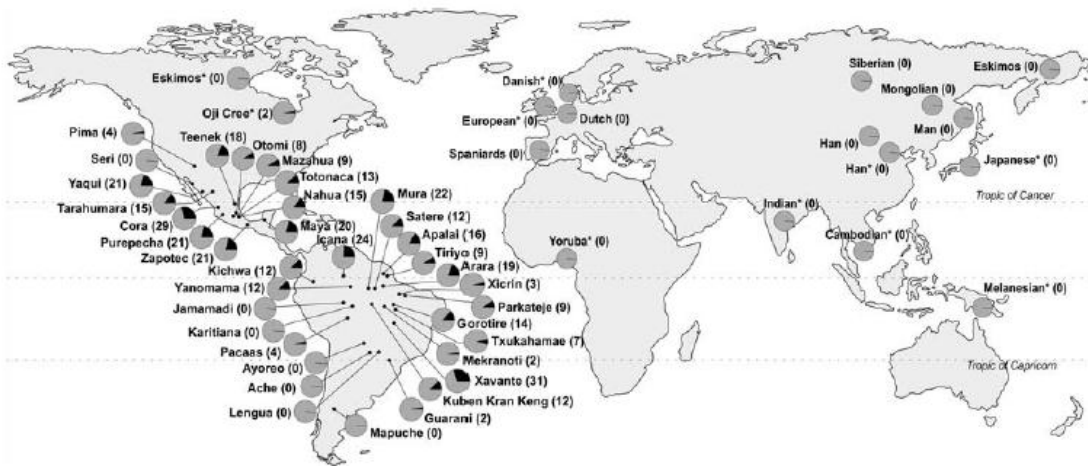


Fig 2. Distribución del alelo C230 [(% área en negro)] en poblaciones nativas americanas, europeas, asiáticas y africanas.⁴⁵

1.4.3.1 Estudios de asociación por genes candidatos

El abordaje principal en el estudio de enfermedades complejas como la EHGNA es el estudio de casos y controles. Estos estudios buscan asociaciones entre variantes genéticas y la enfermedad a nivel de poblaciones. La selección de genes candidatos está fundamentada en una supuesta plausibilidad biológica en la participación de un gen o proteína en una ruta metabólica determinada. Son

estudios con hipótesis a priori en la selección de genes que surgen cuando la función biológica de dicho gen es comprendida y considerada relevante con respecto a la enfermedad⁴⁰.

Para la búsqueda de genes candidatos al desarrollo de la enfermedad se han utilizado distintas estrategias, tal es el caso del estudio de ligamiento genético en familias el cual permite localizar regiones cromosómicas asociadas a un rasgo cuantitativo. Una vez localizadas estas regiones, se realiza la búsqueda de los genes que por su posición cromosómica, pudieran modular estos rasgos.

Los estudios de ligamiento han sido de gran utilidad para la identificación de variantes implicadas en enfermedades mendelianas; sin embargo esta estrategia ha sido poco exitosa para la localización de variantes que presentan una baja penetrancia y que se encuentran implicadas en enfermedades comunes como EHGNA.

Los genes que han sido identificados mediante análisis de ligamiento explican solamente una pequeña proporción del componente genético que da lugar al desarrollo de la EHGNA. Por otra parte, al ser la EHGNA una enfermedad compleja y cuyo desarrollo depende de la contribución de distintas variantes; ha sido necesario el uso de otras estrategias, como los escaneos de genoma completo (GWAS)³⁹.

1.4.3.2 GWAS

Desde la introducción de los estudios de genoma amplio (GWAS) para la investigación de variantes genómicas ha habido avances considerables en el entendimiento del genoma humano y de sus consecuencias clínicas en las enfermedades. Hasta el momento se han identificado 3.1 millones de SNP y el Proyecto Internacional de HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) ha descrito asociaciones en diversas etnias^{47,52,53}. De esta manera se han publicado numerosos estudios de este tipo en el campo de la DM2, resistencia a la insulina y otro tipo de enfermedades hepáticas (hepatitis B, hepatitis C, cirrosis biliar)^{54,55} y solo pocos se han concentrado a EHGNA.

Actualmente, los escaneos del genoma completo representan la principal herramienta para investigar la arquitectura genética en el desarrollo de la EHGNA; estos han permitido identificar cientos de variantes genéticas asociadas a este padecimiento.

Las distintas estrategias utilizadas para la identificación ya sea de regiones o genes asociados a rasgos relacionados con EHGNA han sido útiles para dilucidar el papel que presenta el factor genético en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, es necesario completarlo con trabajos más finos que nos permitan conocer el efecto que presentan estos genes en el desarrollo de la enfermedad en distintas poblaciones.

De esta forma se han propuesto varios genes candidato debido a su posición en regiones de susceptibilidad ligadas para EHGNA. Los resultados de diferentes estudios de asociación sugieren una extensa heterogeneidad genética y una posible interacción epistática entre los múltiples genes involucrados en la susceptibilidad de la enfermedad.

Aunque se han reportado que algunos genes juegan un papel en la susceptibilidad a EHGNA en múltiples estudios y en más de una población, estos genes no siempre han sido replicados en otras poblaciones como la hispana.

En 2008, el primer GWAS en EHGNA fue reportado por Romeo et al⁵⁶. En este estudio, se aplicó espectroscopia de protones por resonancia magnética no invasiva (1H-MRS) para evaluar la esteatosis hepática. En total, se estudiaron 2.111 personas de una población mixta de hispanos, afroamericanos y americanos europeos. Se identificaron variaciones de 9229 SNPs en el grupo con EHGNA en comparación con los controles normales. Un alelo de patatin como dominio que contiene la fosfolipasa miembro de la familia A3 (*PNPLA3*, rs738409 SNP, codificación I148M), también denominado adiponutrina, en el cromosoma 22 se demostró estar asociada con un aumento de los niveles de grasa hepática y la inflamación hepática. Este alelo fue más común en los hispanos, grupo más

susceptible a EHGNA, con contenido de grasa hepática siendo más de dos veces mayor en los sujetos homocigotos G que en los no portadores.

Estos resultados fueron validados por otra GWAS. En total 1.117 individuos con diagnóstico histológico confirmado EHGNA se genotipificó para seis SNPs de interés asociados a niveles de grasa intrahepática y valores elevados de ALT y AST. *PNPLA3* se asoció significativamente con esteatosis, inflamación portal, inflamación lobular, cuerpos de Mallory-Denk, EHGNA y fibrosis⁵⁷. Posteriormente, *PNPLA3* fue replicado de forma independiente tanto en sujetos adultos y pediátricos con esteatosis simple, ENA usando diferentes técnicas de laboratorio^{58,59}.

Por otro lado, el consorcio GOLD identificó 4 variantes genéticas que se asociaron con la esteatosis hepática en o cerca de los genes *LYPLAL1*, *PPP1R3B*, *NCAN* y *GCKR*.

El gen *IRS1* (sustrato-1 del receptor de insulina) es uno de los genes candidato para el estudio riesgo cardiovascular⁴⁸ y enfermedades metabólicas. Se han visto asociadas variantes en y cerca de 2q36.3-*IRS1* en estudios GWAS con resistencia a la insulina, diabetes⁴⁹, adiposidad⁵⁰, altos valores de TG y colesterol, bajos niveles de HDL, así como riesgo cardiovascular⁵¹

El gen *PPARG* (receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma)

Es un factor de transcripción que se expresa abundantemente en tejido adiposo y que está involucrado en la adipogénesis mediante la activación de la diferenciación del adipocito y mediando la expresión de genes específicos de este tipo de células⁶⁰. Un estudio GWAS más describe *ADIPOR2* con altos niveles de triglicéridos y grasa intrahepática⁶⁷.

Hasta la fecha, la asociación de *PNPLA3*/I148M con los niveles de transaminasas o EHGNA ha sido ampliamente descrita en varias poblaciones, sin embargo las asociaciones con las otras variantes no han sido consistentes.

1.5 Polimorfismos de genes que se han asociado a EHGNA

Se han examinado otros SNPs para determinar su asociación con EHGNA y la EHNA en poblaciones no hispanas, incluyendo los genes *ENPP1* y *IRS1*, que anteriormente fueron vinculados con la diabetes y la resistencia a la insulina. El SNP rs767870 del gen *ADIPOR2* ha sido relacionado con esteatosis hepática en varios estudios en países europeos.²⁰ Por último, un estudio GWAS identificó variantes en o cerca de tres nuevos *loci* *NCAN*, *GCKR* y *LYPLAL1* que están asociados con el desarrollo de EHGNA una muestra predominantemente caucásica en EE.UU.^{21,33}

Además como mencionamos previamente en el consorcio GOLD posteriormente identificó cuatro variantes genéticas adicionales que se asociaron con la esteatosis hepática (HS) en o cerca de genes *LYPLAL1* , *PPP1R3B*, *NCAN* y *GCKR*.

La asociación entre la variante rs738409 (I148M) del gen *PNPLA3*, y el contenido de grasa intrahepática y niveles de transaminasas ha sido validado en otros estudios y hasta la fecha es la asociación más convincente entre la esteatosis hepática y un solo SNP.¹⁸ que además se ha reportado más prevalente en población hispana (49%) que en la población caucásica (23%).³³

Sin embargo las asociaciones con otras variantes no han sido consistentes^{27,34,77}

1.5.1 SNPs Analizados en este estudio

PNPLA3

Patatin-like phospholipase domain containing 3, Adiponutrina.

Es una proteína de 481 aminoácidos con una masa de aproximadamente 53kDa de la familia de las fosfolipasa tipo patatin conocida también como adiponutrina. Su función es desconocida pero la adiponutrina es una proteína transmembrana con actividad lipolítica y lipogénica in vitro y es altamente expresada en adipocitos

y hepatocitos^{56,70}. Se ha asociado con contenido de TG en hepatocitos y steatosis macrovesicular⁷⁷.

Un estudio de genoma amplio de más de 9000 SNPs no sinónimos identificaron el SNP rs738409 (I148M) en PNPLA3 como la única variante fuertemente asociada con el contenido de grasa hepática en el estudio multiétnico Dallas Heart Study controlando por BMI, diabetes y consumo de alcohol y no se encontró ninguna asociación entre esta variante de PNPLA3 y el BMI, marcadores de sensibilidad a la insulina o dislipidemias.

De forma interesante, la prevalencia más alta encontrada de I148M fue encontrada en la población hispana de ese estudio (0.49), que además es sabido que tiene la prevalencia más alta de la enfermedad confiriéndole dos veces el riesgo a los portadores del alelo G de padecer EHGNA con respecto a los no portadores, de forma concomitante I148M también fue asociado con altos niveles de ALT y AST. De forma contraria la población Afroamericana que tiene la prevalencia menor de EHGNA, tiene también la frecuencia mas baja del alelo de riesgo (0.17)⁴⁶.

Posteriormente Kantartzis et al. Descubrieron que los hepatocitos de grasa subcutánea eran menores en los que tenían el alelo de riesgo en comparación con el ancestral ($p=0.005$)^{75,76}. Posteriormente un estudio de tres cohortes independientes (Bruneck, Italy, population-based; SAPHIR, Austria, healthy working population; and Utah, obesity case-control study) encontraron una fuerte asociación de I148M con niveles de ALT y AST ajustando por edad y sexo⁷¹.

Posteriormente se comprobó el efecto de rs738409 I148M SNP en la severidad histopatológica de la enfermedad y asociado con el grado de esteatosis hepática⁷².

NCAN

Neurocan la proteína producto de NCAN es un proteoglicano coindroitin sulfato, que se expresa principalmente en el sistema nervioso central y se piensa que está involucrado en adhesión celular y migración⁷⁸⁻⁸⁰. El locus de NCAN contiene al menos 20 genes en una región de 500 kb en el cromosoma 19 (19p13)⁸¹⁻⁸³. Mientras que ninguno de esos genes guarda relación con EHGNA o metabolismo de los lípidos la variación rs2228603 localizada en el exón 3 de NCAN es una

mutación Pro92Ser84 que ha comenzado a conocerse que en el sistema nervioso central es un importante regulador del metabolismo de glucosa y TG^{85,86}.

LYPLA1

Lysophospholipase I

Este gen es un miembro de la superfamilia alfa / beta hidrolasa. Lisofosfolipasa 1 (LYPLA1) ha sido identificada como una proteína palmitoil tioesterasa candidata responsable de despalmoilación en células de mamífero así como actividad de lisofosfolipasa. La palmitoilación de proteína es una modificación post-translacional esencial necesaria para el tráfico y la localización de las proteínas reguladoras que juegan un papel clave en el crecimiento celular y la señalización. Importante mediador de inflamación en fibroblastos⁸⁷. Así mismo se asocia a niveles elevados de ALT⁷⁴. Y EHGNA^{43,88}.

IRS1

Insulin receptor substrate 1

Estos SNPs rs2943634 y rs2972146 se habían visto asociados previamente con Diabetes tipo 2, pero se demostró posteriormente que se asociaban con estados de fibrosis hepática. A pesar que las frecuencias no fueron diferentes entre casos y controles otro estudio tuvo una significancia limítrofe. Se asoció con niveles bajos de triglicéridos y a una prevalencia mayor de Diabetes tipo 2⁸⁹.

Juega un papel clave en la señalización de la insulina. Cuando la insulina se une al receptor de la insulina, que actúa mediante la fosforilación de *IRS1* y una cascada de reacciones de fosforilación se inicia, resultando en efectos metabólicos. La variación genética, cerca del gen que codifica *IRS1* se ha asociado con la diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, y la adiposidad en los estudios de asociación de genoma completo⁴⁷.

GCKR

Glucokinase receptor

Regulador de la actividad de la glucocinasa en el metabolismo de la glucosa, que cuenta con el SNP rs780094 identificado que está en fuerte desequilibrio de ligamiento con un SNP funcional. Esta variante se piensa que reduce la habilidad de GCKR de inhibir la glucocinasa en respuesta a la fructosa-6-fosfato, con el consiguiente aumento de la actividad de la glucocinasa hepática y la captura de glucosa en el hígado. Se ha asociado en diversos estudios con esteatosis hepática^{74, 43, 88, 90}.

PPP1R3B

Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 3B

Este gen codifica la subunidad catalítica de la serina / treonina fosfatasa, la proteína fosfatasa - 1. La proteína codificada se expresa en el hígado y el tejido muscular esquelético y puede estar implicada en la regulación de la síntesis de glucógeno en estos tejidos. Este gen puede ser involucrado en la diabetes tipo 2 y diabetes de comienzo temprano jóvenes⁹¹. Recientemente se ha asociado con steatosis hepática en diversos estudios en distintas poblaciones^{43,90}.

PPARG

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)

Son los principales reguladores del metabolismo de lípidos en el hígado.

PPAR γ tiene un rol fundamental en el almacenamiento de lípidos⁹². PPAR α and PPAR γ tienen sin embargo funciones opuestas en la regulación de lípidos; Mientras que PPAR α promueve la movilización de grasa PPAR γ promueve su almacenamiento. PPAR γ es expresado en adipocitos, macrófagos y músculo donde regula la homeostasis de lípidos⁹³.

Se ha asociado con obesidad, hipertensión arterial y diabetes⁶⁹. Diversos estudios han probado la hipótesis de asociación con EHGNA en distintas variantes genéticas. Pero siempre con resultados no concluyentes^{60,94}.

ADIPOR2

Adiponectin Receptor 2

Mientras que ADIPOR1 se expresa principalmente en músculo esquelético ADIPOR2 se expresa en el hígado. Es un receptor esencial de adiponectina, una hormona esencial secretada por los adipocitos. Tiene una función antidiabética. Esta probablemente involucrada en rutas metabólicas que regulan el metabolismo de lípidos como oxidación de ácidos grasos, aumentando el AMP cíclico, activando PPAR α y en el metabolismo de glucosa por la acción de la adiponectina. La variación rs767870 de ADIPOR2 se ha visto asociada con esteatosis hepática para los portadores del alelo C en tres cohortes independientes con población europea^{95,96}.

II. JUSTIFICACIÓN

El EHGNA es una entidad que se identifica cada vez con más frecuencia y que puede progresar a falla hepática. EL escenario clínico es similar al observado en la lesión hepática inducida por el alcohol; solo que se desarrolla sin la presencia de este. Diversos términos han sido utilizados para describir a esta entidad, incluyendo hepatitis grasa, enfermedad de Laënnec no alcohólica siendo el término hígado graso no alcohólico es el preferido.

El síndrome metabólico debe de considerarse como una entidad clínica caracterizada por la asociación de varias enfermedades vinculadas fisiopatológicamente a través de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Y la EHGNA representa la manifestación hepática de la enfermedad. Se considera que un cierto genotipo confiere susceptibilidad a la acción de diversos factores ambientales para que se desarrolle una respuesta inflamatoria endotelial que es la base del Síndrome Metabólico (SM). Una susceptibilidad genética adicional propicia que este trastorno se exprese como enfermedades diversas: hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, obesidad, EHGNA entre otras. Es por eso que el Adult Treatment Panel III (ATP III) ha reconocido recientemente la

importancia de estos factores de riesgo de origen metabólico para el desarrollo de cardiopatía. La importancia conceptual de esto es referir que las anomalías enlistadas son más frecuentes que ocurran juntas que separadas y que cuando se encuentran juntas están más directamente relacionadas con morbilidad y crecientes tasas de mortalidad.

La EHGNA es una entidad nosológica compleja con numerosos factores genéticos que contribuyen a la considerable variabilidad en la historia natural de la enfermedad. Al día de hoy es sabido que la EHGNA es más común en ciertas poblaciones étnicas que con respecto a otras.

En la actualidad poco es conocido acerca de los factores que influyen en el desarrollo y progresión de EHGNA, las variaciones en genes que afectan el metabolismo de lípidos en el hígado, la resistencia a la insulina, la formación y la degradación de ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés), citocinas y receptores de endotoxinas y mediadores profibrogénicos.

Hasta el momento no se ha realizado un estudio que explore el componente genético para el desarrollo de EHGNA en población altamente predispuesta como la mexicana.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dramático aumento en la prevalencia de la obesidad, el síndrome metabólico, y EHGNA se ha relacionado con la difusión global de la dieta occidental, caracterizada por el exceso de ingesta calórica, debido al aumento del consumo de alimentos y bebidas procesados, ligado a un estilo de vida más sedentario. Esto ha llevado a un aumento significativo en el consumo de sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa, los cuales contienen cantidades similares de glucosa y fructosa. El consumo excesivo de fructosa se ha relacionado con un aumento de la prevalencia de las enfermedades metabólicas y una evidencia creciente sugiere

que también puede contribuir al desarrollo y severidad de la EHGNA, al exacerbar la deposición de grasa, inflamación y, posiblemente, la fibrosis.

En la población mexicana encontramos una alta prevalencia de factores de riesgo para la EHGNA, como lo son las dislipidemias, la resistencia a la insulina y la obesidad. Sin embargo, la sola presencia de estos factores no explica totalmente la variabilidad del fenómeno, por lo que explorar la participación de una predisposición genética propia de los mexicanos podrá ayudar a explicar mejor este fenómeno. Identificar estos factores es vital para el mayor entendimiento de la fisiopatología del desarrollo y evolución de la enfermedad que podría explicar uno de los principales problemas de salud pública de la actualidad.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La frecuencia con la que se presentan los nueve SNP's candidatos es mayor entre los participantes con EHGNA diagnosticado por elevación persistente de transaminasas será mayor que entre los controles sanos?

V. HIPÓTESIS

La frecuencia con la que se presentan los nueve SNP's candidatos es mayor entre los casos (participantes con EHGNA) que entre los controles (participantes sin EHGNA).

VI. OBJETIVO

Objetivo general:

- Evaluar la frecuencia y la magnitud de la asociación de los nueve SNP's seleccionados encontrados en o cerca de *PNPLA3*, *NCAN*, *IRS1*, *ADIPOR2*, *PPARG*, *LYPLA1*, y *PPPR3B* con la presencia de EHGNA.

Objetivos específicos:

- Identificar los casos (pacientes con EHGNA) entre los participantes en la cohorte denominada *Estudio de Cohorte de Trabajadores de la Salud* del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).
- Seleccionar los controles (participantes sin EHGNA) de la misma cohorte.
- Seleccionar SNPs entre el total de polimorfismos registrados en la literatura, relacionados con la presencia de EHGNA en función de que

hayan sido reportado en dos o más poblaciones, ser identificados por GWAS y/o haber sido explorados en población hispana

- Evaluar la magnitud de la asociación de los nueve SNP's seleccionados, con la presencia de EHGNA, independientemente del Índice de Masa Corporal (IMC), edad y sexo de los participantes.

VII. VARIABLES

Independiente: Frecuencia con la que se presentan los nueve SNP's candidatos.

Dependiente: Presencia de enfermedad de hígado graso no alcohólico.

Variables potencialmente confusoras:

1. Controladas por análisis: IMC, edad y sexo.
2. Controladas por diseño: Alcoholismo

VIII. METODOLOGÍA

Diseño del estudio

Se propuso un estudio de casos y controles anidado al *Estudio de Cohorte de Trabajadores de la Salud* del IMSS.

Población de Estudio

El *Estudio de Cohorte de Trabajadores de la Salud* (ECTS) del IMSS fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética y la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS. La cohorte está integrada por \approx 2100 hombres y mujeres entre 7 y 92 años de edad, trabajadores y sus familias que participan en diversas instituciones de salud y universidades de los cuales contamos con su ADN con el cual se han genotipificado los SNPs para este estudio

Actualmente la ECTS se encuentra en la tercera fase de seguimiento, que básicamente consiste en documentar los cambios ocurridos en los factores?? de riesgo evaluados en la etapa basal y en registrar la aparición de casos nuevos de las patologías en estudio, entre ellas la enfermedad hepática y en particular la EHGNA. Los procedimientos que se utilizan para la tercera fase de seguimiento son los mismos que los aplicados en las dos primeras etapas.

A cada participante del ECTS se le realizaron mediciones antropométricas, biometría hemática, química sanguínea y extracción de ADN. Los casos fueron seleccionados a partir de los resultados de dos pruebas de funcionamiento hepático alteradas (ALT y AST \geq 40 U/l), en un lapso de por lo menos seis meses.

Definición de caso:

Enfermedad de hígado graso no alcohólico:

- Se consideró como caso de EHGNA a la persistencia en la elevación de las enzimas hepáticas ALT y/o AST igual o mayor a 40 U/L durante seis meses o más, en ausencia de consumo significativo de alcohol o de otras sustancias hepatotóxicas.

Definición de control

- Se consideró como control a todo participante en el ECTS que no presentara elevación de enzimas ALT y AST en ningún momento del seguimiento, que presentara un diagnóstico negativo de EHGNA y/o cualquier otro tipo de hepatopatía.

Criterios de selección

○ Criterios de inclusión de los casos:

- Participantes mayores de 18 años.
- Con consentimiento informado por escrito.
- Con diagnóstico de EHGNA a partir de la presencia y magnitud de las enzimas ALT y AST en sangre.

○ Criterios de inclusión de los controles

- Participantes que sin diagnóstico de EHGNA u otras afecciones hepáticas, sin antecedentes de consumo de alcohol, que cuenten con resultados normales en las pruebas de funcionamiento hepático en un periodo de por lo menos seis meses y que no se encuentren tomando cualquiera de los medicamentos y sustancias señalados antes como hepatotóxicos.

○ Criterios de exclusión de los casos:

- Antecedente (por lo menos de 1 año) de consumo significativo de bebidas alcohólicas (ingesta alcohólica mayor a una bebida diaria o >20 de g/día en mujeres y >30 g/día en hombres).
- Antecedentes de consumo significativo de sustancias hepatotóxicas: esteroides, cloroquina, tetraciclinas, ácido valpróico, fenitoína, acetaminofén, clorpromazina, metotrexate, tamoxifeno, raloxifeno y erythroxyllum novogranatense (cocaína).
- Evidencia clínica o historia de ascitis, hemorragia debida a várices o encefalopatía espontanea.
- Antecedente de procedimientos quirúrgicos como gastroplastía, anastomosis yeyuno-ileal o yeyuno-cólica.
- Nutrición Parenteral Total en los últimos 6 meses.
- Enfermedad hepática crónica por hepatitis B, C, hepatitis autoinmune, cirrosis hepática y cáncer de hígado.
- Enfermedades médicas mayores o sistémicas diferentes a enfermedades hepáticas, tales como insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedad arterial coronaria, enfermedades pulmonares que desarrollen hipoxia, falla renal, post trasplante de órganos.

Tamaño de muestra

De acuerdo con la fórmula para estimar diferencias de proporciones se estimó el tamaño de la muestra. Se consideró una prevalencia de exposición en los controles del 0.3% del estudio y la prevalencia de exposición en los caso del 10%

El cálculo del tamaño de muestra se realizó con el programa QUANTO ® University of Southern California describiendo a continuación cada paso.

Fórmula 1. Cálculo de muestra por diferencia de proporciones⁹⁸

$$n = \frac{\left[Z\alpha\sqrt{2\bar{p}\bar{q}} + Z\beta\sqrt{p_1q_1 + p_2q_2} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

En donde:

$Z\alpha = 1.96$ (α 0.05 para 2 colas)

$Z\beta = 1.28$ (error .10)

$p_2 = 0.03$

$q_1 = 1 - p_1$

$p_1 = 0.10$

$$n = \frac{[1.96 \sqrt{2(0.065)(0.935)} + 1.28 \sqrt{0.03(0.97) + 0.10(0.90)}]^2}{(0.03 - 0.096)^2} = 258$$

R= pérdidas (10%)	2 casos por controles
$n_a = n$ ajustada	$m = [(r+1)n]/2r$
$n_a = N/(1-R)$	
$n_a = (1/(1-.10))$	Donde:
$n_a = 98(1.11)$	r numero de controles
$n_a = 287$	$m = [(2+1)287]/(2)(2) = 215$
	casos 215
	controles 215 X2 = 431

Selección de casos

Para la selección de casos se identificaron aquellos participantes que dentro del seguimiento del ECTS resultaban con parámetros anormales de enzimas hepáticas (≥ 40 U/L) a los cuales se les daba seguimiento y se reevaluaban sus valores de transaminasas 6 meses después para corroborar si la elevación persistía, denominando a los que lo hicieran como *casos con enzimas hepáticas persistentemente elevadas*

Se excluyeron aquellos participantes que tuvieran consumo significativo de alcohol y uso habitual de medicamentos hepatotóxicos. De esta forma se identificaron 147 casos durante la etapa de seguimiento de 2004-2006 que continuaron bajo seguimiento durante la etapa 2011-2013.

De igual forma durante la etapa 2011-2013 fueron identificados 60 nuevos casos que se sumaron a los 147 previos dando un total de 207 casos.

Selección de controles

Del resto de participantes del ECTS, todos aquellos que cumplieron con los criterios de inclusión fueron seleccionados dando un total de 534 controles.

Siguiendo las recomendaciones de Schlesselman (49). Se decidió incluir a todos. 2.6 controles por caso

Medición de las variables

Los participantes de la cohorte respondieron a un cuestionario auto-aplicado sobre su estado de salud, factores demográficos y de estilo de vida (hábitos alimentarios, actividad física, horas de descanso y traslado, consumo de tabaco y alcohol, etc.)

Adicionalmente se realizaron las siguientes pruebas de laboratorio:

1. Niveles de séricos de las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).
2. Niveles séricos de Colesterol total, Triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). se tomaron 20 ml de sangre periférica y se analizó en el equipo de análisis clínicos de laboratorio del ECTS.

Genotipificación de SNPs

El ADN genómico fue extraído a partir de una muestra de 15 ml de sangre periférica de todos los individuos incluidos en el estudio usando un kit de extracción comercial (Puregene, Qiagen, CA, USA).

La genotipificación de los SNPs fue realizada mediante la metodología de Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Modo fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan®)

Para cada ensayo de discriminación alélica se utilizaron 9 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con dos fluorocromos VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2. En el extremo 3' contenían un quencher (TAMRA), el cual mientras la sonda permanezca intacta inhibe la emisión de fluorescencia.

Durante la reacción de PCR los primers hibridaran con su secuencia diana en la cadena de DNA. Si existe dicha secuencia polimórfica, la sonda TaqMan® hibridará con su secuencia homóloga. Durante este proceso la AmpliTaq Gold tiene actividad de DNA polimerasa y de exonucleasa 5'-3' lo que le confiere la capacidad de degradar la sonda marcada durante la amplificación y liberar el fluorocromo de la acción del quencher de manera que solo la sonda específica para un polimorfismo determinado será capaz de hibridar y diferenciar un alelo de otro de acuerdo a la fluorescencia emitida.

Análisis de ancestría

Para las generar las variables de ancestría se hizo mediante el análisis de componentes principales (PCA) se estimó utilizando los 96 marcadores en el programa Smartpca del paquete Eigensoft 3.0, y las estimaciones de ancestría se

incluyeron en dos variables como factores de confusión para la población de estudio.

Selección de SNP's asociados con EHGNA

En La Tabla 1 se presentan los nueve SNPs que han sido anteriormente descritos como asociados con el desarrollo de EHGNA y que fueron seleccionados en función del cumplimiento de 3 de los siguientes 4 criterios:

- 1.- Asociación previa en población hispana.
- 2.- Estudio en 2 o más poblaciones diferentes.
- 3.- En estudios de GWAS.
- 4.- Por su fuerza de asociación con la enfermedad (en función de su OR).

Tabla 2. SNP's seleccionados para realizar este estudio

Gen	Nombre	rs		Localización	MAF	Cromosoma
LYPLA1	<i>Lysophospholipase like 1</i>	rs12137855	C>T	219448378	0.16	1
IRS1	<i>insulin receptor substrate 1</i>	rs2943634	A>C	227068080	0.01	2
IRS1	<i>insulin receptor substrate 1</i>	rs2972146	G>T	227100698	0.19	2
GCKR	<i>glucokinase (hexokinase 4) regulator</i>	rs780094	T>C	27741237	0.30	2
PPARG	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	rs1801282	Pro12Ala	12393125	0.07	3
PPP1R3B	<i>protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B</i>	rs4240624	G>A	9184231	0.11	8
ADIPOR2	<i>adiponectin receptor 2</i>	rs767870	G>A	1889823	0.29	12
NCAN	<i>Neurocan</i>	rs2228603	P92S	19329924	0.04	19
PNPLA3	<i>patatin-like phospholipase domain containing 3</i>	rs738409	I148M	44324727	0.26	22

IX. Análisis Estadístico

Las frecuencias y distribuciones de los valores clínicos (peso, talla y edad) y de laboratorio (colesterol total, HDL, LDL, AST y ALT) fueron expresadas como promedios, desviaciones estándar y/o medianas. Para conocer las distribuciones por sexo se emplearon proporciones.

Las comparaciones de los parámetros clínicos y de laboratorio entre el grupo de participantes con EHGNA y el grupo control se realizaron mediante la prueba *t* de *student* no pareada, para promedios y varianzas. La comparación de proporciones se realizó utilizando la Chi cuadrada de Pearson's y probando equilibrio de Hardy-Weinberg.

La asociación entre los genotipos de los SNP's y el riesgo de presentar EHGNA se determinó mediante la comparación de las frecuencias alélicas de los SNP's entre los casos y los controles, utilizando la prueba de Chi cuadrada de Pearson's. Se calcularon Odds Ratios (OR) e intervalos de confianza al 95%.

En el modelo aditivo, homocigotos para el alelo de riesgo (B/B), heterocigotos (A/B) y homocigotos para el alelo normal o ancestral (no-riesgo) (A/A), se codificaron a una variable categórica para el genotipo 2, 1 y 0, respectivamente. El modelo dominante fue definido como AB + BB versus AA, y el modelo recesivo como BB versus AA + AB.

Se realizó una regresión logística múltiple para cada uno de los SNP's seleccionados, a fin de obtener los factores predictivos para EHGNA en la población estudiada.

Para evaluar la contribución de cada SNP's al riesgo de presentar EHGNA, se realizó una prueba de Wald de regresión logística múltiple para los modelos aditivo, recesivo y dominante, considerando como variable dependiente a la enfermedad EHGNA inicialmente en crudo y posteriormente ajustados por edad, sexo, IMC y ancestría.

Finalmente, para aquellos SNP's relevantes que tuvieron significancia en el estadístico de Wald, se realizó un análisis de niveles de ALT estratificando por categorías de Índice de Masa Corporal y número de alelos de riesgo. Los valores de ALT fueron calculados mediante regresiones lineales y múltiples ajustando por edad, sexo e IMC.

En todos los casos, los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con los programas estadísticos SPSS (versión 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL) y STATA 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

X. RESULTADOS

Se analizó la información de los 741 participantes de entre 22 y 92 años que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión. De ellos, 207 fueron casos y 534 controles. En todos ellos se realizó medición de datos antropométricos en cada visita al ECTS, así como estudios de laboratorio que comprendían enzimas hepáticas (ALT y AST), colesterol total, triglicéridos, HDL, y LDL entre otros. Esta información se resume en la tabla 1.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre casos y controles en casi todas las variables, Edad, sexo, peso, estatura, IMC, triglicéridos, HDL, LDL, así como en las variables de selección ALT y AST. Excepto en el colesterol total. Los participantes con EHGNA fueron más jóvenes, predominantemente del sexo masculino, con un IMC mayor, con valores más bajos de LDL, HDL, ALT y AST.

Tabla 1. Características Socio demográficas de casos y controles

Media± DE	Casos = 207	Controles = 534	Valor P ¹
Sexo, hombres, n (%)	74 (35.7)	117 (21.9)	< 0.001
Edad (años)	53.8 ± 12.2	56.4 ± 13.5	0.017
Peso (kg)	74.8 ± 16.7	66.3 ± 12.4	< 0.001
Altura (cm)	158.8 ± 14.9	155.7 ± 18.4	0.027
Índice de Masa Corporal (IMC)	29.2 ± 4.9	26.6 ± 4.4	< 0.001
Cholesterol total (mg/dl)	202.3 ± 40.9	206.1 ± 43.7	0.27
Trigliceridos (mg/dl)	207.9 ± 158.2	179.6 ± 111.3	0.006
HDL (mg/dl)	42.9 ± 9.7	46.3 ± 11.9	< 0.001
LDL (mg/dl)	125.0 ± 34.1	131.3 ± 37.2	0.036
ALT (U/L)	44.9 ± 26.4	19.6 ± 6.6	< 0.001
AST (U/L)	42.1 ± 22.7	23.0 ± 5.5	< 0.001

¹ Las diferencias entre proporciones se realizaron usando pruebas de chi cuadrada de homogeneidad. Las diferencias entre medias se realizaron con prueba de T.

En la tabla 2 se resumen las frecuencias alélicas encontradas en los controles de nuestra población de estudio, comparadas con las reportadas en la literatura en distintas poblaciones.

El polimorfismo con prevalencia mas alta en nuestra población fue rs2943634 (84.4%) y rs2972146 (83.3%) en *IRS1*; le siguió rs738409 en *PNPLA3* con 57.8%; rs780094 (33.2%) en *GCKR* y rs4240624 (27.9%) en *PPP1R3B*. Los menos prevalentes fueron: rs2228603 (2.7%) en *NCAN*; rs767870 (10.6%) en *ADIPOR2*; rs12137855 (11.5%) en *LYPLAL1*; and rs1801282 (13.7%) en *PPARG*. (Tabla 2)

Tabla 2. SNPs en genes candidatos y frecuencias alélicas encontradas en nuestro estudio comparadas con las reportadas en distintas poblaciones

Gen	SNP	Alelos	Localización	Frecuencia Alélica (%) ¹				CONTROLES n=534 ⁶	Casos N=207	Este estudio n=741	P para HWE ⁶
				ASW ²	CEU ³	YRI ⁴	MEX ⁵				
<i>IRS1</i>	rs2943634	A>C	227068080	51	67	39	83	84.25	84.8	84.4	0.197
<i>IRS1</i>	rs2972146	G>T	227100698	16	35	10	16	83.49	83.41	83.3	0.547
<i>PNPLA3</i>	rs738409	C>G	44324727	17	22	12	55	54.97	58.30	57.8	0.991
<i>GCKR</i>	rs780094	T>C	27741237	11	41	13	34	32.35	33.41	33.2	0.152
<i>PPP1R3B</i>	rs4240624	G>A	9184231	20	6	20	30	26.15	28.82	27.9	0.601
<i>PPARG</i>	rs1801282	C>G	12393125	2	10	0	13	13.66	13.77	13.7	0.057
<i>LYPLA1</i>	rs12137855	C>T	219448378	16	21	19	14	10.06	12.02	11.5	0.855
<i>ADIPOR2</i>	rs767870	C>T	1889823	50	17	70	13	10.49	11.34	10.6	0.053
<i>NCAN</i>	rs2228603	C>T	19329924	2	9	0	1	2.08	3.41	2.7	0.625

¹ Es la frecuencia en la que se presenta el alelo de riesgo (el segundo alelo en la columna de "Alelos")

² Ancestría Africana en el Suroeste de EEUU (ASW)

³ Residentes de Utah con ancestría del Oeste de Europa (CEU)

⁴ Población Yoruba en Ibadan, Nigeria (YRI)

⁵ Ancestría mexicana en mexicanos residentes en Los Angeles, California (MEX)

⁶ Valor P para el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) calculado en casos y controles

Se encontró que la mayoría de los individuos fueron homocigotos para el genotipo G (54,9%). Es digno de mención el 10,49% en rs767470 de ADIPOR2 y el de rs2943634 en IRS1 (84,25%).

Se examinó la asociación de la edad, sexo, índice de masa corporal y ALT / AST valores entre los participantes con EHGNA y controles. Hay una diferencia significativa en la edad, el sexo, el peso, la altura y el IMC y en todas las variables de química sanguínea, (HDL, LDL, triglicéridos, ALT y AST), pero esta diferencia estadística no se encontró en el colesterol total

Utilizamos diferentes modelos genéticos para investigar la asociación entre los polimorfismos en genes candidato entre casos con EHGNA y controles como se muestra en la tabla 3,4 y 5.

Después de ajustar por factores de confusión (edad, sexo, índice de masa corporal y la ascendencia), el modelo de regresión logística múltiple final de logística múltiple reveló que la variante CG y GG de rs738409 (*PNPLA3*) y la

variante de *LYPLA1* rs12137855 TT fueron factores de riesgo independientes de hígado graso no alcohólico. 2.33(1.18,4.55) y 5,37 (1,05, 27,35), respectivamente.

Utilizamos diferentes modelos genéticos para investigar la asociación entre estos polimorfismos en genes candidatos y la EHGNA. Las variantes rs738409 (*PNPLA3*), rs2228603 (*NCAN*), rs12137855 (*LYPLA1*), rs780094 (*GCKR*), rs4240624 (*PPP1R3B*) eran factores de riesgo independientes para la EHGNA en modelos recesivos y dominantes. El SNP rs738409 en *PNPLA3* se asoció con la enfermedad en ambos modelos, siendo el riesgo un poco más evidente bajo el modelo recesivo, con un OR de 1.78 (1.3, 2.5)

Después de ajustar por factores de confusión (edad, sexo, índice de masa corporal y la ancestría), sólo el modelo dominante para los rs738408 variantes siguen siendo importantes con OR = 1.70 (1.1, 2.7) y el modelo recesivo para rs12137855 OR = 5,13 (1.01,25.98) fueron estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Se estratificó por sexo y en el grupo de las mujeres se encontraron estas diferencias en los genotipos de *PNPLA3* y *LYPLA1* bajo los tres modelos; alélico, dominante y recesivo para rs738409 y bajo dos modelos el alélico y dominante para rs12137855. Después de ajustar por factores de confusión esta diferencia permanecen en dos modelos para rs738409 el alélico 2.01 (1.34, 3.03) y el recesivo 2.71 (1.57, 4.67) para rs738409 y en ninguno en *LYPLA1*. El caso de rs78009 de *GCKR* fue notable 1.47 (1.01, 2.13) ya que después de ajustar en el modelo alélico fue esa diferencia estadísticamente significativa.

Posteriormente se estratificó por BMI, realizando una variable dicotómica considerando a los participantes con peso normal como referencia comparando con los participantes con sobrepeso y obesidad. La antes mencionada asociación para *PNPLA3* con EHGNA permaneció similar bajo esta estratificación. Para rs2228603 en *NCAN* después de ajustar por factores confusores en el modelo alélico y dominante este SNP resultó como factor de riesgo independiente para EHGNA con un OR= 2,68 (1.17, 6.15) para el modelo alélico y de 2,69 (1,15, 6,29) para el modelo dominante. El análisis para el alelo recesivo y TT, fueron omitidos

debido a la baja prevalencia que presenta el alelo TT en los participantes (<1% en casos y 0.0% en controles) que corresponde con la prevalencia reportada en la población de todo el mundo. Para *LYPLA1* rs12137855 el genotipo TT fue factor de riesgo de EHGNA en comparación con los sujetos con los alelos homocigotos CC, independientemente de la edad el sexo, IMC y ancestría. Las probabilidades de tener EHGNA sería de 4,53 veces (IC 95%, 1,11-18,41). Es de notar que bajo los tres modelos y controlando por factores confusores dicho SNP resulto un factor de riesgo independiente para la enfermedad siendo más evidente en el recesivo OR=4,16 (1.03,16.84).

Tabla 3. Asociación entre SNPs y participantes con EHGA

Gen	SNP	Genotipo	N (%)		Crudo OR (95% CI)	Ajustado OR (95% CI) ¹	Valor p
			Casos	Controles			
PNPLA3	rs738409	GG	90 (43.5)	161 (30.2)	1.00	1.00	
		CG	90 (43.5)	264 (49.4)	1.64 (2.33,1.15)	1.96(3.16,1.23)	0.005
		CC	27 (13.0)	108 (20.2)	2.22 (3.70,1.37)	2.33(1.18,4.55)	0.015
		Alélico			1.53 (1.2, 1.9)	1.58 (1.2, 2.0)	0.003
		Dominante			1.69 (1.1, 2.7)	1.70 (1.1, 2.7)	0.002
NCAN	rs2228603	Recesivo			1.78 (1.3, 2.5)	1.90 (1.3, 2.7)	0.156
		CC	187 (90.3)	506 (94.8)	1.00	1.00	
		CT	17 (8.2)	22 (4.1)	2.09 (1.09, 4.02)	1.52(0.61, 3.79)	0.368
		TT	1 (0.5)	0 (0.0)	--	--	--
		Alélico			2.25 (1.21, 4.20)	1.68(0.72, 3.93)	0.233
LYPLA1	rs12137855	Dominante			2.21 (1.16, 4.22)	1.63(0.67, 3.98)	0.285
		Recesivo			--	--	--
		CC	150 (72.5)	430 (80.5)	1.00	1.00	
		CT	47 (22.7)	97 (18.2)	1.39 (0.94, 2.06)	1.22 (0.71, 2.12)	0.103
		TT	8 (3.9)	5 (0.9)	4.59(1.48, 14.24)	5.37 (1.05, 27.35)	0.008
GCKR	rs780094	Alélico			1.59 (1.15, 2.22)	1.49 (0.94, 2.36)	0.091
		Dominante			1.54 (1.06, 2.25)	1.39 (0.82, 2.34)	0.220
		Recesivo			4.28 (1.38, 13.24)	5.13(1.01,25.98)	0.048
		GG	80 (38.7)	247 (46.3)	1.00	1.00	
		AG	103 (49.8)	215 (40.3)	1.48 (1.05, 2.09)	1.40 (0.88, 2.22)	0.156
PPP1R3B	rs4240624	AA	21 (10.1)	62 (11.6)	1.05 (0.60, 1.82)	1.43 (0.72, 2.86)	0.306
		Alélico			1.15 (0.91, 1.46)	1.25 (0.91, 1.72)	0.170
		Dominante			1.38 (0.99, 1.92)	1.41 (0.90, 2.19)	0.131
		Recesiv			0.86 (0.51, 1.44)	1.19 (0.63, 2.26)	0.589
		AA	94 (45.4)	287 (53.8)	1.00	1.00	
IRS1	rs2943634	AG	84 (40.6)	197 (36.9)	1.30 (0.92, 1.84)	1.13 (0.71, 1.81)	0.603
		GG	24 (11.6)	38 (7.1)	1.93 (1.10, 3.38)	1.78 (0.89, 3.56)	0.101
		Alélico			1.36 (1.06, 1.74)	1.27 (0.93, 1.74)	0.137
		Dominante			1.40 (1.01, 1.94)	1.26 (0.81, 1.94)	0.301
		Recesivo			1.72 (1.00, 2.94)	1.69 (0.87, 3.26)	0.120
IRS1	rs2972146	CC	148 (71.5)	378 (70.8)	1.00	1.00	
		AC	55 (26.6)	132 (24.7)	1.06 (0.74, 1.54)	1.28 (0.79, 2.06)	0.320
		AA	4 (1.9)	17 (3.2)	0.60 (0.20, 1.82)	0.45(0.05, 3.95)	0.472
		Alélico			1.04 (0.76, 1.42)	0.89 (0.58, 1.37)	0.596
		Dominante			1.69 (0.56, 5.09)	2.38 (0.27, 20.65)	0.433
PPARG	rs1801282	Recesivo			0.99 (0.69, 1.41)	0.82 (0.51, 1.32)	0.418
		CC	145 (70.1)	363 (68.0)	1.00	1.00	
		AC	52 (25.1)	139 (26.0)	0.93 (0.65, 1.36)	1.05 (0.64, 1.72)	0.847
		AA	9 (4.4)	16 (3.0)	1.41 (0.61, 3.26)	1.15 (0.32, 4.02)	0.832
		Alélico			1.03 (0.76, 1.39)	1.05 (0.70, 1.60)	0.702
ADIPOR2	rs767870	Dominante			1.01 (0.71, 1.45)	0.94 (0.59, 1.52)	0.812
		Recesivo			1.43 (0.62, 3.30)	1.13 (0.32, 3.93)	0.848
		CC	151 (73.0)	398 (74.5)	1.00	1.00	
		CG	51 (24.6)	114 (21.4)	1.18 (0.81, 1.72)	1.16 (0.69, 1.94)	0.585
		GG	3 (1.5)	15 (2.8)	0.53 (0.15, 1.85)	0.91 (0.22, 3.84)	0.899
ADIPOR2	rs767870	Alélico			1.02 (0.74, 1.41)	1.08 (0.70, 1.67)	0.719
		Dominante			1.10 (0.76, 1.60)	1.13 (0.69, 1.86)	0.633
		Recesivo			0.51 (0.15, 1.77)	0.88 (0.21, 3.69)	0.861
		CC	163 (78.7)	428 (80.2)	1.00	1.00	
		CT	41 (19.8)	91 (17.0)	1.18 (0.78, 1.78)	1.60 (0.91, 2.82)	0.102
ADIPOR2	rs767870	TT	2 (1.0)	10 (1.9)	0.53 (0.11, 2.42)	--	--
		Alélico			1.04 (0.73, 1.49)	1.39 (0.82, 2.35)	0.223
		Dominante			1.12 (0.75, 1.67)	1.52 (0.87, 2.66)	0.143
		Recesivo			0.51 (0.11, 2.34)	--	--

¹ Ajustado por edad, sexo, IMC y ancestría

Tabla 4. Asociación entre SNPs y participantes con EHGNA estratificado por sexo (mujeres)

Gen	SNP	Genotipo	N (%)		Crudo OR (IC 95%)	Ajustado OR (IC95%) ¹
			Casos	Controles		
PNPLA3	rs738409	GG	60 (45.1)	117 (28.1)	1.00	1.00
		CG	56 (42.1)	208 (50.0)	1.89 (1.23,2.94)	2.56 (1.43,4.54)
		CC	17 (12.8)	91 (21.8)	2.78 (1.49,5.0)	3.33 (1.43,7.70)
		Alélico			1.72 (1.28, 2.29)	2.01 (1.34, 3.03)
		Dominante			1.91 (1.09, 3.34)	1.95 (0.89, 4.26)
NCAN	rs2228603	Recesivo			2.10 (1.40, 3.14)	2.71 (1.57, 4.67)
		CC	121 (91.0)	394 (94.5)	1.00	1.00
		CT	10 (7.5)	18 (4.3)	1.81 (0.81, 4.02)	1.27 (0.37, 4.27)
		TT	0 (0.0)	0 (0.0)	--	--
		Alélico			1.81 (0.81, 4.02)	1.27 (0.37, 4.27)
LYPLA1	rs12137855	Dominante			1.81 (0.81, 4.02)	1.27 (0.37, 4.27)
		Recesivo			--	--
		CC	94 (70.7)	336 (80.6)	1.00	1.00
		CT	33 (24.8)	76 (18.2)	1.56 (0.97, 2.48)	1.20 (0.62, 2.35)
		TT	4 (3.0)	3 (0.7)	4.77 (1.05, 21.67)	4.30 (0.72, 25.87)
GCKR	rs780094	Alélico			1.70 (1.13, 2.55)	1.45 (0.83, 2.51)
		Dominante			1.67 (1.06, 2.63)	1.36 (0.72, 2.56)
		Recesivo			4.33 (0.96, 19.58)	4.13 (0.69, 24.68)
		GG	53 (39.9)	197 (47.2)	1.00	1.00
		AG	64 (48.1)	166 (39.8)	1.43 (0.94, 2.18)	1.58 (0.90, 2.78)
PPP1R3B	rs4240624	AA	15 (11.3)	46 (11.0)	1.21 (0.63, 2.34)	2.06 (0.93, 4.58)
		Alélico			1.19 (0.89, 1.59)	1.47 (1.01, 2.13)
		Dominante			1.39 (0.93, 2.06)	1.67 (0.98, 2.86)
		Recesivo			1.01 (0.54, 1.88)	1.61 (0.78, 3.34)
		AA	65 (48.9)	232 (55.6)	1.00	1.00
IRS1	rs2943634	AG	54 (40.6)	152 (36.5)	1.27 (0.84, 1.92)	1.09 (0.62, 1.92)
		GG	13 (9.8)	24 (5.8)	1.93 (0.93, 4.00)	2.04 (0.86, 4.84)
		Alélico			1.34 (0.98, 1.82)	1.30 (0.88, 1.93)
		Dominante			1.36 (0.92, 2.01)	1.25 (0.74, 2.10)
		Recesivo			1.75 (0.86, 3.54)	1.97 (0.86, 4.52)
IRS1	rs2972146	CC	91 (68.4)	293 (70.3)	1.00	1.00
		AC	38 (28.6)	106 (25.4)	1.15 (0.74, 1.79)	1.42 (0.80, 2.52)
		AA	4 (3.0)	13 (3.1)	0.99 (0.32, 3.11)	0.54 (0.06, 4.62)
		Alélico			0.91 (0.64, 1.31)	0.84 (0.51, 1.38)
		Dominante			1.05 (0.34, 3.28)	2.07 (0.24, 17.64)
PPARG	rs1801282	Recesivo			0.88 (0.58, 1.34)	0.75 (0.43, 1.31)
		CC	7 (5.3)	13 (3.1)	1.00	1.00
		AC	37 (27.8)	111 (26.6)	0.62 (0.23, 1.67)	1.72 (0.33, 8.98)
		AA	89 (66.9)	281 (67.4)	0.59 (0.23, 1.52)	1.41 (0.28, 7.06)
		Alélico			0.86 (0.61, 1.22)	0.94 (0.58, 1.52)
ADIPOR2	rs767870	Dominante			0.60 (0.23, 1.53)	1.49 (0.30, 7.37)
		Recesivo			0.89 (0.59, 1.36)	0.87 (0.49, 1.53)
		CC	93 (69.9)	312 (74.8)	1.00	1.00
		CG	36 (27.1)	87 (20.9)	1.39 (0.88, 2.18)	1.45 (0.79, 2.65)
		GG	2 (1.5)	11 (2.6)	0.61 (0.13, 2.80)	1.13 (0.22, 5.71)
ADIPOR2	rs767870	Alélico			1.17 (0.80, 1.71)	1.29 (0.79, 2.12)
		Dominante			1.30 (0.84, 2.02)	1.41 (0.79, 2.53)
		Recesivo			0.56 (0.12, 2.57)	1.03 (0.21, 5.16)
		CC	105 (79.0)	330 (79.1)	1.00	1.00
		CT	26 (19.6)	74 (17.8)	1.10 (0.67, 1.82)	1.69 (0.87, 3.31)
ADIPOR2	rs767870	TT	2 (1.5)	8 (1.9)	0.79 (0.16, 3.76)	--
		Alélico			1.03 (0.68, 1.58)	1.44 (0.78, 2.69)
		Dominante			1.07 (0.66, 1.74)	1.60 (0.82, 3.11)
		Recesivo			0.77 (0.16, 3.68)	--

¹ Ajustado por edad, sexo, IMC y ancestría

Tabla 5. Asociación entre SNPs y EHGNA estratificado por IMC. (participantes con sobrepeso y obesidad)

Gen	SNP	Genotipo	N (%)		Crudo OR (IC 95%)	Ajustado OR (IC95%) ¹
			Casos	Controles		
<i>PNPLA3</i>	rs738409	GG	74 (42.5)	100 (29.5)	1.00	1.00
		CG	76 (43.7)	171 (50.4)	1.67 (1.11,2.5)	1.75 (1.13,2.63)
		CC	24 (13.8)	68 (20.1)	2.13 (1.20,3.70)	2.22 (1.25,4.00)
		Alélico			1.50 (1.14, 1.96)	1.49 (1.04, 2.13)
<i>NCAN</i>	rs2228603	Dominante			1.56 (0.94, 2.59)	1.49 (0.76, 2.92)
		Recesivo			1.79 (1.22, 2.62)	1.79 (1.09, 2.94)
		CC	157 (91.3)	325 (96.7)	1.00	1.00
		CT	14 (8.1)	11 (3.3)	2.63 (1.17, 5.93)	2.56 (1.08, 6.05)
		TT	1 (0.6)	0 (0.0)	(omitted)	(omitted)
		Alélico			2.82 (1.30, 6.13)	2.68 (1.17, 6.15)
<i>LYPLA1</i>	rs12137855	Dominante			2.82 (1.27, 6.29)	2.69 (1.15, 6.29)
		Recesivo			(omitted)	(omitted)
		CC	123 (71.5)	275 (81.4)	1.00	1.00
		CT	41 (23.8)	60 (17.8)	1.52 (0.97, 2.40)	1.50 (0.93, 2.41)
		TT	8 (4.7)	3 (0.9)	5.96 (1.56, 22.85)	4.53 (1.11, 18.41)
		Alélico			1.78 (1.22, 2.58)	1.68 (1.13, 2.49)
<i>GCKR</i>	rs780094	Dominante			1.73 (1.13, 2.67)	1.67 (1.05, 2.62)
		Recesivo			5.44 (1.42, 20.80)	4.16 (1.03, 16.84)
		GG	64 (37.4)	157 (47.0)	1.00	1.00
		AG	88 (51.5)	140 (41.9)	1.54 (1.03, 2.29)	1.56 (1.03, 2.35)
		AA	19 (11.1)	37 (11.1)	1.26 (0.67, 2.35)	1.22 (0.64, 2.33)
		Alélico			1.24 (0.94, 1.64)	1.23 (0.92, 1.64)
<i>PPP1R3B</i>	rs4240624	Dominante			1.48 (1.02, 2.16)	1.00 (1.00, 2.20)
		Recesivo			1.00 (0.56, 1.80)	0.97 (0.53, 1.78)
		AA	80 (46.8)	185 (55.9)	1.00	1.00
		AG	67 (39.2)	117 (35.5)	1.32 (0.88, 1.97)	1.23 (0.81, 1.86)
		GG	24 (14.0)	29 (8.8)	1.91 (1.05, 3.50)	1.69 (0.91, 3.15)
		Alélico			1.36 (1.04, 1.79)	1.27 (0.96, 1.69)
<i>IRS1</i>	rs2943634	Dominante			1.44 (0.99, 2.09)	1.32 (0.90, 1.94)
		Recesivo			1.70 (0.95, 3.02)	1.54 (0.85, 2.81)
		CC	1 (0.6)	12 (3.6)	1.00	1.00
		AC	46 (26.4)	76 (22.7)	7.26 (0.91, 57.70)	7.54 (0.92, 61.94)
		AA	127 (73.0)	247 (73.7)	6.17 (0.79, 47.99)	6.46 (0.80, 51.90)
		Alélico			1.09 (0.76, 1.58)	1.11 (0.76, 1.62)
<i>IRS1</i>	rs2972146	Dominante			6.43 (0.83, 49.84)	6.73 (0.84, 53.92)
		Recesivo			0.96 (0.64, 1.46)	0.97 (0.63, 1.49)
		CC	6 (3.5)	11 (3.4)	1.00	1.00
		AC	43 (24.7)	80 (24.5)	0.99 (0.34, 2.85)	0.86 (0.28, 2.60)
		AA	125 (71.8)	236 (72.2)	0.97 (0.35, 2.69)	0.85 (0.29, 2.44)
		Alélico			0.99 (0.70, 1.39)	0.96 (0.67, 1.37)
<i>PPARG</i>	rs1801282	Dominante			0.97 (0.35, 2.68)	0.85 (0.30, 2.44)
		Recesivo			0.98 (0.65, 1.48)	0.96 (0.63, 1.48)
		CC	127 (73.8)	256 (76.9)	1.00	1.00
		CG	42 (24.4)	69 (20.7)	1.22 (0.79, 1.90)	1.30 (0.82, 2.05)
		GG	3 (1.74)	8 (2.4)	0.76 (0.20, 2.90)	0.76 (0.18, 3.07)
		Alélico			1.10 (0.76, 1.60)	1.15 (0.80, 1.70)
<i>ADIPOR2</i>	rs767870	Dominante			1.17 (0.77, 1.80)	1.24 (0.80, 1.94)
		Recesivo			0.72 (0.19, 2.75)	0.71 (0.18, 2.87)
		CC	135 (78.0)	275 (82.1)	1.00	1.00
		CT	37 (21.4)	53 (15.8)	1.42 (0.89, 2.27)	1.46 (0.90, 2.39)
		TT	1 (0.6)	7 (2.1)	0.29 (0.04, 2.39)	0.34 (0.04, 2.86)
		Alélico			1.13 (0.76, 1.71)	1.18 (0.77, 1.80)
			1.29 (0.81, 2.03)	1.34 (0.83, 2.15)		
			0.27 (0.03, 2.23)	0.32 (0.04, 2.66)		

Ajustado por edad, sexo, IMC y ancestría

Tabla 6. Asociación del genotipo con EHGNA en la población de estudio

PNPLA3 M148M	I148I n (%)	I148M n (%)	M148M n (%)	p
<i>Todos (n=741)</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	27 (13)	90 (43.5)	90 (43.5)	0.000333
Controles ALT < 40 U/L	107 (20)	265 (49.6)	161 (30.1)	OR=1.9 (1.33-2.69)
<i>Hombres</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	10 (13.5)	34 (45.9)	30 (40.5)	0.512
Controles ALT < 40 U/L	17 (14.5)	56 (47.9)	44 (37.6)	
<i>Mujeres</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	17 (12.8)	56 (42.1)	60 (45.1)	0.000094
Controles ALT < 40 U/L	90 (21.6)	209 (50.1)	117 (28.1)	OR= 2.3 (1.51-3.5)

NCAN Pro92Ser	P92P n (%)	P92S n (%)	S92S n (%)	p
<i>Todos (n=741)</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	187 (90.3)	17 (8.2)	1 (0.5)	0.020
Controles ALT < 40 U/L	506 (94.8)	22 (4.1)	0 (0.0)	OR=2.290 (1.14-4.6)
<i>Hombres</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	66 (89.2)	7 (9.5)	1 (1.4)	.131
Controles ALT < 40 U/L	112 (95.7)	4 (3.4)	0 (0.0)	
<i>Mujeres</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	121 (91.0)	10 (7.5)	2 (1.5)	.110
Controles ALT < 40 U/L	394 (94.5)	18 (4.3)	5 (1.2)	

LYPLA1 C>T	CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)	p
<i>Todos (n=741)</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	150 (72.5)	47 (22.7)	8 (3.9)	0.062
Controles ALT < 40 U/L	430 (80.5)	97 (18.2)	5 (0.9)	
<i>Hombres</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	56 (75.7)	14 (18.9)	4 (5.4)	0.929
Controles ALT < 40 U/L	94 (80.3)	21 (17.9)	2 (1.7)	
<i>Mujeres</i>				
Casos ALT ≥ 40 U/L	94 (70.7)	33 (24.8)	4 (3.0)	0.048
Controles ALT < 40 U/L	336 (80.6)	76 (18.2)	3 (0.7)	OR=1.6 (1.004-2.56)

ALT: Alanino transaminasa.

El valor de p fue calculado por regresión logística múltiple ajustado por edad, sexo e IMC.

Se hizo el análisis bajo el Modelo Dominante.

Para concluir se realizó lo que denominamos “*Análisis Estadístico 2*” en el que analizamos rs738409 en *PNPLA3* en toda la población, a fin de analizar las consecuencias de contar con: a) ninguna copia del alelo de riesgo I148I; b) una copia del alelo de riesgo (I148M), y c) dos copias del alelo de riesgo (M148M). Inicialmente se consideró el valor de ALT en forma de gradiente y posteriormente se estratificó por categorías de IMC (peso normal, sobrepeso y obesidad) y por sexo.

En el grupo con IMC normal no se encontró evidencia de este gradiente, pero sí si se encontró en las mujeres con sobrepeso y obesidad $p=0.002$ y 0.007 respectivamente.

Análisis Estadístico 2

A partir de aquí se hace un estudio transversal para ver el gradiente de niveles de ALT

Tabl 7. Niveles de Alanina Transaminasa en toda la población de estudio de acuerdo al genotipo I148M de *PNPLA3* estratificado por

Normal				
N=227	42 (18.5)	108 (47.6)	77 (33.9)	
ALT (U/L)	19.0 (15.5–25)	17 (13.2–21)	19 (15–31)	0.082
<i>Hombres</i>	19 (19–)	17 (14–23.5)	20.5 (16.2–31.7)	0.620
<i>Mujeres</i>	19 (14.75–25.2)	17 (13–20)	18 (14–31)	0.098
ALT ≥ 40 U/L (%)	3 (9.1)	14 (42.4)	16 (48.5)	0.060†
<i>Hombres</i>	0 (0.0)	5 (55.6)	4 (44.4)	0.804†
<i>Mujeres</i>	3 (12.5)	9 (37.5)	12 (50.0)	0.041†
Sobrepeso				
N=331	55 (16.6)	155 (46.8)	121 (36.6)	
ALT (U/L)	20 (15–26.5)	19 (16–31)	25 (19–42)	0.107
<i>Hombres</i>	23 (16–41)	25 (18–44)	28 (21–56)	0.712
<i>Mujeres</i>	19 (14–23)	18 (15.2–25)	25 (18.7–39.2)	0.105
ALT ≥ 40 U/L (%)	11 (11.6)	37 (38.9)	47 (49.5)	0.004†
<i>Hombres</i>	5 (12.8)	16 (41.0)	18 (46.2)	0.586†
<i>Mujeres</i>	6 (10.7)	21 (37.5)	29 (51.8)	0.002†
Obesos				
N=180	37 (20.6)	90 (50)	53 (29.4)	
ALT (U/L)	23 (16–49)	25 (17.5–39)	26 (22–47)	0.040
				B=6.8
<i>Hombres</i>	45 (25–65)	41 (33–56)	32 (21.2–44.2)	0.432
<i>Mujeres</i>	20 (15–30)	23 (17–34.5)	26 (21.5–47.5)	0.007
				B=9.97
ALT ≥ 40 U/L (%)	13 (16.7)	38 (48.7)	27 (34.6)	0.191†
<i>Hombres</i>	5 (19.2)	13 (50.0)	8 (30.8)	0.819†
<i>Mujeres</i>	8 (15.4)	25 (48.1)	19 (36.5)	0.109†

Los datos son medianas (rango intercuartil) o n (%).

ALT: Alanino transaminasa

Los valores *p fueron calculados por regresión lineal y ajustado por sexo, edad e IMC.

Los valores p† se calcularon con regresión logística múltiple bajo el modelo recesivo ajustando por edad.

XI. Discusión

Como hemos visto la EHGNA es una enfermedad de alta prevalencia en poblaciones de Europa. En la población mexicana según encuestas nacionales de salud la colocan como una enfermedad de alta prevalencia y se perfila como un problema de salud pública en el siglo XXI⁸⁷. A la fecha existen pocos estudios encaminados a la caracterización genética de esta enfermedad.

En este estudio de casos y controles anidado en una cohorte seleccionamos 9 SNPs localizados en los genes: IRS1, PNPLA3, GCKR, PPP1R3B, PPARG, LYPLA1, ADIPOR2, NCAN previamente descritos asociados en al menos dos poblaciones con la EHGNA. Y examinamos estas variaciones en población del altiplano mexicano.

Uno de los genes previamente asociados en una población del centro del país (distrito federal), fue el gen *PNPLA3*. Este gen se expresa principalmente en la membrana intracelular de los hepatocitos durante la lipogénesis así como cuando existe resistencia a la insulina¹⁰². Aunque no se conoce del todo la fisiología de *PNPLA3* se sabe que guarda homología con la actividad de la lipasa de TG¹⁰⁰ y que su expresión está regulada por el consumo de energía¹⁰⁰. El polimorfismo de *PNPLA3* rs738409 es el más ampliamente estudiado resulta en una sustitución de un aminoácido isoleucina por una metionina que reduce el acceso y actividad enzimática a lípidos que altera el contenido hepático de TG y provocando esteatosis macrovesicular⁷⁷ que da gran susceptibilidad a padecer EHGNA^{56,43,101}.

De acuerdo con Romeo et al. que ha explorado este polimorfismo con esteatosis hepática en individuos de distintas ancestrías, ha encontrado que los hispanos son el grupo con mayor predisposición para presentar EHGNA como lo confirma que nuestro estudio ha encontrado una frecuencia alélica del alelo G de casi 58% la prevalencia más alta reportada en población mestiza. Y que comparando los homocigotos para CC, los heterocigotos CG y los homocigotos GG va aumentando el riesgo de padecer la enfermedad por el número de copias presentes. Estos datos también corresponden con los previamente reportados

junto con las variantes en *NCAN*, *LYPLA1* y *GCKR* por Speliotes y Hernaez^{43,90} en mexicanos residentes en EEUU.

En nuestra población (Edo de Morelos), la frecuencia es bastante similar en todas las poblaciones analizadas, sin embargo nosotros observamos un riesgo mayor en las mujeres, probablemente debido a que es un grupo poblacional que es más activo en campañas de salud y en el autocuidado. Es de resaltar que las prevalencias encontradas en nuestra población fueron más altas que otras reportadas en población mexicana, debido probablemente al componente indígena presente

Por otro lado, la proteína de *NCAN*, neurocan por sí sola no se ha encontrado que se exprese en el hígado o que afecte directamente el metabolismo de los lípidos pero se reconoce cada vez más su importancia como regulador de glucosa periférica y metabolismo de lípidos en el sistema nervioso central. Se ha demostrado que después de estimulación vagal aumenta la secreción hepática de VLDL y TG¹⁰³. De esta forma desde que se asoció la variante rs2228603 con esteatosis hepática y con niveles de TG^{43,82}. Es plausible biológicamente que exista una relación entre el cerebro y el hígado que aumente el riesgo de EHGNA. Se requieren estudios adicionales para poder comprender del todo este fenómeno.

LYPLA1 codifica una enzima que está poco conocida y caracterizada, que se conoce su función como oncogén y mediador de inflamación en fibroblastos⁸⁷ y que se ha asociado con esteatosis hepática^{43,88}. Corroboramos estos resultados en nuestro estudio siendo además el OR más alto reportado hasta ahora reportado en la literatura en participantes con sobrepeso y obesos.

Los polimorfismos en la región de *GCKR* se identificaron al principio con niveles de triglicéridos por GWAS^{90,104}, y los alelos descritos que aumentaban los niveles de TG se encontró que alteraban a su vez los niveles de glucosa, los niveles de insulina y de resistencia a la insulina en diferentes estudios⁸². Sin embargo la variante rs780094 reportó asociación con esteatosis hepática y altos niveles séricos de ALT⁹⁰. La asociación de dicho SNP con niveles de glucosa, insulina y

resistencia a la insulina y riesgo de DM2 ha sido inconsistente, entre algunas poblaciones no se encuentra esta asociación¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ y algunas veces si^{106,107,109}. Esta inconsistencia de resultados reportada puede deberse a componentes genéticos y estilos de vida entre hispanos, asiaticos y europeos. En nuestro estudio el alelo T de rs780094 incrementó el riesgo de padecer EHGNA en los portadores en una forma muy discreta. Para comprender el metabolismo de glucosa y lípidos por esta vía, será necesario analizar variantes en *GCKR* en relación con el metabolismo de TG y glucosa en estudios longitudinales y tamaños de muestras mayores para ver dicho efecto de forma más clara.

Hasta donde sabemos este es el primer estudio realizado en la población mexicana donde se estudia el efecto de múltiples variantes en o cerca de *PNPLA3* (rs738409), *GCKR* (rs780094), *IRS1* (rs2943634, rs2972146), *LYPLA1* (rs12137855), *NCAN* (rs22286032), *PPP1R3B* (rs4240624), *PPARG* (rs1801282) y *ADIPOR2* (rs767870) que se han asociado con esteatosis hepática en población enteramente mestiza hispana brindando una buena aproximación de las prevalencias reales de los alelos de riesgo de dichas variantes en la región central de México siendo además el primer estudio que analiza estos polimorfismos con la cronicidad de la elevación de las enzimas hepáticas.

Entre las limitaciones del estudio, es que nno se contó con biopsia ni diagnóstico ultrasonográfico de todos los individuos **pudiendo ser esta una debilidad del estudio**. Además, realizamos medición de enzimas hepáticas como medición indirecta del daño hepático derivado de inclusiones de grasa en el hepatocito siendo una forma bien aceptada de diagnóstico en población abierta que está bajo seguimiento donde no se pueden realizar pruebas diagnósticas más complejas o invasivas que representan un riesgo innecesario para los participantes.

Por otro lado, dentro de las fortalezas, el diagnóstico se realizó midiendo las enzimas hepáticas de forma continua realizando mediciones a los participantes cada 6 meses teniendo seguimientos de 3 a 9 años brindando una herramienta diagnostica excelente para la selección de casos ya que los casos eran obtenidos de una cohorte de participantes con enzimas hepáticas persistentemente

alteradas. a diferencia de otros en este son participantes que no han sido extraídos de una encuesta o de un ambiente hospitalario sino que son extraídos de una cohorte donde los pacientes han tenido seguimiento junto con sus familias teniendo información de residencia de incluso 3 generaciones.

Aunque se encontró de inicio diferencias valores antropométricos y bioquímicos entre los grupos de casos y de controles estas diferencias podrían ser atribuidas a la enfermedad como son los valores bioquímicos, que además se espera que sean diferentes ya que ese fue precisamente el criterio de inclusión. La edad aunque es diferente cabe mencionar que al ser los casos 3 años en promedio más jóvenes que los controles, esta diferencia de tres años carece de relevancia clínica y aun así los análisis estadísticos fueron controlados además por esta variable.

Aunque la frecuencia de diversos alelos se observó más alta en la población masculina es interesante que la asociación fue más significativa en el grupo de las mujeres probablemente por contar este grupo con un tamaño de muestra mayor.

La razón de esta diferencia en genero se debe a que el sexo femenino es sabido que es de más afluencia a campañas de salud y en el autocuidado con respecto al género masculino, recalcando que este grupo también tiene mayores conductas de riesgo en consumo de alcohol y sustancias hepatotóxicas y pudo haber sufrido una autoselección negativa. Siendo estos resultados consistentes con las diferencias encontradas por sexo en valores de ALT y AST encontrados por Sookoian y Pirola⁷².

XII. Conclusiones

Esta es la primera vez que se explora la frecuencia y su relación de estos 9 polimorfismos con enzimas hepáticas alteradas y EHGNA en población del altiplano mexicano. Encontrado frecuencias alélicas que no se habían reportado en población mexicana donde la variación de *LYPLA1* tiene una de las frecuencias alélicas más bajas y la de *PNPLA3* junto con las dos variaciones de *IRS1* de las

más altas reportadas⁹⁷ probablemente por el componente indígena de nuestra población. Por lo que se sugiere que la EHGNA y en particular, los valores elevados de ALT son mayores en la población mestiza mexicana por el componente indígena presente aún después del mestizaje.

Nuestro estudio confirma la asociación de 4 SNPs en población mestiza mexicana indicando que los individuos portadores del alelo G de rs738409, el alelo T de rs2228603, el alelo T de rs12137855 y el alelo A de rs780094 los predisponen para padecer EHGNA.

Es importante recalcar que al no contar con estudios de imagen para hacer un diagnóstico más fino de la enfermedad pudimos haber pasado por alto aquellos casos con valores de enzimas hepáticas normales por lo que estas asociaciones que reportamos podrían ser incluso mayores

Los estudios de asociación genética en años recientes han identificado satisfactoriamente diversos *loci* que confieren riesgo para enfermedades complejas tal es el caso de la EHGNA. Entender las rutas biológicas y metabólicas del todo para comprender la enfermedad desde el punto fenotipo-genotipo es todavía un gran reto y es aún una tarea más ardua traducir estos hallazgos a la práctica clínica.

Nuestros hallazgos demuestran que hay influencias genéticas específicas en el desarrollo de EHGNA y esto sugiere que combinado con factores ambientales las variaciones genéticas influyen en el desarrollo de EHGNA.

XIII. Referencias

1. Alfaradhi MZ1, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Musial B, Fowden AL, Ozanne SE. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Apr 30.
2. Larter CZ1, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Apr;25(4):672-90.
3. Loomba, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Nov;10(11):686-90.
4. Chalasani et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease; practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American Colleague of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **55** 2005-2023 (2012).
5. Clark JM1, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2003 May;98(5):960-7.
6. Welsh JA1, Karpen S, Vos MB. Increasing prevalence of nonalcoholic fatty liver disease among United States adolescents, 1988-1994 to 2007-2010. *J Pediatr*. 2013 Mar;162(3):496-500.e1.
7. Li YM1, Fan JG, Wang BY, Lu LG, Shi JP, Niu JQ, Shen W; Chinese Association for the Study of Liver Disease. Guidelines for the diagnosis and management of alcoholic liver disease: update 2010: (published in Chinese on Chinese Journal of Hepatology 2010; 18: 167-170). *J Dig Dis*. 2011 Feb;12(1):45-50.
8. Farrell GC1, Wong VW, Chitturi S. NAFLD in Asia--as common and important as in the West. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 May;10(5):307-18.
9. Das K, et al Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease. *Hepatology*. 2010 May;51(5):1593-602.
10. López-Velázquez JA1, et al. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann Hepatol*. 2014 Mar-Apr;13(2):166-78.
11. Aballay LR1, Eynard AR, Díaz Mdel P, Navarro A, Muñoz SE. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr Rev*. 2013 Mar;71(3):168-79.
12. Rivera JA1, Barquera S, González-Cossío T, Olaiz G, Sepúlveda J. Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr Rev*. 2004 Jul;62(7 Pt 2):S149-57.
13. Wanless IR1, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*. 1990 Nov;12(5):1106-10.
14. Organización para la cooperación y Desarrollo Economico Paris, Francia 2014 consultado el 3 de Febrero de 2014 Disponible en: <http://www.oecd.org/>
15. Lizardi-Cervera J1, Laparra DI, Chávez-Tapia NC, Ostos ME, Esquivel MU. [Prevalence of NAFLD and metabolic syndrome in asymptomatic subjects]. *Rev Gastroenterol Mex*. 2006 Oct-Dec;71(4):453-9.
16. Roesch-Dietlen F1, et al. [Frequency of NAFLD in a group of patients with metabolic syndrome in Veracruz, Mexico]. *Rev Gastroenterol Mex*. 2006 Oct-Dec;71(4):446-52.

17. Castro-Martínez MG¹, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in subjects with metabolic syndrome. *Cir Cir*. 2012 Mar-Apr;80(2):128-33.
18. Gutierrez-Grobe Y1, Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. *Ann Hepatol*. 2010 Oct-Dec;9(4):402-9.
19. Rojas R. et al. Metabolic syndrome in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex*. 2010;52 Suppl 1:S11-8.
20. Brunt EM. Et al. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens. *Hum Pathol*. 2004 Sep;35(9):1070-82.
21. Adams LA. Et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):113-21.
22. Ertle J. et al. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer*. 2011 May 15;128(10):2436-43.
23. Lazo M. & Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis*. 2008 Nov;28(4):339-50.
24. Mahady SE¹, George J. Management of nonalcoholic steatohepatitis: an evidence-based approach. *Clin Liver Dis*. 2012 Aug;16(3):631-45.
25. Zimmermann R. et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. 2004 Nov 19;306(5700):1383-6.
26. Böhm T. et al. Food-derived peroxidized fatty acids may trigger hepatic inflammation: a novel hypothesis to explain steatohepatitis. *J Hepatol*. 2013 Sep;59(3):563-70.
27. Ramsden CE et al. Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2012 Oct-Nov;87(4-5):135-41.
28. Tilg H¹, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010 Nov;52(5):1836-46.
29. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V, et al. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20314-26.
30. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20704-28.
31. Wree A¹, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Nov;10(11):627-36.
32. Kral JG¹, Schaffner F, Pierson RN Jr, Wang J. Body fat topography as an independent predictor of fatty liver. *Metabolism*. 1993 May;42(5):548-51.
33. Marceau P¹, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 May;84(5):1513-7.
34. Timar O¹, Sestier F, Levy E. Metabolic syndrome X: a review. *Can J Cardiol*. 2000 Jun;16(6):779-89.

35. Cortez-Pinto H1, Jesus L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clin Nutr.* 2006 Oct;25(5):816-23. Epub 2006 May 4.
36. Das UN. Biological significance of essential fatty acids. *J Assoc Physicians India.* 2006 Apr;54:309-19.
37. Lê KA1, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2009 Jun;89(6):1760-5.
38. Neuschwander-Tetri BA. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013 Jul;16(4):446-52.
39. Hirschhorn JN1, Gajdos ZK. Genome-wide association studies: results from the first few years and potential implications for clinical medicine. *Annu Rev Med.* 2011;62:11-24.
40. Anstee QM1, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013 Nov;10(11):645-55.
41. Wang WY1, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet.* 2005 Feb;6(2):109-18.
42. Lim JS1, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 May;7(5):251-64.
43. Speliotes EK, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet.* 2011 Mar;7(3):e1001324.
44. Browning JD1, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004 Dec;40(6):1387-95.
45. Acuña-Alonzo V1, Flores-Dorantes T, Kruit JK, et al. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Hum Mol Genet.* 2010 Jul 15;19(14):2877-85.
46. Yuan X1, Waterworth D, Perry JR Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am J Hum Genet.* 2008 Oct;83(4):520-8.
47. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;449:851-861.
48. Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C, Bacot F, Balkau B, Belisle A, Borch-Johnsen K, et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 2009;41(10):1110-5.
49. Harrap SB, Zammit KS, Wong ZY, et al. Genome-wide linkage analysis of the acute coronary syndrome suggests a locus on chromosome 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:874-8.

50. Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 2009;41:1110–5.
51. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010;42:579–89.
52. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010;466:707–13.
53. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005;437:1299–1320.
54. Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med.* 2009;360:1759–1768.
55. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447:661–678.
56. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40:1461–1465.
57. Romeo S, Sentinelli F, Cambuli VM, Incani M, Congiu T, Matta V, Pilia S, Huang-Doran I, Cossu E, Loche S, et al. The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. *J Hepatol.* 2010;53:335–338.
58. Valenti L, Alisi A, Galmozzi E, Bartuli A, Del Menico B, Alterio A, Dongiovanni P, Fargion S, Nobili V. I148M patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene variant and severity of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;52:1274–1280.
59. Santoro N, Kursawe R, D’Adamo E, Dykas DJ, Zhang CK, Bale AE, Calí AM, Narayan D, Shaw MM, Pierpont B, et al. A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology.* 2010;52:1281–1290.
60. Tan LJ, Zhu H, He H, Wu KH, Li J, Chen XD, Zhang JG, Shen H, Tian Q, Krousel-Wood M, Papasian CJ, Bouchard C, Pérusse L, Deng HW. Replication of 6 obesity genes in a meta-analysis of genome-wide association studies from diverse ancestries. *PLoS One.* 2014 May 30;9(5):e96149.
61. Chen G1, Bentley A, Adeyemo A, Shriner D, Zhou J, Doumatey A, Huang H, Ramos E, Erdos M, Gerry N, Herbert A, Christman M, Rotimi C. Genome-wide association study identifies novel loci association with fasting insulin and insulin resistance in African Americans. *Hum Mol Genet.* 2012 Oct 15;21(20):4530–6. Epub 2012 Jul 12.
62. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1313–21.
63. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003;37:909–916.
64. Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Järvinen H. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:2804–2809.

65. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, Pigeyre M, Verkindt H, Dharancy S, Louvet A, et al. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology*. 2009;137:532–540.
66. Furuya CK, de Oliveira CP, de Mello ES, Faintuch J, Raskovski A, Matsuda M, Vezozzo DC, Halpern A, Garrido AB, Alves VA, et al. Effects of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: preliminary findings after 2 years. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:510–514.
67. Chen G, Bentley A, Adeyemo A, Shriner D, Zhou J, Doumatey A, Huang H, Ramos E, Erdos M, Gerry N, Herbert A, Christman M, Rotimi C. Genome-wide association study identifies novel loci association with fasting insulin and insulin resistance in African Americans. *Hum Mol Genet*. 2012 Oct 15;21(20):4530-6. Epub 2012 Jul 12.
68. Alaynick WA. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion*. 2008 Sep;8(4):329-37. doi: 10.1016/j.mito.2008.02.001. Epub 2008 Feb 26
69. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia*. 2002 May;45(5):740-3. Epub 2002 Apr 23.
70. Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res*. 2006 Sep;47(9):1940-9. Epub 2006 Jun 25.
71. Kollerits B, Coassin S, Kiechl S, Hunt SC, Paulweber B, Willeit J, Brandstätter A, Lamina C, Adams TD, Kronenberg F. A common variant in the adiponutrin gene influences liver enzyme values. *J Med Genet*. 2010 Feb;47(2):116-9. doi: 10.1136/jmg.2009.066597. Epub 2009 Jun 18.
72. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011 Jun;53(6):1883-94. doi: 10.1002/hep.24283. Epub 2011 May 14. Review
73. Castera L, Vilgrain V, Angulo P. Noninvasive evaluation of NAFLD *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Nov;10(11):666-75. doi: 10.1038/nrgastro.2013.175. Epub 2013 Sep 24. Review.
74. Kitamoto A, Kitamoto T, Nakamura T, Ogawa Y, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Nakao K, Sekine A, Chayama K, Nakajima A, Hotta K. Association of polymorphisms in GCKR and TRIB1 with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome traits. *Endocr J*. 2014 Jul 30;61(7):683-9. Epub 2014 May 1.
75. Kantartzis K et al. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes*. 2009 Nov;58(11):2616-23.
76. Kantartzis K, Machann J, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. The impact of liver fat vs visceral fat in determining categories of prediabetes. *Diabetologia*. 2010 May;53(5):882-9.

77. Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, et al. (2012) Patatinlike phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J Hepatol* 57: 1276–1282.
78. Rauch U, Feng K, Zhou XH. Neurocan: A brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Nov;58(12–13):1842–1856.
79. Retzler C, Gohring W, Rauch U. Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Biol Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27304–27310.
80. Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 1994 May;125(3):669–680.
81. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):189–197.
82. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):161–169
83. Zhou L, Ding H, Zhang X, He M, Huang S, Xu Y, et al. Genetic variants at newly identified lipid loci are associated with coronary heart disease in a chinese han population. *PLoS One.* 2011;6(11):e27481.
84. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010 Apr;7(4):248–249.
85. Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Poci A, Bhanot S, Tso P, Schwartz GJ, et al. Brain glucose metabolism controls the hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. *Nat Med.* 2007 Feb;13(2):171–180.
86. Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Keogh JM, Sutton GM, et al. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2007 Nov;117(11):3475–3488.
87. Dekker FJ1, Rocks O, et al. Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat Chem Biol.* 2010 Jun;6(6):449–56.
88. Palmer ND1, Musani SK, et al. Characterization of European ancestry nonalcoholic fatty liver disease-associated variants in individuals of African and Hispanic descent. *Hepatology.* 2013 Sep;58(3):966–75. doi: 10.1002/hep.26440. Epub 2013 Jul 16.
89. Dongiovanni P, Valenti L, et al. Genetic variants regulating insulin receptor signalling are associated with the severity of liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2010 Feb;59(2):267–73.
90. Hernaez R, McLean J, Lazo M, Brancati FL, Hirschhorn JN, Borecki IB, Harris TB; Genetics of Obesity-Related Liver Disease (GOLD) Consortium, Nguyen T, Kamel IR, Bonekamp S, Eberhardt MS, Clark JM, Kao WH, Speliotes EK. Association between variants in or near PNPLA3, GCKR, and PPP1R3B with ultrasound-defined steatosis based on data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11:1183–1190.e2.

91. Dunn JS, Mlynarski WM, Pezzolesi MG, Borowiec M, Powers C, Krolewski AS, Doria A. Examination of PPP1R3B as a candidate gene for the type 2 diabetes and MODY loci on chromosome 8p23. *Ann Hum Genet.* 2006 Sep;70(Pt 5):587-93.
92. Beaven SW, Tontonoz P. Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. *Annual Review of Medicine.* 2006;57:313-329.
93. Wu Z, Rosen ED, Brun R, et al. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular Cell.* 1999;3(2):151-158.
94. Dongiovanni P, Valenti L. Peroxisome proliferator-activated receptor genetic polymorphisms and nonalcoholic Fatty liver disease: any role in disease susceptibility? *PPAR Res.* 2013;2013:452061.
95. Kotronen A, et al. Genetic variation in the ADIPOR2 gene is associated with liver fat content and its surrogate markers in three independent cohorts. *Eur J Endocrinol.* 2009 Apr;160(4):593-602.
96. <http://www.genecards.org>
97. <http://browser.1000genomes.org/index.html>
98. Case-Control Studies: Design, Conduct, Analysis. de James J. Schlesselman.
99. Fundamentos de Epidemiología Mauricio Hernandez
100. Rae-Whitcombe SM, Kennedy D, Voyles M, Thompson MP (2010) Regulation of the promoter region of the human adiponutrin/PNPLA3 gene by glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 402: 767-772.
101. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, et al. (2010) A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 285: 6706-6715.
102. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, et al. (2010) A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7892-7897.
103. Robertson MD, Mason AO, Frayn KN. Timing of vagal stimulation affects postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002 Jul;76(1):71-77.
104. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, et al. (2007) Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316: 1331-1336.
105. Larrieta-Carrasco E, et al. PNPLA3 I148M polymorphism is associated with elevated alanine transaminase levels in Mexican Indigenous and Mestizo populations. *Mol Biol Rep.* 2014 Jul;41(7):4705-11.
106. Ling Y, Li X, Gu Q, Chen H, Lu D, et al. (2011) Associations of common polymorphisms in GCKR with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population: a case-control study. *BMC Med Genet*12: 66.
107. Tam CH, Ma RC, So WY, Wang Y, Lam VK, et al. (2009) Interaction effect of genetic polymorphisms in glucokinase (GCK) and glucokinase regulatory protein (GCKR) on metabolic traits in healthy Chinese adults and adolescents. *Diabetes* 58: 765-769
108. Qi Q, Wu Y, Li H, Loos RJ, Hu FB, et al. (2009) Association of GCKR rs780094, alone or in combination with GCK rs1799884, with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population. *Diabetologia* 52: 834-843

109. Wen J, Ronn T, Olsson A, Yang Z, Lu B, et al. (2010) Investigation of type 2 diabetes risk alleles support CDKN2A/B, CDKAL1, and TCF7L2 as susceptibility genes in a Han Chinese cohort. PLoS One 5: e9153.