



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado**

**Petróleos Mexicanos
Dirección Corporativa de Administración
Subdirección de Servicios de Salud
Gerencia de Servicios Médicos**



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

**“RELACIÓN DE POLIMORFISMOS PNPLA3, GCKR Y NCAN CON
HIGADO GRASO Y GROSOR DE ÍNTIMA MEDIA CAROTÍDEA EN
PACIENTES ADULTOS CON DIABETES MELLITUS 2”**

TESIS DE POSGRADO

**PARA OBTENER EL GRADO DE MÉDICO ESPECIALISTA EN
MEDICINA INTERNA**

PRESENTA:

DRA. KARINA ORDAZ LÓPEZ

**TUTOR: DR. MARTÍN CORONADO MALAGÓN
ASESOR DE TESIS: DR. CÉSAR ALEJANDRO ARCE SALINAS
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD**

CIUDAD DE MÉXICO JULIO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
División de Estudios de Posgrado
Petróleos Mexicanos
Dirección Corporativa de Administración
Subdirección de Servicios de Salud
Gerencia de Servicios Médicos
Hospital Central Sur de Alta Especialidad

**“Relación de polimorfismos PNPLA3, GCKR y NCAN con Hígado graso
y grosor de íntima media carotídea en pacientes adultos con Diabetes
Mellitus 2”**

Tutor: Dr. Martín Coronado Malagón
Asesor de Tesis: Dr. César Alejandro Arce Salinas
Hospital Central Sur de Alta Especialidad

Ciudad de México; Julio 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA
ESPECIALIDAD .**

**“RELACIÓN DE POLIMORFISMOS PNPLA3, GCKR,
Y NCAN CON HIGADO GRASO Y GROSOR DE
INTIMA MEDIA CAROTÍDEA EN PACIENTES
ADULTOS CON DIABETES MELLITUS 2”**

**TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**P R E S E N T A
DRA. KARINA ORDAZ LÓPEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARTÍN CORONADO MALAGÓN**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO:
DR. CÉSAR ALEJANDRO ARCE SALINAS.**

Ciudad Universitaria

agosto 2018

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

2018



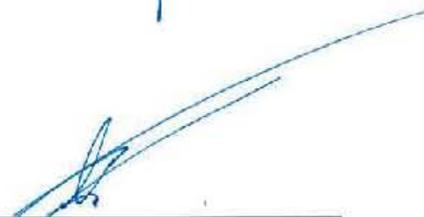
Dra. Ana Elena Limón Rojas
Director



Dr. Jesus Reyna Figueroa
Jefa de Enseñanza e Investigación



Dr. César Alejandro Arce Salinas.
Profesor Titular y asesor de tesis



Dr. Martín Coronado Malagón
Tutor de tesis

ÍNDICE	
RESUMEN ESTRUCTURADO	6
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	7
Enfermedad hepática no alcohólica.	7
Patogénesis de NAFLD y asociación genética.	8
Grosor de íntima media carotídea	9
Planteamiento Del Problema	10
Justificación	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	12
Diseño del estudio	13
Criterios de inclusión	13
Criterios de exclusión	13
Criterios de eliminación	14
Universo de estudio	14
Etnicidad	14
Duración del estudio	14
Metodología y procedimientos generales	15
Genotipificación, diagnóstico de hígado graso y medición de íntima media carotídea	16
Aspectos éticos	17
Recursos humanos, físicos, financiamiento y conflictos de interés	17
Análisis estadístico	18
RESULTADOS	20
Características generales, demográficas y organización por centro.	20
Prevalencia de esteatosis hepática	21
Prevalencia de aterosclerosis subclínica	21
Frecuencias alélicas	22
Distribución de genotipos rs738409 (PNPLA3), rs780094 (GCKR), rs2228603 (NCAN)	22
Asociación entre SNPs con niveles de glucosa, transaminasas y perfil de lípidos en la población total	23
Efecto de SNP´s con Esteatosis Hepática	25
Asociación entre SNPs con grosor de íntima media de carótida.	26
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS	

RESUMEN ESTRUCTURADO

Introducción: El protocolo “Relación de polimorfismos PNPLA3, GCKR y NCAN con Hígado graso y grosor de íntima media carotídea en pacientes adultos con Diabetes Mellitus 2” es un estudio de un solo centro que evaluó la asociación de polimorfismos rs738409 (PNPLA3), rs780094 (GCKR), rs2228603 (NCAN) con hígado graso y grosor de íntima media carotídea en población con diabetes mellitus tipo 2. Se ha descrito una relación significativa en los pacientes que padecen hígado graso y el grosor de íntima media carotídea sin embargo la asociación genética con polimorfismos específicos que relacionen ambas condiciones es algo que no se ha estudiado en población con diabetes mellitus tipo 2. México no hay estudios que asociación de polimorfismos en PNPLA3, GCKR y NCAN que relacionen ambas condiciones en la población con síndrome metabólico y diabetes mellitus.

Objetivos: Determinar la relación de SNP’s PNPLA3, GCKR y NCAN con hígado graso y grosor de íntima media carotídea en pacientes mexicanos con diabetes mellitus tipo 2.

Material y métodos: Estudio observacional analítico de corte transversal. Se obtuvieron variables demográficas, antropométricas, clínicas y estudios de laboratorio que incluyen perfil de lípidos, pruebas de funcionamiento hepático, química sanguínea completa. Se realizaron estudios de ultrasonido hepático y doppler carotídeo bilateral. Y se realizó una genotipificación mediante diseño comercial prediseñado Sondas TaqMan en un sistema StepOne Plus RT PCR (Aplicado Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) Se utilizaron para genotipificar SNP: rs738409 (PNPLA3), rs780094 (GCKR), rs2228603 (NCAN). La prueba ANOVA, t de Student y chi-cuadrado se usaron para evaluar la relación entre variables cuando fueron necesarias. Se utilizaron modelos de regresión lineal y logística y se incluyeron a modelos de herencia. En los modelos de regresión fueron incluidas variables confusoras (edad, sexo, IMC, tratamiento con estatinas, metformina y condiciones como dislipidemia o hipertensión arterial y tiempo de evolución) cuando fueron requeridas. La fuerza de asociación expresada mediante Odds Ratio (OR) e IC del 95%. Se consideró una significancia estadística a una $p < 0.05$. Para esto se utilizó el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 25.

Resultados: Incluimos 242 pacientes con edad promedio de 62.49 (DE \pm 8.6) años, un 57.9% correspondió a mujeres, 45% con algún grado de obesidad, sólo un 16.9 % de la población presentó peso normal. Hipertensión arterial estuvo en el 55.8 % y dislipidemia en un 58.7 % de la población total. El 91.7% tuvieron diagnóstico para algún grado de esteatosis hepática y 8.3% sanos. La distribución para los grados de esteatosis fue de 47.50% para leve (115 individuos), 38.4% (93) esteatosis moderada, y 5.8% severa (14). PNPLA3 el alelo G se asoció con niveles más bajos de glucosa sérica (Padd 0.013 IC 95%; Pdom 0.026 IC 95%) pero no a esteatosis o grosor de íntima media carotídea >0.9 mm. El SNP GKCR y NCAN no se demostró relación para algunas de las condiciones.

Conclusiones: La prevalencia de esteatosis hepática en Diabetes mellitus es alta. El polimorfismo documentado PNPLA3 (rs738409) en la población mexicana estudiada, tiene una frecuencia alta, similar a la informada (56.63 % vs 59%), no hubo asociación con esteatosis hepática ni GIMC mayor a 0.9 mm.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

Se sabe que los seres humanos compartimos el 99.9% de la secuencia del genoma y solamente el 0.1% varía en cada individuo; dichas variaciones se deben a cambios en una base, y así las diferentes combinaciones de nucleótidos resulta en la individualidad genética ⁽¹⁾. En México nuestra población cuenta con una carga genética diversa, está formada por una mezcla de genes caucásicos e indígenas, algunos estudios han establecido que la población mestiza mexicana contiene un 56% de genes amerindios, 40% de genes caucásicos y un 4% de genes negroides ⁽²⁻³⁾.

En los últimos años se ha determinado el papel de la predisposición genética en la susceptibilidad o resistencia a desarrollar enfermedades. El uso de métodos de análisis genético como el escaneo global del genoma, los análisis de asociación genética y los estudios de ligamiento genético han contribuido a la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados a grosor de intima media de carótida como medida de riesgo cardiovascular y enfermedad hepática no alcohólica ⁽⁴⁾.

Enfermedad hepática no alcohólica.

La enfermedad hepática no alcohólica (NAFLD) en la última década es el trastorno hepático más frecuente ^(5,6), la prevalencia varía drásticamente, se ha reportado una prevalencia del 70.1 % en pacientes con síndrome metabólico, comparado con 38.5% sana ⁽⁷⁾. Por otra parte en individuos con Diabetes mellitus tipo 2 los

datos son heterogéneos en cifras de 34%, 54 % y 94 % ^(8,9,10). Además, otras comorbilidades asociadas se han reportado incluyendo, hiperlipidemia (69%), hipertrigliceridemia (41%), síndrome metabólico (43%) e hipertensión (39%) ⁽¹¹⁾.

La hepatopatía no alcohólica histológicamente representa un espectro de enfermedades que van desde hígado graso no alcohólico (NAFL), caracterizado por acumulación de grasa hepática sin inflamación, esteatohepatitis (NASH), caracterizada por deposición de grasa hepática con inflamación, fibrosis acumulada y finalmente hígado cirrosis (10,11). Existe una fuerte asociación entre NAFLD y el riesgo de diabetes. El riesgo de una persona de desarrollar diabetes aumenta aproximadamente 5 veces si tiene NAFLD, sin embargo el riesgo de NAFLD en DM se desconoce ^(12,13).

La coexistencia de DM2 y enfermedad hepática no alcohólica aumenta la probabilidad de complicaciones microvasculares (nefropatía y retinopatía) aumento de los requerimientos de insulina, y mayor riesgo cardiovascular ^(14,15). También se aumenta el riesgo de progresión de NAFLD a cirrosis ⁽¹⁵⁾, carcinoma hepatocelular ⁽¹⁶⁾ e incremento de la mortalidad secundaria a complicaciones hepáticas ^(17,18).

Patogénesis de NAFLD y asociación genética.

En la patogénesis de esteatosis hepática se ha descrito disfunción de varias vías metabólicas, donde el aumento del conjunto circulante de ácidos grasos es un factor determinante. Se ha identificado una asociación altamente significativa de niveles de triglicéridos hepáticos y presencia de NAFLD. Pero tal parece esta alteración esta determinada por un fuerte componente de asociación genética.

El estudio GWAS publicado en 2008 identificó los factores genéticos que contribuyen a la patogénesis del hígado graso. Describió principalmente cuatro variantes de secuencia de ADN, dominio de fosfolipasa tipo Patatin 3 (PNPLA3) rs738409-G, regulador de glucocinasa (GCKR) rs780094-T, Neurocan (NCAN) rs2228603-T y lisilofosfolipasa tipo 1 (LYPLAL1) rs12137855, se asociaron con NAFLD demostrada por biopsia. Pero se encontraron diferencias en etnias ⁽¹⁸⁾.

La variante PNPLA3 (rs738409) se debe a la sustitución de metionina por isoleucina en el resto 148 de PNPLA3, que da como resultado un aumento de la lipogénesis (SNP rs738409 C / G, M148I)⁽¹⁹⁾.

En México se encontró la prevalencia del alelo en el 59% en sujetos sanos ⁽²⁰⁾. pero este porcentaje aumentó un estudio mas reciente donde el 40% tenia diagnostico de DM2, se encontró una frecuencia del alelo del 77%, asociándose además 3.8 veces más el riesgo de esteatohepatitis y 2.3 veces para fibrosis hepática ⁽²¹⁾.

Otras variantes de riesgos encontrada en población mexicana pero en mucho menor prevalencia son GCKR (rs780094-T) y NCAN (rs2228603) se han asociado a niveles elevados de transaminasas ⁽²²⁾ y triglicéridos en ayunas, asi como niveles elevados de Proteína C Reactiva (PCR) ^(24,25) e histológicamente asociados a inflamación y fibrosis hepática en pacientes obesos ^(23,26).

Grosor de íntima media carotídea (IMT)

El IMT de las arterias carótidas internas y comunes es una medida cuantitativa de la aterosclerosis y un fuerte predictor de enfermedad cardiovascular futura (ECV) y

accidente cerebrovascular^(27,28) . La arteria carótida pueda estar influenciado por factores ambientales previamente identificados y componentes genéticos indirectamente relacionados con metabolismos de lipidos así como componentes únicos que actúan en combinación para influir en la patogénesis compleja del desarrollo de la aterosclerosis ⁽²⁹⁾ .

La asociación con hígado graso y grosor de íntima media carotídea en los últimos años, los investigadores encontraron que, en comparación con pacientes no NAFLD, el IMT promedio de pacientes NAFLD aumentó significativamente, y esta relación fue independiente de los factores de riesgo cardiovascular clásicos. En un metanálisis del 2015 ⁽²⁹⁾ el IMT en pacientes NAFLD aumentó 0.16 mm en comparación con el grupo control, y el riesgo de placa carotídea fue 3.73 veces mayor que el de los controles.

En este contexto, los estudios de asociación genómica argumentan la alteración en homeostasis metabólica, la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrogénesis, como la conexión en estas dos entidades que influyen en la acumulación de grasa hepática y la gravedad del daño hepático en NAFLD ^(30,31,32) .

Planteamiento del problema

La enfermedad hepática no alcohólica es altamente prevalente. La coexistencia con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se ha relacionado con mayor progresión a fibrosis, mayores complicaciones microvasculares, y mayor riesgo cardiovascular. En la población mexicana se ha descrito una mayor prevalencia en comparación con series de otros países y se ha asociado esto a la presencia de los genotipos de riesgo para GCKR Y NCAN, el primero encontrado hasta en un 77% de la

población estudiada. La relación de estos genotipos y grosor de íntima carotídea solo se ha estudiado en una cohorte italiana donde se encontró asociación del genotipo PNPLA3 GG de forma independiente con el engrosamiento IMT solo en pacientes más jóvenes con NAFLD sin otra comorbilidad.

En México se han llevado a cabo estudios para determinar la prevalencia y riesgo genético para enfermedad Hepática no alcohólica, en población general con síndrome metabólico, sin embargo la relación de estos genotipos de riesgo no se han aplicado para medir la asociación con grosor de íntima media carotídea.

Justificación

En el mundo la prevalencia de enfermedad hepáticas no alcohólicas está en aumento, y su relación con desenlaces cardiovasculares está mayormente relacionada en medida que se conocen los factores que intervienen en homeostasis metabólica, la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrogenesis ⁽⁶⁾.

Se ha descrito una relación significativa en los pacientes que padecen hígado graso y el grosor de íntima media carotídea sin embargo la asociación genética con polimorfismos específicos que relacionen ambas condiciones es algo que no se ha estudiado en población con diabetes mellitus tipo 2.

Por lo que en pacientes Diabéticos y síndrome metabólico determinar la presencia y relación de dichos genes con grosor de íntima media e hígado graso permitirá conocer la posible relación con el desarrollo de hígado graso y aterosclerosis subclínica, y en estudio posteriores predecir el riesgo genético individual. Con esto, las medidas de intervención para modificar los factores ambientales se podrían intensificar a fin de retrasar dichos desenlaces.

En México no hay estudios que asociación de polimorfismos en PNPLA3, GCKR y NCAN con hígado graso y grosor de íntima media carotídea en la población con síndrome metabólico y diabetes mellitus.

Hipótesis

H1: Los Polimorfismos en los genes PNPLA3, GCKR y NCAN en pacientes con Diabetes Mellitus está relacionado con hígado graso y grosor en íntima media carotídea.

H0: Alteraciones en los genes PNPLA3, GCKR y NCAN en pacientes con Diabetes Mellitus no está relacionado con hígado graso y grosor en íntima media carotídea.

Objetivo

Objetivo principal

- 1) Determinar la relación de SNP's PNPLA3, GCKR y NCAN con hígado graso y grosor de íntima media carotídea en pacientes mexicanos con diabetes mellitus tipo 2.

Objetivos secundarios

- 1) Determinar la prevalencia de polimorfismos de PNPLA3, GCKR y NCAN en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2.
- 2) Determinar la prevalencia de hígado graso en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

- 3) Medir la prevalencia de aterosclerosis subclínica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.
- 4) Determinar la relación del genotipo PNPLA3, GCKR Y NCAN con parámetros clínicos índice de masa corporal (IMC), Gamma glutamil transpeptidasa (GGT), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), glucosa en sangre en ayunas (FPG), Hemoglobina glucosilada (HgA1C1), Albúmina, Colesterol total (CT), lipoproteína de baja densidad (LDL-C), lipoproteína de alta densidad (HDL-C), triglicéridos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio observacional analítico de corte transversal.

Criterios de inclusión

- Ambos sexos.
- Mayores de 18 años.
- Sujetos con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2.
- Sujetos s que consientan participar en el protocolo.
- Sujetos que accedan a la toma de muestras sanguíneas y realizar ultrasonido hepática y carotídeo.

Criterios de exclusión

- Sujetos con enfermedad hepática previa (cirrosis, hepatocarcinoma, hepatitis viral, hepatitis autoinmune)

- Sujetos con consumo de alcohol actual con grados igual o mayor de 140 gramos por semana en hombres y consumo actual con grados igual o mayor de 70 gramos por semana en mujeres.
- Sujetos con uso de medicamentos esteatogenicos y quimioterapia.
- Sujetos con padecimientos agudos con hospitalizaciones recientes por comorbilidades graves, con deterioro de sus condiciones generales o ingreso a terapia intensiva.

Criterios de eliminación.

- Sujetos con estudios de laboratorio incompletos o ultrasonido incompleto.
- sujetos que deseen ser excluidos del estudio.

Universo del estudio

Sujetos mexicanos adultos de cualquier sexo y derechohabientes a servicio de salud de Pemex procedentes de la consulta externa de medicina interna, endocrinología o medicina general que acudan a estudios de laboratorio del hospital central sur de alta especialidad y que accedan a participar en el protocolo.

Etnicidad

Todos los participantes tenían que ser mexicanos, con más de dos generaciones familiares de origen mexicanos, entre los 18 y 75 años de edad, y previa firma de consentimiento informado para participar.

Duración del estudio

El reclutamiento de pacientes se realizó desde Enero a Mayo del 2018 simultáneamente la recolección de datos.

Metodología y procedimientos generales

- 1) La base de datos del estudio se compone de los datos obtenidos mediante una entrevista directa el día que el sujeto acudía a laboratorio clínico del hospital, para el cual mediante el diagnóstico de DM2 reportado en la solicitud de laboratorio se hacía la invitación a participar en el protocolo, una vez que aceptaba se procedía a realizar la toma de muestras sanguíneas tanto para química clínica completa como para los estudios genéticos, posteriormente fueron programados un segundo día para realizar el ultrasonido hepático y de ambas carótidas.
- 2) Las muestras sanguíneas recolectadas para estudio genético se entregaban y almacenaban por el laboratorio del HCSAE máximo por 7 días para ser procesadas en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).
- 3) Las características generales obtenidas mediante el cuestionario de todos los pacientes contienen la siguiente información: institución de adscripción y ficha de adscripción, nombre del paciente, dirección, lugar de residencia, origen étnico del sujeto y padres, teléfono, fecha de nacimiento, estado civil, ocupación, antecedentes familiares de diabetes, medidas antropométricas (peso, talla), circunferencia de cintura y cadera, tabaquismo (índice tabáquico), alcoholismo, diagnósticos previos, hospitalizaciones previas, tratamiento

farmacológico actual (especialmente tipo y dosis de hipoglucemiantes, uso de estatinas, fibratos, antihipertensivos), uso de suplementos alimenticios o medicina alternativa, tiempo de evolución de enfermedades crónicas (diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, dislipidemia, enfermedad renal crónica).

- 4) Los estudios de laboratorio: biometría hemática, química sanguínea (glucosa, urea, creatinina, nitrógeno ureico, ácido úrico), hemoglobina glucosilada y perfil de lípidos (colesterol, triglicéridos, colesterol HDL, VLDL, LDL) proteína C reactiva, Transaminasas (AST, ALT, GGT) fosfatasa alcalina, bilirrubina directa, electrolitos séricos (sodio, potasio, magnesio, calcio, fósforo).
- 5) Los datos de los métodos de imagen se obtendrán de acuerdo a las especificaciones y estandarización de un solo centro y validado por un solo médico especialista: ultrasonido hepático y carotídeo bilateral.

Genotipificación de SNP's

Para la genotipificación se utilizó el diseño comercial prediseñado Sondas TaqMan en un sistema StepOne Plus RT PCR (Aplicado Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) Se utilizaron para genotipificar SNP: rs738409 (PNPLA3), rs780094 (GCKR), rs2228603 (NCAN). La determinación por este método para cada SNP's fue de el 100% para rs738409 (PNPLA3), rs780094 (GCKR), y 95.16% para rs2228603 (NCAN) y no se observaron genotipos discordantes en el 20% de los duplicados muestras.

Determinación de Hígado Graso y grosor de íntima media de carótida.

Todos los sujetos fueron sometidos a ultrasonido, los cuales fueron capturados y las imágenes con validación de un solo operador.

El hígado graso se evaluó como la presencia o ausencia de esteatosis hepática mediante ecografía, identificada por un operador profesional utilizando el método estándar, la presencia de ecogenicidad aumentada del hígado en comparación con la corteza renal y fue reportado por grados de esteatosis como leve, moderada o severa. El ultrasonido carotídeo fue reportado como grosor de íntima media de carótida derecha o izquierda en milímetros (mm).

Aspectos éticos

- 1) El estudio cuenta con aprobación del comité de bioética del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Pemex con registro 76/17.
- 2) El proyecto cumple la normativa internacional y local de estudios de investigación en humanos, acorde con la Ley General de Salud y la Declaración de Helsinki.

Recursos humanos, físicos y financiamiento

Humanos

Se requerirá la participación del investigador principal, colaboradores, coordinadores del proyecto de tesis y de otros servicios practicantes:

- 1) Hospital Central Sur de Alta Especialidad: Dr. César Alejandro Salinas Arce, Dr. Martín Coronado Malagón, Dra. Nadia Ruth Cruz Cruz, Dr. Heriberto

Hernández Fraga, Dr. Pedro Arturo Zarate Rodríguez, Dra. Karina Ordaz López, Dr. Efraín Isaías Camarín Sánchez, Dra. Alma Yantela Seco Sánchez, Dra. Karina Núñez Barragán, Dr. Aurelio Ruiz López.

- 2) Instituto Nacional de Medicina Genómica: Dra. Mirelle Vanessa González Covarrubias, Dr. Samuel Canizales Quinteros, Dr. Hugo Villamil Ramírez. Lic. Cintia Khain Guzmán Cruz.

Financieros

- 1) Todos los procedimientos de laboratorio clínico y ultrasonidos serán financiados por el Hospital Central Sur de Alta especialidad.
- 2) Procedimientos de extracción y genotipificación serán financiados por el Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Conflicto de intereses y vinculación con la industria farmacéutica.

Los investigadores involucrados no muestran conflicto de intereses. El estudio no cuenta con ninguna relación o financiamiento relacionado con la industria farmacéutica.

Análisis estadístico

Utilizamos estadística descriptiva para las variables numéricas que incluye medidas de tendencia central y dispersión, media o mediana y desviación estándar. Las variables categóricas son representadas como frecuencias y porcentajes. La prueba ANOVA, la prueba t de Student y la prueba de chi-

cuadrado se usaron para evaluar la relación entre variables cuando fueron necesarias.

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para evaluar el efecto independiente de cada en los parámetros bioquímicos. Se utilizaron modelos de regresión logística para evaluar la relación de la esteatosis hepática y engrosamiento íntima media de carótida como igual o mayor a 0.9 mm. Se incluyeron estos modelos de regresión a modelos de herencia (modelo aditivo, dominante y recesivo). En los modelos de regresión fueron incluidas variables confusoras (edad, sexo, IMC, tratamiento con estatinas, metformina y condiciones como dislipidemia o hipertensión arterial y tiempo de evolución) cuando fueron requeridas.

La fuerza de asociación expresada mediante *Odds Ratio* (OR) e IC del 95%. Se consideró una significancia estadística a una $p < 0.05$. Para esto se utilizó el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 25.

RESULTADOS

1.- Análisis descriptivo

a) Características generales, demográficas.

Se incluyeron 245 pacientes fueron elegibles, de los cuales 2 fueron excluidos por con infección por virus de hepatitis C, a 1 sujeto se detectó hepatocarcinoma, quedando un total de 242 pacientes. Para el análisis descriptivo con edad promedio de 62.49 (DE \pm 8.6) años, un 57.9% correspondió a mujeres. Índice de masa corporal (IMC) una media de 29.6 (DE \pm 4.85) Kg/m², se encontró una prevalencia alta de obesidad (45% de la muestra) y solo un 16.9 % con peso normal. Comorbilidades como Hipertensión arterial estuvo en el 55.8 % de sujetos y dislipidemia en un 58.7 %.

Los años de evolución tanto para Diabetes mellitus como Hipertensión la media fue de 12.07 (DE+8.6) y 6.0 (DE+7.5) años respectivamente. El porcentaje de pacientes con menor a 10 años de evolución de DM fue de 56.6 % y 80% para HAS. Las metas de control la glucosa sérica en ayunas el 52.5 % (127) estaba en cifras igual o menor a 130 mg/dl, y para hemoglobina glucosilada < 7% fue 54.1% (131). EL 100 % contaban con revisión oftalmológica, siendo el 85 % de estos tener una revisión menor a un año. El 11.2% (27) presentaba algún grado de retinopatía diabética y el 88.8% (215) estaba libre de enfermedad.

El 77.7 % tenía de tratamiento metformina sola o en combinación con otro tratamiento y 30.2 % usaba insulina. El 56.2% era originario de la ciudad de México. Resto de características basales se muestran en la tabla 1

Tabla 1. Características basales (n=242) *

	HCSAE (n=242)
Hombre*	102 (42.1)
Mujeres*	140 (57.9)
Edad en años, media (DE)	62.4 (8.6)
IMC, Kg/m ² , media (DE)	29.66 (4.85)
Peso normal, IMC*	41 (16.9)
Sobrepeso, IMC*	92 (38)
Obesidad*	109 (45)
Hipertensión*	135 (55.8)
Dislipidemia	142 (58.7)
Glucosa central, mg/dL, media (DE)	144.29 (59.11)
Hb A1C1 %, media (DE)	7.27 (1.75)
Colesterol total, mg/dL, media (DE)	186.88 (39.48)
Colesterol HDL, mg/dL, media (DE)	45.15 (13.14)
Triglicéridos, mg/dL, med (DE)	198.14 (105.55)
AST, mg/dL, media (DE)	27.09 (16.14)
ALT, mg/dL, media (DE)	32.01 (23.14)
GGT, mg/dL, media (DE)	49.4 (50.73)
Albúmina	4.49 (0.32)
Fosfatasa alcalina	96.59 (36.32)

*Los datos se presentan como n (%) a menos que se especifique lo contrario.

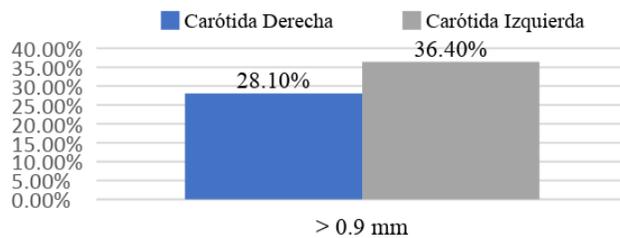
Abreviaturas: ALT : alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa, GGT: gammaglutamiltranspeptidasa, Hb A1C1: hemoglobina glucosilada.

b) Prevalencia de esteatosis hepática

De los 242 pacientes incluidos 222 sujetos (91.7%) tuvieron diagnóstico para algún grado de esteatosis hepática y 20 sujetos (8.3%) reportados como sanos. La distribución para los grados de esteatosis fue de 47.50% para leve (115 individuos), 38.4% (93) esteatosis moderada, y 5.8% severa (14).

c) Prevalencia de grosor de íntima media carotídea ≥ 0.9 mm.

La prevalencia de GIMC mayor a 0.9 mm fue 48.3 %. Dividida por tipo de carótida 28.1% corresponde a carótida derecha y 36.4% para carótida izquierda.



Gráfica 3. Prevalencia aterosclerosis subclínica

Distribucion y frecuencias alélicas para rs738409 (PNPLA3), rs780094 (GCKR), rs2228603 (NCAN).

De los 242 sujetos genotipificados para PNPLA3, el 44.47 % (81) fueron para el alelo GG , 45.86 % (111) para CT y 20.66 % (50) para CC. Para CGKR, 112 fueron para el alelo CC (46.28%), 102 para alelo CT (42.14%) y 28 para TT (11.57%). La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg fue equilibrada.

Las frecuencias alélicas para cada genotipo del PNPLA3 (rs738409) el alelo G fue 56.63 %, y 43.77 % para el alelo C; GCKR (rs 780094) la frecuencia del alelo C 67.63 %, el alelo T fue 32.78 %; y NCAN (rs 2228603) el alelo C fue 97.08 %, el alelo T fue 2.9 %, para este último no se encontraron homocigotos TT.

d) Distribución por condición clínica.

32.8 % de los sujetos que presentaban esteatosis hepática corresponde a GG, 45.4% GC y 21.5% CC para PNPLA3. El resto de frecuencias por grados de esteatosis genotipos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. distribución de alelos y esteatosis hepática *

	Tota l 242	Esteatosis Hepática (222)	Esteatosis Hepática leve (115)	Esteatosis Hepática moderada (93)	Esteatosis Hepática severa (14)	Sin Esteatosis hepática (20)
PNPLA3 rs 738409, n (%)						
GG	81	73 (32.88)	37 (32.17)	34 (36.55)	2 (14.28)	8 (40)
GC	111	101 (45.49)	51 (44.34)	43 (46.23)	7 (50)	10 (50)
CC	50	48 (21.62)	27 (23.47)	16 (17.20)	5 (37.75)	2 (10)
GCKR rs780094, n (%)						
CC	112	104 (46.84)	54 (46.9)	42 (45.16)	8 (57.14)	8 (40)
CT	102	92 (41.44)	46 (40)	42 (45.16)	4 (48.57)	10 (50)
TT	28	26 (11.71)	15 (13)	9 (9.6)	2 (14.28)	2 (10)
NCAN rs2228603, n (%)**						
CC	226	207 (94)	109 (95.62)	84 (91.3)	14 (100)	19 (95)
CT	14	13 (6)	5 (4.38)	8 (8.7)	0 (0)	1 (5)
TT	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*Los datos se presentan como n (%) a menos que se especifique lo contrario. ** 240

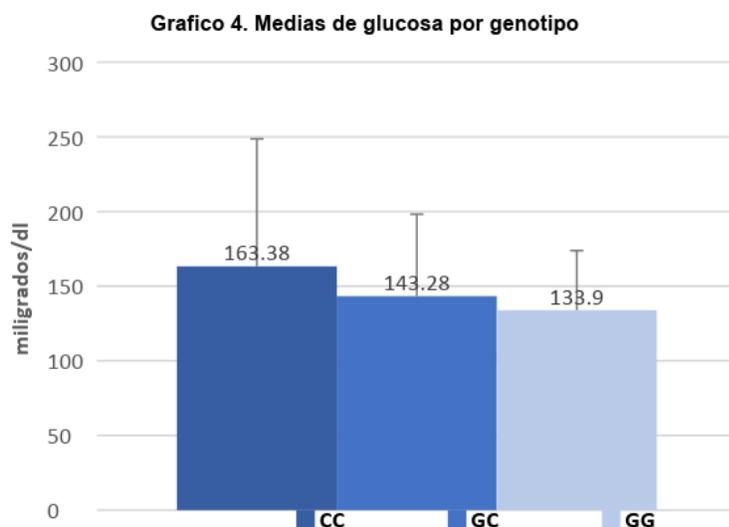
De los 117 individuos con GIMC mayor a 0.9 mm la prevalencia de genotipo GC fue del 47.0% seguido de GG (32.4 %) para PNPLA3.

2.- Análisis de asociación

Dado que las variantes que analizamos también se han relacionado con otros rasgos metabólicos, decidimos evaluar su asociación con variables clínicas que se han asociado con NAFLD como glucosa y transaminasas.

Encontramos asociación entre los niveles de glucosa para los haplotipos GG (p 0.023 IC 93%) y CC (0.01 IC 95%) observado que los sujetos portadores de GG

tienen una diferencia menor de glucosa (29.48 mg/dl) con respecto a la media de los dos grupos, encontrando significancia estadística.



Los niveles de transaminasas fueron analizados no encontrando relación con respecto a genotipo de PNPLA3, por lo que fueron divididos en grupos de transaminasemia, observando relación para GC y niveles de ALT (p 0.042 IC 95%).

Tabla 4.- asociación PNPLA3 y transaminasemia.

PNPLA3	AST					ALT					GGT				
	normal		elevada		p	normal		elevada		p	normal		elevada		p
n	%	n	%	n		%	n	%	n		%	n	%	n	
GG	68	(32.2)	13	(43.3)	.228	61	(31.3)	20	(43.5)	.115	68	(34.9)	12	(27.3)	.335
CC	42	(19.9)	7	(23.3)	.662	38	(19.5)	11	(23.9)	.502	36	1(8.5)	12	(27.3)	.188
GC	101	(47.9)	10	(33.3)	.135	96	(49.2)	15	(32.6)	.042*	91	4(6.7)	20	(45.5)	.884

*El p valor fue calculado por análisis T student

Las diferencias entre los genotipos de sanos y esteatosis no alcanzó significancia estadística para establecer una asociación entre PNPLA3 por análisis de X^2 (tabla 3).

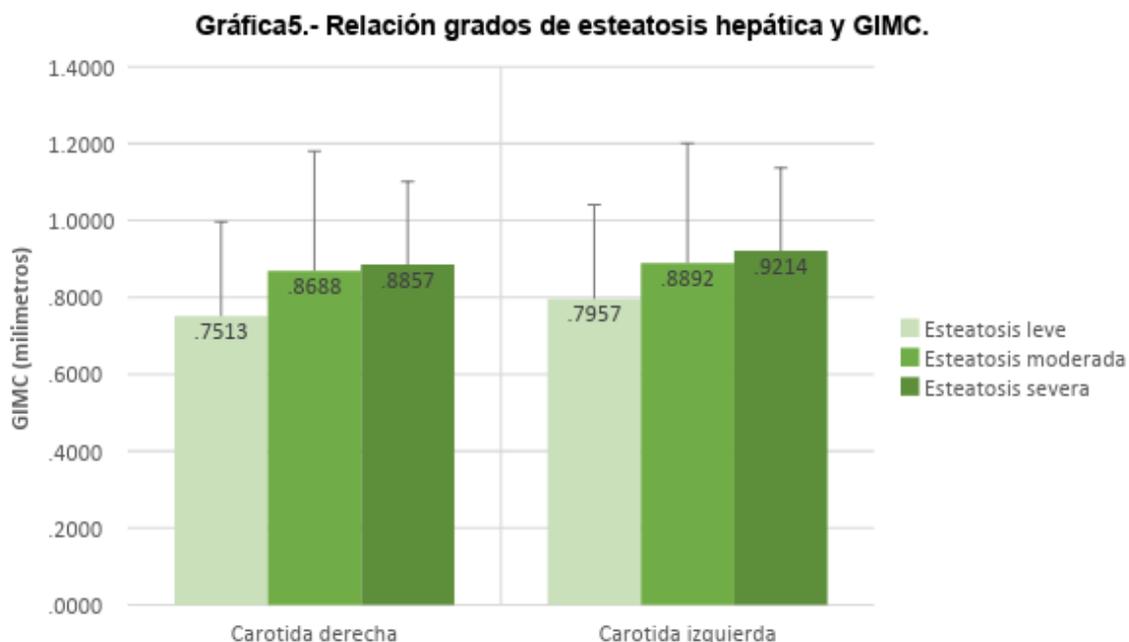
Tabla 3.- Relación entre variante PNPLA3 y esteatosis hepática

PNPLA3	Sanos		Esteatosis hepática		P*
	N	%	N	%	
GG	8	40.0%	73	32.9%	Ns
CC	2	10.0%	48	21.6%	Ns
GC	10	50.0%	101	45.5%	Ns

*p valor calculado por X^2

a) Relación de grados de esteatosis con grosor de íntima media de carótida

El análisis de varianza (ANOVA) para grados de esteatosis y grosor de íntima media de carótida se encontró una relación significativa; carótida izquierda P 0.020 (IC 95% 0.66-1.024) carótida derecha p 0.003 (IC 95% 0.58-1.03). (Gráfica 5)



Mediante regresión lineal el rs738409 (PNPLA3) se asoció a niveles más bajos de glucosa sérica (Beta -13.3 Padd 0.013 IC 95%; Pdom 0.026 IC 95%) y con tendencia a niveles más elevados de ALT pero no hubo significancia estadística (Beta 2.82 Padd 0.15 IC 95%). La hemoglobina glucosilada (A1C1), colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL y LDL no se encontró relación estadísticamente.

El SNP rs780094 (GCKR) se asoció con niveles bajos de HDL (Beta - 0.054 Padd 0.035 IC 95%; Pdom 0.013 IC 95%). El resto de variables clínicas no se encontró significancia estadística para los modelos de herencia. NCAN no tuvo asociación con parámetros clínicos.

Tabla 4.- Asociación SNP'S y parámetros clínicos.

	Beta	ES	P add	P dom	Pres
PNPLA3 (rs738409)					
Colesterol total	1.89	-0.027	0.661	0.428	
Colesterol HDL	0.282	-0.033	0.661	0.484	
Triglicéridos	-3.84	9.35	0.682	0.793	
Glucosa en ayunas	-13.3	5.13	0.013	0.026	0.032
AST	1.75	1.37	0.205	0.917	0.25
ALT	2.82	1.95	0.15	0.963	0.137
GGT	-3.3	4.46	0.458	0.141	0.630
Albúmina	-0.04	0.028	0.145	0.605	
A1C1	-0.197	0.153	0.198	0.104	
GCKR (rs780094)					
Colesterol total	-0.023	0.021	0.279	0.90	0.9
Colesterol HDL	-0.054	0.025	0.035	0.013	0.542
Triglicéridos	0.025	0.041	0.536	0.798	0.363
Glucosa en ayunas	0.009	0.32	0.787	0.989	0.579
AST	0.03	0.047	0.518	0.435	0.868
ALT	0.002	0.002	0.903	0.894	0.64
GGT	0.023	0.027	0.397	0.638	0.282
Albúmina	0.054	0.03	0.07	0.06	0.362
A1C1	0.011	0.025	0.658	0.329	0.563

El P valor fue calculado por modelo de regresión lineal.

Abreviaturas: ALT : alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa

Pdom: P modelo de herencia dominante (GG+GC vs CC)

Padd: P modelo de herencia additivo (GG + GC + CC)

En la población total con esteatosis PNPLA3, GCKR y NCAN no hubo asociación con los modelos genéticos. En la tabla 4 se muestran los resultados.

Tabla 4.- Asociación de SNP's y esteatosis hepática.*

	RM	OR	P	IC
PNPLA3				
Modelo Aditivo	0.324	0.724	0.337	0.374-1.401
Modelo dominante	0.908	2.47	0.240	0.545-11.27
GCKR				
Modelo Aditivo	-0.115	0.891	0.739	0.452-1.75
Modelo dominante	-0.261	0.770	0.588	0.300-1.98
NCAN				
Modelo Aditivo	0.193	1.21	0.858	0.147-9.99

*Ajustado por Edad, Sexo, IMC, y tratamiento.

P valor calculado por regresión logística

Asociación entre SNPs con grosor de íntima media de carótida.

El SNP's para NCAN se encontró un riesgo 1.4 veces más para un GIMC mayor a 0.9 mm en derecha y 1.3 veces para la izquierda pero sin obtener una significancia estadística (P 0.547 IC 0.438-4.74 y P 0.64 IC 0.417-4.15). Los SNP's PNPLA3 (rs738409) y rs780094 (GCKR) no se encontró asociación.

Tabla 5.- Efecto de SNP's en grosor de Íntima media de carótida*

	RM	Padd	Pdom	OR	IC	IC 95%
PNPLA3 (rs738409)						
Mayor 0.9 mm						
Derecha	0.060	0.783	0.873	0.783	0.693-1.62	P <0.05
Izquierda	-0.164	0.421	0.646	0.848	0.569-1.26	
GCKR						
Mayor 0.9 mm						
Derecha	-0.60	0.793	0.501	0.942	0.601-1.47	
Izquierda	0.175	0.402	0.862	1.19	0.791-1.79	
NCAN						
Mayor 0.9 mm						
Derecha	0.359	0.553		1.43	0.438-4.68	
Izquierda	0.518	0.361		1.67	0.552-5.10	

*Ajustado a Edad, Sexo, IMC, HAS, dislipidemia y uso de estatinas

P valor calculado por regresión logística

Pdom: P modelo de herencia dominante (GG+GC vs CC)

Paddi: P modelo de herencia aditivo (GG + GC + CC)

DISCUSIÓN

Este estudio se realizó en población con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2. Considerando el tratamientos de estos pacientes los modelos de regresión logística y lineal fueron ajustados a dichas variables. La prevalencia de esteatosis hepática se encontró en más del 91.7 % de la muestra, muy por arriba de lo previamente documentado (34% y 54 %)^{4,5}. Tendría sentido ya que esta población cuenta con factores de riesgo asociados como la diabetes, obesidad (45%) dislipidemia (58.7%), e hipertensión arterial (55.8 %).

Las frecuencias alélicas fueron similares a las reportadas en población mexicana 56.63 % vs 59% (N. Méndez, et al.) para PNPLA3. En la población con EH el alelo de riesgo G estuvo presente en el 78.2 % de los individuos, resultados similares al 80.4% reportado por A. Martínez, et al.⁽³³⁾. Para presentar cualquier grado de esteatosis el rs738409 incrementa un riesgo de 1.4 veces pero sin ser estadísticamente significativo (P=0.259 95% IC 0.745-2.86) similar a lo encontrado en un metanálisis donde el riesgo encontrado fue de 1.3 (OR 1.34 95% CI 0.82–2.20) tanto para modelos aditivos como dominante⁽³⁴⁾. El alelo T de rs780094 en GCKR y el alelo T de rs2228603 (NCAN) no encontramos una asociación.

Cabe señalar que el rs738409 no fue asociado a esteatosis hepática ni bajo los grados de la misma, sin embargo este SNP se ha asociado fuertemente con presencia de NASH, pero en este estudio estamos limitados al ultrasonido.

Encontramos que la variable de PNPLA3 afecta a factores de riesgo para esteatosis como los niveles de glucosa donde la variable CC está relacionado con

mayores niveles de glucosa, contrario al los homocigotos GG sugiriendo que confiere una susceptibilidad para mantener niveles bajos de glucosa, esto no ha sido reportado previamente en estudios de asociación. No encontrando asociación para los niveles de transaminasas, dichos resultados contrastan con lo descrito en la literatura, una explicación a esta contrariedad se puede encontrar en el uso de metformina, la cual ha sido relacionada a disminución de transaminasas en NADFL en estudios previos ^(35, 36) para lo cual se necesitan estudios de extensión que muestren esta tendencia asociada al genotipo.

El rs780094 (GCKR) se asocian a niveles de HDL (Padd 0.035 IC 95%; Pdom 0.013 IC 95%) esto ya descrito por Murata-Mori F. et al. ⁽³⁷⁾. No encontramos asociación de este genotipo con riesgo los demás factores de riesgo convencionales como colesterol, triglicéridos o glucosa.

La variable rs2228603 (NCAN) no tuvo significancia estadística para los perfiles de colesterol, triglicéridos ni para esteatosis hepática, dicho contraste con lo descrito en población mexicana concuerda con los reportado por Wu J. et al. ⁽³⁸⁾ donde el papel de este polimorfismo no demostró no ser un factor de riesgo. Para el grosor de íntima media carotidea los genotipos no hubo asociación.

CONCLUSIONES

La prevalencia de esteatosis hepática y grosor de íntima media carotídea mayor a 0.9 mm es alta en población con diabetes mellitus 2. Hay una relación entre los grados de esteatosis con mayor GIMC. El SNP PNPLA3 (rs738409) en la población mexicana estudiada tiene una frecuencia alta, similar a la informada (56.63 % vs 59%) esto favorece la esteatosis hepática en pacientes del alelo de riesgo, independientemente de los factores de riesgo convencionales. Pero no encontramos una relación del SNP con esteatosis hepática ni GIMC mayor a 0.9mm en esta población, sin embargo interviene en los niveles de glucosa sérica en ayunas. El SNP's GKCR se relaciono con niveles de HDL (Padd 0.035 IC 95%; Pdom 0.013 IC 95%) pero no tuvo efectos sobre el riesgo de esteatosis hepática o mayor grosor de íntima media carotídea al igual que rs2228603 (NCAN).

Nuestro estudio presenta dos limitaciones, primero tener un número limitado de controles (8.2 % del total de la muestra) dado que la prevalencia de esteatosis fue alta en esta población. La segunda limitación fue no haber realizado biopsias hepáticas por lo que no se documentó que pacientes cursaran con esteatohepatitis y no pudimos establecer asociaciones con este aspecto de la enfermedad hepática no alcohólica.

Se puede suponer que PNPLA3 juega un papel independiente en la patogénesis de NAFLD, y en desarrollo de presentaciones más graves, pero también interviene en factores de riesgo convencionales para el desarrollo de la misma. Se requieren más estudios de extensión para conocer el papel de la variante de PNPLA3.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Vargas G. Polimorfismos genéticos en enfermedades cardiovasculares. La experiencia en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" .Arch Cardiol Mex 2007; 77, S4, 88-93.
- 2.- Lisker R., Perez-Briseno R., Granados J., Et al. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexican City population. Am J Physical Anthropos 1986; 71: 203-207.
- 3.- Lasker R., Perez-Briceno R., Et al. Gene frequencies and admixture estimates in the State of Puebla, Mexico. Am J Physical Anthropos 1988; 76: 331-335.
- 4.- Lasker R., Perez-Briceno R., Et al. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centers. Hum Biology 1990; 62: 791-801.
- 5- Souza MR, Deniz MF, et al. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. Arq Gastroenterol 2012;49:89e96.
6. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes 2001;50:1844e1850.
- 7.- Clarence Gill, MDa, Kristina P. Vatcheva, PhD. Frequency of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Subclinical Atherosclerosis Among Young Mexican Americans. Am J Cardiol 2017;119:1717e1722.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.03.010>
- 8.- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med 2002;346:1221-31.
- 9.- Amiri DN, Mehdi K, Motedayen M. Type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2017; 10 (Suppl. 1):S1-S7
- 10.- Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population

utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011;140:124-31.

11.- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver diseaseMeta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73-84.

12.- Jäger S, Jacobs S, Kröger J, Stefan N, et al. Association between the fatty liver index and risk of type 2 diabetes in the EPIC-Potsdam Study. *PLoS One* 2015;10:0124749.

13- Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism* 2016;65:1096-108.

14.- Ryysy L, Häkkinen AM, Goto T, et al. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;49: 749–58.

15.- Hossain N, Afendy A, Stepanova M, et al. Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:1224–9.

16.- Bae JC, Rhee EJ, Lee WY, et al. Combined effect of nonalcoholic fatty liver disease and impaired fasting glucose on the development of type 2 diabetes: a 4-year retrospective longitudinal study. *Diabetes Care* 2011;34:727–9.

17.- De Marco R, Locatelli F, Zoppini G, et al. Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999;22:756–61.

- 18.- Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2: 262–5.
- 19.- Romeo S, Kozlitina J, Xing Ch, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 12: 1461-5.
- 20.- Gutierrez-Grobe Y. et al. A PNPLA3 Gene Poly- morphism is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Mexican Patients. *Gastroenterology* 2010; 138: S-803.
- 21.- Martínez L., Larrieta E, Calva JJ. The expression of PNPLA3 Polymorphism could be the key for severe Liver Disease in NAFLD in Hispanic Population. *Annals of Hepatol* 2017; 6: 909-15.
- 22.- Yvonne N. et al. Association between PNPLA3 (rs738409), LYPLAL1 (rs12137855), PPP1R3B (rs4240624), GCKR (rs780094), and elevated transaminase levels in overweight/obese Mexican adults. *Mol Biol Rep.* 2016 December ; 43(12): 1359–1369. doi:10.1007/s11033-016-4058-z.
- 23.- Gordena A., et al. Genetic Variation at NCAN Locus Is Associated with Inflammation and Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Morbid Obesity. *Hum Hered* 2013;75:34–43.
- 24.- Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research (2007) Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316: 1331–1336.

25. Ridker PM, Pare G, et al. Loci related to metabolic-syndrome pathways including LEPR, HNF1A, IL6R, and GCKR associate with plasma C-reactive protein: the Women's Genome Health Study. *Am J Hum Genet.* 82:1185–1192.
- 26.- Lin YC, Chang PF, et al. Genetic determinants of hepatic steatosis and serum cytokeratin-18 fragment levels in Taiwanese children. *Liver Int* 2018; [Epub ahead of print].
- 27.- Santos RD , Nasir K . La comprensión de la aterosclerosis a partir de estudios de imágenes invasivas y no invasivas: ¿Deberíamos tratar la aterosclerosis subclínica? *Atherosclerosis* . 2009 ;205 : 349 - 356 .
- 28.- Paternoster L , et al. Efectos genéticos sobre el grosor íntima-media de la carótida: evaluación sistemática y metanálisis de polimorfismos genéticos candidatos estudiados en más de 5000 sujetos. *Circ Cardiovasc Genet* .2010 ; 3 : 15 – 21.
- 29.- Schott LL ,et al. Efectos específicos de los factores de riesgo cardiovascular sobre el grosor íntima-medial de la arteria carótida en mujeres de mediana edad. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2004 ; 24 : 1951 - 1956 .
- 30.- Valenti L, et al. col. La homocigosidad para el polimorfismo fosfolipasa-3 / adiponutrina I148M tipo patatin influye en la fibrosis hepática en pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica . *Hepatology* 51 : 1209-1217
31. Sookoian S, Pirola C., Meta-análisis de la influencia de la variante I148M del dominio de fosfolipasa similar a patatin que contiene el gen 3 (PNPLA3) en la susceptibilidad y la gravedad histológica de la enfermedad del hígado grasa no alcohólico . *Hepatology* 53 : 1883-94.

32. Speliotes EK, NASH CRN, Consorcio GIGANTE, Investigadores MAGIC, Consorcio GOLD, et al. (2011) El análisis de asociación de todo el genoma identifica variantes asociadas con la enfermedad del hígado graso no alcohólico que tienen efectos distintos sobre los rasgos metabólicos. *PLoS Genet* 7 : e1001324.

32.-Cheung CL, et al. Non-invasive score identifies ultrasonography-diagnosed non-alcoholic fatty liver disease and predicts mortality in the USA. *BMC Med* 2014;12:154

33.-Leonardo A. Martínez, El., et al. The Expression of PNPLA3 Polymorphism could be the Key for Severe Liver Disease in NAFLD in Hispanic Population. , *Annals of hepatology*, 2017; 16 (6): 909-915

34.- Xu, R., Tao, A., et al. Association Between Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3 Gene (PNPLA3) Polymorphisms and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* 5, 9284; DOI:10.1038/srep09284 (2015)

35.- LI. Y., LIU L. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomedical reports* 1: 57-64, 2013.

36.- Loomba, R. et al. Nagabhyru, P.; Sumner, A.E.; Liang, T.J.; Hoofnagle, J.H., Clinical trial: pilot study of metformin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009, 29, (2), 172-182.

37.- Murata-Mori F., et al., Association of the GCKR rs780094 polymorphism with metabolic traits including carotid intima-media thickness in Japanese community-dwelling men, but not in women. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(2): 289–295.

38.- Wu1. M., et al. Role of NCAN rs2228603 polymorphism in the incidence of nonalcoholic fatty liver disease: a case-control study. *Lipids in Health and Disease* (2016) 15:207.

