

El papel de las variantes genéticas de PNPLA3 y GCKR en la determinación de la composición de la microbiota intestinal de los adultos mexicanos con enfermedad de hígado graso asociada a disfunción metabólica

Nahum Méndez Sánchez, Mariana Michelle Ramírez Mejía, Samuel Canizales Quinteros

Afiliación: **Fundación Clínica Médica Sur, A.C.**

Resumen:

ANTECEDENTES

Desde el 2020 se ha propuesto la implementación de una nueva nomenclatura para la enfermedad de hígado graso, previamente conocida como NAFLD (non-alcoholic liver disease). El hígado graso es considerado la manifestación hepática de un trastorno multisistémico, que es heterogénea en sus causas subyacentes, su presentación, su evolución y su pronóstico (1). Por este motivo se propuso el término enfermedad de hígado graso asociada a disfunción metabólica (MAFLD, por sus siglas en inglés). La nueva terminología reconoce la complejidad de la fisiopatología, así como el papel que diversos factores heterogéneos desenvuelven en el desarrollo de la misma, incluyendo el origen étnico, el sexo, los hábitos dietéticos, la predisposición genética, la edad, el microbiota intestinal y el estado metabólico (2).

Hoy en día no existe un consenso general sobre los criterios para definir la "salud metabólica" la cual indica un riesgo alto o bajo de enfermedad cardiometabólica, varias directrices tienen recomendaciones basadas en la evidencia para la evaluación del riesgo.

Los criterios para definir el estado de "salud metabólica" suelen basarse en la definición de síndrome metabólico propuesta por el ATP III, los cuales consideran las alteraciones en la tensión arterial, los niveles de colesterol, triglicéridos y colesterol HDL, así como la presencia de prediabetes, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) o resistencia a la insulina (IR) (3).

De acuerdo con la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD, por sus siglas en inglés), el diagnóstico de NAFLD, inicia con la demostración histológica o por imagen de esteatosis hepática, seguida de la exclusión de otras causas, principalmente la ausencia de ingesta significativa de alcohol (4). En México, de acuerdo con la guía de práctica clínica mexicana (4) la ingesta significativa de alcohol se considera:

- >15 bebidas estándar por semana en un periodo de 2 años en hombres (210 gr de alcohol).
- >10 bebidas estándar por semana en mujeres en un periodo de 2 años (140 gr de alcohol).

Sin embargo, el cambio en la terminología de NAFLD por MAFLD trae consigo una serie de criterios diagnósticos cardiometabólicos que consideran todos los factores asociados que existen entorno a la enfermedad. Los criterios propuestos para un diagnóstico positivo de MAFLD se basan en pruebas histológicas (biopsia), de imagen o biomarcadores sanguíneos de acumulación de grasa en el hígado (esteatosis hepática), además de uno de los de los tres criterios siguientes: sobrepeso/obesidad, presencia de DMT2 o evidencia de disregulación metabólica. Esta última se define por la presencia de al menos dos anormalidades de riesgo metabólico, dentro de las cuales se considera:

- Circunferencia de cintura $\geq 102/88$ cm en hombres y mujeres caucásicos (o $\geq 90/80$ cm en hombres asiáticos y mujeres)
- Tensión arterial $\geq 130/85$ mmHg o tratamiento farmacológico específico

- Triglicéridos plasmáticos ≥ 150 mg/dl o tratamiento farmacológico específico
- Colesterol HDL en plasma < 40 mg/dl para hombres y < 50 mg/dl para mujeres o tratamiento farmacológico específico
- Prediabetes (es decir, niveles de glucosa en ayunas de 100 a 125 mg/dl o 2 horas después de la carga niveles de glucosa de 140 a 199 mg/dl o HbA1c de 5.7 % a 6.4 %)
- Evaluación del modelo de homeostasis de la puntuación de resistencia a la insulina ≥ 2.5
- Nivel plasmático de proteína C reactiva de alta sensibilidad > 2 mg/L

En los últimos años se ha observado una tendencia al alza de la prevalencia de MAFLD. En el 2018 se reportaba una prevalencia global del 25% (5), para el 2019 y 2022 del 29.8% (6) y del 32.4% (7) respectivamente. Esto ha dado como resultado que la MAFLD se posicione como la primera causa de enfermedad hepática crónica a nivel mundial, afectando aproximadamente a un cuarto de la población adulta mundial (8). Este aumento en la prevalencia de la enfermedad se ha visto influenciado por la creciente epidemia de obesidad y diabetes mellitus. Se estima que alrededor del 50% de los adultos que padecen sobrepeso y obesidad desarrollan MAFLD. La MAFLD no solo se ha establecido como una enfermedad de adultos sino también como una enfermedad que afecta a niños y adolescentes (9).

Por otro lado, en los individuos con un peso normal, se ha visto que la prevalencia de MAFLD también es alta. Sin embargo, a diferencia de los pacientes con sobrepeso y obesidad, la prevalencia varía ampliamente dependiendo la población, con un rango del 5 al 26%. Cabe resaltar que los pacientes con peso normal o IMC dentro de rangos normales (18.5-25 kg/m²) constituyen del 5-50% de los casos totales de MAFLD (10).

Hoy en día es ampliamente conocido que la evolución de la historia natural de la enfermedad conduce al desarrollo de fibrosis, cirrosis y en algunos casos carcinoma hepatocelular. Estas etapas avanzadas de la enfermedad se han establecido como las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes con MAFLD (11). A pesar de ello, la importancia de un diagnóstico temprano y oportuno de MAFLD no solo radica en la prevención de las complicaciones a nivel hepático, sino también de todas aquellas que se manifiestan extrahepáticamente. La enfermedad cardiovascular, la diabetes mellitus, la enfermedad renal crónica, el cáncer hepático y extrahepático son algunas de las complicaciones extrahepáticas que pueden desarrollar los pacientes con MAFLD (12).

MARCO DE REFERENCIA

El hecho de que no todos los adultos obesos desarrollen MAFLD sugiere que los factores ambientales y/o genéticos pueden influir en la susceptibilidad de cada individuo. En un estudio que se realizó en gemelos, se determinó que la esteatosis hepática asociada a MASLD y la fibrosis hepática son rasgos hereditario (13). Se estima que alrededor del 25% y 75% del depósito de grasa hepática y la variabilidad de MAFLD se hereda (14). Diversos estudios de prevalencia en gemelos han demostrado que la prevalencia de MAFLD en gemelos monocigóticos es mayor en comparación a gemelos dicigóticos

(15). Los estudios familiares indican que los familiares de primer grado de una persona con cirrosis relacionada con MAFLD tienen una probabilidad de 12.5 veces mayor de fibrosis hepática aguda que la población en general, el conjunto de esta información ha evidenciado el factor genético de esta enfermedad tan compleja (16).

A diferencia de enfermedades monogénicas, la heredabilidad de rasgos complejos incluye miles de variantes genéticas que son comunes y que se encuentran distribuidas a lo largo de todo el genoma. A través de los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS, por sus

siglas en inglés) se han logrado identificar varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), los cuales afectan la gravedad y la progresión de MAFLD (14).

Actualmente se han descrito más de 10 SNP relacionados al desarrollo de MAFLD, entre ellos se destacan variantes genéticas de PNPLA3, TM6SF2, GCKR, MBOAT7, SAMM50, APOC3, entre otros (16).

La asociación más fuerte que se ha encontrado entre un SNP y MAFLD es el que está asociado con la fosfolipasa similar a la patatina 3 (PNPLA3, por sus siglas en inglés), también conocida como adiponutrina, esta enzima se expresa principalmente en hígado, retina, piel y tejido adiposo. Es codificada por el gen PNPLA3, ubicado en el cromosoma 22 (17). A través de GWAS se identificó la variante rs738409 C > G, p.I148M, también conocida como variante I148M, y su asociación con MAFLD. Esta variante surge a partir de una mutación de transversión de nucleótidos de citosina a guanina en el codón 148 que provoca el cambio de aminoácido de isoleucina a metionina (15). La enzima de tipo salvaje facilita la hidrólisis de triglicéridos, por otro lado, la variante I148M promueve la acumulación de lípidos intracelulares en el hígado debido a la reducción de la hidrólisis de triglicéridos así como de la secreción de partículas de lipoproteínas de baja densidad (VLDL) (18). La progresión de MAFLD hacia esteatohepatitis y fibrosis, es un proceso dinámico influenciado por diversos factores, dentro de las cuales destacan los factores genéticos (5). Se ha visto en población de origen europeo que los sujetos homocigotos para el alelo de riesgo I148M tienen un riesgo 3.3 veces mayor de desarrollar esteatohepatitis y fibrosis hepática.

En un contexto relacionado, el gen GCKR, localizado en el cromosoma 2 (2p23.3), también se ha vinculado a MAFLD (19). Inicialmente estudiado en los años noventa en relación con la DMT2, se descubrió que las variantes genéticas de GCKR se asocian con niveles bajos de glucosa plasmática y niveles elevados de lípidos hepáticos. Codificando la proteína GKR, que regula la actividad de la glucocinasa en hepatocitos, se ha

identificado el polimorfismo rs780094 como relevante en relación con concentraciones de triglicéridos y glucosa plasmática en ayunas (20). El alelo mayor (C) se asocia con niveles reducidos de triglicéridos, pero mayores niveles de glucosa plasmática en ayunas, mientras que el alelo menor (T) se relaciona con niveles más bajos de glucosa plasmática e insulina, y mayores niveles de triglicéridos, estableciendo una asociación directa con el desarrollo de MAFLD (21-23). Estas evidencias genéticas subrayan la compleja interacción entre factores genéticos y la patogénesis de MAFLD.

Además de los factores genéticos y ambientales, la composición y diversidad de la microbiota intestinal también han surgido como elementos clave en la patogénesis de la MAFLD. El término de microbiota hace referencia al conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que reside en las distintas partes del cuerpo humano de forma simbiótica. Trillones de estos microorganismos se encuentran a lo largo del tracto gastrointestinal, donde ayudan a mantener 3 funciones fisiológicas del sistema digestivo: la digestión, el metabolismo y la protección. Se ha identificado que el intestino grueso es donde hay una mayor porción de estos microorganismos, siendo los filos dominantes los *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Adicionalmente se ha observado que la proporción *Firmicutes*:*Bacteroidetes* está correlacionada con la susceptibilidad individual a enfermedades como la obesidad. La composición y función de la microbiota dependen de diversos factores del huésped y del entorno, como la dieta, la actividad física, el uso de medicamentos, la actividad circadiana y la localización geográfica. En años recientes se ha estudiado como influye la microbiota intestinal en el desarrollo de MAFLD (24).

A través del eje intestino-hígado se ha establecido la relación bidireccional entre el intestino, junto con su microbiota, y el hígado, la cual surge como resultado de las interacciones entre las señales generadas por factores dietéticos, genéticos y ambientales. En condiciones fisiológicas la interacción recíproca entre la microbiota y el hígado se establece a través de la vena portal, la cual transporta los productos derivados del intestino al hígado, y la retroalimentación de bilis y anticuerpos del hígado al intestino. Sin embargo,

en condiciones patológicas como lo es MAFLD hay un disfunción de la barrera epitelial intestinal causada principalmente por el consumo de dietas altas en grasas, la cual se traduce en el aumento de la permeabilidad intestinal. Este cambio en la permeabilidad favorece que los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) provenientes de microorganismos y los metabolitos derivados de las acciones de la microbiota intestinal sobre sustratos exógenos (de la dieta y la exposición ambiental) y endógenos (ácidos biliares y aminoácidos) puedan llegar al hígado a través de la vena porta y promover un estado proinflamatorio, lo que a su vez favorece la progresión de MAFLD hacia esteatohepatitis y fibrosis hepática (25).

En el análisis del perfil metataxonómico, el cual se centra en la estructura y distribución de diversos taxones dentro de la microbiota intestinal, se evidencia un notable contraste entre individuos sanos y aquellos diagnosticados con MAFLD. Es importante destacar que estos cambios no son estáticos, sino que varían de acuerdo con las fases clínicas específicas de la enfermedad (26). En el contexto de MAFLD, se han identificado alteraciones consistentes en la composición de la microbiota intestinal, estas modificaciones se manifiestan a diferentes niveles taxonómicos desde el phylum hasta los géneros bacterianos (27). A nivel de phylum (aumento de Proteobacteria), familia (aumento de Enterobacteriaceae y disminución de Rikenellaceae y Ruminococcaceae) y géneros (aumento de Escherichia, Dorea, Peptoniphilus y disminución de Anaerospobacter, Coprococcus, Eubacterium, Faecalibacterium y Prevotella) (28). Los cambios en la abundancia de géneros bacterianos pueden influir en la capacidad de la microbiota para realizar funciones clave, como la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la modulación de la respuesta inmunológica (29).

Investigaciones recientes han explorado cómo la variación genómica humana, incluyendo los SNP, puede influir en la composición de la microbiota intestinal (30). Algunos ejemplos son las variantes de los genes MEFV, FUT2 y NOD2, los cuales están asociados con cambios significativos en la abundancia relativa de ciertas especies bacterianas en el

intestino de individuos con enfermedad de Crohn y enfermedad inflamatoria intestinal, respectivamente (31-33). No obstante, ha surgido la intriga por saber si alguno de los SNP asociado a MAFLD puede influir en la determinación de la composición de la microbiota en los individuos que padecen la enfermedad. En un estudio que evaluaba los SNP de PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7 y HD17B13 y su relación con la variación del perfil metataxonómico de la microbiota hepática. En este estudio se observó que los portadores de los alelos de riesgo rs738409 y rs58542926 de los genes PNPLA3 y TM6SF2 respectivamente, presentaban un enriquecimiento significativo de los miembros de la clase Gammaproteobacteria, incluyendo los géneros Enterobacter y Pseudoalteromonas, respectivamente. Así mismo, mediante la construcción de un puntaje de riesgo poligénico se demostró que el efecto combinado de los alelos de riesgo explica el 7.4% de la variación de los taxones a nivel de género (34). Sin embargo, es importante destacar que este estudio se centró en la microbiota hepática, y existe una notable falta de investigaciones que exploren la relación entre la variación genómica humana y la composición de la microbiota intestinal en MAFLD. Aunque se ha comenzado a abordar esta brecha en la literatura, como lo demuestra un estudio reciente, este se restringió a explorar el efecto aditivo de la variante I148M de PNPLA3 y la composición de la microbiota intestinal en la fracción de grasa hepática (35).

PLANTEAMIENTO

En los últimos años, se ha destacado la complejidad y heterogeneidad de la MAFLD revelando la existencia de múltiples factores que influyen en su desarrollo y progresión. Entre estos factores, se han identificado la genética y la microbiota intestinal como elementos clave. Previamente hemos abordado como la genética y la microbiota intestinal se asocian a la MAFLD; mediante la presencia de SNP relacionados a la regulación del metabolismo de los lípidos, vías de señalización proinflamatorias, la señalización de la insulina, el estrés oxidativo, la fibrogénesis y mediante el eje intestino-hígado, la disbiosis intestinal y los metabolitos microbianos, respectivamente. No obstante, la MAFLD es una enfermedad compleja que resulta de la interacción de múltiples mecanismos

fisiopatológicos. Con el presente estudio proponemos dilucidar la relación entre los SNP asociados a MAFLD y la microbiota intestinal, específicamente como la presencia de los SNP influye en la determinación de la composición de la microbiota intestinal en individuos con MAFLD. La combinación de enfoques genéticos y microbiómicos permitirá obtener una visión más completa de los mecanismos subyacentes a la MAFLD, estableciendo un puente crucial entre la variabilidad genética y la respuesta de la microbiota intestinal en el contexto de esta enfermedad hepática.

¿Existe una asociación entre los polimorfismos de PNPLA3 (rs738409) y GCKR (rs7800094) y la composición metataxonómica de la microbiota intestinal en individuos con MAFLD?

JUSTIFICACIÓN

La relevancia de este protocolo de investigación radica en la creciente prevalencia de la MAFLD en nuestra población, reflejando un aumento preocupante en los factores de riesgo asociados. La alta frecuencia de la enfermedad plantea una preocupación significativa para la calidad de vida de los individuos afectados, así como para la carga económica y temporal que implica su manejo clínico. Esta investigación se justifica por su contribución significativa a la comprensión de la interacción entre los genes asociados a la MAFLD y la composición del microbiota intestinal. La identificación de variantes génicas prevalentes en nuestra población proporcionará información valiosa sobre la susceptibilidad genética a la enfermedad. Además, profundizar en los aspectos fisiopatológicos de la MAFLD mejorará nuestro conocimiento teórico. Los resultados satisfarán la necesidad de información crucial para diseñar intervenciones clínicas específicas y, considerando la creciente prevalencia de la MAFLD, la prioridad de abordar este problema de salud pública se destaca como un aspecto fundamental de la investigación propuesta.

OBJETIVO

Principal

Determinar si existe una asociación entre los polimorfismos de PNPLA3 (rs738409), GCKR (rs7800094) y la composición metataxonómica de la microbiota intestinal en individuos con MAFLD.

Específicos

Identificar la frecuencia de los polimorfismos de PNPLA3 (rs738409) y GCKR (rs780094) en la población de estudio.

Determinar la composición taxonómica de la microbiota intestinal

Analizar el grado de asociación entre los polimorfismos PNPLA3 (rs738409) y GCKR (rs780094) y la composición metataxonómica y funcional de la microbiota intestinal de la microbiota intestinal.

Secundarios

Analizar el grado de asociación entre las características clínicas (IMC, peso, talla, tensión arterial, índice cintura-cadera, riesgo cardiovascular, presencia de comorbilidades), bioquímicas (glucosa, insulina, hemoglobina glicosilada, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos, AST, ALT, GGT, FA, proteína C reactiva, ácido úrico, de imagen (elastografía hepática) con los polimorfismos de PNPLA3 (rs738409) y GCKR (rs780094) y la composición metataxonómica y funcional de la microbiota intestinal.

Analizar el grado de asociación entre los polimorfismos PNPLA3 (rs738409) y GCKR (rs780094) y la severidad de MAFLD.

Analizar el grado de asociación entre la composición metataxonómica de la microbiota intestinal y la severidad de MAFLD.

HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H0): No hay una asociación significativa entre los polimorfismos de PNPLA3 (rs738409) y GCKR (rs7800094) y la composición metataxonómica de la microbiota intestinal en individuos con MAFLD.

Hipótesis alterna (H1): Existe una asociación significativa entre los polimorfismos de PNPLA3 (rs738409) y GCKR (rs7800094) y la composición metataxonómica de la microbiota intestinal en individuos con MAFLD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Universo de estudio. Población de estudio

Adultos mexicanos de 18 a 70 años, de ambos sexos, sin hepatopatía crónica.

Tamaño de la muestra.

Los cálculos considerados, fueron para dos escenarios: para una potencia del 80 y 90. Para cada una de ellas, se consideraron, dentro de las estimaciones estandarizadas de la distribución del número de sujetos necesarios para detectar diferencias medias que representen cambios 2.0 veces. El cálculo del tamaño de la muestra se realizó de acuerdo con la prevalencia reportada de cada variante a estudiar de 0.57 y 0.77 para PNPLA3 (36, 37) y de 0.33 para GCKR (38). En este escenario, considerando que el alelo GCKR presenta una prevalencia menor, el tamaño de muestra estimado basado en esta variante se adoptará como el tamaño de muestra global para el estudio.

PNPLA3	
Potencia= 80 P = 0.57 Alfa Hipótesis Unilateral = 0.05 Diferencia = 2 N= 282	Potencia=90 P = 0.57 Alfa Hipótesis Unilateral = 0.05 Diferencia = 2 N=356
Potencia= 80 P = 0.77 Alfa Hipótesis Unilateral = 0.05	Potencia=90 P = 0.77 Alfa Hipótesis Unilateral = 0.05
Diferencia = 2 N= 64	Diferencia = 2 N=82

GCKR	
Potencia= 80 P = 0.33 Alfa Hipótesis Unilateral = 0.05 Diferencia = 2 N=346	Potencia= 90 P = 0.33 Alfa Hipótesis Unilateral = 0.05 Diferencia= 2 N=462

Muestreo

No probabilística

CRITERIOS DE SELECCIÓN.

Criterios de Inclusión.

- Criterios de Selección:
- Criterios de Inclusión.
- Tener entre 18-70 años
- Tener consentimiento informado
- Ambos géneros
- Estar libre de la ingesta de antibióticos en los últimos 3 meses
- Sin enfermedad gastrointestinal aguda
- Sin hepatopatía crónica de etiología viral, alcohólica o autoinmune

Cumplir con uno de los criterios diagnósticos de MAFLD

- Índice de masa corporal $\geq 25 \text{ kg/m}^2$
- Diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2

En pacientes sin diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y con un IMC $< 25 \text{ kg/m}^2$ cumplir con dos de los siguientes:

- Circunferencia de cintura $\geq 102/88 \text{ cm}$ en hombres y mujeres caucásicos (o $\geq 90/80 \text{ cm}$ en hombres asiáticos y mujeres)
- Tensión arterial $\geq 130/85 \text{ mmHg}$ o tratamiento farmacológico específico
- Triglicéridos plasmáticos $\geq 150 \text{ mg/dl}$ o tratamiento farmacológico específico
- Colesterol HDL en plasma $< 40 \text{ mg/dl}$ para hombres y $< 50 \text{ mg/dl}$ para mujeres o tratamiento farmacológico específico
- Prediabetes (es decir, niveles de glucosa en ayunas de 100 a 125 mg/dl o 2 horas después de la carga niveles de glucosa de 140 a 199 mg/dl o HbA1c de 5.7 % a 6.4 %)
- Evaluación del modelo de homeostasis de la puntuación de resistencia a la insulina ≥ 2.5

- Nivel plasmático de proteína C reactiva de alta sensibilidad >2 mg/L

Criterios de exclusión.

- Ingesta de antibióticos en los últimos 3 meses
- Enfermedad gastrointestinal aguda
- Cirugía bariátrica

Criterios de eliminación.

- Retiro del consentimiento informado
- La recolección de datos es incompleta

Definición de variables

Independientes. CAUSA)		Dependientes. (EFECTO)	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Ácido úrico	Cuantitativa continua (mg/dL)	Abundancia relativa de <i>Bacteroidetes Firmicutes Actinobacteria Proteobacteria</i>	Intervalo (porcentaje)
ALT	Cuantitativa continua (UI/L)	Perfil metataxonómico de la microbiota intestinal	Nominal (especie bacteriana específica)
AST	Cuantitativa continua (UI/L)		
Circunferencia abdominal	Cuantitativa continua (cm)		
Colesterol HDL	Cuantitativa continua (mg/dL)		
Colesterol LDL	Cuantitativa continua (mg/dL)		
Colesterol total	Cuantitativa continua (mg/dL)		

Independientes. CAUSA)		Dependientes. (EFECTO)	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Consumo de alcohol en la dieta	Cuantitativa continua (gramos/día)		
Consumo de fructuosa en la dieta	Cuantitativa continua (gramos/día)		
Consumo de grasa en la dieta	Cuantitativa continua (gramos/día)		
Edad	Cuantitativa continua (años)		
FA	Cuantitativa continua (UI/L)		
GCKR (rs7800094)	Nominal		
	CC CT TT		
GGT	Cuantitativa continua (UI/L)		
Glucosa	Cuantitativa continua (mg/dL)		
Hemoglobina glicosilada	Cuantitativa continua (porcentaje)		
Índice cintura-cadera	Cuantitativa continua (valor numérico)		
Índice de Masa Corporal (IMC)	Cuantitativa continua (kg/m ²)		
Insulina	Cuantitativa continua (mcU/ml)		
MBOAT7 (rs641738)	Nominal CC CT TT		
Peso	Cuantitativa continua (kg)		
PNPLA3 (rs738409)	Nominal CC CG GG		
Proteína C reactiva	Cuantitativa continua (mg/dL)		
Riesgo cardiovascular	Cuantitativa continua (porcentaje)		
Sexo	Nominal Hombre Mujer		
Talla	Cuantitativa continua (m)		

Independientes. CAUSA		Dependientes. (EFECTO)	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Tensión arterial	Cuantitativa continua (mmHg)		
TM6SF2 (rs58542926)	Nominal CC CT TT		
Triglicéridos	Cuantitativa continua (mg/dL)		
APRI	Cuantitativa continua (valor numérico)		
FIB-4	Cuantitativa continua (valor numérico)		
Parámetro de atenuación controlada medida por elastografía transitoria	Intervalo (db/m) Categórica S0: 0 a 233 S1: 234 a 268 S2: 269 a 300 S3: 301 a 400		
Rigidez hepática medida por elastografía	Intervalo (kPa) Categórica 1.F0-F1: <7		

Descripción de procedimientos

Definiciones operacionales

Ácido úrico: producto de oxidación, vía xantino oxidasa, de oxipurinas tales como la xantina y la hipoxantina. Producto final de oxidación del catabolismo de la purina en seres humanos

ALT: enzima del metabolismo intermedio, que cataliza la transferencia de alanina al ácido acetoglutárico, formando ácido oxalacético y ácido pirúvico.

AST: enzimas del metabolismo intermedio, que catalizan la transferencia de grupos amino del ácido aspártico al ácido acetoglutárico, formando ácido oxalacético y ácido pirúvico.

Circunferencia abdominal: Es la medición de la distancia alrededor del abdomen en un punto específico.

Colesterol HDL (c-HDL): lipoproteína de alta densidad. El c-HDL se produce en el hígado y en el intestino. La principal proteína de las moléculas de HDL es la apo A-I (peso molecular 28 000 Da)

Colesterol LDL (c-LDL): lipoproteína de baja densidad. Las c-LDL son sintetizadas en el hígado: Tienen una concentración alta de colesterol y moderada de fosfolípidos, y no contienen triglicéridos. Su apolipoproteína asociada de mayor importancia es apo B-100. Debido a su alta aterogenicidad, es de gran interés clínico, típicamente representa entre 60-70% del colesterol sérico total y su función es transportar el colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos [93].

Colesterol: forma parte de las membranas celulares, sirve como precursor de todas las hormonas esteroideas, ácidos biliares, y de la vitamina D

Edad: tiempo transcurrido a partir del nacimiento del paciente, expresado en años

Elastografía transitoria (ET): se basa en el hecho de que la velocidad de la propagación de una onda de corte elástica depende de la rigidez (o elasticidad) del medio. Cuanto más duro es el medio, más rápido se propaga la onda de corte. Se obtendrán 2 mediciones: el parámetro de atenuación controlada (CAP, expresado en dB/m), como indicador de esteatosis y LSM (Liver Stiffness Measurement, expresado en kPa) como indicador de rigidez hepática

Esteatosis hepática: acumulación anormal de grasa que afecta a más del 5% de los hepatocitos, definida por técnicas de imagen, cuantificación directa o estimación histológica. Para el protocolo se definirá acorde a la clasificación de estadios definidos por valores de elastografía transitoria.

FA: enzima que cataliza la conversión de un monoéster ortofosfórico y agua en un alcohol y ortofosfato.

Fibrosis hepática: esteatosis o esteatohepatitis no alcohólica con puentes de fibrosis periportal, portal o sinusoidal (45). Para el protocolo se definirá acorde a la clasificación de estadios definidos por valores de elastografía transitoria.

Fructuosa: monosacárido que se encuentra en frutas dulces y la miel, soluble en agua, alcohol o éter.

Gamaglutamil transferasa (GGT): prueba de función hepática, denominada enzima de colestasis, cuya función es romper determinados enlaces entre moléculas y transferir grupos gamma glutamil.

Glucosa: es un monosacárido cuya función principal es producir energía para el ser vivo y poder llevar a cabo los procesos que ocurren en el cuerpo como: la digestión, multiplicación de células, reparación de tejidos, entre otros. Asimismo, la glucosa es uno de los principales productos de la fotosíntesis y combustible para la respiración celular.

Grasa: ésteres glicerol de un ácido graso o de una mezcla de ácidos grasos. Son importantes en la dieta como fuente de energía

Hemoglobina glicosilada: fracción de la hemoglobina circulante que sufre glicosilación. Se utiliza como un parámetro analítico que estima el control metabólico de la diabetes mellitus en las cuatro semanas anteriores a la extracción de sangre.

Índice cintura-cadera: El índice cintura-cadera es la relación que resulta de dividir el perímetro de la cintura de una persona por el perímetro de su cadera, ambos valores en centímetros (cm).

Índice de masa corporal (IMC): es un indicador antropométrico que se calculará al dividir el peso (en kilogramos) entre la estatura (en metros) al cuadrado, y se expresará como kg/m^2

Insulina: hormona proteica segregada por las células beta del páncreas. La insulina desempeña un papel fundamental en la regulación del metabolismo de la glucosa, generalmente promoviendo la utilización celular de la glucosa. También es un regulador importante del metabolismo proteico y lipídico [85]

Obesidad: acumulación excesiva de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud. En adultos el diagnóstico se establece si el IMC es superior a 30 kg/m^2

Perfil metatoxómico de la microbiota intestinal: Se refiere a la composición taxonómica de las bacterias presentes en la microbiota intestinal. La metataxonomía es un enfoque que utiliza técnicas de secuenciación del ADN para identificar y clasificar las especies bacterianas presentes en una muestra de microbiota intestinal.

Perfil microbiota intestinal: composición cuantitativa y cualitativa de la microbiota. Los cambios pueden conducir a la alteración de la interacción microbiana-huésped o

desequilibrio homeostático que puede contribuir a un estado de enfermedad a menudo con inflamación [95]. Aproximadamente el 98% de todas las especies bacterianas que componen la microbiota intestinal pertenecen a los siguientes filos: Firmicutes (64%) y Bacteroidetes (23%), que representan la mayor parte de la microbiota intestinal además de Proteobacteria (8%) y Actinobacteria (3%) [96]. El filo Firmicutes contiene más de 250 géneros, incluido Lactobacillus [97]. El phylum Bacteroidetes, similar a Firmicutes, se encuentra en el intestino delgado y grueso, especialmente en el colon, y abarca varios géneros, como Bacteroides, Flavobacteria y Sphingobacteriales, siendo Bacteroides thetaiotaomicron uno de los más abundantes

Peso: indicador de masa corporal total necesario para detectar alteraciones en el estado nutricional; se expresará en kilogramos

Polimorfismo de un solo nucleótido: Variación genética común que ocurre en un solo nucleótido de la secuencia de ADN.

Polimorfismo rs1260326 de GCKR: polimorfismo de un solo nucleótido que ocurre en el gen GCKR (Glucokinase Regulatory Protein) en el que hay un cambio de citosina por timina (C>T) también conocida como variante P446L.

Polimorfismo rs738409 de PNPLA3: polimorfismo de un solo nucleótido que ocurre en el gen PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) en el que hay un cambio de citosina por guanina (C>G) en el codón 148 del gen, también conocida como variante I148M.

Presión arterial: La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre circulante contra las paredes de las arterias, que son grandes vasos por los que circula la sangre en el organismo. Su determinación incluye dos mediciones: la presión sistólica, que se mide durante el latido del corazón (momento de presión máxima), y la presión diastólica, que se mide durante el descanso entre dos latidos (momento de presión mínima).

Proteína C reactiva: Proteína que sintetiza el hígado cuando se presenta inflamación o daño de un tejido en el cuerpo.

Riesgo cardiovascular: Probabilidad de que una persona sufra un episodio de enfermedad cardiovascular (infarto de miocardio o un accidente cerebrovascular) durante un período determinado, por ejemplo 10 años.

Sexo: la totalidad de las características de las estructuras reproductivas y sus funciones, fenotipo y genotipo, que diferencian al organismo masculino del femenino.

Sobrepeso: indicador nutricional establecido si el IMC es superior.

Talla: se compone de la suma de cuatro componentes: las piernas, la pelvis, la columna vertebral y el cráneo; es un indicador de crecimiento lineal expresado en centímetros (-)

Triglicéridos: lípidos plasmáticos insolubles en medio acuoso

Descripción de procedimientos

Cuestionario

- Mediante la utilización de cuestionarios estandarizados (historia clínica):
- Nombre:
- Edad:
- Sexo:
- Antecedentes familiares y personales de:
- MASLD o NAFLD: Si/No.
- Cirrosis: Si/No.
- Carcinoma hepatocelular: Si/No.
- Consumo de alcohol: Si/No.
- Alcoholismo: Si/No.
- Tabaquismo: Si/No.
- Toxicomanías: Si/No
- Cardiopatía isquémica: Si/No.
- Dislipidemias: Si/No.
- Hipertensión: Si/No.
- Consumo de fármacos o medicina tradicional hepatotóxicos: Si/No.
- Diagnóstico o antecedente de hepatitis viral: Si/No.
- Otras causas de hepatopatía (acumulación de metales, autoinmune, trasplante): Si/No.

Cuestionario de consumo de alimentos: Recopilar información detallada sobre los patrones de alimentación y las elecciones dietéticas de los individuos en los últimos 7 días.

Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ) versión corta: La versión corta de este cuestionario pregunta por las horas y minutos de actividad física vigorosa,

moderada y caminata realizada en los últimos siete días durante al menos 10 minutos continuos. Previamente ha sido validado en la población mexicana (39).

Determinación de biomarcadores (FIB-4, APRI): Se llevará a cabo mediante el uso de calculadoras online especializadas. Antes de utilizar la calculadora, se recopilarán datos clínicos y de laboratorio del paciente, como niveles séricos de AST y ALT y el recuento de plaquetas.

Determinación de estatura: Se utilizará un estadiómetro previamente calibrado. Se colocará al sujeto de pie, descalzo y con los pies juntos. Manteniendo una postura recta y relajada, con los talones, las nalgas, los hombros y la parte posterior de la cabeza en contacto con el estadiómetro. El procedimiento se lleva a cabo por el personal del centro integral de diagnóstico y tratamiento.

Determinación de peso corporal: Se utilizará una balanza de plataforma previamente calibrada. Se le pedirá al sujeto se retire los zapatos y cualquier objeto pesado que pueda llevar consigo. Se le pedirá sujeto que se suba a la balanza y se pare en el centro de la plataforma con los pies separados de manera uniforme. Se espera a que la balanza se estabilice y muestre una lectura constante antes de registrar el peso. Una vez que la balanza se haya estabilizado, se lee y registra el peso. El procedimiento se lleva a cabo por el personal del centro integral de diagnóstico y tratamiento.

Determinación del riesgo cardiovascular: Previo al cálculo del riesgo cardiovascular, se recabran los datos necesarios mediante la realización de la historia clínica completa y la determinación de los factores de riesgo asociados como la presión arterial, niveles séricos de colesterol, historial de tabaquismo, diagnóstico de diabetes y actividad física. Para el cálculo del riesgo cardiovascular se utilizará el Framingham Risk Score para calcular el riesgo general de enfermedad cardiovascular a 10 años.

Determinación IMC: Con los datos del peso corporal (kg) y estatura (m), utilizando la fórmula: $\text{peso (kg)} / (\text{estatura (m)})^2$ se obtendrá el IMC el cual será expresado en kg/m².

Determinación índice cintura-cadera: Se solicita al sujeto que se despoje de prendas que puedan interferir con la medición. Debera estar de pie con los pies ligeramente separados y los brazos relajados a los costados del cuerpo. Se identifica los puntos de referencia, la cintura se mide en el punto más estrecho entre las costillas inferiores y la parte superior de la cadera; la cadera se mide en el punto más prominente de los glúteos. Se coloca la cinta métrica flexible en los puntos de referencia previamente mencionados, asegurando que esté

ajustada, evitando comprimir el tejido abdominal. Se realiza la medición y se registrara la medición en centímetros. Se divide el valor de la circunferencia de la cintura entre el valor de la circunferencia de la cadera para obtener el índice cintura-cadera.

Elastografía hepática: Para la evaluación de la rigidez hepática (RH) y el parámetro de atenuación controlada (PAC), se utilizará elastografía con onda de corte a través de Fibroscan®, acorde con las instrucciones del fabricante. Se utilizará transductor de 3.5 MHz con diámetro de 7 mm para medir simultáneamente RH y PAC. Con el adulto en decúbito dorsal, se identificará la región hepática libre de las estructuras vasculares mayores. La punta del transductor se colocará sobre la piel entre las costillas a nivel del lóbulo derecho del hígado y se registrarán los valores de RH en kPa, calculándose la mediana de 10 mediciones individuales. PAC representa la medición de la atenuación de las ondas del ultrasonido en el hígado a 3.5 MHz medidos al mismo tiempo que el RH. El valor final de PAC el cual varía de 100 a 400 decibeles por metro (dB/m) se calculará como la mediana de 10 mediciones individuales. Una vez obtenidos los valores de PAC y RH se estadificarán acorde a los valores previamente mencionados.

Genotipificación: Para realizar la extracción de ADN genómico de sangre total, se obtendrá una muestra de sangre total en tubos con anticoagulante (EDTA). Se obtendrá una alícuota de 1.0 mL y el resto será almacenado a -20°C. La extracción de DNA, se realizará con el kit QIAamp 96 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany). La pureza y concentración del DNA será evaluada con NanoDrop ND 100. La genotipificación de los polimorfismos de PNPLA3 (rs738409) y GCKR rs7800094 se realizará mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan, en el sistema StepOne (Applied Biosystems) para la cuantificación absoluta de fluorescencia y el análisis de discriminación alélica.

Medición de perímetro abdominal: Se solicitará al sujeto que se coloque de pie de manera cómoda y relajada, con los pies separados aproximadamente a la altura de los hombros, se le solicitará que se descubra el abdomen. Se localizará el punto inferior de la última costilla y la cresta ilíaca, se trazará una línea imaginaria entre estos dos puntos. Se colocará la cinta métrica alrededor del abdomen del paciente, se revisará que este ajustada y sin arrugas. Se registrará el valor de la circunferencia abdominal en centímetros.

Toma de muestras de sangre periférica: Previo al inicio del procedimiento se realizará lavado de manos, se colocarán guantes desechables y se preparara la aguja y la jeringa estéril. Se identificará el sitio de punción apropiado en el brazo del sujeto, se utilizará una bola de algodón empapada en alcohol para limpiar y desinfectar el área seleccionada. Se colocará un torniquete en el brazo del sujeto y se le pedirá que abra y cierre el puño varias veces

para hacer que las venas sean más prominentes y fáciles de acceder. Con mano firme y segura, se introducirá la aguja en la vena seleccionada en un ángulo de aproximadamente 15-30 grados. Cuando la sangre comience a fluir, se retirará el torniquete. Se extraerá la cantidad necesaria de sangre según los requisitos del análisis de laboratorio, posteriormente se retirará suavemente la aguja de la vena, aplicando presión firme con una bola de algodón en el sitio de punción para detener el sangrado. Una vez que el sangrado se haya detenido, se colocará un vendaje o una banda adhesiva estéril en el sitio de punción para protegerlo. Se etiquetará adecuadamente los tubos de recolección con la información del sujeto. El procedimiento se llevará a cabo por el personal del centro integral de diagnóstico y tratamiento.

Toma de tensión arterial: Previo al inicio del procedimiento se verificará que el esfigmomanómetro esté calibrado y en buen estado de funcionamiento. Se le solicitará al sujeto que se siente en una silla con respaldo y apoye su brazo en una superficie plana, así mismo se le solicitará que se lo descubra y que este relajado. Se envolverá el manguito alrededor del brazo, justo por encima del codo, asegurando que el borde inferior del manguito este a 2.5 cm por encima del pliegue del codo. Se localizará la arteria braquial y se colocará el diafragma del estetoscopio sobre la arteria braquial, debajo del manguito. Con la ayuda de la pera de inflado del esfigmomanómetro se bombeará aire al manguito hasta que alcance un nivel de presión 20-30 mmHg por encima de la estimación de la presión arterial sistólica esperada del paciente. Se abrirá lentamente la válvula de liberación de aire del esfigmomanómetro para permitir que el aire salga gradualmente, al escuchar el primer sonido claro y rítmico (sonido de Korotkoff), se registrará ese valor como la presión arterial sistólica y en el punto en el que desaparezca el sonido se registrará ese valor como la presión arterial diastólica, ambos valores se registrarán en mmHg. El procedimiento se llevará a cabo por el personal del centro integral de diagnóstico y tratamiento

Análisis de pruebas de laboratorio: Se obtendrán mediante análisis de laboratorio los niveles séricos de AST, ALT, FA, GGT, glucosa, insulina, proteína C reactiva, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, ácido úrico y hemoglobina glicosilada.

Análisis microbiota fecal: Se realizará toma de muestra de materia fecal para llevar a cabo análisis microbiológico, evaluación de abundancia, diversidad y estabilidad a través de la técnica de PCR cuantitativo (qPCR, Polymerase Chain Reaction cuantitativa o en tiempo real con un equipo Light cycler 480). Para la extracción del DNA total de las muestras de materia fecal se utilizará el kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research,

USA), de acuerdo al protocolo del fabricante, como se menciona a continuación. De manera general la extracción del DNA por este kit incluye: obtención de un lisado, eliminación de impurezas, ajuste de pH y sales para evitar favorecer la unión del DNA a la membrana de sílica, lavado y elución del DNA, para lo cual, se transferirán 250 µL de muestra de heces clarificadas en solución salina de fosfatos (PBS) al tubo (ZR Bashing Bead Lysis), se adicionarán 750 µL de la solución de lisis del kit y se agitará a máxima velocidad por 10 minutos con ayuda de un vortex Genie 2 de Scientific Industries, Inc.; enseguida se centrifugará a 4°C $\geq 10\,000$ g/1 minuto en la centrífuga Legend Micro 21R de Thermo Scientific, el sobrenadante se transferirá a 400 µL en la columna (Zymo-Spin™ IV Spin Filter) con tubo colector, luego se centrifugará a 7 000 g/1 minuto; al filtrado se adicionarán 200 µL de buffer (Fecal DNA Binding Buffer), la mezcla se filtrará en la columna con tubo colector (Zymo-Spin™ IIC Column) y de nuevo se centrifugará a 10 000 g/ 1minuto; enseguida se le adicionará 500 µL de fecal DNA Wash Buffer y nuevamente se centrifugará a 10 000 g/ 1 minuto; para eluir el DNA soportado en la membrana de la columna se adicionarán 50 µL de DNA Elution Buffer y se incubará a temperatura ambiente por 2 minutos, posteriormente se centrifugará a 10 000 g/ 30 segundos; el filtrado se pasará por la columna (Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter) que previamente se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril, finalmente se centrifugará a 8 000 g/ 1 minuto. Para inactivar las DNasas, se incubará a 90°C/ 10 minutos. La cuantificación espectrofotométrica del DNA total obtenido se medirá a una longitud de onda (λ) (260/280) en el espectrofotómetro NanoDrop One de Thermo Scientific. El DNA total se almacenará a -70°C hasta su estudio.

Toma de muestra de materia fecal: Se recolectará a partir de la muestra que el sujeto traiga consigo el día de su cita en el centro integral de diagnóstico y tratamiento

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Primera fase

Ingreso de sujetos al estudio

Se incluye en el estudio adultos mexicanos que cumplan con los criterios de inclusión previamente establecidos.

Se les brinda información del protocolo y se les invita a participar en este. En caso de que acepten participar se les brinda el consentimiento informado el cual debe llenar y firmar adecuadamente.

Una vez que se tenga el consentimiento informado, se realiza el cuestionario previamente mencionado. Posteriormente el sujeto pasa de manera rutinaria a su visita en el centro integral de diagnóstico y tratamiento, en donde el investigador principal se encarga de recolectar la información clínica, antropométrica, así como la recolección de la muestra de materia fecal y de sangre.

Se reservan 5ml de muestra de sangre total para el aislamiento de ADN y la posterior determinación de los polimorfismos en un tubo BD Vacutainer con EDTA y 4ml de sangre total para la determinación de insulina en un tubo BD Vacutainer con heparina.

La muestra de materia fecal se colocará en un vaso estéril el cual se coloca inmediatamente en la hielera para conservar la cadena fría.

Para la evaluación de la rigidez hepática (RH) y el parámetro de atenuación controlada (PAC), se utiliza elastografía con onda de corte a través de Fibroscan®

Almacenaje y transporte de muestras

Una vez obtenidas, las muestras de sangre y materia fecal son almacenadas en una hielera médica hasta finalizar la jornada de captura de sujetos. Posteriormente la hielera con las muestras son trasladadas a la Unidad Periférica de Investigación en Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para su resguardo. Las muestras serán resguardadas hasta el momento en el que se inicie la fase 2 del estudio.

Segunda fase

Genotipificación y aislamiento de ADN microbiano

De acuerdo con la metodología previamente planteada, se lleva a cabo en la Unidad Periférica de Investigación en Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud del INMEGEN.

Tercera fase

Análisis genético

Se obtiene frecuencias alélicas y genotípicas y se analiza si estas se distribuyen de acuerdo con lo esperado por la ley del equilibrio de Hardy Weinberg.

Análisis microbiano

La cuantificación de cada phylum bacteriano (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacterias* y *Proteobacterias*) se lleva a cabo por qPCR. Se amplifica y se cuantifica siguiendo la metodología de Bergstrom. Se utilizan los iniciadores específicos para la región que codifica para el 16S rRNA para cada phylum bacteriano y se cuantifican con SYBER Green en unidades arbitrarias de fluorescencia:

Primer	Phylum	Secuencia
U1	Universal	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT AGCTGACGACAACCATGCAG
F1	Firmicutes	TGAAACTYAAAGGAATTGACG ACCATGCACCACCTGT
B1	Bacteroidetes	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
A1	Actinobacteria	GCGTGCTTAACACATGCAAGTC CACCCGTTTCCAGGAGCTATT

Para el análisis taxonómico los datos de secuenciación del gen 16S rARN serán filtrados, limpiados y procesados en la plataforma QIIME2 para la posterior identificación taxonómica mediante la asignación de unidades taxonómicas operativas (OTUs).

Análisis estadístico

Para abordar los objetivos propuestos en el estudio se desarrollará una sección de análisis estadístico detallada que permita evaluar las relaciones entre estas variables genéticas, el microbiota intestinal, y diversos factores clínicos y bioquímicos, como se muestra a continuación:

Análisis inicial

Realizar un análisis descriptivo de la población de estudio, incluyendo frecuencias para variables categóricas (como los polimorfismos de PNPLA3 y GCKR) y medidas de

tendencia central y dispersión para variables continuas (IMC, peso, glucosa, triglicéridos etc.).

Análisis del estudio genético

Se utiliza estadística descriptiva para reportar las frecuencias y porcentajes de los alelos y genotipos de PNPLA3 y GCKR en la muestra. Se aplican pruebas de chi-cuadrado o test exacto de Fisher para comparar las frecuencias observadas con las esperadas bajo equilibrio de Hardy-Weinberg.

Análisis del estudio de la microbiota

Se utilizan análisis de diversidad alfa y beta para evaluar las diferencias en la composición taxonómica de la microbiota intestinal. Para comparar la abundancia de taxones específicos entre grupos se utiliza la prueba de suma de rangos de wilcoxon.

Asociación entre Polimorfismos y Composición de la Microbiota

Se utiliza modelos lineales o logísticos para asociar la presencia del alelo de riesgo con cambios en la abundancia de taxones específicos. Estos modelos se podrán ajustar por covariables como la edad, el sexo, el índice de masa corporal (IMC), y otros factores que podrían influir en la microbiota intestinal.

Asociación entre Polimorfismos, Composición de la Microbiota, y Factores Clínicos/Bioquímicos

VALIDACIÓN DE DATOS.

Se utiliza estadística descriptiva, medidas de tendencia central y dispersión: rango, media, mediana, moda, desviación estándar, proporciones o porcentajes.

Por tener dos o más muestras, se utiliza estadística inferencial.

Pare el (los) parámetro(s) principal(es): Indique el parámetro que considera para llegar a la conclusión escala nominal. Prueba de Chi cuadrada.

El nivel de significancia para rechazar la hipótesis nula (H_0) será de $p < 0.05$

Por medir asociación, se utilizará: Análisis de Correlación lineal, Coeficiente de correlación de Spearman, otras.

Otra(s) prueba(s) estadística(s), Ej.- Análisis de regresión multiple.

Comparación	Paramétrica	No Paramétrica
2 muestras	t de 2 muestras	W-Mann Whitney (suma de rangos)
Pareado	t pareada	Rangos señalados de Wilcoxon
>2 muestras	ANOVA (1 vía)	Kruskal-Wallis
Correlación	r de pearson	r de Spearman

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Para presentar los resultados se utilizarán tablas descriptivas, tablas comparativas y/o gráficas (barras, histogramas, líneas, puntos).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. El estudio será realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki, y con las leyes nacionales y locales.

Todos los pacientes firman un consentimiento informado por escrito antes de la inclusión en el estudio, se les asigna un número de folio consecutivo para proteger su nombre, autorizando el uso anónimo de su información médica para la investigación.

NOTAS AL PIE

Declaración de consentimiento informado: Todos los datos de los pacientes fueron anonimizados y manejados bajo estricta confidencialidad.

Declaración de conflicto de intereses: Todos los autores declaran no tener conflictos de interés relevantes relacionados con este artículo.

Disponibilidad de datos: Los conjuntos de datos generados y/o analizados durante el presente estudio no están disponibles públicamente debido a las políticas institucionales de protección de datos, pero pueden ser solicitados al autor de correspondencia previa solicitud razonable.

Acceso abierto: Este artículo es de acceso abierto, seleccionado por un editor interno y sometido a revisión por pares por evaluadores externos. Se distribuye conforme a la licencia Creative Commons Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0), que permite a terceros distribuir, remezclar, adaptar y desarrollar el contenido con fines no comerciales, así como licenciar sus obras derivadas en términos diferentes, siempre que se otorgue el crédito correspondiente a la obra original y el uso no sea comercial.

Véase: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

País de origen: México.

REFERENCIAS

Las referencias bibliográficas se mantienen en su idioma original con el propósito de permitir su revisión directa y asegurar la fidelidad de las fuentes citadas.

1. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. J Hepatol. 2020;73(1):202-9.
2. Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. Hepatology. 2023.
3. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. BMC Med. 2011;9:48.

4. Social IMdS. Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica del Adulto. Mexico. 2014.
5. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20.
6. Le MH, Yeo YH, Li X, Li J, Zou B, Wu Y, et al. 2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022;20(12):2809-17.e28.
7. Riazi K, Azhari H, Charette JH, Underwood FE, King JA, Afshar EE, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022;7(9):851-61.
8. Le Garf S, Nègre V, Anty R, Gual P. Metabolic Fatty Liver Disease in Children: A Growing Public Health Problem. *Biomedicines*. 2021;9(12).
9. Liu J, Mu C, Li K, Luo H, Liu Y, Li Z. Estimating Global Prevalence of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease in Overweight or Obese Children and Adolescents: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Public Health*. 2021;66:1604371.
10. Eslam M, El-Serag HB, Francque S, Sarin SK, Wei L, Bugianesi E, George J. Metabolic (dysfunction)-associated fatty liver disease in individuals of normal weight. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022;19(10):638-51.
11. Gralherr F, Grander C, Effenberger M, Schwärzler J, Tilg H. MAFLD: what 2 years of the redefinition of fatty liver disease has taught us. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2022;13:20420188221139101.
12. Pipitone RM, Ciccioli C, Infantino G, La Mantia C, Parisi S, Tulone A, et al. MAFLD: a multisystem disease. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2023;14:20420188221145549.

13. Loomba R, Schork N, Chen CH, Bettencourt R, Bhatt A, Ang B, et al. Heritability of Hepatic Fibrosis and Steatosis Based on a Prospective Twin Study. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1784-93.
14. Sharma D, Mandal P. NAFLD: genetics and its clinical implications. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2022;46(9):102003.
15. Choudhary NS, Duseja A. Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2021;6:2.
16. Zhu X, Xia M, Gao X. Update on genetics and epigenetics in metabolic associated fatty liver disease. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2022;13:20420188221132138.
17. Ganesan R, Jeong JJ, Kim DJ, Suk KT. Recent Trends of Microbiota-Based Microbial Metabolites Metabolism in Liver Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:841281.
18. Meroni M, Longo M, Tria G, Dongiovanni P. Genetics Is of the Essence to Face NAFLD. *Biomedicines*. 2021;9(10).
19. Rees MG, Wincovitch S, Schultz J, Waterstradt R, Beer NL, Baltrusch S, et al. Cellular characterisation of the GCKR P446L variant associated with type 2 diabetes risk. *Diabetologia*. 2012;55(1):114-22.
20. Yang Z, Wen J, Tao X, Lu B, Du Y, Wang M, et al. Genetic variation in the GCKR gene is associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese people. *Mol Biol Rep*. 2011;38(2):1145-50.
21. Ansari N, Ramachandran V, Mohamad NA, Salim E, Ismail P, Hazmi M, Mat LNI. Association of GCK (rs1799884), GCKR (rs780094), and G6PC2 (rs560887) Gene Polymorphisms with Type 2 Diabetes among Malay Ethnic. *Glob Med Genet*. 2023;10(1):12-8.

22. Zain SM, Mohamed Z, Mohamed R. Common variant in the glucokinase regulatory gene rs780094 and risk of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(1):21-7.
23. Li J, Zhao Y, Zhang H, Hua W, Jiao W, Du X, et al. Contribution of Rs780094 and Rs1260326 Polymorphisms in GCKR Gene to Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis Involving 26,552 Participants. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2021;21(9):1696-708.
24. Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(8):1541-58.
25. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol*. 2020;72(3):558-77.
26. Hrnčir T, Hrnčířová L, Kverka M, Hromádka R, Machová V, Trčková E, et al. Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. *Microorganisms*. 2021;9(5).
27. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Gill SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2013;57(2):601-9.
28. Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, Le P, Holleboom AG, Verheij J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(5):279-97.
29. Dai X, Hou H, Zhang W, Liu T, Li Y, Wang S, et al. Microbial Metabolites: Critical Regulators in NAFLD. *Front Microbiol*. 2020;11:567654.
30. Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, Sun Q, Bukowski R, Bell JT, et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*. 2015;16(1):191.

31. Tong M, McHardy I, Ruegger P, Goudarzi M, Kashyap PC, Haritunians T, et al. Reprograming of gut microbiome energy metabolism by the FUT2 Crohn's disease risk polymorphism. *Isme j.* 2014;8(11):2193-206.
32. Knights D, Silverberg MS, Weersma RK, Gevers D, Dijkstra G, Huang H, et al. Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med.* 2014;6(12):107.
33. Khachatryan ZA, Ktsoyan ZA, Manukyan GP, Kelly D, Ghazaryan KA, Aminov RI. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS One.* 2008;3(8):e3064.
34. Pirola CJ, Salatino A, Quintanilla MF, Castaño GO, Garaycochea M, Sookoian S. The influence of host genetics on liver microbiome composition in patients with NAFLD. *EBioMedicine.* 2022;76:103858.
35. Monga Kravetz A, Testerman T, Galuppo B, Graf J, Pierpont B, Siebel S, et al. Effect of Gut Microbiota and PNPLA3 rs738409 Variant on Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Obese Youth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2020;105(10):e3575-e85.
36. Chinchilla-López P, Ramírez-Pérez O, Cruz-Ramón V, Canizales-Quinteros S, Domínguez-López A, Ponciano-Rodríguez G, et al. More Evidence for the Genetic Susceptibility of Mexican Population to Nonalcoholic Fatty Liver Disease through PNPLA3. *Ann Hepatol.* 2018;17(2):250-5.
37. Martínez LA, Larrieta E, Kershenovich D, Torre A. The Expression of PNPLA3 Polymorphism could be the Key for Severe Liver Disease in NAFLD in Hispanic Population. *Ann Hepatol.* 2017;16(6):909-15.
38. Trejo MJ, Morrill KE, Klimentidis YC, Garcia DO. Examining genetic associations with hepatic steatosis in Mexican-origin adults. *Annals of Hepatology.* 2023;28(5):101120.

39. Medina C, Barquera S, Janssen I. Validity and reliability of the International Physical Activity Questionnaire among adults in Mexico. *Rev Panam Salud Publica*. 2013;34(1):21-8.