



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA BENITO JUÁREZ
DE OAXACA.**

FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA

MAESTRÍA EN BIOMEDICINA EXPERIMENTAL



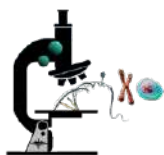
TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN EN BIOMEDICINA EXPERIMENTAL

**DETERMINACIÓN DE CANDIDATOS A BIOMARCADORES PARA
LA ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO
MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

PRESENTA: Q.F.B. ITAYETZI REYES AVENDAÑO

DIRECTORA: DRA. EN C. VERÓNICA ROCÍO VÁSQUEZ GARZÓN

CO-DIRECTOR: DR. EN C. JAIME ARRELLANES ROBLEDO



Fibrosis y Cáncer

OAXACA DE JUÁREZ, JUNIO DEL 2021





**COORDINACIÓN MAestrÍA EN
BIOMEDICINA EXPERIMENTAL**
OF/118/2021

Asunto: Autorización Impresión de Tesis.

Oaxaca de Juárez, Oax., 09 de junio de 2021.

**C. REYES AVENDAÑO ITAYETZI
PRESENTE.**

Informo a usted, que después de haber revisado y evaluado su tesis titulada: "**DETERMINACIÓN DE CANDIDATOS A BIOMARCADORES PARA LA ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**", la cual presenta como candidata para obtener el Grado de Maestra en Biomedicina Experimental; los abajo firmantes concedemos la **AUTORIZACIÓN** para que proceda a la impresión de tesis.

**ATENTAMENTE
"CIENCIA, ARTE, LIBERTAD"
INTEGRANTES DEL JURADO**

DRA. VERÓNICA ROCÍO VÁSQUEZ GARZÓN
PRESIDENTE

DR. JESÚS HERNÁNDEZ JUÁREZ
SECRETARIO

DR. ESTANISLAO RAMÍREZ VARGAS
SINODAL

DR. ÚRIA GUEVARA LÓPEZ
SINODAL

DR. JAIME ARELLANES ROBLEDO
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Verónica Vásquez Garzón por su paciencia, sus enseñanzas, sus consejos y todo su apoyo incondicional e impulsarme a dar siempre lo mejor de mí. Muchas gracias doctora por la oportunidad.

A la candidata a doctora Ana Beatriz Villaseñor Altamirano por ser mi mentora y guía en la realización de este proyecto, por su paciencia y brindarme su conocimiento incondicionalmente. Muchas gracias por todo.

Al Doctor Jaime, por sus consejos y brindarme su conocimientos y experiencia para mejorar este proyecto y ayudarme a forjar nuevas habilidades.

Al Doctor Rafael Baltierrez, por sus consejos en mi formación académica, siempre me ayudo a mejorar y esforzarme mas.

A todo el laboratorio de fibrosis y cáncer, por ser compañeros y amigos en todo este proceso. Gracias por todo Caro, Edí, Aurora, Adri, Jovito, Juan, Karina, Cecilia y Armando.

A mis asesores, Dr. Jesús, Dr. Uria, Dr. Estanislao, por tomarse el tiempo, brindarme consejos y sugerencias para hacer de este proyecto un mejor trabajo.

Un sincero y profundo agradecimiento a toda mi familia, por su apoyo incondicional.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
RESUMEN GRÁFICO	X
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO CONCEPTUAL	3
2.1 ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO.....	3
2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE EHGNA	4
2.3 CLASIFICACIÓN DE LA EHGNA	6
2.4 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A EHGNA	7
2.5 EHGNA Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA	11
2.6 FISIOPATOLOGÍA DE LA EHGNA	12
2.7 DIAGNÓSTICO ACTUAL	14
2.8 ESTADIFICACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA EHGNA	15
2.9 BIOMARCADORES.....	17
2.10 BIOINFORMÁTICA Y LA EHGNA.....	19
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4 JUSTIFICACIÓN	23
5 HIPÓTESIS	24
6 OBJETIVOS	25
6.1 GENERAL:	25
6.2 ESPECÍFICOS:.....	25
7 METODOLOGÍA	26
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO:	26
7.1.1 Estrategia de búsqueda.....	26
7.1.2 Selección de estudios	26
7.2 EXTRACCIÓN DE DATOS Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD	26
7.3 ANÁLISIS DE DATOS	27
7.3.1 Meta-análisis.....	27
7.4 ANÁLISIS DE DATOS MEDIANTE EL LENGUAJE DE PROGRAMACIÓN R.....	28
7.4.1 Identificación de Genes diferencialmente expresados (DEG).....	28
7.4.2 Análisis de superposición con la categoría proteómica y liberación al torrente sanguíneo	28
7.4.3 Análisis de la vía GO, HALLMARK, WIKIPATHWAYS y REACTOME	29
7.5 RESULTADOS.....	29
7.5.1 Identificación de DEG para distintas etapas de la EHGNA mediante meta-análisis.	29
7.5.2 Identificación de genes específicos las etapas de la EHGNA.....	33

7.5.3	<i>Los DEG de las etapas de HGNA y EHNA se agrupan principalmente en BP en el análisis de GO.</i>	35
7.5.4	<i>El meta-análisis mostró patrones de expresión génica global específicos para cada etapa de la EHGNA.</i>	39
7.5.5	<i>Los DEG para las distintas etapas de la EHGNA tiene similitudes con las categorías de liberación al torrente sanguíneo y proteómica.</i>	41
7.5.6	<i>Vías del relacionadas al colesterol y metabolismo de lípidos son cruciales en la progresión de la EHGNA en vías: Hallmark, Wikipathways y REACTOME</i>	42
7.5.7	<i>Genes relacionados al colesterol son candidatos a biomarcadores para las etapas de HGNA y EHNA en la EHGNA.</i>	47
8	DISCUSIÓN	49
9	CONCLUSIONES	54
10	PERSPECTIVAS	55
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de EHGNA Y CHC a partir de hígado sano.	4
Figura 2. Definiciones de enfermedad del hígado graso no alcohólico y sus subconjuntos. .	7
Figura 3. Variantes genéticas frecuentes asociadas con EHGNA y sus principales efectos.	10
Figura 4. Patogénesis de la EHGNA.	14
Figura 5. Vía de la enfermedad e impacto potencial de los biomarcadores.	18
Figura 6. Ejemplos de biomarcadores cardiovasculares y su relación con diferentes tecnologías "ómicas" y enfermedades.	20
Figura 7. Mapa de calor de las comparaciones realizadas en el meta-análisis.	31
Figura 8. Los 10 DEG con mayor diferencia de expresión en la etapa de HGNA.	32
Figura 9. Top 10 de los genes diferencialmente expresados en la etapa de EHNA.	33
Figura 10. Upset Plot para las mostrar la superposición de genes diferencialmente expresados entre las comparaciones realizadas mediante el meta-análisis.	34
Figura 11. Análisis GO de genes expresados diferencialmente en la etapa de HGNA.	38
Figura 12. Análisis GO de genes expresados diferencialmente en la etapa de EHNA.	39
Figura 13. Los DEG establecen una firma genética específica para cada etapa de la enfermedad.	41
Figura 14. Los DEG encontrados en tejido, también están presentes en liberación al torrente sanguíneo y proteómica.	42
Figura 15. Vías de homeostasis del colesterol son cruciales en la progresión de la EHGNA en vías Hallmark.	44
Figura 16. Vías del metabolismo del colesterol son cruciales en la progresión de la EHGNA en vías wikipathways.	45
Figura 17. Vías del metabolismo del colesterol y organización de la MEC son cruciales en la progresión de la EHGNA en vías de REACTOME.	46
Figura 18. Candidatos a biomarcadores seleccionados del meta-análisis se relacionan principalmente al metabolismo del colesterol.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación histológica de actividad de hígado graso no alcohólico.....	17
Tabla 2. GSE utilizados en la meta-análisis.....	27
Tabla 3. DEG para las distintas etapas.....	29
Tabla 4. Genes que intersectan en las distintas comparaciones.....	34

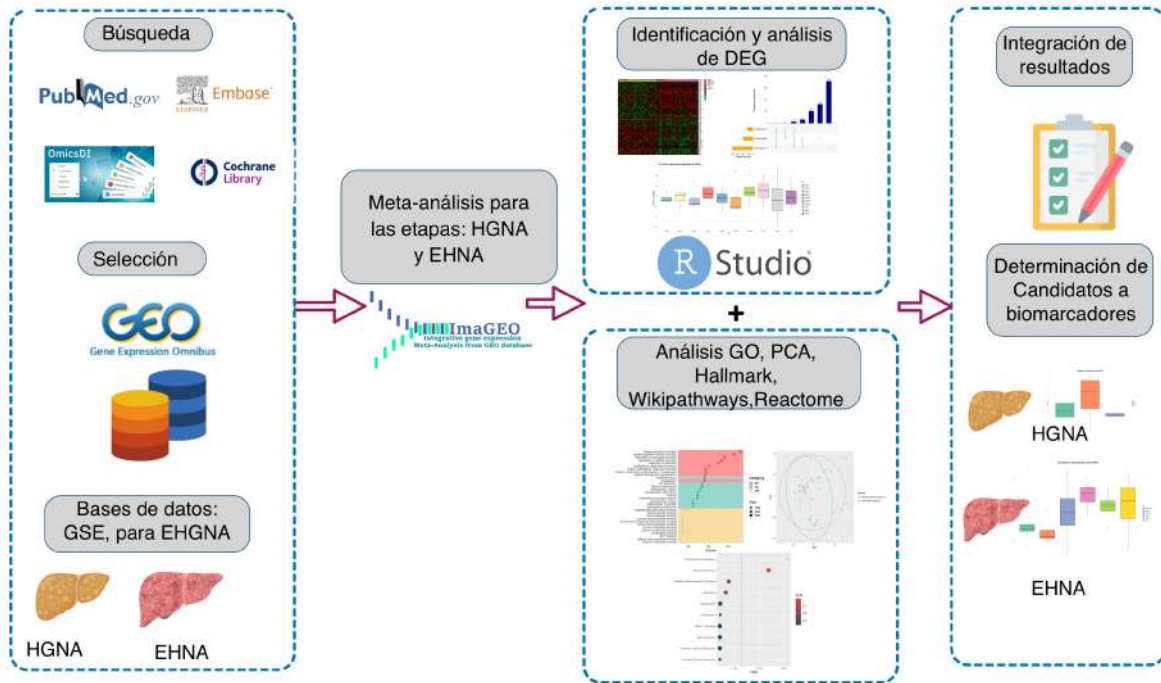
RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (**EHGNA**) engloba distintas etapas de desarrollo que van desde el hígado graso no alcohólico (**HGNA**) hasta la esteatohepatitis no alcohólica (**EHNA**). Su alta incidencia la ha convertido en una urgente necesidad de identificar biomarcadores para su diagnóstico temprano. El análisis bioinformático es una herramienta útil en la búsqueda de biomarcadores con potencial en la práctica clínica. El objetivo de este proyecto fue identificar genes diferencialmente expresados (**DEG**) en las etapas de HGNA y EHNA de la EHGNA mediante el uso de análisis bioinformáticos, y proponerlos como biomarcadores candidatos para el diagnóstico de la enfermedad. El análisis bioinformático se realizó a partir de bases de datos transcriptómicos recuperados de repositorios públicos los cuales fueron obtenidos de biopsias de pacientes con algún grado de desarrollo de la EHGNA. Identificamos 121 DEG asociados al HGNA y 402 asociados a la EHNA. La ontología de genes reveló que los genes alterados estaban principalmente asociados a la disfunción de procesos celulares primarios; además, los análisis de vías hallmark, wikipatways y reactome validaron la participación de vías moleculares relacionadas con el metabolismo del colesterol en la progresión del HGNA y la EHNA. Finalmente, como biomarcadores candidatos para el HGNA identificamos a los genes *ACSS2*, *PCSK9* y *CYP7A1*, y para la EHNA a los genes *ANGPTL3*, *CD36*, *CYP51A1*, *FASN*, *FDFTI* y *LSS*. En conclusión, el análisis bioinformático de bases de datos públicas es una herramienta útil para la identificación de genes potenciales a biomarcadores para el diagnóstico de la EHGNA.

ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) involves different development stages ranging from NAFLD to nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Its high incidence has made it an urgent need to identify biomarkers for early diagnosis. Bioinformatic analysis is a useful tool in the search for biomarkers with potential in clinical interventions. The aim of this investigation was to identify differentially expressed genes (DEG) in the stages of NAFLD associated to NAFLD by using bioinformatic analyses, as well as, to propose them as candidate biomarkers for the early diagnosis of the disease. Bioinformatic analyses were performed from transcriptomic databases retrieved from public repositories which were obtained from biopsies of patients bearing some degree of NAFLD development. We identified 121 DEG associated to NAFLD and 402 associated to NASH. Gene ontology revealed that altered genes were primarily associated with dysfunction of primary cellular processes. In addition, hallmark, wikipatways, and reactome pathway analyses validated the participation of molecular pathways related to cholesterol metabolism in the progression of both NAFLD and NASH stages. Finally, as candidate biomarkers for NAFLD, we identified the ACSS2, PCSK9 and CYP7A1 genes, as well as, for NASH the ANGPTL3, CD36, CYP51A1, FASN, FDFT1 and LSS genes were also identified. In conclusion, bioinformatic analysis performed from transcriptomic databases retrieved from public databases is a useful tool for the identification of potential biomarkers for the early diagnosis of NAFLD.

RESUMEN GRÁFICO



1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es una afección en la que se acumula grasa en exceso en el hígado de un paciente sin antecedentes de abuso de alcohol. La EHGNA está etiológicamente asociada con la resistencia a la insulina sistémica y hepática, y se considera, en la mayoría de los casos, como una manifestación del síndrome metabólico hepático (Marchesini et al. 2003).

La EHGNA se caracteriza por la presencia de grasa en exceso o HGNA, inflamación, lesión de hepatocitos y/o fibrosis. Los factores de riesgo clave incluyen diabetes, obesidad, edad, etnia, género y polimorfismos genéticos que pueden afectar la historia natural y la progresión de la enfermedad. La divergencia de estos factores reflejan la naturaleza compleja y heterogénea de la enfermedad (Singh et al. 2015).

La EHGNA es reconocido como un problema de salud pública que está estrechamente relacionado con la obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2), lo cuál es preocupante debido a que un cuarto de la población mundial sufre alguna de las afecciones antes mencionadas (Kutlu, Kaleli, and Ozer 2018). Entre el 40 y el 50% de los pacientes que son obesos tienen EHGNA y aproximadamente el 70% de los pacientes con DM2 también la presentan. A la etapa inicial de la EHGNA se le conoce como hígado graso no alcohólico, caracterizada por una acumulación de triglicéridos (TG) de $\geq 5\%$ sin evidencia de lesión hepatocelular en forma de globo de hepatocitos o sin evidencia de fibrosis. En su forma más severa, la EHGNA es conocida como esteatohepatitis no alcohólica, se asocia con lesión de hepatocitos, con necrosis e inflamación lobular, con o sin fibrosis (Z. M. Younossi, Koenig, et al. 2016; Wainwright, Scorletti, and Byrne 2017). La EHNA aumenta la vulnerabilidad del hígado al estrés oxidativo o al insulto pro-inflamatorio, lo que resulta en la EHGNA. Por lo tanto, las medidas que suprimen el estrés oxidativo y la inflamación podrían prevenir el desarrollo de EHGNA. Una de las vías de señalización alterada es la de NF- κ B la cuál está implicada en los procesos inflamación durante el desarrollo de la EHGNA (Y. Liu et al. 2017).

Se estima que la prevalencia de la EHGNA afecta a mil millones de pacientes en todo el mundo. La EHGNA puede conllevar tanto a una insuficiencia hepática como a la progresión

del carcinoma hepatocelular (CHC). Weston y colaboradores han reportado que la prevalencia de la EHGNA es más alta en la población étnica hispana, seguida de los blancos no hispanos, asiáticos y afroamericanos (Weston et al. 2005). Asimismo, se ha descrito que la prevalencia aumenta significativamente entre un 80 y 90% en adultos obesos, 60% en pacientes con hiperlipidemia y de un 30 a 50% en diabéticos. Actualmente, la EHGNA es la tercera causa más común de trasplante de hígado y se proyecta que sea la principal causa para la siguiente década en los Estados Unidos de América. Además, entre el 4 y el 22% de los carcinomas hepatocelulares se atribuyen a la EHGNA en el mundo occidental (Michelotti, Machado, and Diehl 2013).

La EHGNA es sin duda una enfermedad multifactorial que plantea desafíos para su comprensión y terapia. Descubrir alteraciones en genes y sus contrapartes moleculares dentro de tejidos particulares, que conducen a una alteración patológica de la homeostasis biológica, se está convirtiendo progresivamente en un foco clave para la investigación científica. Los enfoques tradicionales que examinan un gen o factor a la vez se han vuelto menos eficientes para abordar las complejidades multidimensionales de la EHGNA (Blencowe et al. 2019). Por esta razón, el avance de las tecnologías ómicas de alto rendimiento y las tuberías analíticas así como el modelado de redes, se han convertido en herramientas poderosas para integrar la información multidimensional y así dilucidar los sistemas moleculares complejos ya sea dentro o entre los tejidos de esta patología y otras enfermedades asociadas. Asimismo, el aumento de las tecnologías de secuenciación de células de alto rendimiento permite mejorar la disección de información sobre los procesos celulares para revelar interacciones reguladoras moleculares dentro y entre los distintos tipos de células (Boyle, Li, and Pritchard 2017; Blencowe et al. 2019).

Por lo tanto, existe una necesidad crítica de comprender con mayor claridad las características moleculares de la EHGNA. Actualmente, el uso de la bioinformática ha brindado distintas herramientas para la integración de la información existente así como para dilucidar las características moleculares de los genes expresados diferencialmente y los mecanismos asociados con la EHGNA, lo que podría contribuir en la comprensión de la patogénesis de la EHGNA y así, proponer candidatos a biomarcadores de diagnóstico para dicha enfermedad.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 Enfermedad de hígado graso no alcohólico

El hígado es un órgano central responsable del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. También es de los órganos más abundantes en términos de número y densidad de mitocondrias, y sirve como un sitio crítico para múltiples vías metabólicas que incluyen la oxidación β , el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la cetogénesis, la actividad respiratoria y la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP), además, proporciona combustibles metabólicos para sí mismo y para el resto del cuerpo (Degli Esposti et al. 2012).

Asimismo, existe la denominada EHGNA la cuál se define como una deposición de triglicéridos en los hepatocitos por encima del 5% del peso/volumen del hígado, de igual manera, se le considera un espectro de enfermedades hepáticas que van desde la HGNA simple hasta la lesión hepática como cirrosis y CHC (Jazayeri-Tehrani et al. 2019; Kutlu, Kaleli, and Ozer 2018).

La EHGNA se caracteriza por la acumulación de grasa ($\geq 5\%$) hepática en ausencia de cualquier causa secundaria y se considera como un diagnóstico de exclusión. Por lo tanto, se deben descartar otras etiologías que conducen a una histología hepática similar, incluido el consumo excesivo de alcohol; hepatitis viral; otras enfermedades hepáticas crónicas tales como la enfermedad de Wilson, hemocromatosis, hepatitis viral, hepatitis autoinmune, enfermedad hepática colestásica y otras enfermedades hepáticas crónicas como son la inanición; lipodistrofia; enfermedad celíaca; Enfermedad de Cushing; y medicamentos (corticosteroides, metotrexato, diltiazem, oxaliplatino, amiodarona, isoniazida, terapia antirretroviral altamente activa, etc.). Las pautas actuales recomiendan utilizar criterios que requieran una exposición al alcohol de menos de 30 g/d para los hombres y menos de 20 g/d para las mujeres como un componente para el diagnóstico de EHGNA (Chalasani et al. 2012; Perumpail et al. 2017).

Reconocida como un problema de salud pública y asociada a consecuencia de epidemias como la obesidad y la DM2, la EHGNA se caracteriza por inflamación, daño hepatocelular y fibrosis, distribuidas en distintas etapas, donde inicialmente se tiene un hígado sano que se expone a distintos insultos los cuáles conducen el desarrollo de las distintas fases de la enfermedad y finalmente, puede producir cirrosis, además, en los últimos años se a

considerado, como una de las etiologías más comunes para desarrollar y aumentar el riesgo de padecer CHC con altas tasas de mortalidad (**Figura 1**) (Kutlu, Kaleli, and Ozer 2018).

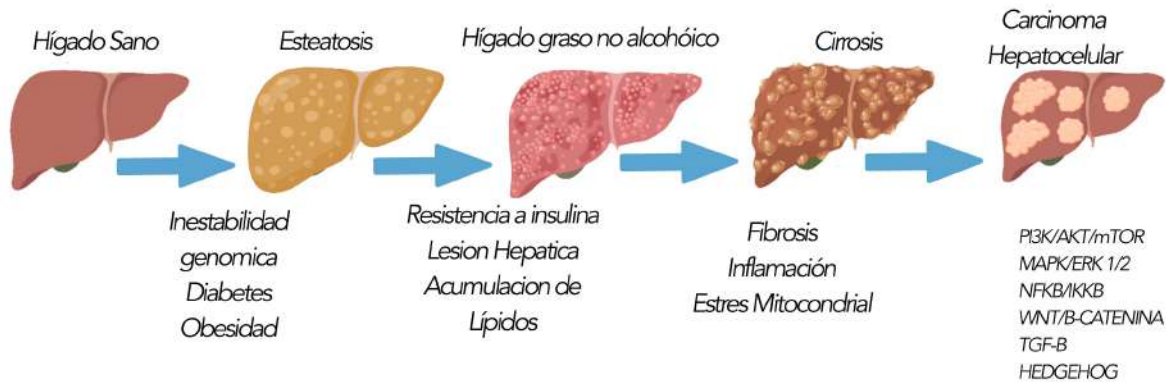


Figura 1. Desarrollo de EHGNA Y CHC a partir de hígado sano.

Fuente: modificado a partir de (Kutlu, Kaleli, and Ozer 2018).

2.2 Epidemiología de EHGNA

Una tendencia que ha sido reconocida a nivel mundial debido a su incremento en los últimos años, es la incidencia de enfermedades metabólicas del hígado. De hecho, la prevalencia global de EHGNA en adultos se estima en ~25%, mientras que la prevalencia global de EHNA se estima entre el 3 y 5%. (Z. Younossi et al. 2019).

Younossi y colaboradores (2016) reportaron, a través de un meta-análisis, que la prevalencia global de EHGNA en 8,515,431 individuos diagnosticados mediante análisis de imágenes fue del 25.24%. Esta prevalencia fue más alta en el Medio Oriente y Sudamérica, pero baja en África. Los porcentajes regionales estimados de EHGNA en Asia e Israel fueron de 52.34 por 1,000 y 28.01% por 1,000 personas-años respectivamente (Z. M. Younossi, Koenig, et al. 2016). Estos resultados proporcionan claramente un panorama de la relevancia de la EHGNA a nivel global.

En cuanto a los datos reportados en América, un estudio revela que la prevalencia general de la EHGNA en los Estados Unidos se estima en un 24%. Además, cuando analizaron qué población era la más afectada encontraron que los hispanoamericanos radicados en este país

tienen una mayor prevalencia, mientras que los afroamericanos tienen una menor prevalencia de EHGNA (Tamoore, Pegah, Linda, & Zobair, 2020).

Es importante recalcar que en los países occidentales se ha estimado que la prevalencia de EHGNA en la población pediátrica está entre el 3 y 5%, pero su prevalencia aumenta hasta ~70% entre los niños obesos (Z. Younossi et al. 2019); por lo tanto la EHGNA representa en un grave problema de salud.

La prevalencia de la HGNA y la EHNA ha aumentado a nivel mundial y es ahora la principal causa de enfermedad hepática crónica en Occidente, además de ser cada vez más reconocida en todas las partes del mundo. En una recopilación realizada por Mitra y colaboradores reportaron que en Japón y China se ha registrado un aumento del doble de la prevalencia de EHGNA en una década. También encontraron que la prevalencia aumentó del 18,7 al 27,3% en Corea del Sur (durante el periodo de 2006 a 2013), aumentó del 12,9 al 43,3% en Shanghái, China (2003 a 2016), aumentó del 11,5 al 27,0% en Taiwán (2006 a 2007), y aumentó del 7,9 al 51,0% en Indonesia (2013 a 2015) (Mitra, De, and Chowdhury 2020; Seto and Yuen 2017; Loomba and Sanyal 2013).

La genética también ha contribuido en la comprensión de la prevalencia de la HGNA en diferentes grupos étnicos. Por ejemplo, tal y como lo muestra un meta-análisis que incluyó 368,569 sujetos, la prevalencia en los hispanos es especialmente alta, mientras que la de los negros es baja (Weston et al. 2005). En México, Chinchilla y colaboradores, mediante un estudio en el cuál incluyeron 189 pacientes mexicanos con EHGNA y 201 sanos donde evaluaron variables antropométricas, metabólicas y bioquímicas, así como el polimorfismo rs738409, sugieren que el polimorfismo de nucleótido único (SNP) PNPLA3 es muy frecuente en la población mexicana y por lo tanto, lo asocian como principal gen para el desarrollo de la EHGNA en dicha población, por lo tanto se plantea susceptibilidad genética para la población mexicana (Chinchilla-López et al. 2018).

Cabe resaltar que la prevalencia de EHGNA en México va de la mano con las cifras de obesidad y diabetes, La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), reveló que a nivel nacional, en 2018, el porcentaje de adultos de 20 años y más con sobrepeso y obesidad es de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad), porcentaje que en 2012 fue de 71.3 %, en la categoría de reporte de medición de colesterol y triglicéridos, en el rubro de medición de

valores altos, se encontró que dichos niveles pasaron de 13% en 2012 a 19.5 % en 2018, en cuanto a diabetes en población de 20 años y más se estimaba en 2012 a 6.4 millones de personas con dicho padecimiento, mientras que para el 2018 se estimó alrededor de 8.6 millones de personas, lo que resulta en un aumento preocupante ya que estas condiciones están estrechamente relacionadas con la EHGNA. Aunque la prevalencia no se conoce con exactitud, estudios realizados sugieren que las cifras correspondientes pueden estimarse a partir de la prevalencia de la obesidad y DM2. La EHGNA se presenta en el 25% de la población obesa, la prevalencia de la diabetes en la población adulta es del 9.2% y se ha estimado una presencia de EHGNA en más de 50% de estos pacientes (Almeda-Valdés, Cuevas-Ramos, and Alberto Aguilar-Salinas 2009). En otro estudio realizado por Lizardi-Cervera y colaboradores sugiere que en México se ha estimado una prevalencia de alrededor de 17.05% en población asintomática (Lizardi-Cervera et al. 2006). Asimismo, por medio del conceso mexicano para la enfermedad de hígado graso en 2019, se destacó que un estudio en población derechohabiente de compañías aseguradoras que acudió a una revisión clínica, reportó una prevalencia de HGNA del 14.4%, y posteriormente, en un estudio en voluntarios convocados por internet se encontraron datos de HGNA de un 62.9%. Éstas son cifras alarmantes si el diagnóstico no se realiza de manera pertinente, debido a que puede progresar a etapas más avanzadas e incluso cirrosis y cáncer (Bernal-Reyes et al. 2019).

2.3 Clasificación de la EHGNA

La EHGNA incluye distintas características a nivel histopatológico como HGNA, EHNA, fibrosis, cirrosis y CHC relacionados con EHNA (**Figura 2**), es una clara clasificación de lo que sucede en las distintas etapas de la enfermedad; así como los subconjuntos que podemos encontrar dentro de ella (Perumpail et al. 2017).

La clasificación que sirve de referencia para la enfermedad, es aquella que divide la EHGNA, en HGNA y EHNA. La EHGNA puede diagnosticarse con la evidencia de HGNA hepática en las imágenes o la histología y la ausencia de causas secundarias de acumulación de grasa hepática. El HGNA o HGNA simple se define como la presencia de HGNA ($\geq 5\%$) hepática sin evidencia de lesión hepatocelular en forma de abombamiento de los hepatocitos. Mientras que la mayoría de los pacientes tienden a permanecer en el estadio benigno de la EHGNA, algunos pacientes progresan a la etapa de EHNA, que se caracteriza por la presencia de

HGNA e inflamación con lesión hepatocelular, con o sin fibrosis (Chalasanani et al. 2018) .Un sistema de puntuación establecido para la evaluación de la histología en la EHGNA es la actividad de la EHGNA (NAS, por su siglas en ingles). La NAS se cuantifica con base las siguientes características: HGNA (0-3), inflamación lobular (0-3) y abombamiento de los hepatocitos (0-2), que se suman para llegar a una puntuación final de (0-8). La NAS se ha convertido en un criterio de inclusión en los ensayos clínicos, y la mejora de la NAS también se utiliza a menudo como criterio de valoración. En última instancia, la histología del hígado también puede mostrar signos de fibrosis, lo que hace temer una enfermedad hepática progresiva y más avanzada (**figura 2**).

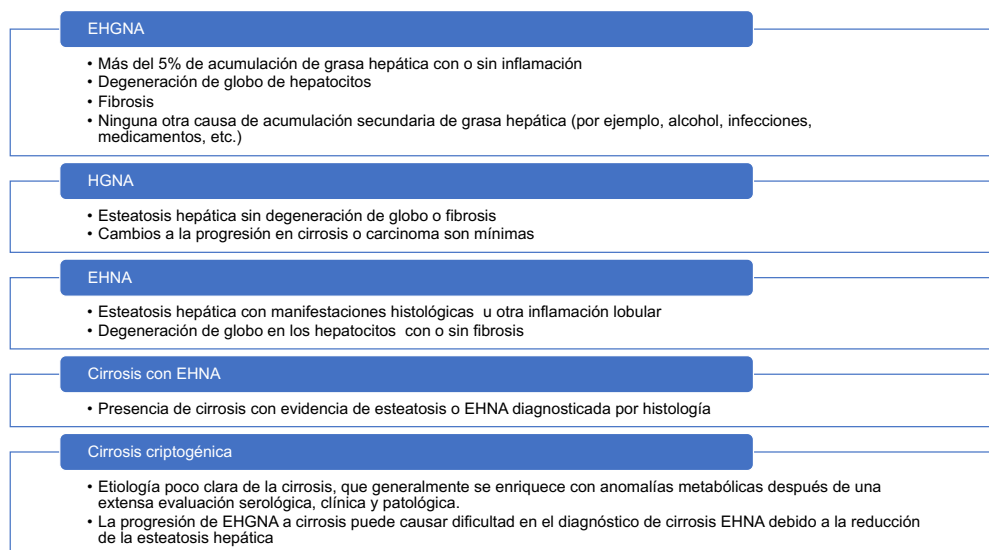


Figura 2. Definiciones de enfermedad del hígado graso no alcohólico y sus subconjuntos.

Adaptada de (Perumpail et al., 2017).

2.4 Factores de riesgo asociados a EHGNA

La asociación entre el síndrome metabólico, la EHGNA y la prevalencia de la obesidad va en aumento en el mundo occidental, en consecuencia asume el carácter de epidemia. La

obesidad a su vez, aumenta la prevalencia de DM2, la dislipidemia, la hipertensión y en última instancia, del síndrome metabólico (Asrih and Jornayvaz 2015).

La EHGNA suele asociarse como se mencionó anteriormente, a la presencia de obesidad, DM2, dislipidemia y hipertensión. Cada una de estas anomalías conlleva un riesgo de enfermedad cardiovascular y en conjunto, suelen clasificarse como síndrome de resistencia a la insulina o síndrome metabólico (Hamaguchi et al. 2005).

La DM2 y la EHGNA pueden coexistir y su principal mecanismo patológico es la resistencia a insulina (IR) en el hígado y los tejidos extrahepáticos, como el tejido adiposo y el músculo esquelético, que actúan sinérgicamente, lo que conduce a la inflamación sistémica que a su vez causa la liberación de factores proaterogénicos y nefrotóxicos (Lipina and Hundal 2011).

La DM2 es uno de los factores de riesgo más fuertes para el desarrollo de EHGNA, fibrosis/cirrosis avanzada, y el CHC, además, la asociación subyacente entre la EHGNA y la DM2 es bidireccional, lo que sugiere que la EHGNA puede preceder y/o mejorar el desarrollo de DM2T y promover resultados adversos asociados a la diabetes (Xia, Bian, and Gao 2019).

Al igual que la DM2, la obesidad es prevalente en la población general, la obesidad es uno de los factores de riesgo más importantes para la EHGNA y se ha relacionado con la presencia y gravedad de la fibrosis hepática, lo cuál ha sido estudiado por diversos grupos de investigación. Kim y colaboradores plantearon un estudio de cohorte prospectivo donde incluyeron 40,700 adultos con EHGNA, con las siguientes las características demográficas, los factores de estilo de vida así como también la historia clínica. Se descubrió que la obesidad y el aumento de peso estaban asociados de forma independiente con un mayor riesgo de progresión de la fibrosis, según el APRI (aspartate aminotransferase to platelet ratio index, por sus siglas en ingles), por lo tanto, concluyen que mantener un peso normal y saludable y evitar el aumento de peso puede ayudar a reducir la progresión de la fibrosis en personas con HGNA (Kim et al. 2019).

De modo similar, Nachit y colaboradores evaluaron la EHGNA en biopsias hepáticas, el índice de masa muscular esquelética a través de tomografía computarizada (CT-SMI) y la impedancia bioeléctrica (BIA-SMI), en pacientes con sobrepeso u obesidad (n=184) y 12 meses después de una intervención dietética (n=15) o una cirugía bariátrica (n=24), y

determinaron que el contenido de grasa muscular, pero no la masa muscular, está fuerte e independientemente asociado con la EHNA. Todos los individuos que lograron una disminución ($\geq 11\%$) en SMFIP (CT-based psoas muscle density) después de la intervención, mejoraron, las OR asociadas a SMFIP por desviación estandar aumentan para la EHGNA en la población total y para la EHNA en la EHGNA fueron respectivamente de 3,57 (IC 95% 1,87-6,83, $p < 0,001$) y 2,95 (IC 95% 1,68-5,20, $p < 0,001$) cuando no se ajustaron (Nachit et al. 2021).

La presencia del síndrome metabólico se asocia significativamente con la IR, consideraciones fisiopatológicas, la asociación clínica y las investigaciones de laboratorio respaldan el papel central de la IR en la patogénesis de la EHGNA. Marchesini y colaboradores evaluaron la IR mediante el método HOMA, un índice bastante crudo de la acción de la insulina. Los valores de HOMA fueron elevados en la mayoría de los pacientes con EHGNA, pero el aumento de los valores de HOMA se asoció a un riesgo mayor de síndrome metabólico, lo que refuerza el papel patogénico de la enfermedad (Marchesini et al. 2003).

Los factores genéticos y ambientales así como la nutrición y la actividad física, interactúan y modulan el riesgo individual de desarrollar la EHGNA y la gravedad de su progresión. Se han identificado variantes genéticas asociadas a la EHGNA mediante estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) y enfoques de genes candidatos (Jonas and Schürmann 2020). Actualmente, la implementación de este tipo de técnicas ha arrojado distintas variantes genéticas implicadas en dicha enfermedad como son la variante del dominio de la fosfolipasa similar a la patatina 3 (PNPLA3) y su asociación con el SNP rs738409 (C > G). Este SNP causa la variación de secuencia de sentido I148M que interrumpe la actividad fosfolipasa de la enzima, por lo que interfiere con el catabolismo lipídico (**Figura 3**). El PNPLA3I148M se asocia con un aumento en el contenido de grasa y actividad enzimática, fibrosis y cirrosis. Así mismo se sabe que la variación en el locus del gen regulador de glucocinasa (GCKR) también se ha asociado con EHGNA, la variante de sentido erróneo (rs1260326), que codifica P446L, es muy probablemente la causante de dicha asociación (Trépo and Valenti 2020). Antecedentes plantean que la variante rs58542926 (G > A; E167K) del miembro de la superfamilia transmembrana 6 2 (TM6SF2) se asocia con un aumento del contenido de TG hepáticos y un mayor riesgo de fibrosis avanzada en pacientes con EHGNA debido a un

alteración de la secreción de VLDL(Kozlitina et al. 2014; Y.-L. Liu et al. 2014), y recientemente la variante HSD17B13 rs72613567 conduce a la síntesis de una enzima truncada de pérdida de función, lo que promoverá un aumento en la cantidad de fosfolípidos y disminución de retinol deshidrogenasa(Jonas and Schürmann 2020) (**Figura 3**).

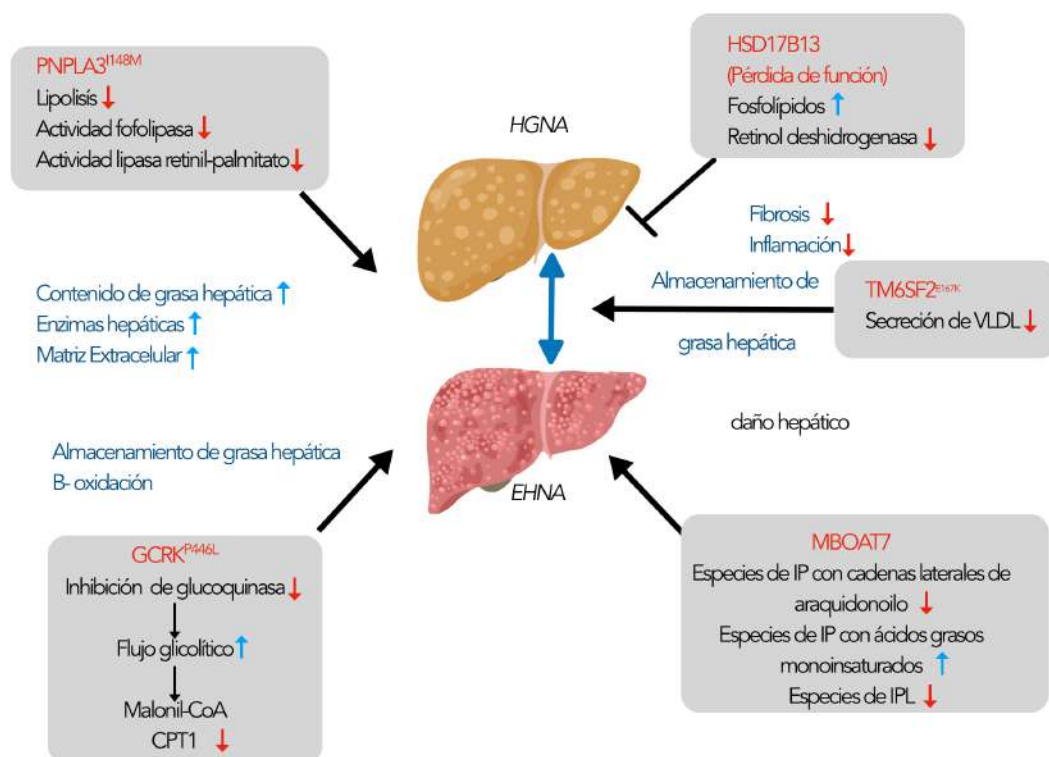


Figura 3. Variantes genéticas frecuentes asociadas con EHGNA y sus principales efectos.

CPT1, carnitina palmitoil transferasa-1; LPI, lisofosfatidilinositol; PI, fosfatidilinositol. Adaptada de Jonas and Schürmann,2020.

Recientemente, la microbiota ha estado en la mira de distintos investigadores ya que se le atribuye un papel clave en la patogénesis de éstas, principalmente las relacionadas con enfermedades metabólicas, incluyendo la IR, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares relacionadas con el metabolismo. Wang y colaboradores proponen que la inhibición de la señalización intestinal de FXR alivia la EHNA al disminuir la producción intestinal de ceramida; además, al administrar agonistas del FXR T-β-MCA y Gly-MCA descubrieron mejoras significativas en la EHNA (Wang, Xia, and Jiang 2019). Todos éstos,

son considerados factores de riesgo para la EHGNA debido a que promueven el desarrollo de dicha enfermedad.

2.5 EHGNA y su importancia clínica

Si bien la EHGNA es letal por su progreso a cirrosis y CHC, también se relaciona directamente con otras enfermedades. Pennisi y colaboradores determinaron una mayor prevalencia de TMI (espesor íntimo-media o Intima-media thickness, por sus siglas en inglés; ≥ 1 mm) asociado a un riesgo alto o intermedio de fibrosis grave (24% y 28,6%, respectivamente) en una cohorte de 542 sujetos con EHGNA en comparación con aquellos con bajo riesgo (12,1%) ($p=0,03$); esta asociación se mantuvo después de ajustar algunos factores (OR 2,70,95% C.I. 1.01-2,86, $p=0,04$); por lo que sugieren que la presencia de EHGNA y fibrosis grave se asocian con un perfil de riesgo cardiovascular más alto, (Pennisi et al. 2021). Se ha descrito que la disfunción hepática puede contribuir a la enfermedad cardiovascular trombótica (ECV) a través de los efectos en la síntesis de lipoproteínas, proteínas de coagulación y factores de inflamación (Lisman and Porte 2017). Con base en lo anteriormente, Alexander y colaboradores realizaron un estudio en población estadounidense donde incluyeron 30,239 personas y determinaron que los niveles altos de varios de biomarcadores de la enfermedad hepática, especialmente los relacionados con la EHGNA, se asociaron con un menor riesgo de accidente cerebrovascular en los hombres, pero con un mayor riesgo o ninguna asociación en las mujeres. Si bien la asociación por sexo aún no está bien definida, estudios como éste marcan el inicio de una línea de investigación interesante dentro del área (Alexander et al. 2018).

Lo anterior es relevante debido a que se ha propuesto a la EHGNA como un posible predictor de enfermedades cardiovasculares (Hamaguchi et al. 2005). Estos investigadores implementaron un estudio entre enero y diciembre de 1998, con un total de 2.429 participantes (1680 hombres y 748 mujeres) y encontraron que los sujetos con EHGNA tenían niveles altos de enzimas hepáticas, glucosa plasmática en ayunas, colesterol LDL y TG y colesterol HDL más bajo que aquellos sin EHGNA. Además, el síndrome metabólico se diagnosticó en 206 de los 1647 participantes del estudio (12,5%), y la prevalencia del síndrome metabólico fue mayor en los sujetos con EHGNA (38,1%) que en los que no tenían

la enfermedad (6,5%), lo que sugirió que la EHGNA tiene un papel predictor de enfermedades cardiovasculares (Hamaguchi et al. 2007).

2.6 Fisiopatología de la EHGNA

La fisiopatología de la EHGNA es compleja, multifactorial y aún se investiga. En general, se acepta que hay múltiples vías y mecanismos implicados en la patogénesis de la EHGNA, estos mecanismos incluyen factores dietéticos, IR, polimorfismos genéticos, lipotoxicidad y alteración del microbiota intestinal entre los más importantes.

La etiología de la EHGNA no está bien dilucidada, sin embargo, hay múltiples estudios que aportan los principales mecanismos que llevan al desarrollo de la enfermedad. Hasta el momento, la teoría de los múltiples impactos es la que mejor representa los eventos de dicha patología, en primer lugar, hay una participación directa de la acumulación de grasa, que se almacenará en los hepatocitos tanto por la entrega de ácidos grasos libres hepáticos como por la lipogénesis de Novo (Mandato et al. 2005).

La primera adaptación para evitar la lipotoxicidad sistémica de la sobrealimentación crónica es el agrandamiento de los adipocitos (hipertrofia) en adultos, seguido de un mecanismo compensatorio a largo plazo que implica la replicación de células grasas (hiperplasia), esta acumulación de grasa hepática en la EHGNA se observa más comúnmente en el entorno de la adiposidad central; durante la cuál, el exceso de calorías se almacena como grasa en adipocitos viscerales en lugar de adipocitos subcutáneos. El aumento de la administración de ácidos grasos al hígado induce IR, lo que paradójicamente, conduce a un aumento de la lipogénesis de Novo (Chitturi and George 2003; Cusi 2012).

El inicio de la enfermedad se ha asociado primordialmente al estilo de vida de las personas ya que el continuo suministro de energía a través de carbohidratos dietéticos, lípidos y combustibles proteicos, no iguala la proporción entre actividad física y la demanda de energía (Bremer, Mietus-Snyder, and Lustig 2012). Además de la dieta desequilibrada y nula actividad física, se han asociado ciertas variantes genéticas que promueven el desarrollo de la enfermedad, dentro de las más estudiadas, se sabe que la propensión a acumular grasa intrahepática parece estar relacionada con la actividad de la PNPLA3. Esta proteína esta regulada al alza en estados de sobrenutrición. PNPLA3 se asocia con acumulación de grasa y lesión hepática o inflamación (Romeo et al. 2008; Y. Huang et al. 2010). Los polimorfismos

de PNPLA3 difieren por raza, etnia y, en parte, pueden explicar las diferencias raciales y étnicas en la EHNA, de igual manera otros polimorfismos han sido asociados tal y como se menciona en la **Figura 3**.

Recientemente, la disbiosis o alteración de la microbiota intestinal también se ha considerado un desencadenante para el inicio y progresión de la enfermedad, actualmente se sabe que la microbiota intestinal es colectivamente un reactor bioquímico intenso que genera subproductos que pueden cruzar la mucosa intestinal a la circulación portal y directamente al hígado. Se sospecha que algunos metabolitos microbianos estimulan la inflamación o causan lesiones hepatocelulares. Lo más notable en este sentido son los lipopolisacáridos (LPS), que se ha detectado en el suero de pacientes obesos y se correlaciona con el grado de daño hepático, lo que sugiere un vínculo entre los LPS derivado de la microbiota y la progresión de la EHNA. Se cree que la disbiosis se asocia con la progresión a la EHNA al afectar la digestión, el desarrollo de la obesidad, la respuesta inmunitaria y la producción de hormonas intestinales. Otras vías metabólicas que se ven afectadas por la microbiota, y se cree que contribuyen a la EHNA, incluyen ácidos grasos de cadena corta, etanol y ácidos biliares (Imajo et al. 2012; Albhaisi and Bajaj 2021).

La acumulación de grasa intrahepática contribuye a la lesión de hepatocitos a través de la disfunción mitocondrial, de la producción de radicales reactivos libres de oxígeno y del estrés del retículo endoplasmático que en última instancia activan la vía de la apoptosis hepatocítica. Esta disfunción y estrés pueden conducir a la liberación de alanina aminotransferasa (ALT) y, en menor medida, aspartato aminotransferasa (AST), así como a la producción de citocinas inflamatorias como la interleucina-1 β , la interleucina-6, la leptina y el factor de necrosis tumoral- α (Mencin and Lavine 2011; Cusi 2012). Las células de Kupffer, macrófagos residentes en las sinusoides del hígado, también contribuyen a la liberación de citocinas y al reclutamiento de linfocitos en las áreas portales y lobulares (Cusi 2012).

Los hepatocitos dañados tienen una menor sensibilidad a la insulina y subsecuentemente una resistencia. Al mismo tiempo, el aumento de los niveles de citocinas inflamatorias sistémicas y hormonas/características endocrinas (factor de necrosis tumoral- α , interleucina-6, adipocinas, etc.), están asociados con la resistencia a la insulina periférica (D'Adamo et al.

2010; Schwimmer et al. 2008). En estados más progresivos, la inflamación persistente y la lesión de los hepatocitos conduce a la activación de vías inflamatorias, mecanismo llevado a cabo primordialmente por las células de Kupffer, lo que desencadena la activación de las células estelares, principales encargadas de la producción de fibrosis y balonamiento de los hepatocitos como parte de la etapa de EHNA o EHNA con fibrosis (Middleton et al. 2014) (**Figura 4**). Todo esto, promueve los cuadros característicos de la enfermedad.

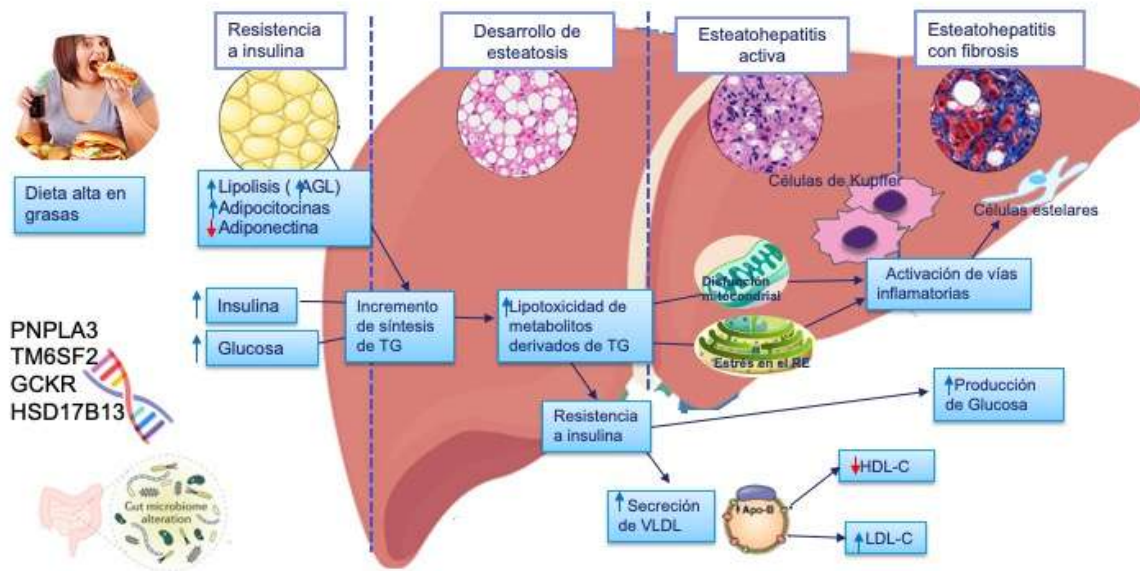


Figura 4. Patogénesis de la EHGNA.

2.7 Diagnóstico actual

La prueba diagnóstica estándar de oro es la biopsia hepática. Hay algunas modalidades no invasivas disponibles para diagnosticar la EHGNA son: la ecografía hepática, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética, ya que se consideran modalidades aceptadas para detectar la infiltración de grasa hepática. La diferencia en la sensibilidad de las modalidades de diagnóstico puede explicar la discrepancia en los datos de prevalencia de la EHGNA (Vernon, Baranova, and Younossi 2011).

Por lo general, los métodos de diagnóstico no invasivos se utilizan ampliamente para que la diferenciación exacta entre las etapas sea difícil. Además, las enzimas hepáticas ALT y AST pueden estar elevadas 1.5 a 2 veces por encima de los niveles normales. Sin embargo, muchas personas con EHNA e incluso cirrosis tienen niveles normales de enzimas hepáticas. Por lo

tanto, las tasas de EHGNA son probablemente más altas que las reportadas. Los síntomas con frecuencia incluyen fatiga y molestias abdominales en la parte superior derecha (Jazayeri-Tehrani et al. 2019).

Actualmente, la elastografía transitoria (TE) y la elastografía por resonancia magnética (MRE) se utilizan para determinar de manera no invasiva el grado de fibrosis hepática en pacientes con EHGNA. Otras medidas utilizadas en la práctica clínica incluyen modelos de puntuación, como el índice de AST, la relación plaquetaria (APRI), el índice de fibrosis basado en cuatro factores (FIB-4) y la puntuación de fibrosis de la EHGNA (NFS) (Jang et al. 2021).

2.8 Estadificación para el desarrollo de la EHGNA

Se ha usado el sistema de puntuación de Kleiner denominado NAS (NAFLD Activity Score, por sus siglas en inglés), para la estadificación del desarrollo de EHGNA, el cuál consiste en asignar una serie de puntos dependiendo de las características observadas en la histología. Dicha clasificación surgió con la iniciativa de estandarizar los elementos histopatológicos presentes en la enfermedad, en el año 2005 Kleiner y colaboradores describieron el diseño y validación de este sistema de puntuación para la EHGNA con la finalidad de homogeneizar la información histopatológica diagnóstica en todo lo relacionado a la HGNA. El sistema es sencillo y sólo requiere tinciones histoquímicas de rutina (tinciones de H&E y tricrómico de Masson), de modo que puede ser utilizado por patólogos en el diagnóstico clínico (Kleiner et al. 2005). Este sistema presenta una guía sobre la realización del diagnóstico debido a que brinda parámetros de referencia que pueden ser fácilmente utilizados en la práctica diaria, además, en primera instancia NAS es capaz de discriminar entre el HGNA y la EHNA en pacientes (**Tabla 1**).

Componentes NAS			
Etapa	Puntuación	Grado	Definición y comentario
Esteatosis hepática	0	< 5%	Se refiere a la cantidad de área de superficie involucrada por la esteatosis según lo evaluado en el examen de potencia baja a media; la esteatosis mínima (<5%) recibe una puntuación de 0 para evitar dar un exceso de

			peso a las biopsias con muy poco cambio graso
	1	5-33%	
	2	> 33-66%	
	3	> 66%	
Inflamación lobular	0	Sin focos	Los cuerpos acidófilos no están incluidos en esta evaluación, ni la inflamación portal
	1	< 2 focos / 200x	
	2	2-4 focos / 200x	
	3	> 4 focos / 200x	
Degeneración en globo de los hepatocitos	0	Ninguna	
	1	Pocas células de globo	El término "pocas" significa hepatocitos con globos raros pero definidos, así como casos que son diagnósticamente limítrofes
	2	Muchas células/globo prominente	La mayoría de los casos con globo prominente también tenían hialina de Mallory, pero la hialina de Mallory no se califica por separado para el NAS
Etapa de fibrosis (evaluada por separado de NAS)			
Fibrosis	0	Ninguna	
	1	Perisinusoidal o periportal	
	1A	Leve, zona 3, perisinusoidal	fibrosis "inicial"
	1B	Moderado, zona 3, perisinusoidal	fibrosis "densa"
	1C	Portal/periportal	Esta categoría se incluye para acomodar casos con fibrosis portal y/o periportal sin acompañar de fibrosis pericelular/perisinusoidal

	2	Perisinusoidal y portal/periportal	
	3	Puente fibrosis	
	4	Cirrosis	

Tabla 1. Clasificación histológica de actividad de hígado graso no alcohólico.

Adaptado de (Kleiner et al., 2005)

2.9 Biomarcadores

Según el diccionario del National Cancer Intitute, podemos definir a un biomarcador como “Molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos corporales o tejidos que es un signo de un proceso normal o anormal, o de una afección o enfermedad (“NATIONAL CANCER INSTITUTE” 2021).

Los marcadores biológicos, también conocidos como marcadores o biomarcadores, se definen como indicadores objetivamente mensurables y evaluables de ciertos estados biológicos en procesos normales y patológicos, o posibles respuestas farmacológicas a la terapéutica, es decir, son características objetivas y cuantificables de los procesos biológicos, los biomarcadores se consideran criterios de valoración sustitutos; es decir, actúan como sustitutos o sustitutos de los criterios de valoración clínicamente significativos, pero no todos están destinados a serlo, algunos por sus características podrían ser el complemento al diagnóstico actual de alguna enfermedad (Strimbu and Tavel 2010; Lin et al. 2019). Desde un punto de vista médico, los biomarcadores son sustancias trazables con la capacidad de clasificar condiciones binarias (por ejemplo, estados normales y de enfermedad, etc.) o multicondicionales (por ejemplo, estadios de la enfermedad, etc.) de enfermedades. En comparación con los factores asociados a la enfermedad de rutina, los biomarcadores predicen la incidencia o progresión de la enfermedad no solo a nivel de expresión ya que también tienen el potencial de indicar el cambio dinámico de los procesos o estados biológicos, lo que los convierte en indicadores de mayor importancia (Chen, Sun, and Shen 2015; Lin et al. 2019)

En la práctica, los biomarcadores incluyen herramientas y tecnologías que pueden ayudar a comprender la predicción, causa, diagnóstico, progresión, regresión o resultado del tratamiento de la enfermedad. Además de delimitar los eventos entre la exposición y la enfermedad, los biomarcadores tienen el potencial de identificar los eventos más tempranos en la historia natural, reduciendo el grado de clasificación errónea tanto de la enfermedad como de la exposición, por lo tanto, representa una nueva opción para identificar los posibles mecanismos relacionados con la patogénesis de la enfermedad (**Figura 5**). Los biomarcadores también pueden proporcionar información sobre la progresión de la enfermedad, el pronóstico y la respuesta al tratamiento, como se mencionó anteriormente (Mayeux 2004).

Los biomarcadores moleculares, en manos de investigadores clínicos, proporcionarán un enfoque dinámico y poderoso para comprender el espectro de las enfermedades con aplicaciones obvias en epidemiología analítica, ensayos clínicos y prevención, diagnóstico y manejo de enfermedades.

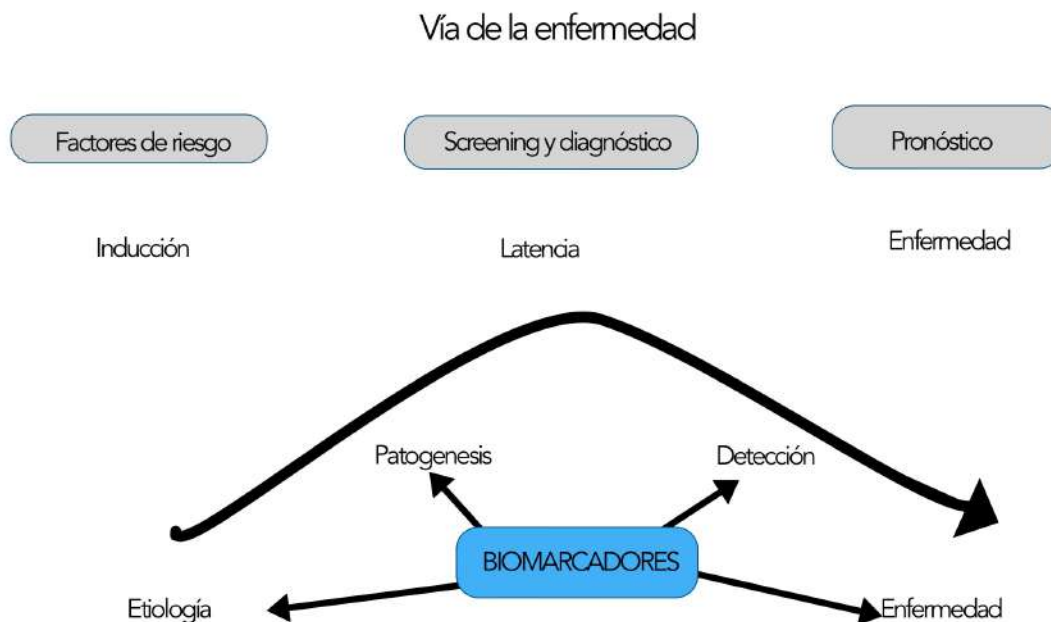


Figura 5. Vía de la enfermedad e impacto potencial de los biomarcadores.

Modificado de (Mayeux 2004).

2.10 Bioinformática y la EHGNA

La Bioinformática es considerada una disciplina científica basada en la computación, que aplica métodos de ciencias de la información y matemáticas en biología, y más específicamente, proporciona herramientas para el análisis de datos, visualización o predicción a través del desarrollo de algoritmos y softwares (S.-Y. Zhang and Liu 2013).

Hoy en día, se han dedicado grandes esfuerzos a la detección de firmas moleculares para la prevención de enfermedades a través de enfoques computacionales o bioinformáticos, ya que brinda la posibilidad de realizar análisis complejos y con la inclusión de determinados parámetros sin utilizar modelos realizados de forma tradicional en un laboratorio, el descubrimiento de biomarcadores moleculares asistidos por computadora integra varios recursos de datos y conocimientos biológicos en un marco holístico. Es más eficiente explorar la capacidad y función de las moléculas biológicas, así como sus interacciones, contribuye así a la comprensión sistemática de la evolución de la enfermedad. En la era del big data, los recursos de datos, cada vez más acumulados, promueven el desarrollo de la informática biomédica y la medicina traslacional, y se diseñan constantemente nuevos modelos o tecnologías para capturar las señales cruciales asociadas con la homeostasis salud-enfermedad. (Lin et al. 2019; Agostini et al. 2015).

Los biomarcadores moleculares se miden en muestras biológicas como tejidos sólidos, sangre u otros fluidos. Por ejemplo, en el ámbito de las enfermedades cardiovasculares, una situación clínica típica para la aplicación de biomarcadores es cuando un paciente presenta un fuerte dolor en el pecho. Esto desencadenaría preguntas como: ¿Este paciente sufre un infarto de miocardio o una angina inestable? Si el paciente sufre un infarto de miocardio, ¿Cuál es la magnitud del daño miocárdico? ¿Cuál es la probabilidad de una futura recurrencia? ¿Cuál es la probabilidad de que evolucione hacia la insuficiencia cardíaca o la muerte en un futuro próximo? Los biomarcadores proteicos, pueden aplicarse para ayudar a los médicos a responder estas preguntas, como lo observamos en la **figura 6** (“Biomarkers and Bioinformatics” 2010).

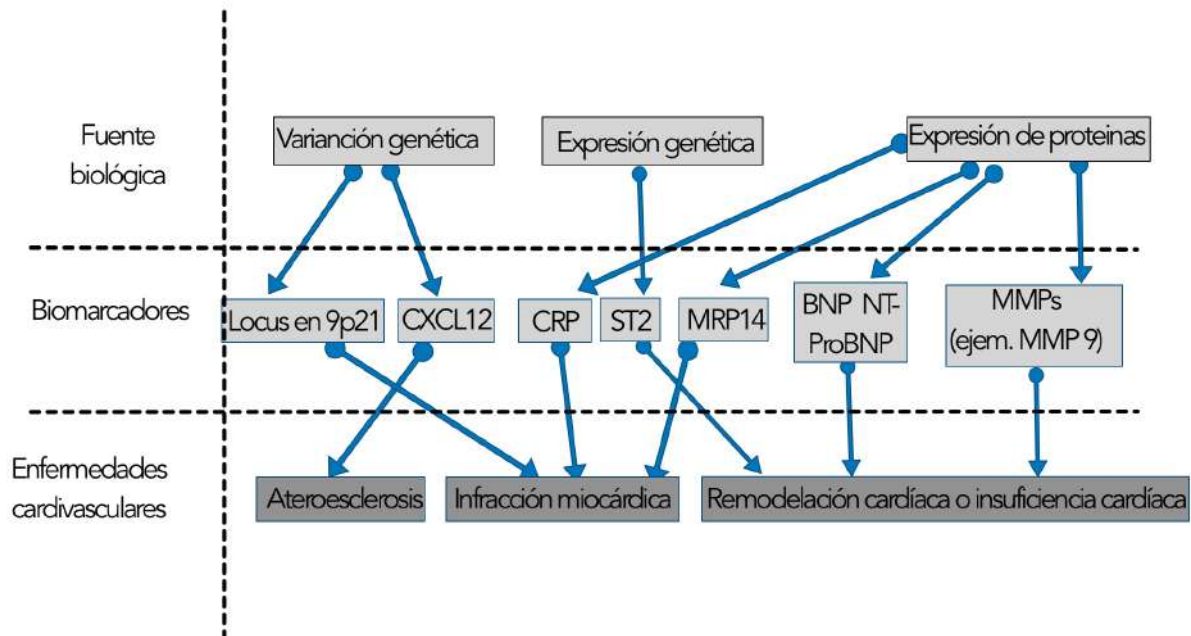


Figura 6. Ejemplos de biomarcadores cardiovasculares y su relación con diferentes tecnologías "ómicas" y enfermedades.

Modificado de ("Biomarkers and Bioinformatics" 2010)

Respecto a la EHGNA, Feng y colaboradores mencionan que la importancia de la implementación de las ciencias ómicas para múltiples aplicaciones, involucra el estudio de análisis bioinformáticos con las distintas ramas de las ciencias ómicas y brinda oportunidades de aplicar el conocimiento y realizar análisis in silico que pudieran proponer información importante como la determinación de biomarcadores. Para investigar la EHGNA, en una propuesta del 2020, en la que utilizaron muestras de seres humanos de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO), se identifican genes clave asociados a la HGNA y a la EHNA con el fin de explorar los mecanismos subyacentes a la HGNA, y desarrollar nuevos biomarcadores de diagnóstico para la EHNA (Feng et al. 2020). Además Dedoussis integra un análisis de interactoma con la EHGNA, y aplica un enfoque sistémico a este estudio, logro identificar 77 proteínas candidatas relacionadas con la 77 EHGNA (Amanatidou and Dedoussis 2020), la bioinformática representa una buena oportunidad para la búsqueda de información, así lo muestran Li y colaboradores en su estudio ellos lograron identificar genes clave en la progresión de EHGNA basada en análisis bioinformáticos, para su posterior

verificación en líneas celulares (Li et al. 2018). Esto demuestra la diversidad de aplicaciones que tiene la bioinformática, y que cada vez representa una herramienta mas completa en la realización de análisis complejos.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia para EHGNA está aumentando rápidamente en todo el mundo. Esto es consistente con un aumento de la prevalencia de obesidad y DM2. La EHGNA es actualmente la enfermedad hepática crónica más común y su prevalencia en la población adulta de países desarrollados es aproximadamente del 30% (OMS, 2018).

Estudios poblacionales estimaron una prevalencia de alrededor de 17.05% en población mexicana asintomática en 2006, y en un estudio realizado en 2012, se determinó que la prevalencia encontrada es alarmante, ya que ocho de cada diez individuos obesos tienen hígado graso en alguno de sus estadios. El HGNA también se ha convertido en una enfermedad hepática significativa en niños debido a la mayor prevalencia de obesidad infantil.

La EHGNA es una enfermedad de progresión lenta pero con un desarrollo inminente hacia la cirrosis y el CHC. Actualmente, la biopsia hepática se mantiene como el estándar de oro para el diagnóstico y la estadificación de la enfermedad hepática, sin embargo, es invasiva, costosa y conlleva riesgos innecesarios.

Debido al uso creciente de las técnicas de alto rendimiento, la cantidad de información disponible en las bases de datos biomédicas aumenta exponencialmente, por lo tanto, usar la bioinformática para integrar estos datos resulta necesario para aplicaciones como la identificación de nuevos biomarcadores.

De acuerdo con lo anterior, este proyecto de investigación pretende identificar moléculas diferencialmente expresadas en la EHGNA a través de análisis bioinformáticos de microarreglos y como resultado, estas moléculas serán propuestas como candidatos a biomarcadores de la enfermedad. De lo anterior se desprende la siguiente pregunta de investigación.

¿Es posible identificar genes diferencialmente expresados durante las etapas de desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólico que sean candidatos a biomarcadores mediante el uso de análisis bioinformáticos?

4 JUSTIFICACIÓN

Como una causa importante de mortalidad y morbilidad, la EHGNA ha sido ampliamente investigada. Evaluar con precisión cada etapa del desarrollo de la EHGNA es importante debido a que permite identificar a las personas con más probabilidades de progresar a cirrosis hepática y CHC, ya que los pacientes que cursan con dichos padecimientos en algún momento necesitarán un trasplante hepático.

Existe una necesidad urgente de desarrollar métodos no invasivos para el diagnóstico temprano de las enfermedades incluida la EHGNA. En este sentido, el uso de herramientas bioinformáticas brinda la posibilidad de realizar una integración de datos ya existentes y proponer biomarcadores no invasivos que respalden el diagnóstico, el monitoreo de la eficacia terapéutica y la progresión de la enfermedad.

Además, este proyecto busca la generación de nuevo conocimiento acerca de la enfermedad así como incentivar a que más investigadores y estudiantes se interesen en esta línea de investigación y en un futuro, se pueda brindar una variedad de métodos de diagnóstico, efectivos y específicos que incidan en una mejor calidad de vida de los pacientes. Por lo que este proyecto de investigación, pretende usar los análisis bioinformáticos para identificar genes diferencialmente expresados y proponerlos como candidatos a biomarcadores en la enfermedad de hígado graso no alcohólico.

5 HIPÓTESIS

- El análisis bioinformático de meta-análisis de micro-arreglos es una herramienta útil para la identificación de genes diferencialmente expresados con potencial de ser propuestos como candidatos a biomarcadores para el diagnóstico temprano de la enfermedad de hígado graso no alcohólico.

6 OBJETIVOS.

6.1 General:

- Determinar genes diferencialmente expresados candidatos a biomarcadores para la enfermedad de hígado graso no alcohólico mediante el uso de análisis bioinformáticos.

6.2 Específicos:

1. Establecer una base de datos con micro-arreglos que evalúen la EHGNA en tejidos de seres humanos.
2. Realizar un meta-análisis de micro-arreglos para encontrar genes diferencialmente expresados realizados a partir de tejidos de seres humanos durante las etapas de desarrollo de la EHGNA.
3. Realizar un análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados en las distintas etapas de EHGNA con distintas bases de datos de firmas moleculares.
4. Identificar la relación entre los genes diferencialmente expresados y bases de datos de proteómica con categoría de liberación al torrente sanguíneo.
5. Seleccionar los candidatos a biomarcadores para cada etapa de la EHGNA.

7 METODOLOGÍA

7.1 Diseño experimental del análisis bioinformático:

7.1.1 Estrategia de búsqueda

Se realizaron búsquedas en publicaciones en inglés y en español en bases de datos electrónicas como PubMed, EMBASE, Omics DI y Cochrane Library para obtener todos los posibles estudios en el periodo del 1 de enero de 2000 al 31 de mayo del 2020. Las palabras clave de búsqueda fueron las siguientes: EHGNA, hígado graso no alcohólico enfermedad, HGNA, EHNA, esteatohepatitis no alcohólica, micro-arreglos, proteómica, suero, plasma. También se realizaron búsquedas manuales en referencias de los artículos seleccionados para identificar estudios adicionales.

7.1.2 Selección de estudios

Se realizó una base de datos que contuvo la información recolectada, posteriormente, para seleccionar los experimentos finales se verificó que el GSE o ID de los experimentos estuviera disponible en GEO, además, que hubieran sido aceptados en la plataforma ImaGEO (Integrative gene expression meta-analysis from GEO database) y que las bases de datos fueran micro-arreglos. Estas bases de datos debieron haber incluido los siguientes criterios de selección:

- **Criterios de inclusión:** Población adulta participante de cualquier sexo o etnia con EHGNA, que incluyera las dos etapas de la enfermedad: HGNA & EHNA, diagnosticada sobre la base de evidencia bioquímica, radiológica o histológica de hígado graso y la exclusión de otras causas concurrentes de HGNA.
- **Criterios de exclusión:** Estudios que fueran realizados en muestras de seres humanos, artículos de investigación que no informan resultados de interés o datos primarios (editoriales, revisiones), o que utilizan una definición de caso inadecuada.

7.2 Extracción de datos y evaluación de la calidad

Para la recolección de información y establecer nuestra propia base de datos, así como evaluar la calidad de dicha información, se extrajeron los datos de cada estudio de forma

independiente y fueron analizados por la plataforma de ImaGEO y el lenguaje de programación R, así como el software R STUDIO.

7.3 Análisis de datos

7.3.1 Meta-análisis

El meta-análisis se realizó en la plataforma ImaGEO, para dicha plataforma la fuente de datos debió comenzar con "GSE" seguido de un código numérico (es decir, GSE48452). El archivo GSE es un formato específico de NCBI GEO que contiene una matriz de expresión genética y toda la información sobre el experimento, incluido el archivo de anotaciones y la información de la muestra en la cuál se ingresaron los siguientes GSE: GSE48452, GSE89632, GSE33814, GSE59045, GSE49541 (**Tabla 2**).

Tabla 2. GSE utilizados en la meta-análisis.

GSE	Año	No de Muestras Controles	No de muestras para HGNA	No de muestras para EH NA	No de muestras totales	Referencia
GSE33814	2012	13	19	12	44	(Starmann et al. 2012)
GSE48452	2013	14	14	18	46	(Ahrens et al. 2013)
GSE59045	2015	6	4	5	15	(du Plessis et al. 2015)
GSE89632	2015	24	20	19	63	(Arendt et al. 2015)
GSE49541	2014		40	32	72	(Moylan et al. 2014)

Los parámetros utilizados fueron los siguientes: Modelo de efectos aleatorios (REM), donde cada estudio contiene además un efecto aleatorio que puede incorporar heterogeneidades desconocidas de estudios cruzados en el modelo, es decir, debido a diferentes plataformas o lotes).

- Combinación de valor p : Este método integra los valores p del análisis individual en un valor p combinado. Se utilizó el método $\max p$. Este método es el más restrictivo. Para cada resultado, el valor p máximo se asigna a todos los estudios.
- Selección de muestras: En esta tabla se seleccionaron las muestras y se dividieron según el criterio (Casos/Controles). Para la primera meta-análisis se realizó utilizando: HGNA para casos y los controles fueron muestras de pacientes con valores bioquímicos sanos, para el segundo meta-análisis se comparó la segunda etapa EHNA contra los controles y finalmente. Para la siguiente etapa se comparó la HGNA contra EHNA.

7.4 Análisis de datos mediante el lenguaje de programación R

7.4.1 Identificación de Genes diferencialmente expresados (DEG)

Los datos filtrados de los perfiles de expresión de ARNm se descargaron y analizaron mediante el software de lenguaje R. El método limma en Bioconductor se utilizó para identificar genes que se expresaban diferencialmente entre HGNA y EHNA. El umbral para los DEG se estableció como p -valor corregido $<0,05$ y $|\text{cambio log}_2 \text{ veces (FC)}| \geq 1$.

7.4.2 Análisis de superposición con la categoría proteómica y liberación al torrente sanguíneo

En el repositorio de reactome (<https://reactome.org>), se seleccionó la categoría de liberación al torrente sanguíneo, se extrajeron todos los datos pertenecientes a esta categoría, y se formó una base de datos en R studio, para su posterior análisis. De igual manera, se seleccionó una base de datos de proteómica (PXD011839) para su posterior análisis en R studio, a través de la realización de un gráfico de Upset plot, para visualizar las intersecciones en todas las categorías antes mencionadas.

7.4.3 Análisis de la vía GO, HALLMARK, WIKIPATHWAYS y REACTOME.

Para identificar las funciones de los DEG, realizamos análisis de enriquecimiento de la función GO (ontología de genes) en 3 ontologías funcionales: proceso biológico (BP), componentes celulares (CC) y función molecular (MF). También se realizó el análisis de enriquecimiento de la vía Hallmark, Wikipathways y Reactome, para identificar las vías enriquecidas. El valor de p se calculó mediante firma clasificada, se usó una distribución “kstests” y se consideró significativa una vía con un $FDR > 0.05$. Utilizando el lenguaje de R, así como la paquetería de HypeR, para el análisis, ggplot y ggplot2 para realizar las gráficas.

7.5 Resultados

7.5.1 Identificación de DEG para distintas etapas de la EHGNA mediante meta-análisis.

Con el fin de identificar genes clave en la progresión de la EHGNA, específicamente en las dos etapas que la componen: HGNA y EHNA, se analizaron genes diferencialmente expresados entre controles, individuos clínicamente sanos (CTRL), y pacientes con HGNA y con EHNA a través de conjuntos de datos públicos (**Tabla 2**). El análisis arrojó un total de 121 DEG para la comparación HGNA vs CTRL, de los cuáles 61 están sobre-expresados, 60 están sub-expresados. Para la comparación entre EHNA vs CTRL, el análisis arrojó un total de 402 DEG, de los cuáles 230 están sobre-expresados y 172 se encontraron sub-expresados, y finalmente para la comparación entre EHNA vs HGNA; encontramos 196 DEG, de los cuáles 121 están sobre-expresados y 75 sub-expresados (**Tabla 3**). Se muestra un resumen de las bases de datos que se utilizaron para la realización del meta-análisis.

Tabla 3. DEG para las distintas etapas.

Comparación	Genes sobre-expresados	Genes sub-expresados	Total de genes
HGNA vs CTRL	61	60	121
EHNA vs CTRL	230	172	402
EHNA vs HGNA	121	75	196

Nomenclatura: **HGNA** = Hígado graso no alcohólico o esteatosis hepática, **EHNA** = Esteatohepatitis no alcohólica, **CTLR** = Controles.

Se realizó una agrupación jerárquica de los ARNm expresados diferencialmente entre CTLR, HGNA y EHNA. En los mapas de calor que se muestran en las figuras 7A, 7B y 7C, el color rojo indica una expresión relativa alta y el verde indica una expresión relativa baja, cada cuadro en color representa una muestra. En los mapas de calor de observa un patrón para cada etapa de la enfermedad, los genes que se encontraban sub-expresados en la HGNA o EHNA, en los controles están sobre-expresados en su gran mayoría. Con estos resultados se puede sugerir que existe una tendencia de expresión la cuál es distinta para cada etapa de la enfermedad en los genes usados en este meta-análisis.

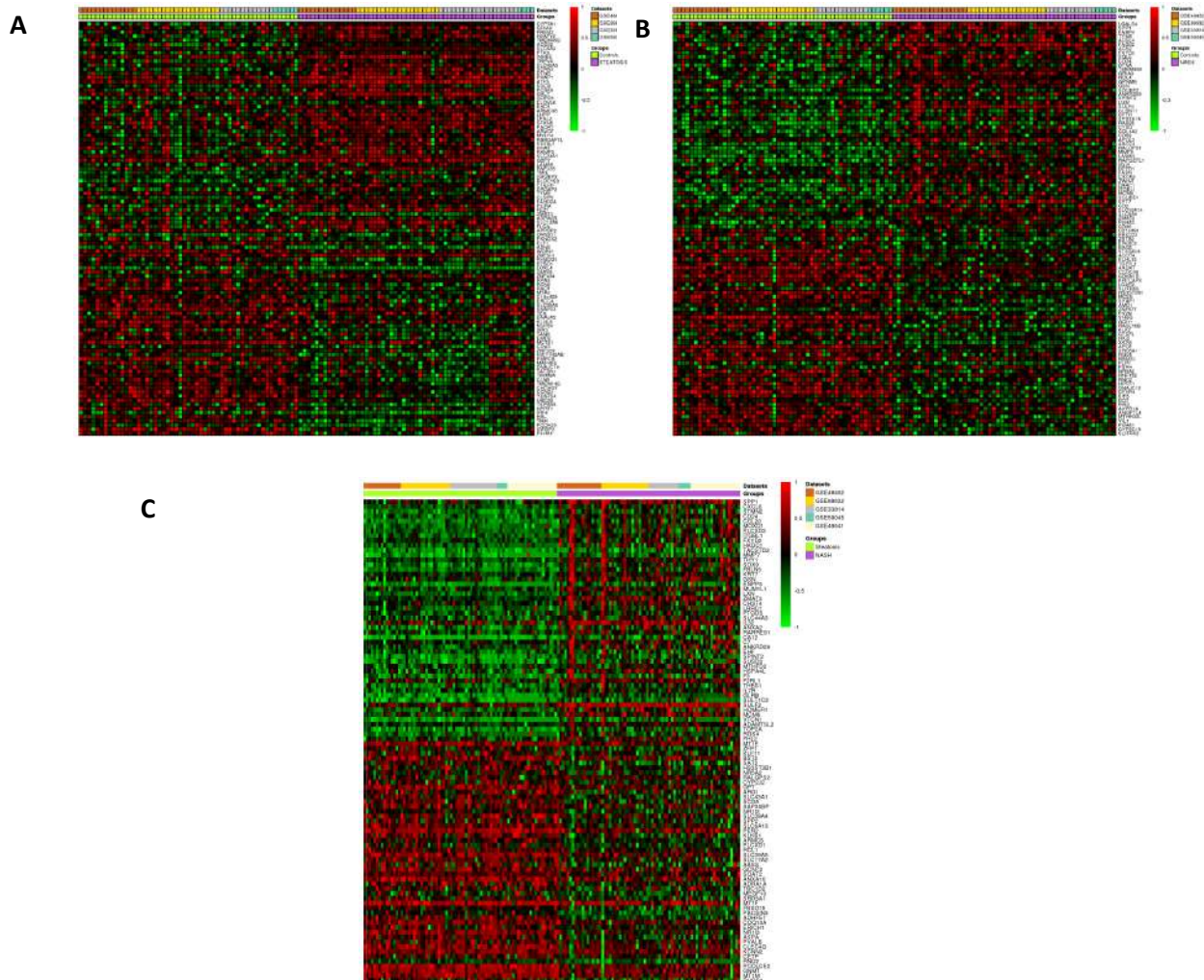
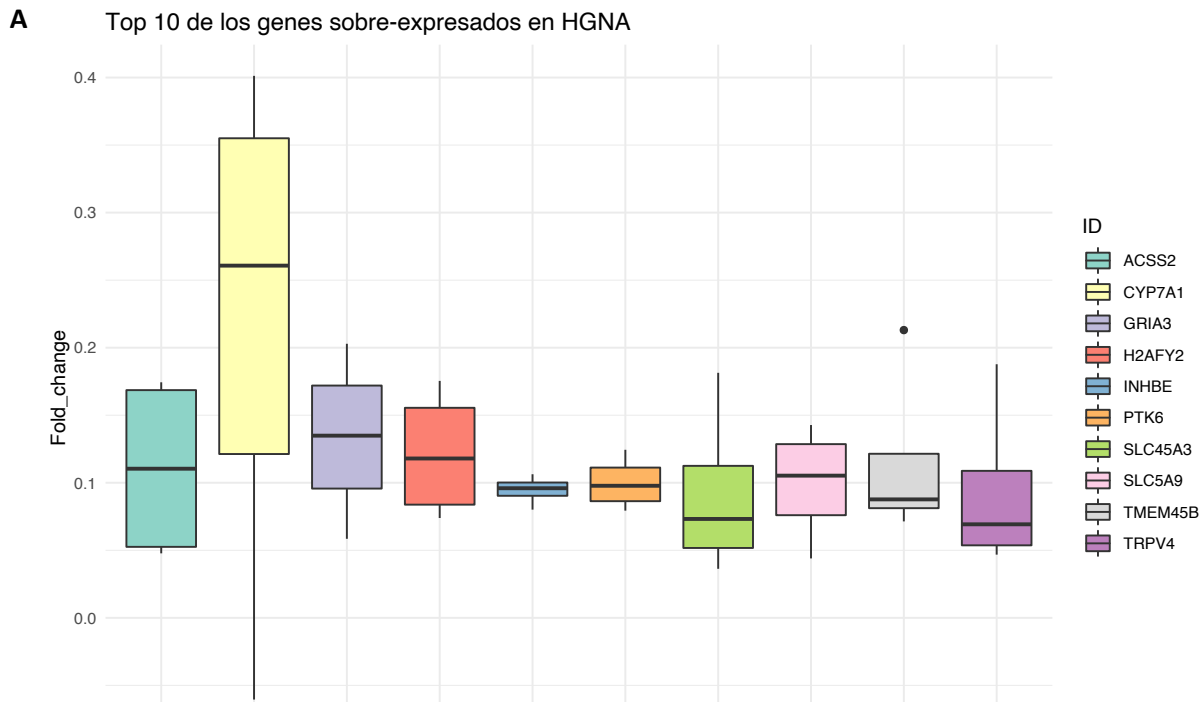


Figura 7. Mapa de calor de las comparaciones realizadas en el meta-análisis.

El mapa de calor muestra la expresión génica diferencial entre A) HGNA y CTRL, B) EHNA y controles, C) HGNA y EHNA, usando los distintos GSE. El rojo indica una expresión relativa alta y el verde indica una expresión relativa baja, mientras se representan controles sanos, HGNA representa hígado graso no alcohólico y EHNA representa esteatohepatitis no alcohólica.

Se realizaron diagramas de cajas con el top 10 de los genes con mayor diferencia de expresión y se graficaron comparativamente mediante la proporción de cambio (Fold change) para cada etapa. Los 10 DEG sobre-expresados para HGNA fueron: *H2AFY2*, *INHBE*, *PTK6*, *GRIA3*, *TRPV4*, *CYP7A1*, *ACSS2*, *SLC45A3*, *SLC5A9*, *TMEM45B* (**Figura 8A**), mientras que los 10 DEG sub-expresados fueron: *UBE2B*, *HPRT1*, *IRF4*, *HAL*, *TSPAN5*, *PCDH20*, *YEATS4*, *IGFBP2*, *P4HA1* y *TNIK* (**Figura 8B**). Para la etapa de EHNA, los 10 DEG sobre-expresados fueron: *ACE2*, *FABP4*, *LGALS4*, *ACSL4*, *FADS2*, *TYMS*, *SPP1*, *SQLE*, *CD24*, *FXYD2* (**Figura 9A**), y los 10 DEG sub-expresados fueron: *EIF5*, *P4HA1*, *CYP2C19*, *MTHFD2L*, *DCT*, *SLITRK3*, *ANGPTL4*, *AVPR1A*, *IRS2* y *VIL1* (**Figura 9B**). Este análisis nos permitió identificar genes específicos para las etapas HGNA y EHNA.



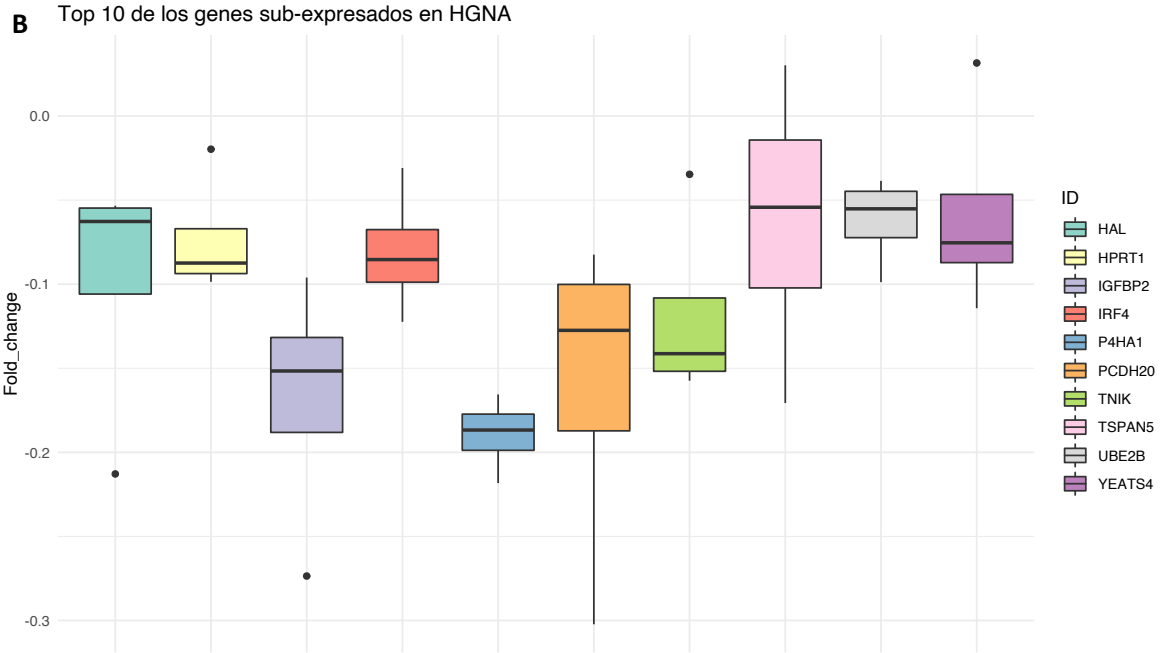
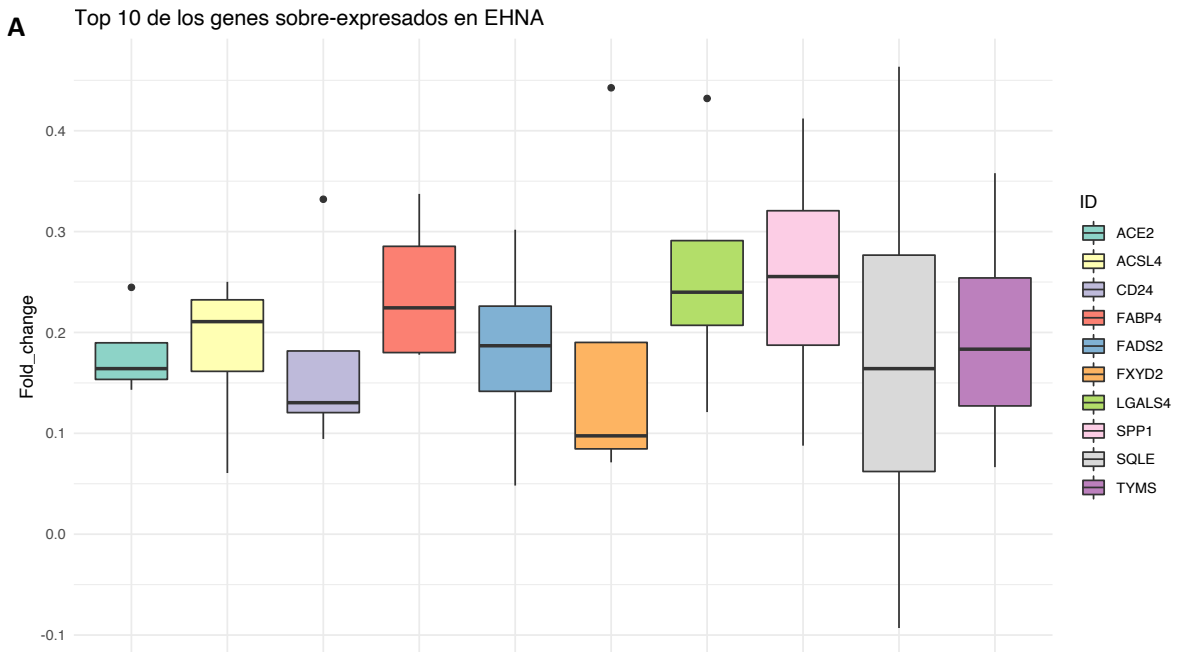


Figura 8. Los 10 DEG con mayor diferencia de expresión en la etapa de HGNA.

La grafica de diagrama de cajas representa el cambio de pliegue de los resultados del meta-análisis. **A)** Los genes sobre-expresados en HGNA. **B)** Los genes sub-expresados en HGNA.



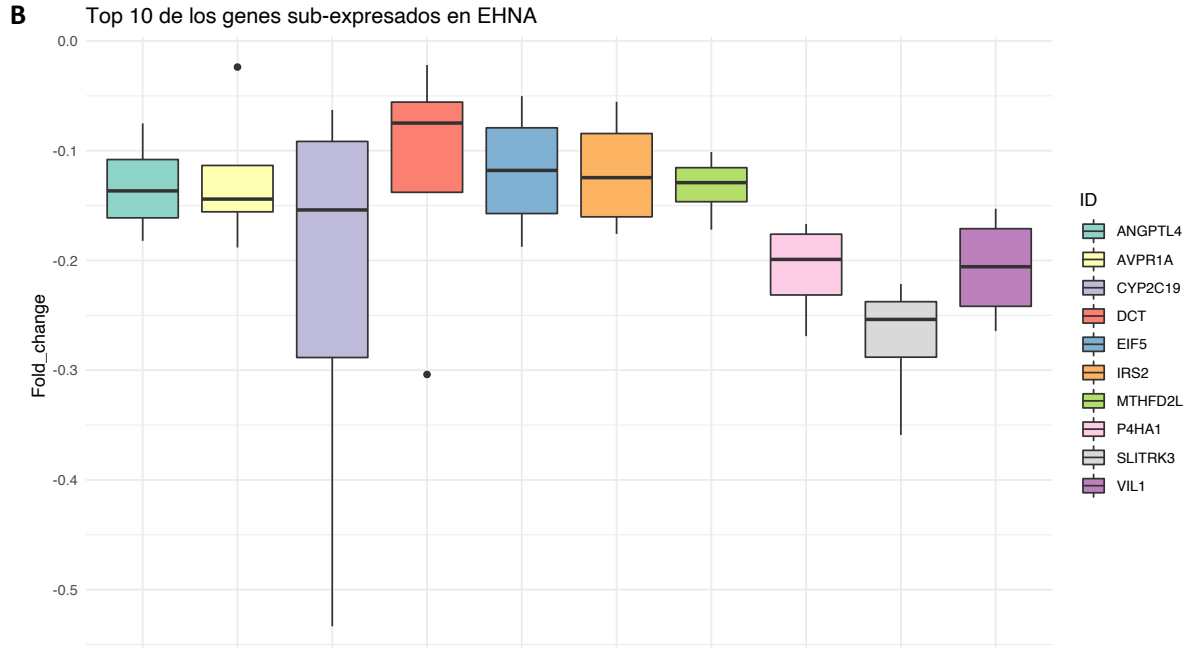


Figura 9. Top 10 de los genes diferencialmente expresados en la etapa de EHNA.

Los diagramas de cajas grafican el cambio de pliegue de los resultados del meta-análisis. A) Diagrama de cajas para el top 10 de los genes sobre-expresados en EHNA. B) Diagrama de cajas para el top 10 de los genes sub-expresados en EHNA.

7.5.2 Identificación de genes específicos las etapas de la EHGNA

Se realizó un upset plot para observar las similitudes y diferencias entre los DEG. El análisis de upset plot reveló la presencia de 105 genes específicos para la etapa de HGNA, 1 gen que se comparte con las otras dos comparaciones y 14 genes que comparte con EHNA, respecto de los controles. Para la etapa de EHNA se observaron 356 genes específicos para esta etapa, 31 genes que comparte con la comparación EHNA vs HGNA. Finalmente, analizamos el número de genes que fueron diferentes cuando se comparaban entre si las etapas de HGNA y EHNA. Encontramos 163 genes específicos en dicha comparación (**Figura 10**), y los genes presentes en cada comparación se detallan en la **Tabla 4**.

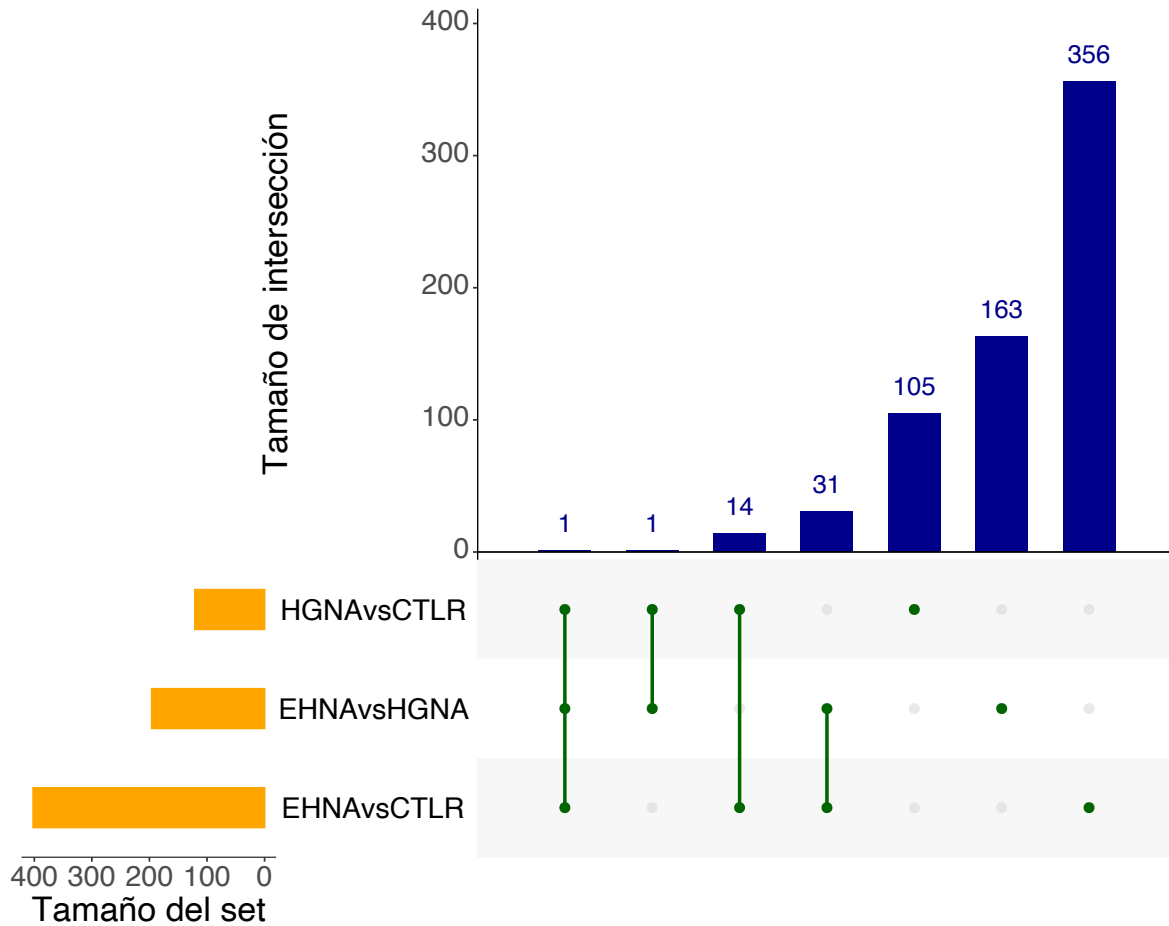


Figura 10. Upset Plot para las mostrar la superposición de genes diferencialmente expresados entre las comparaciones realizadas mediante el meta-análisis.

Las barras azules muestran el tamaño de intersección para cada comparación, las barras naranjas muestran el tamaño de cada set de genes y con las líneas verdes muestran la observación de la superposición para cada comparación.

Tabla 4. Genes que intersectan en las distintas comparaciones.

Comparación	Genes
HGNA/EHNA	<i>APPBP2, GRIA3, HPRT1, NPL, P4HA1, RABGAP1L, SCRIN2, SGCB, SLC5A9, TMEM14B, TMEM45B, TRPV4, TYMS, WIPF1</i>
EHNAvsHGNA/EHNA	<i>AACS, ANKRD29, CD2, CD24, CETN2, CNTN3, CYGB, CYP2J2, DNAJB2, DPYSL2, FXYD2, GSN, HS3ST3B1, ITGBL1, LRRC1, MCM6,</i>

	<i>MCOLN3,MR1,MUMILI,NFASC,NR5A2,RND2,SLC39A10,SLC43A1,SPINT2,SPPI,SRD5A1,ST3GAL6,SULF2,TKT,WIP1I</i>
EHNAvsHGNA /HGNA	<i>FBLN5</i>
EHNAvsHGNA/HG NA/EHNA	<i>ZMAT3</i>

7.5.3 Los DEG de las etapas de HGNA y EHNA se agrupan principalmente en BP en el análisis de GO.

El análisis de GO permite predecir las posibles funciones de los ARNm diferencialmente expresados en las distintas etapas del desarrollo de la EHGNA. Para la etapa de HGNA, el análisis de GO mostró que los genes sub-expresados participan para la categoría de BP, principalmente en la regulación de las vías relacionadas con procesos metabólicos de macromoléculas, procesos metabólicos de sustancias, procesos de metabolismo de compuesto de nitrógeno, para CC se encontró componentes de la célula, intracelulares y de organelos. Para MF los más destacados fueron de unión al ADN. Los genes sobre-expresados se encontraron en la categoría BP: desarrollo de un solo organismo, así como procesos multicelulares. Para CC se encontraron componentes asociados a la membrana y partes de la membrana plasmática. Para MF se encontraron genes relacionados a la unión a ADN **(Figura 11)**.

El análisis de GO mostró que los genes sub-expresados en EHNA estaban involucrados para BP en la regulación de las vías relacionadas con procesos metabólicos, procesos metabólicos de sustancias, procesos metabólicos primarios, mientras que en CC se encontró componentes de la membrana del Golgi y del complejo asociado a microtúbulos. En MF, se encontraron los de unión a ácidos nucleicos, como el ADN y de unión a ADN de secuencias específicas. Para los genes sobre-expresados se encontraron en la categoría BP fueron los de un solo organismo, así como de regulación biológica y celular. Para CC se encontraron los asociados

a la periferia de la célula y la membrana plasmática, así como de componentes de vesículas. Para MF se encontraron los de unión al ADN (**Figura 12**). Este resultado nos permitió observar, que los genes se agrupaban principalmente en la categoría BP para la etapa de HGNA y EHNA, y los genes sub-expresados solamente en EHNA, los cuáles se agruparon en la categoría CC, lo que sugiere que los genes encontrados en el meta-análisis concuerdan con el proceso de desarrollo de la enfermedad.

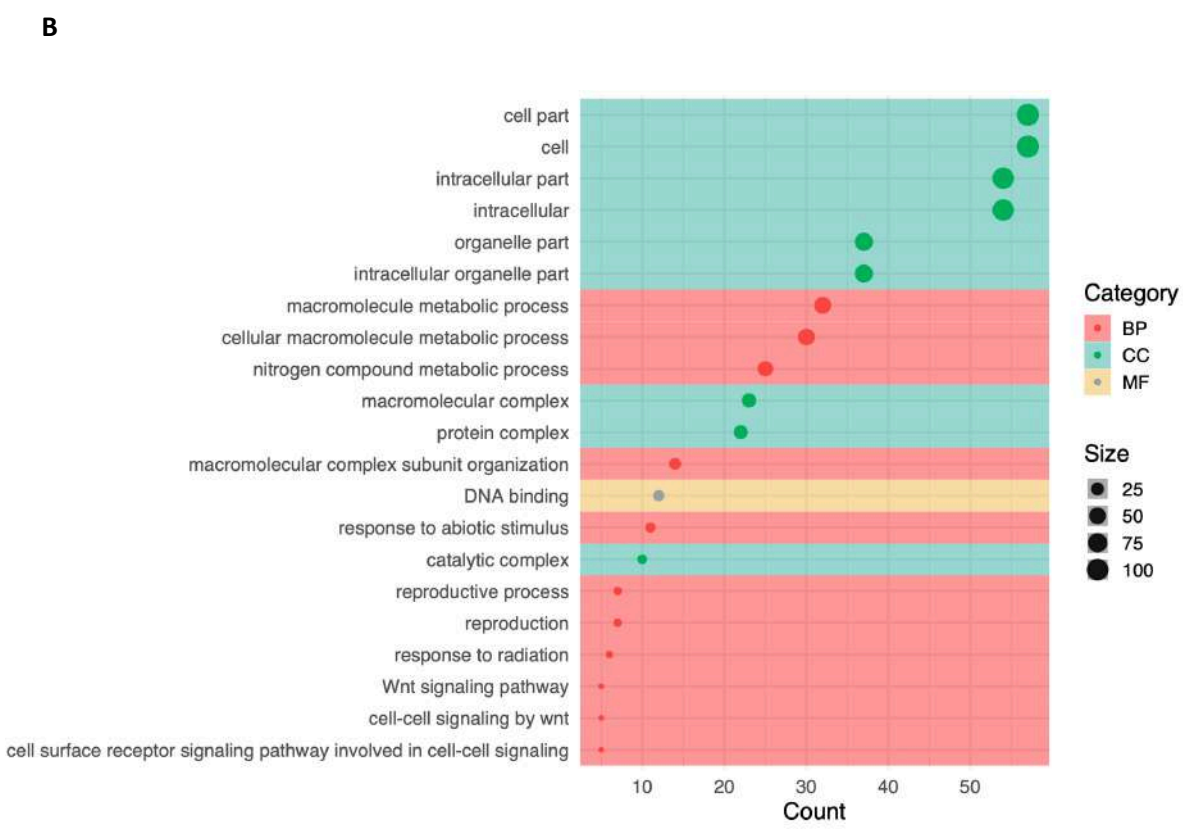
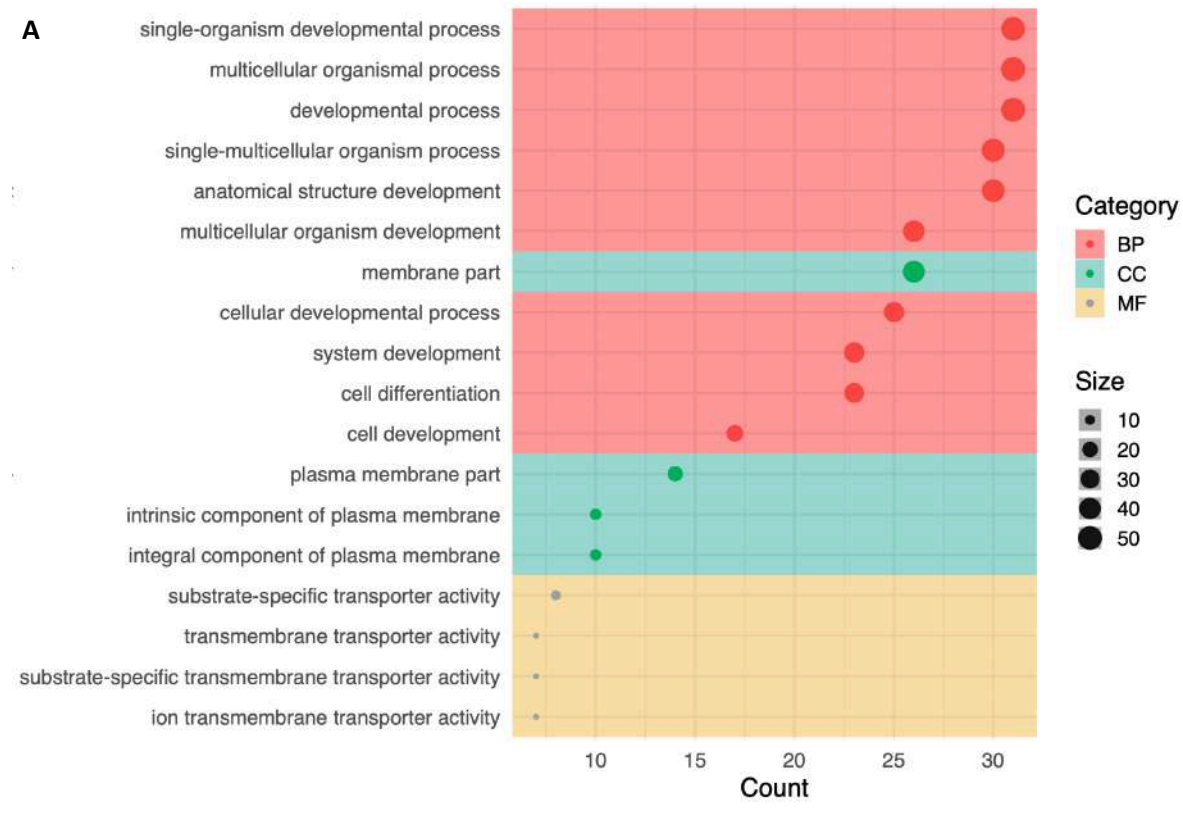
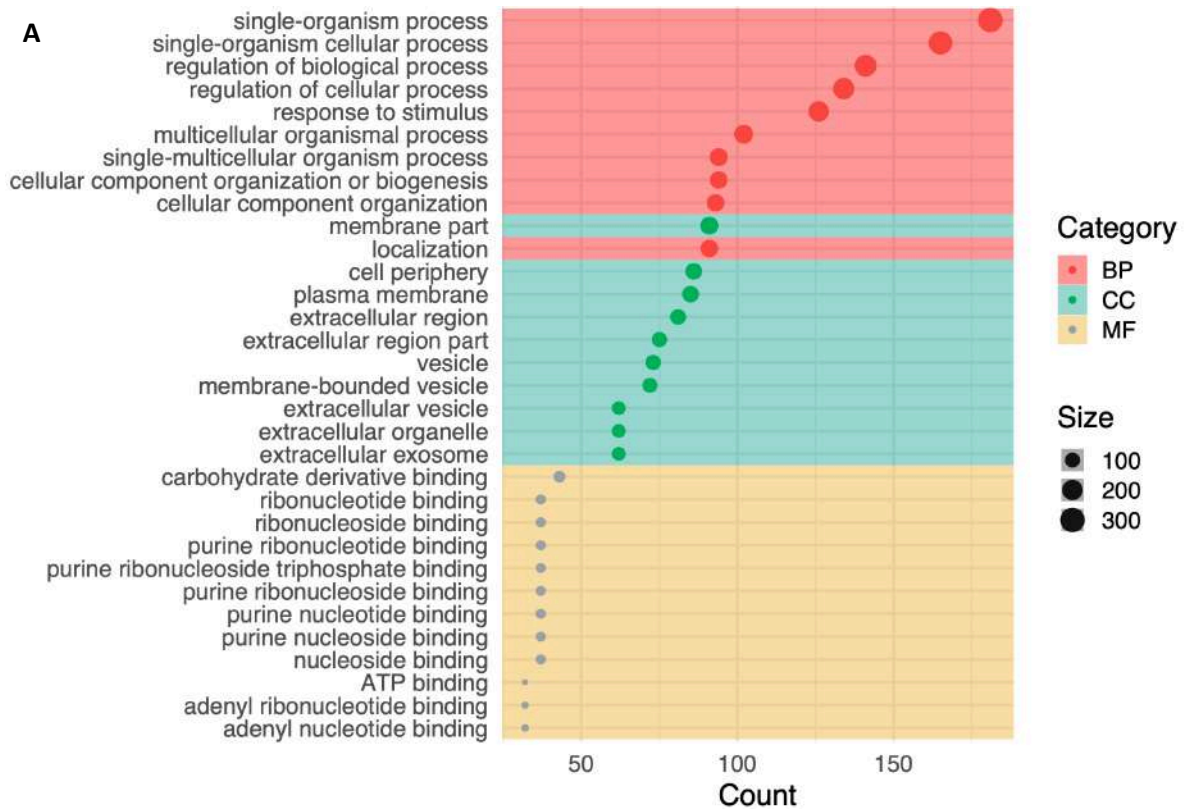


Figura 11. Análisis GO de genes expresados diferencialmente en la etapa de HGNA.

A) GO de genes sobre-expresados. B) GO de genes sub-expresados . En el lado izquierdo están enlistados los términos para cada categoría, del lado derecho están las categorías, BP: procesos biológicos (rojo), CC: componentes celulares (verde), MF: funciones moleculares (amarillo) y se comparan contra el conteo de los DEG.



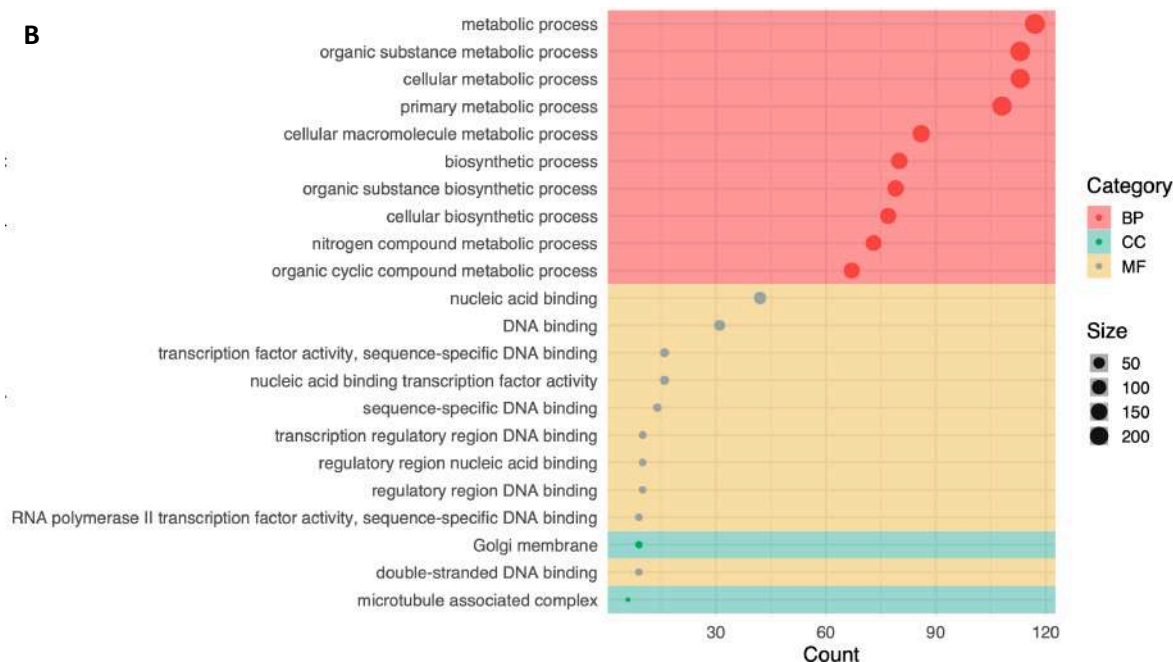


Figura 12. Análisis GO de genes expresados diferencialmente en la etapa de EHNA

A) GO de genes sobre-expresados. B) GO de genes sub-expresados . En el lado izquierdo están enlistados los términos para cada categoría, del lado derecho están las categorías, BP: procesos biológicos (verde), CC: componentes celulares (rojo), MF: funciones moleculares (azul) y se comparan contra el conteo de los DEG.

7.5.4 El meta-análisis mostró patrones de expresión génica global específicos para cada etapa de la EHGNA

Con el fin de comparar los perfiles de expresión génica global de nuestros DEG que se obtuvieron a partir del meta-análisis de biopsias hepáticas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), comparando los DEG contra otros GSE, para este caso utilizamos el GSE49541 para verificar el comportamiento de nuestros datos. El PCA primario, que representa la mayor variabilidad en el conjunto de datos, indicó que los perfiles de transcriptoma hepático de nuestra firma de genes, en especial de EHNA y los datos de GSE49541, se agruparon y había similitudes en las muestras de pacientes con EHNA (**Figura 13**) lo que significa que nuestra firma de genes correlaciona con otros datos reportados en bases de datos públicas.

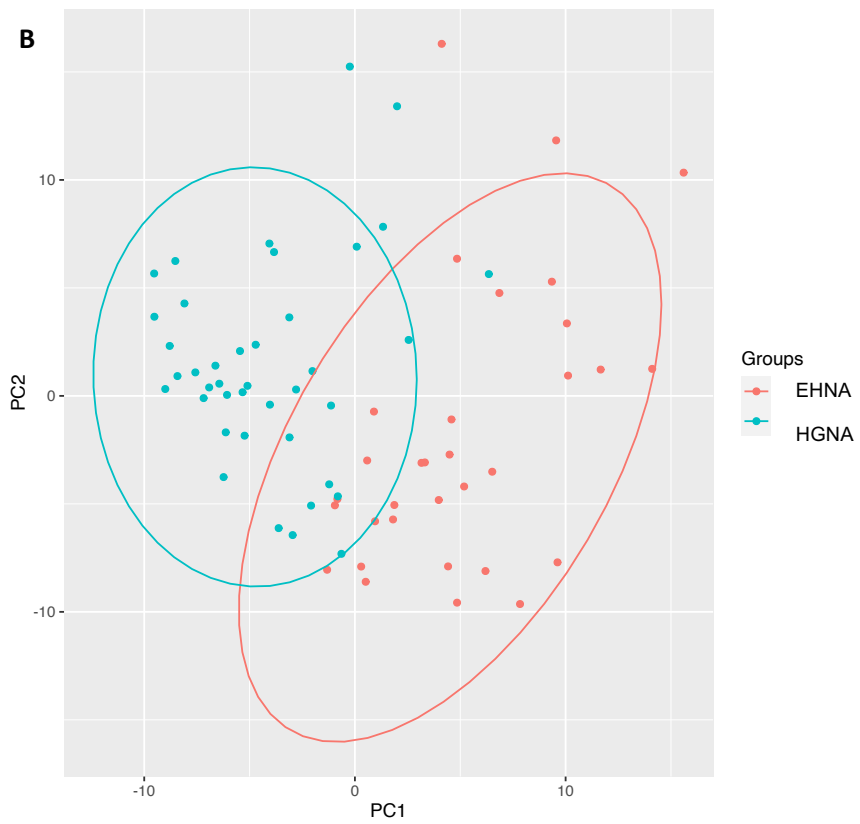
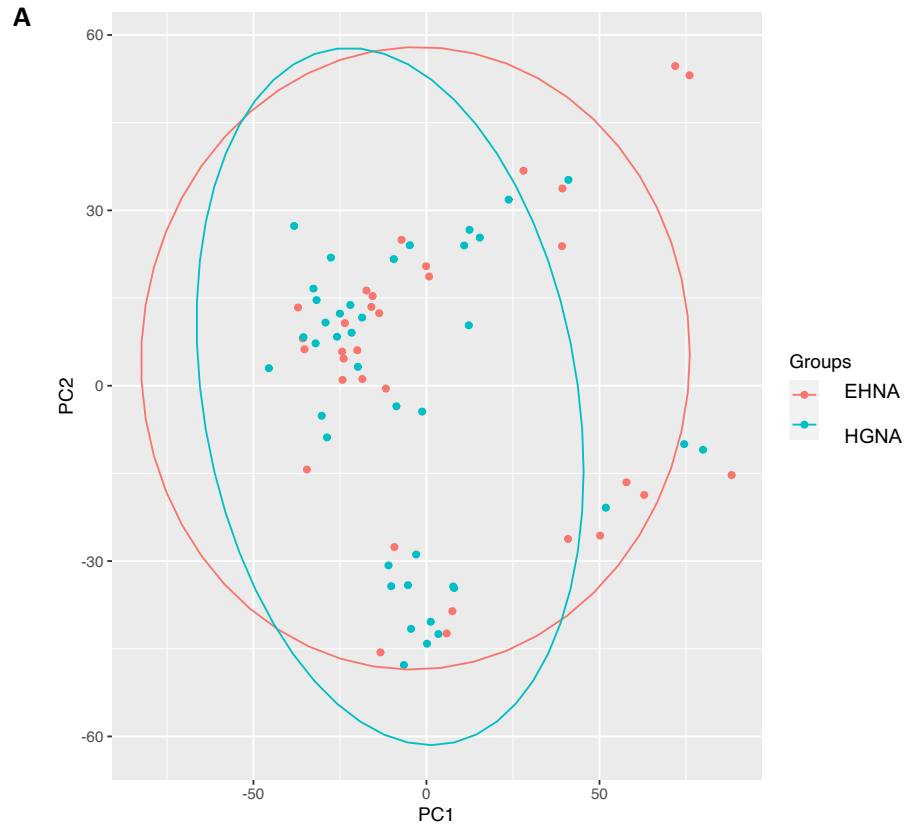


Figura 13. Los DEG establecen una firma genética específica para cada etapa de la enfermedad.

En el PCA, en donde se compara nuestra firma de genes pertenecientes a la base de datos con el registro GSE49541. Observamos las muestras pertenecientes a HGNA (color rojo) y EHNA (color azul). A) PCA antes de agregar los DEG. B) PCA después de añadir los DEG.

7.5.5 Los DEG para las distintas etapas de la EHGNA tiene similitudes con las categorías de liberación al torrente sanguíneo y proteómica.

Para determinar si los cambios de los DEG también se encuentran a nivel de su producto proteico en análisis proteómica de bases de datos públicas, se realizó el análisis de upset plot mediante la comparación de los datos en HGNA y EHNA en la categoría de liberación al torrente sanguíneo (Realse Bloodstream) obtenida de la base de datos de Reactome. En el análisis observamos que para la HGNA existe una superposición de 2 genes, mientras que para EHNA, se observaron 13 genes que se superponen (**Figura 14**).

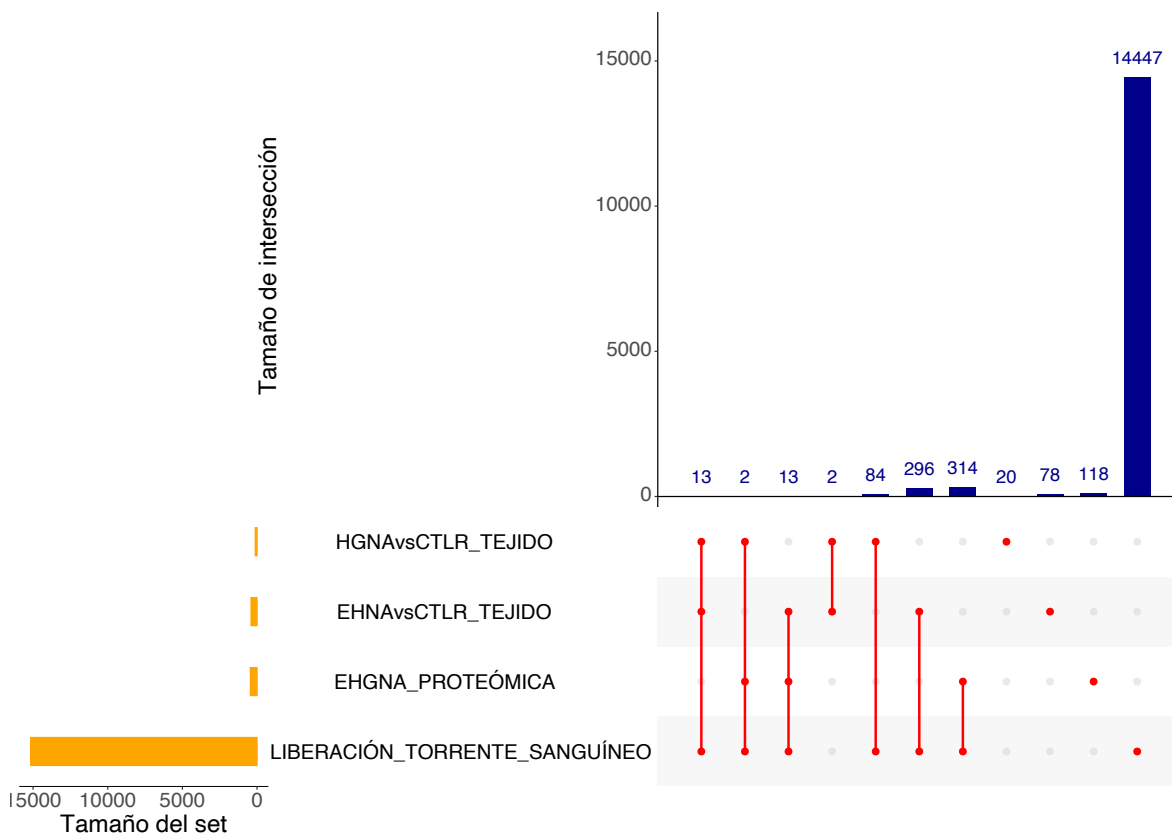


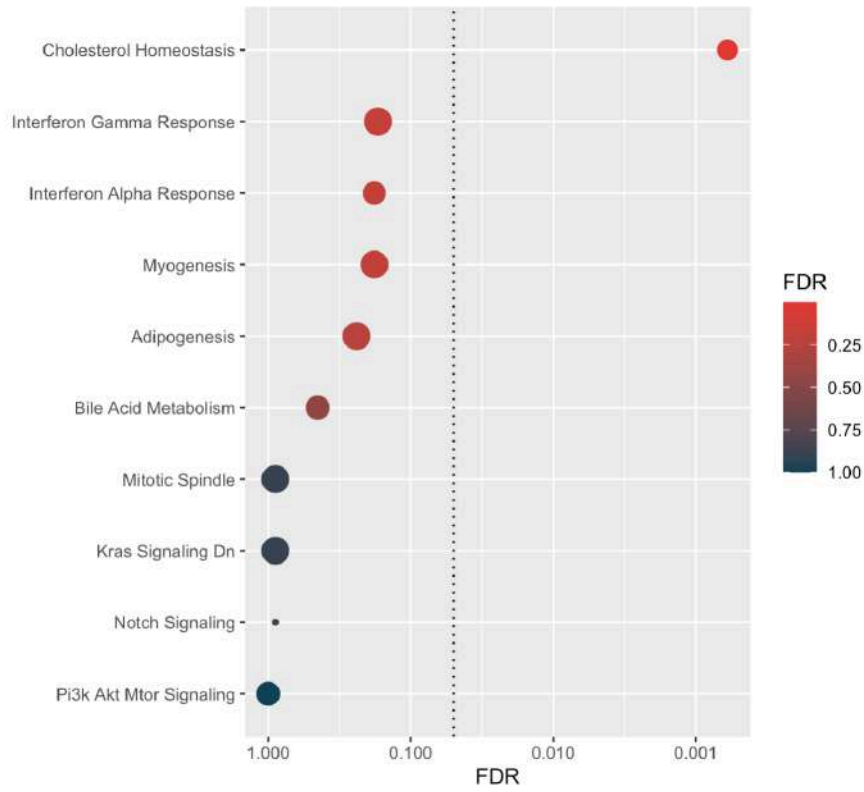
Figura 14. Los DEG encontrados en tejido, también están presentes en liberación al torrente sanguíneo y proteómica.

Grafico de Upset plot, las barras azules muestran el tamaño de intersección para cada comparación, las barras naranjas muestran el tamaño de cada set de genes y con las líneas rojas observación la superposición para cada comparación.

7.5.6 Vías del relacionadas al colesterol y metabolismo de lípidos son cruciales en la progresión de la EHGNA en vías: Hallmark, Wikipathways y REACTOME

Los resultados muestran que en la comparación con la base Hallmark, para la HGNA (FDR > 0.1), el conjunto de datos más enriquecidos es representado por las vías de homeostasis de colesterol, el cuál también se encontró enriquecido en la etapa de EHNA (**Figura 15**). Mientras tanto con la base de datos de Wikipathways (FDR > 0.1) , para HGNA se encontraron vías relacionadas con las proteínas de unión al elemento regulador del esterol (SREBP), de forma similar para EHNA en la base de datos Wikipathways, se halló las vías relacionadas con el metabolismo de colesterol (**Figura 16**). Por último en el análisis con la base Reactome (FDR > 0.1); para HGNA se determinó principalmente las vías relacionadas a la regulación de la biosíntesis de colesterol por SREBP, la activación de genes relacionados a las SREBP y el metabolismo de lípidos, mientras que para la etapa de EHNA, encontramos vías relacionadas a la matriz extracelular (**Figura 17**). Con estos resultados se sugiere que los DEG encontrados en el meta-análisis están principalmente implicados en vías relacionados al colesterol.

A



B

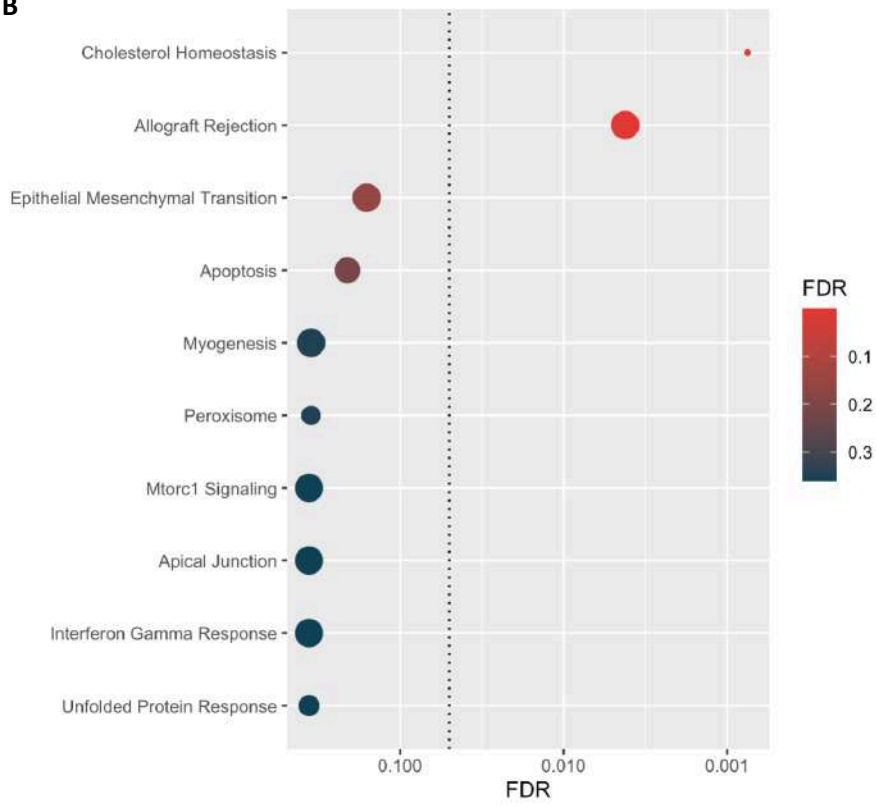
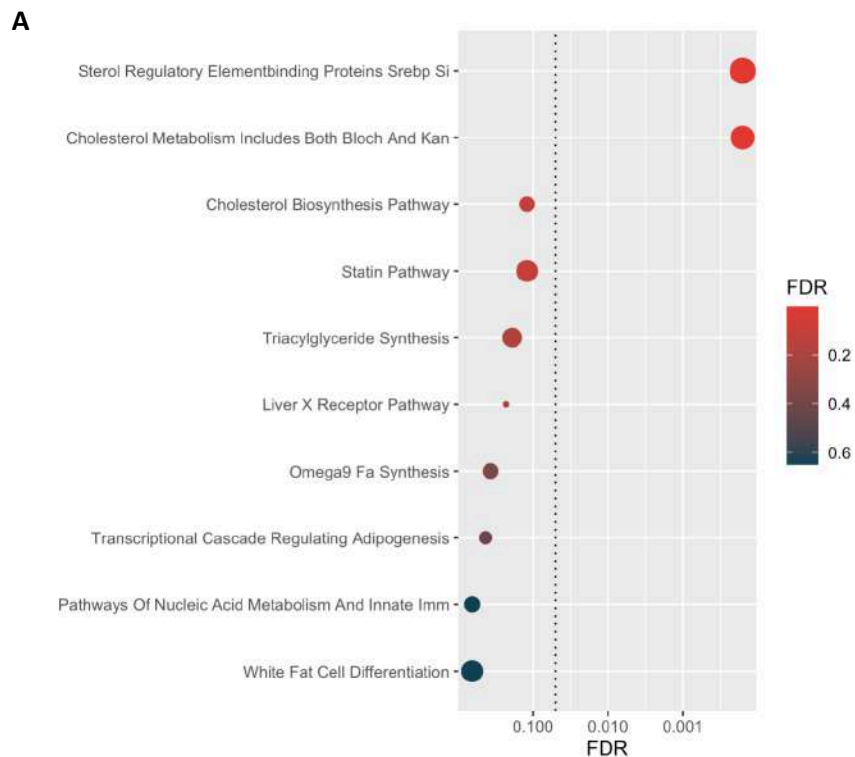


Figura 15. Vías de homeostasis del colesterol son cruciales en la progresión de la EHGNA en vías Hallmark.

Análisis de superposición con la base de datos Hallmark de los DEG en las distintas etapas del desarrollo de EHGNA. A) Análisis de la base de datos de firmas moleculares Hallmark de los genes expresados diferencialmente en esteatosis. B) Análisis de la base de datos de firmas moleculares Hallmark de los genes expresados diferencialmente en EHNA (FDR > 0.1).



B

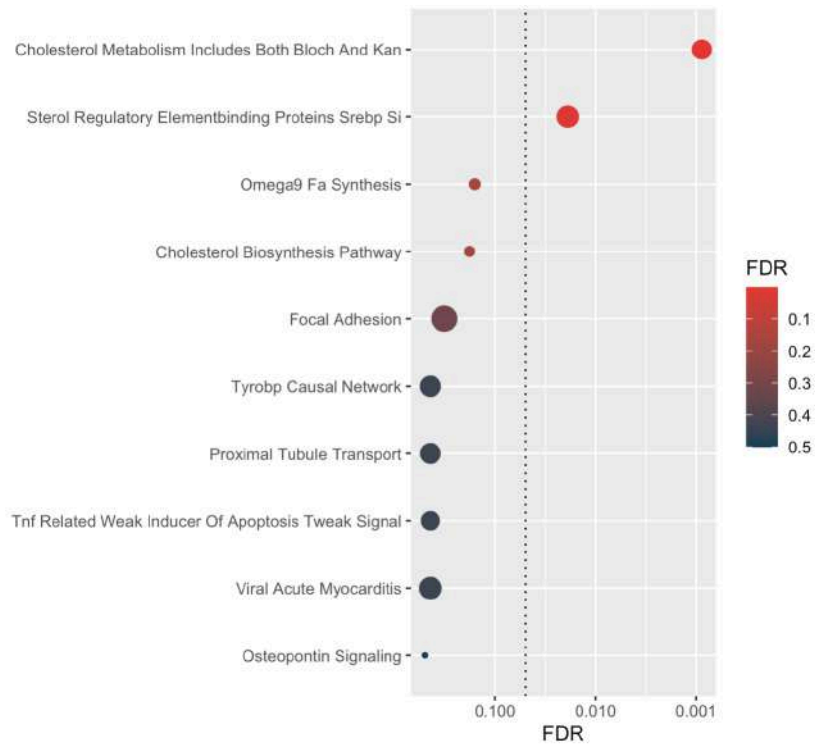


Figura 16. Vías del metabolismo del colesterol son cruciales en la progresión de la EHGNA en vías wikipathways.

Análisis de superposición con la base de datos Wikipathways de los DEG en las distintas etapas del desarrollo de EHGNA. A) Análisis de la base de datos de firmas moleculares Wikipathways de los genes expresados diferencialmente en esteatosis. B) Análisis de la base de datos de firmas moleculares Wikipathways de los genes expresados diferencialmente en EHNA, (FDR > 0.1).

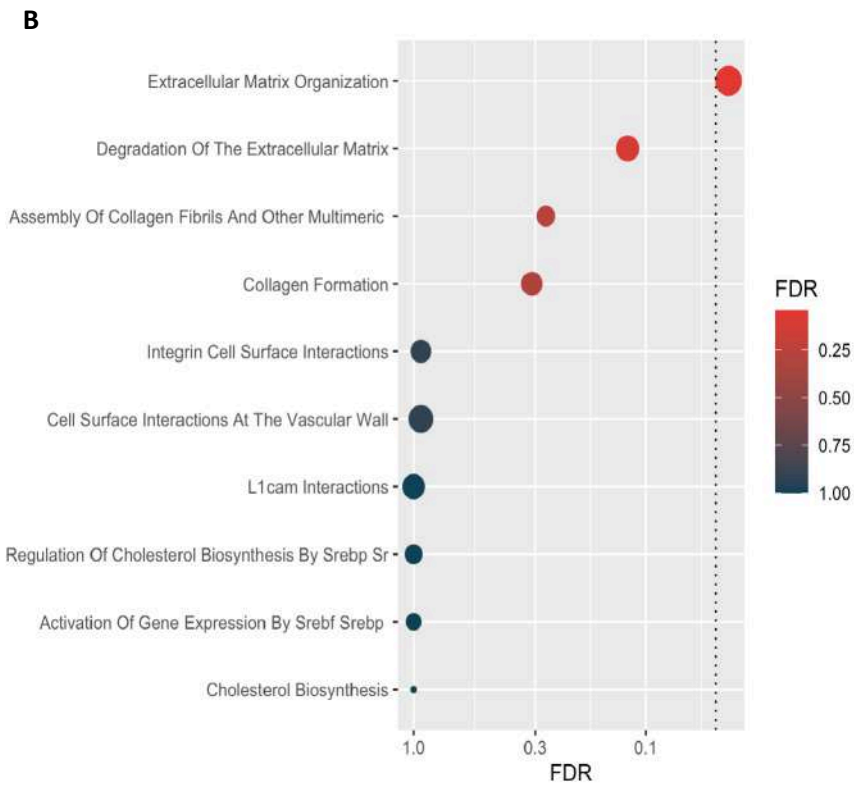
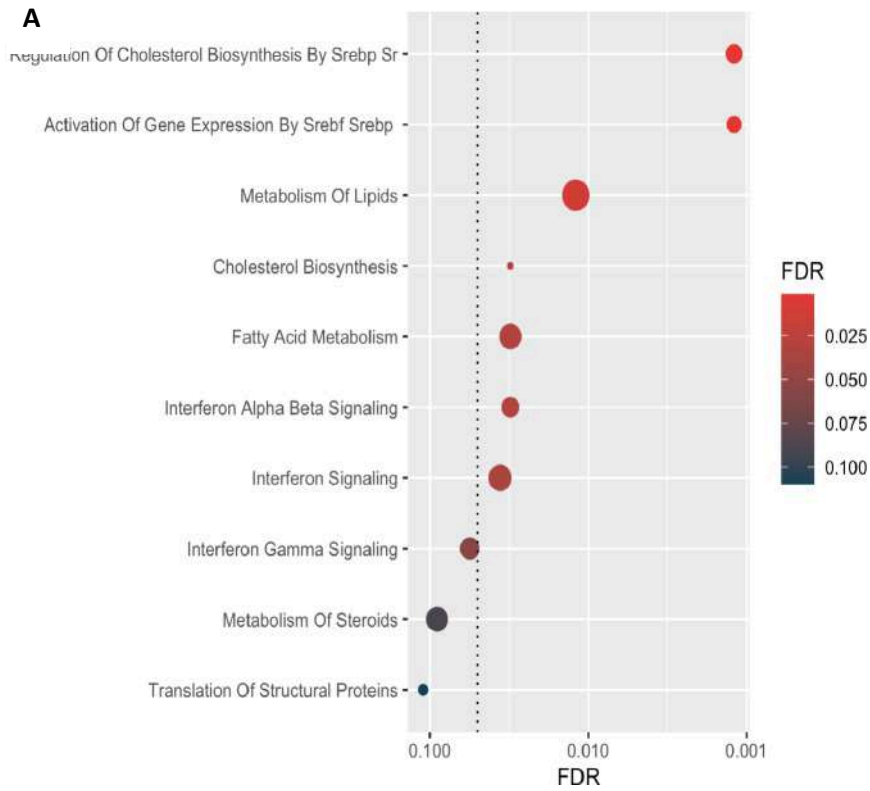


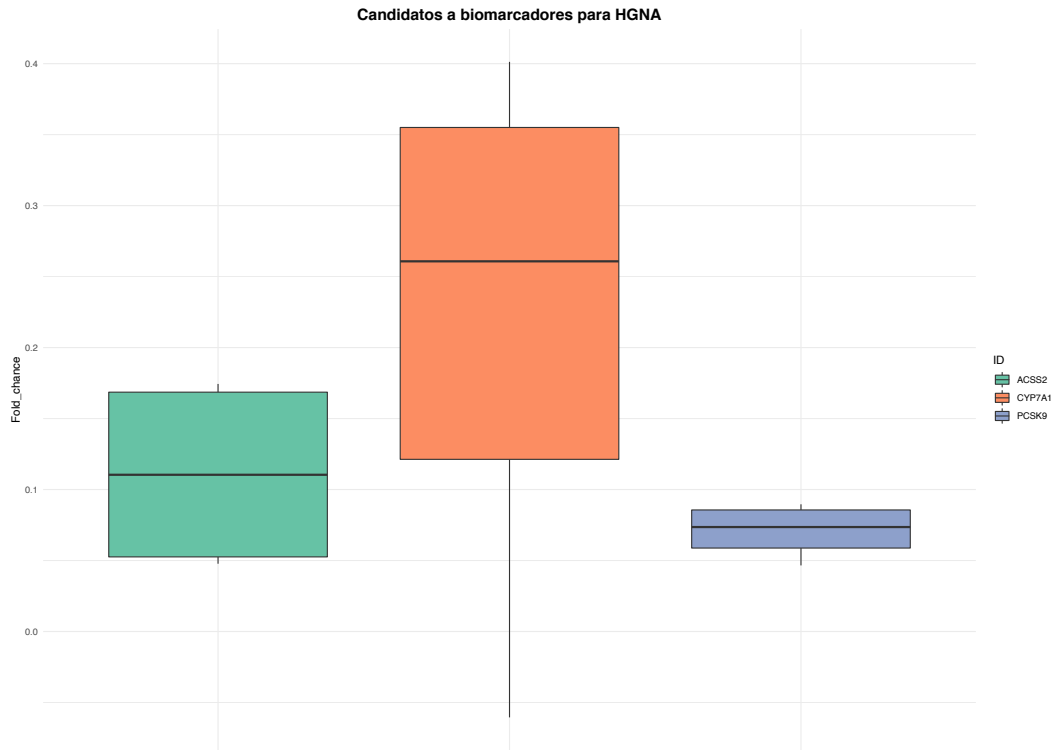
Figura 17. Vías del metabolismo del colesterol y organización de la MEC son cruciales en la progresión de la EHGNA en vías de REACTOME.

Análisis de superposición con la base de datos REACTOME de los DEG en las distintas etapas del desarrollo de EHGNA. A) Análisis de la base de datos de firmas moleculares REACTOME de los genes expresados diferencialmente en esteatosis. B) Análisis de la base de datos de firmas moleculares REACTOME de los genes expresados diferencialmente en EHNA, (FDR > 0.1).

7.5.7 Genes relacionados al colesterol son candidatos a biomarcadores para las etapas de HGNA y EHNA en la EHGNA.

Al correlacionar e integrar los resultados previos, se plantearon genes que podrían funcionar como candidatos a biomarcadores. Para esta selección final, se consideró que los genes candidatos estuvieran en al menos dos de los análisis realizados y que uno de éstos perteneciera a la categoría de liberación al torrente sanguíneo y/o proteómica. De igual manera, se tomó en cuenta la proporción de cambio que fuera con un valor mínimo de 0.05. Por consiguiente, para la HGNA, los candidatos a biomarcadores fueron: *ACSS2*: Miembro de la familia de cadena corta de acil-CoA sintetasa 2, *PCSK9*: Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina Tipo 9 y *CYP7A1*: Familia del citocromo P450 7 Subfamilia A Miembro 1. Para EHNA, los candidatos a biomarcadores fueron *ANGPTL3*: Proteína similar a la angiopoyetina 3, *CD36*: Receptor Scavenger Clase B Miembro 3, *CYP51A1*: Familia del citocromo P450 51 Subfamilia A Miembro 1, *FASN*: Ácido graso sintasa, *FDFT1*: Farnesil-difosfato Farnesiltransferasa 1 y *LSS*: Lanosterol sintasa. Con estos resultados proponemos que los genes anteriores tienen un potencial para convertirse en biomarcadores para las distintas etapas de la EHGNA, los cuáles están relacionados principalmente al metabolismo de colesterol (**Figura 18**).

A



B

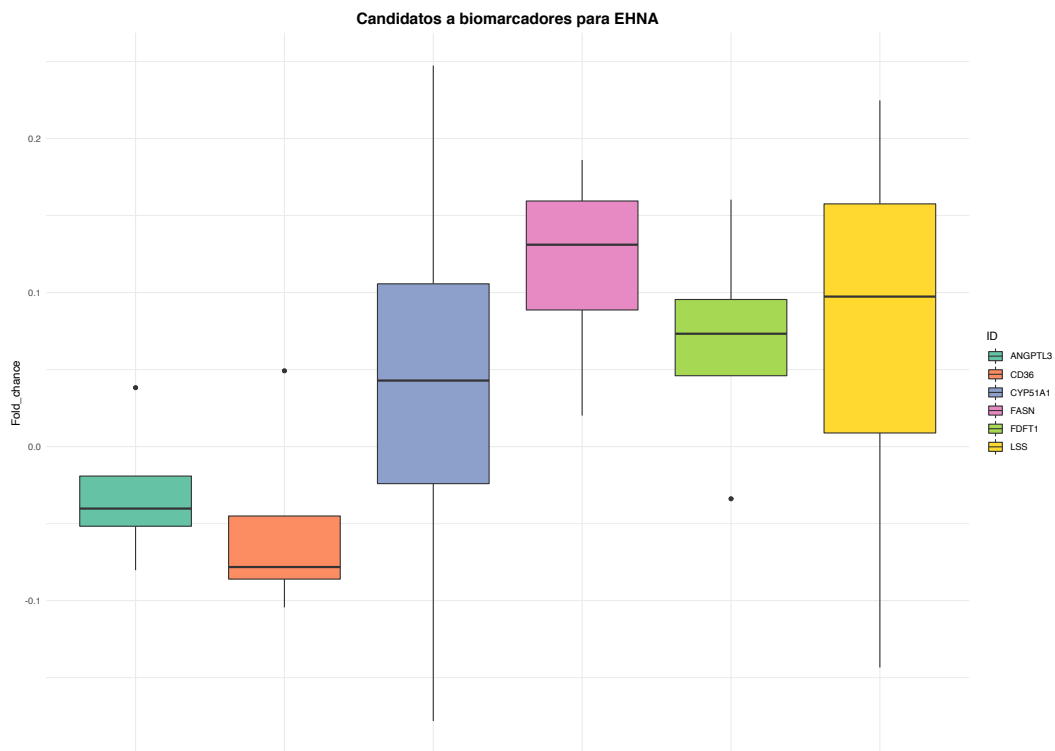


Figura 18. Candidatos a biomarcadores seleccionados del meta-análisis se relacionan principalmente al metabolismo del colesterol

El diagrama de cajas grafica el cambio de pliegue de los resultados del meta-análisis. A) boxplot para los candidatos a biomarcadores en esteatosis. B) Diagrama de cajas para los candidatos a biomarcadores en EHNA.

8 DISCUSIÓN

La EHGNA es una condición emergente en todo el mundo, en los últimos años, la EHGNA se ha convertido en una forma altamente prevalente de las enfermedades hepáticas y es un factor de riesgo significativo para el desarrollo del CHC en la mayoría de los países desarrollados (Yang et al. 2019; Z. M. Younossi, Blissett, et al. 2016). La EHGNA puede progresar a cirrosis hepática debido a una lesión hepática sostenida y a la restauración, que conducen a la distorsión de la arquitectura hepática y a la fibrosis progresiva. Por lo tanto, es esencial evaluar el alcance y el grado de los procesos involucrados en la patogénesis para predecir los resultados clínicos de los pacientes con EHGNA. La biopsia hepática es el estándar de oro para evaluar la fibrosis hepática; sin embargo, esta intervención es invasiva, costosa y susceptible a errores de muestreo, además, no refleja la condición clínica del órgano completo (Regev et al. 2002).

Sin embargo, la EHGNA con frecuencia se subdiagnostica y los pacientes a menudo se presentan a clínicas especializadas en estadios avanzados, cuando las opciones terapéuticas son limitadas. En un estudio reciente, la cirrosis se diagnosticó incidentalmente en 2 de cada 3 pacientes con EHGNA y cirrosis (Blais et al. 2015). Además, en una encuesta realizada entre PCP, el 85% subestimó la prevalencia de EHGNA (Said et al. 2013), mientras que al mismo tiempo, el 78% de los PCP no estaban bien preparados para manejar a los pacientes con EHGNA/EHNA (Vieira Barbosa and Lai 2020).

La progresión de la enfermedad es impredecible, a menudo silenciosa y su diagnóstico definitivo se basa en una biopsia hepática. Las puntuaciones no invasivas o las técnicas de imagen se validan para evaluar la HGNA o la fibrosis, pero no pueden distinguir la HGNA de EHNA con certeza (Castera, Friedrich-Rust, and Loomba 2019). Por esta razón, los grupos de investigación se centran en el estudio de la enfermedad a través de técnicas más especializadas. Esto ha permitido la participación de muchas disciplinas para el análisis de

los datos, tales como la bioinformática, que apoya el estudio de las ciencias ómicas. A su vez, con el avance de dichas técnicas, las bases de datos públicas presentan información novedosa y específica. Así, nuestros análisis de estos datos a través de la bioinformática pueden develar alguno de los mecanismos complejos que ocurren en la enfermedad. La bioinformática se ha utilizado ampliamente para explorar diferentes enfermedades. Por ejemplo, el análisis bioinformático ha permitido a los investigadores examinar grandes repositorios de datos en busca de biomarcadores asociados a tumores para ayudar en el diagnóstico precoz y la evaluación del pronóstico del cáncer (C. Zhang, Berndt-Paetz, and Neuhaus 2020).

En el presente estudio, se utilizaron muestras humanas de la base de datos GEO para identificar genes asociados a la HGNA y a EHNA, con el fin de explorar genes diferencialmente expresados en ambas etapas y así proponer candidatos a biomarcadores de diagnóstico para la EHNA. Utilizamos análisis bioinformáticos para explorar las vías moleculares y genes cruciales implicados en la progresión de la HGNA a EHNA, destacando genes implicados en el metabolismo de colesterol.

Aplicando un meta-análisis a este estudio, pudimos identificar un total de **121** DEG para la comparación de HGNA vs CTRL, de los cuáles **61** fueron sobre-expresados, **60** sub-expresados, posteriormente se identificaron como genes candidatos cruciales involucrados en la etapa de HGNA. En la comparación entre EHNA vs CTRL, se identificaron un total de 402 DEG, de los cuáles 230 fueron sobre-expresados y 172 se encontraron sub-expresados como genes determinantes involucrados en la progresión de la EHNA en pacientes con EHNA. Los análisis de GO mostraron un panorama asociado a la disfunción de procesos primarios presentes en la enfermedad, posteriormente los análisis con las vías hallmark, wikipatways y reactome validaron aún más los roles clave de las vías relacionadas con el metabolismo del colesterol en la progresión de HGNA a EHNA. Por lo tanto, las firmas transcriptómicas relacionadas con el desarrollo de EHNA de los pacientes con EHNA planteados en nuestro estudio se caracterizan por vías relacionadas con el metabolismo de colesterol el cuál es central durante la progresión de la enfermedad.

Entre los genes clave que resultaron sobre-expresados en nuestro meta-análisis, *CYP7A1*, fue uno de los DEG que se repitió en varios de los análisis realizados, lo que sugiere que puede

ejercer un papel crítico en la progresión de la HGNA. Hay evidencia de la participación de *CYP7A1* en el desarrollo de EHGNA. En un meta-análisis realizado por Wruck & Adjaye, se reveló una regulación a la alza de los procesos del colesterol en datos transcriptómicos de varios repositorios de bases de datos públicas, entre ellos se encuentra el *CYP7A1*, el cuál muestra una regulación opuesta a los procesos del colesterol y presenta un comportamiento regulado a la alza en la EHGNA pero a la baja en la ALD (enfermedad hepática alcohólica) (Wruck and Adjaye 2017).

Además del *CYP7A1*, también mostramos que otros genes tales como *PCSK9*, *ACSS2* son relevantes en la etapa de HGNA. Se ha reportado que la expresión de *PCSK9* aumenta en sujetos con EHGNA y se correlaciona con la acumulación de grasa hepática y la lipogénesis hepática, además estudios observacionales sugieren un vínculo potencial entre *PCSK9* y la HGNA hepática. Wargny y colaboradores demostraron que las concentraciones plasmáticas de *PCSK9* están asociadas con la resistencia a la insulina hepática y la HGNA hepática en voluntarios jóvenes sanos alimentados con una dieta alta en fructosa (Wargny et al. 2018). Ruscica y colaboradores encontraron que los niveles circulantes de *PCSK9* se asocian positivamente tanto con marcadores histológicos de la EHNA como con la gravedad de la HGNA, la inflamación y la fibrosis (Ruscica et al. 2016). Recientemente, *PCSK9* ha sido probado como posible blanco terapéutico en la EHGNA, con resultados muy prometedores (Scicali et al. 2021). La HGNA hepática, que es el primer paso y fácilmente reversible en la EHGNA, surge de un desequilibrio entre la adquisición y eliminación del TG hepático. Los ácidos grasos, responsables de la formación hepática de TG, provienen principalmente de tres fuentes: (i) dieta, (ii) síntesis de Novo y (iii) tejido adiposo. Con respecto a esto, Huang y su equipo de trabajo mostraron cómo la deficiencia de *ACSS2* afecta significativamente estas tres fuentes (Cohen, Horton, and Hobbs 2011; Z. Huang et al. 2018) y como resultado, *ACSS2* ha sido considerado un posible blanco terapéutico (Kargbo 2019).

De igual manera, determinamos candidatos para la etapa de EHNA, entre ellos encontramos a *ANGPTL3*, *CD36*, *CYP51A1*, *FASN*, *FDFT1*, *LSS*. En primer lugar, Yilmaz y colaboradores demostraron que los niveles séricos de *ANGPTL3* estaban significativamente elevados en las formas más avanzadas de EHGNA (EHNA definida y límite), pero no en pacientes con hígado graso simple, por lo tanto sus datos sugieren que los niveles séricos de

ANGPTL3 pueden ser útiles como marcador no invasivo para las formas más avanzadas de EHGNA (Yilmaz et al. 2009), y se destaca que dicha proteína mostró datos significativos en la etapa de EHNA en nuestro estudio. Recientemente, también se demostró que los individuos obesos con EHGNA comprobada por biopsia, tienen una mayor expresión hepática del ARNm de ANGPTL3, de igual manera se encontró que la expresión de *ANGPTL3* hepática correlaciona de manera dependiente con la extensión de la infiltración de lípidos intrahepatocitarios, y la concentración de ANGPTL3 circulante se encuentra aumentada en asociación con marcadores histológicos y clínicos de daño hepático en EHGNA/EHNA (Barchetta et al. 2020), lo anterior corrobora que los resultados obtenidos en nuestro estudio propone a dicha molécula para una etapa específica de la enfermedad.

La expresión de *CD36* es muy baja en los hepatocitos, pero es altamente inducible en el hígado por sobrecarga lipídica o activación de receptores nucleares. Se ha demostrado la importancia de *CD36* en la patogenia de la EHGNA debido a que la modulación de su expresión en el hígado afecta directamente a la HGNA hepática (Rada et al. 2020). Experimentos en ratones con delección de *CD36* específica, demostraron que los hepatocitos estaban protegidos contra la HGNA inducida por HFD e incluso, mejoraron la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo (Wilson et al. 2016). Además, la inhibición de la palmitoilación de *CD36* disminuyó tanto la expresión de *CD36* en la membrana plasmática hepatocelular como el contenido de TG hepático y como resultado, protege a los ratones de EHNA inducida por HFD (Zhao et al. 2018). Si bien el papel de dicha molécula en la EHGNA aún está bajo investigación, nuestro estudio anticipa que *CD36* contribuye en el desarrollo de la etapa de EHNA.

Otros genes hepáticos DEG que forman parte de nuestro estudio y que se encontraron en datos de proteómica obtenidos de biopsias, es *CYP51A1* que ha reportado relación con el metabolismo de lípidos y formación de estrés oxidativo involucrado en la etapa de EHNA (Kakehashi et al. 2017). De igual modo, se ha reportado que en respuesta a la SREBP1c elevada, la expresión de *FASN*, la cuál está río abajo, se incrementó tanto en pacientes como en modelos animales con EHGNA; además, el knockout hígado específico de *FASN* del promueve la HGNA hepática en ratones con una dieta sin grasas (Ipsen, Lykkesfeldt, and Tveden-Nyborg 2018).

Se ha descrito que *FDFT1* es un factor genético asociado con la progresión a EHNA en pacientes con HGNA (SNP rs2645424 en *FDFT1*), así como el papel de su polimorfismo en la EHGNA (Chalasan et al. 2010; Ballestri, Day, and Daly 2011). De manera similar, se ha informado de la importancia de la lanosterol sintasa en la patogenia de EHGNA, sobre todo en modelo animales, que vinculan su participación en el metabolismo de los lípidos (Roberts et al. 2015). En nuestro estudio, *FDFT1*, *LSS* y *FASN* fueron DEG más significativos en EHNA, y los posteriores análisis de enriquecimientos sugirieron que dichas moléculas pueden desempeñar un papel clave en la progresión de EHNA a través de múltiples vías funcionales, como la regulación y participación de metabolismo de los lípidos, en especial del colesterol.

Asimismo por medio de análisis bioinformáticos y meta-análisis Ryaboshapkina, & Hammar identificaron 4 genes relacionados con la familia de los citocromos y las apolipoproteínas, que podrían funcionar como biomarcadores para identificar pacientes en riesgo de progresión hacia EHGNA grave de un total de 218 genes (Ryaboshapkina and Hammar 2017). De igual manera, el estudio de Jia y colaboradores encontró que genes diferencialmente expresados se enriquecieron principalmente en procesos metabólicos del ácido carboxílico, procesos metabólicos del ácido monocarboxílico y procesos de oxidación-reducción, además pueden estar involucrados en la biosíntesis de hormonas esteroideas y la vía de señalización *PPAR* (Jia and Zhai 2019). Estos datos apoyan los resultados encontrados en nuestro estudio, ya que tenemos vías en común con las ya reportadas, sobre todo las orientadas al metabolismo y biosíntesis de lípidos.

En conjunto los resultados determinados en nuestro proyecto demuestran el rol valioso de la bioinformática como herramienta para dilucidar candidatos a biomarcadores de la EHGNA, además de aportar conocimiento que pueden sentar las bases para conocer mejor los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad, este análisis comparativo de la expresión génica en biopsias hepáticas de EHGNA, se identificaron genes presentes en la progresión de EHGNA, propone muchos puntos en común en las vías relacionadas al metabolismo de lípidos, en especial del colesterol en las etapas de HGNA y EHNA, asimismo los genes fueron validados en múltiples conjuntos de datos de modelos de seres humanos y

mostramos un perfil genético específico para cada etapa de la enfermedad. La identificación de esta firma génica permitió sugerir candidatos a biomarcadores para la EHGNA.

9 CONCLUSIONES

- Se encontraron genes diferencialmente expresados para cada etapa de la EHGNA provenientes de micro-arreglos mediante la realización de meta-análisis.
- Las vías relacionadas al metabolismo de colesterol fueron las más enriquecidas en el análisis de vías de Hallmark ,WiKipathways y Reactome.
- Se identificaron genes diferencialmente expresados en bases de datos de proteómica y en la categoría de liberación al torrente sanguíneo, para cada etapa de la EHGNA.
- Se identificaron como candidatos a biomarcadores para la etapa de HGNA a *ACSS2*, *PCSK9*, *CYP7A1*.
- Se identificaron como candidatos a biomarcadores para la etapa de EHNA a *ANGPTL3*, *CD36*, *CYP51A1*, *FASN*, *FDFT1*, *LSS*.

10 PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de muestras de pacientes con EHGNA para establecer un banco de muestras robusto.
- Validar las moléculas candidatas a biomarcadores en una prueba piloto o de primera fase, en pacientes con EHGNA.
- Ampliar el número de bases de datos proteómicos que evalúen la progresión de la EHGNA.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostini, Marco, Klaus-Peter Janssen, Il-Jin Kim, Edoardo D'Angelo, Silvia Pizzini, Andrea Zangrando, Carlo Zanon, et al. 2015. "An Integrative Approach for the Identification of Prognostic and Predictive Biomarkers in Rectal Cancer." *Oncotarget* 6 (32): 32561–74. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4935>.
- Ahrens, Markus, Ole Ammerpohl, Witigo von Schönfels, Julia Kolarova, Susanne Bens, Timo Itzel, Andreas Teufel, et al. 2013. "DNA Methylation Analysis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Distinct Disease-Specific and Remodeling Signatures after Bariatric Surgery." *Cell Metabolism* 18 (2): 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.07.004>.
- Albhaisi, Somaya A M, and Jasmohan S Bajaj. 2021. "The Influence of the Microbiome on NAFLD and NASH." *Clinical Liver Disease* 17 (1): 15–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cld.1010>.
- Alexander, Kristine S, Neil A Zakai, Steven D Lidofsky, Peter W Callas, Suzanne E Judd, Russell P Tracy, and Mary Cushman. 2018. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Liver Biomarkers and Stroke Risk: The Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Cohort." *PloS One* 13 (3): e0194153–e0194153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194153>.
- Almeda-Valdés, Paloma, Daniel Cuevas-Ramos, and Carlos Alberto Aguilar-Salinas. 2009. "Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Annals of Hepatology* 8: S18–24. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31822-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31822-8).
- Amanatidou, Athina I, and George V Dedoussis. 2020. "Bioinformatics Analysis of the NAFLD Interactome: Revealing Candidate Biomarkers of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *BioRxiv*, January, 2020.12.01.406215. <https://doi.org/10.1101/2020.12.01.406215>.
- Arendt, Bianca M, Elena M Comelli, David W L Ma, Wendy Lou, Anastasia Teterina, TaeHyung Kim, Scott K Fung, et al. 2015. "Altered Hepatic Gene Expression in

Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated with Lower Hepatic N-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids.” *Hepatology* 61 (5): 1565–78.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.27695>.

Asrih, Mohamed, and François R Jornayvaz. 2015. “Metabolic Syndrome and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Is Insulin Resistance the Link?” *Molecular and Cellular Endocrinology* 418: 55–65.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.02.018>.

Ballestri, Stefano, Christopher P Day, and Ann K Daly. 2011. “Polymorphism in the Farnesyl Diphosphate Farnesyl Transferase 1 Gene and Nonalcoholic Fatty Liver Disease Severity.” *Gastroenterology* 140 (5): 1694–95.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.060>.

Barchetta, Ilaria, Flavia A Cimini, Caterina Chiappetta, Laura Bertocchini, Valentina Ceccarelli, Danila Capoccia, Melania Gaggini, et al. 2020. “Relationship between Hepatic and Systemic Angiopoietin-like 3, Hepatic Vitamin D Receptor Expression and NAFLD in Obesity.” *Liver International* 40 (9): 2139–47.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/liv.14554>.

Bernal-Reyes, R, G Castro-Narro, R Malé-Velázquez, R Carmona-Sánchez, M S González-Huezo, I García-Juárez, N Chávez-Tapia, et al. 2019. “Consenso Mexicano de La Enfermedad Por Hígado Graso No Alcohólico.” *Revista de Gastroenterología de México* 84 (1): 69–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.11.007>.

“Biomarkers and Bioinformatics.” 2010. *Bioinformatics and Biomarker Discovery*. Wiley Online Books. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470686423.ch1>.

Blais, Pierre, Nisreen Husain, Jennifer R Kramer, Marc Kowalkowski, Hashem El-Serag, and Fasiha Kanwal. 2015. “Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Underrecognized in the Primary Care Setting.” *Official Journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 110 (1). <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.134>.

Blencowe, Montgomery, Tilan Karunanayake, Julian Wier, Neil Hsu, and Xia Yang. 2019. “Network Modeling Approaches and Applications to Unravelling Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Genes* 10 (12): 966. <https://doi.org/10.3390/genes10120966>.

- Boyle, Evan A, Yang I Li, and Jonathan K Pritchard. 2017. "An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic." *Cell* 169 (7): 1177–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.038>.
- Bremer, Andrew A, Michele Mietus-Snyder, and Robert H Lustig. 2012. "Toward a Unifying Hypothesis of Metabolic Syndrome." *Pediatrics* 129 (3): 557–70. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-2912>.
- Castera, Laurent, Mireen Friedrich-Rust, and Rohit Loomba. 2019. "Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 156 (5): 1264-1281.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.036>.
- Chalasani, Naga, Xiuqing Guo, Rohit Loomba, Mark O Goodarzi, Talin Haritunians, Soonil Kwon, Jinrui Cui, et al. 2010. "Genome-Wide Association Study Identifies Variants Associated with Histologic Features of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 139 (5): 1567-1576.e15766. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.057>.
- Chalasani, Naga, Zobair Younossi, Joel E Lavine, Michael Charlton, Kenneth Cusi, Mary Rinella, Stephen A Harrison, Elizabeth M Brunt, and Arun J Sanyal. 2018. "The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases." *Hepatology* 67 (1): 328–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.29367>.
- Chalasani, Naga, Zobair Younossi, Joel E Lavine, Anna Mae Diehl, Elizabeth M Brunt, Kenneth Cusi, Michael Charlton, and Arun J Sanyal. 2012. "The Diagnosis and Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (6): 2005–23. <https://doi.org/10.1002/hep.25762>.
- Chen, Jiajia, Maomin Sun, and Bairong Shen. 2015. "Deciphering Oncogenic Drivers: From Single Genes to Integrated Pathways." *Briefings in Bioinformatics* 16 (3): 413–28. <https://doi.org/10.1093/bib/bbu039>.
- Chinchilla-López, Paulina, Oscar Ramírez-Pérez, Vania Cruz-Ramón, Samuel Canizales-

- Quinteros, Aarón Domínguez-López, Guadalupe Ponciano-Rodríguez, Fausto Sánchez-Muñoz, and Nahum Méndez-Sánchez. 2018. "More Evidence for the Genetic Susceptibility of Mexican Population to Nonalcoholic Fatty Liver Disease through PNPLA3." *Annals of Hepatology* 17 (2): 250–55.
<https://doi.org/https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.8644>.
- Chitturi, Shivakumar, and Jacob George. 2003. "Interaction of Iron, Insulin Resistance, and Nonalcoholic Steatohepatitis." *Current Gastroenterology Reports* 5 (1): 18–25.
<https://doi.org/10.1007/s11894-003-0005-y>.
- Cohen, Jonathan C, Jay D Horton, and Helen H Hobbs. 2011. "Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights." *Science (New York, N.Y.)* 332 (6037): 1519–23.
<https://doi.org/10.1126/science.1204265>.
- Cusi, Kenneth. 2012. "Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications." *Gastroenterology* 142 (4): 711-725.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.003>.
- D'Adamo, Ebe, Anna M G Cali, Ram Weiss, Nicola Santoro, Bridget Pierpont, Veronika Northrup, and Sonia Caprio. 2010. "Central Role of Fatty Liver in the Pathogenesis of Insulin Resistance in Obese Adolescents." *Diabetes Care* 33 (8): 1817–22.
<https://doi.org/10.2337/dc10-0284>.
- Degli Esposti, Davide, Jocelyne Hamelin, Nelly Bosselut, Raphaël Saffroy, Mylène Sebah, Alban Pommier, Cécile Martel, and Antoinette Lemoine. 2012. "Mitochondrial Roles and Cytoprotection in Chronic Liver Injury." *Biochemistry Research International* 2012: 387626. <https://doi.org/10.1155/2012/387626>.
- Feng, Gong, Xue-Ping Li, Chun-Yan Niu, Man-Ling Liu, Qin-qin Yan, Li-Ping Fan, Ya Li, et al. 2020. "Bioinformatics Analysis Reveals Novel Core Genes Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis." *Gene* 742: 144549. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144549>.
- Hamaguchi, Masahide, Takao Kojima, Noriyuki Takeda, Chisato Nagata, Jun Takeda, Hiroshi Sarui, Yutaka Kawahito, et al. 2007. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is a Novel Predictor of Cardiovascular Disease." *World Journal of Gastroenterology* 13

(10): 1579–84. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i10.1579>.

Hamaguchi, Masahide, Takao Kojima, Noriyuki Takeda, Takayuki Nakagawa, Hiroya Taniguchi, Kota Fujii, Tatsushi Omatsu, et al. 2005. “The Metabolic Syndrome as a Predictor of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Annals of Internal Medicine* 143 (10): 722–28. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-143-10-200511150-00009>.

Huang, Yongcheng, Shaoqing He, John Zhong Li, Young-Kyo Seo, Timothy F Osborne, Jonathan C Cohen, and Helen H Hobbs. 2010. “A Feed-Forward Loop Amplifies Nutritional Regulation of PNPLA3.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (17): 7892–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003585107>.

Huang, Zhiguang, Menglu Zhang, Abigail A Plec, Sandi Jo Estill, Ling Cai, Joyce J Repa, Steven L McKnight, and Benjamin P Tu. 2018. “ACSS2 Promotes Systemic Fat Storage and Utilization through Selective Regulation of Genes Involved in Lipid Metabolism.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (40): E9499–9506. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806635115>.

Imajo, Kento, Koji Fujita, Masato Yoneda, Yuichi Nozaki, Yuji Ogawa, Yoshiyasu Shinohara, Shingo Kato, et al. 2012. “Hyperresponsivity to Low-Dose Endotoxin during Progression to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Regulated by Leptin-Mediated Signaling.” *Cell Metabolism* 16 (1): 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.012>.

Ipsen, David Højland, Jens Lykkesfeldt, and Pernille Tveden-Nyborg. 2018. “Molecular Mechanisms of Hepatic Lipid Accumulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (18): 3313–27. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>.

Jang, Se Young, Won Young Tak, Soo Young Park, Young-Oh Kweon, Yu Rim Lee, Gyeonghwa Kim, Keun Hur, Man-Hoon Han, and Won Kee Lee. 2021. “Diagnostic Efficacy of Serum Mac-2 Binding Protein Glycosylation Isomer and Other Markers for Liver Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases.” *Annals of Laboratory Medicine* 41 (3): 302–9. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.3.302>.

- Jazayeri-Tehrani, Seyed Ali, Seyed Mahdi Rezayat, Siavash Mansouri, Mostafa Qorbani, Seyed Moayed Alavian, Milad Daneshi-Maskooni, and Mohammad-Javad Hosseinzadeh-Attar. 2019. "Nano-Curcumin Improves Glucose Indices, Lipids, Inflammation, and Nesfatin in Overweight and Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial." *Nutrition & Metabolism* 16: 8. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0331-1>.
- Jia, Xi, and Tianyu Zhai. 2019. "Integrated Analysis of Multiple Microarray Studies to Identify Novel Gene Signatures in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ." *Frontiers in Endocrinology* . <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00599>.
- Jonas, Wenke, and Annette Schürmann. 2020. "Genetic and Epigenetic Factors Determining NAFLD Risk." *Molecular Metabolism*, 101111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101111>.
- Kakehashi, Anna, Vasily E Stefanov, Naomi Ishii, Takahiro Okuno, Hideki Fujii, Kazuaki Kawai, Norifumi Kawada, and Hideki Wanibuchi. 2017. "Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2): 434. <https://doi.org/10.3390/ijms18020434>.
- Kargbo, Robert B. 2019. "Inhibition of ACSS2 for Treatment of Cancer and Neuropsychiatric Diseases." *ACS Medicinal Chemistry Letters* 10 (8): 1100–1101. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00295>.
- Kim, Yejin, Yoosoo Chang, Yong Kyun Cho, Jiin Ahn, Hocheol Shin, and Seungho Ryu. 2019. "Obesity and Weight Gain Are Associated With Progression of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 17 (3): 543-550.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.07.006>.
- Kleiner, David E, Elizabeth M Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J Contos, Oscar W Cummings, Linda D Ferrell, et al. 2005. "Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology* 41 (6): 1313–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.20701>.

- Kozlitina, Julia, Eriks Smagris, Stefan Stender, Børge G Nordestgaard, Heather H Zhou, Anne Tybjærg-Hansen, Thomas F Vogt, Helen H Hobbs, and Jonathan C Cohen. 2014. "Exome-Wide Association Study Identifies a TM6SF2 Variant That Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Nature Genetics* 46 (4): 352–56. <https://doi.org/10.1038/ng.2901>.
- Kutlu, Ozlem, Humeysra Nur Kaleli, and Ebru Ozer. 2018. "Molecular Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis- (NASH-) Related Hepatocellular Carcinoma." Edited by José L Mauriz. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2018: 8543763. <https://doi.org/10.1155/2018/8543763>.
- Li, Lin, Huabao Liu, Xiaoyu Hu, Yi Huang, Yanan Wang, Yansha He, and Qingsong Lei. 2018. "Identification of Key Genes in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Progression Based on Bioinformatics Analysis." *Mol Med Rep* 17 (6): 7708–20. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8852>.
- Lin, Yuxin, Fuliang Qian, Li Shen, Feifei Chen, Jiajia Chen, and Bairong Shen. 2019. "Computer-Aided Biomarker Discovery for Precision Medicine: Data Resources, Models and Applications." *Briefings in Bioinformatics* 20 (3): 952–75. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx158>.
- Lipina, C, and H S Hundal. 2011. "Sphingolipids: Agents Provocateurs in the Pathogenesis of Insulin Resistance." *Diabetologia* 54 (7): 1596–1607. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2127-3>.
- Lisman, Ton, and Robert J Porte. 2017. "Pathogenesis, Prevention, and Management of Bleeding and Thrombosis in Patients with Liver Diseases." *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 1 (2): 150–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rth2.12028>.
- Liu, Yan, Liang Sheng, Yi Xiong, Hong Shen, Yong Liu, and Liangyou Rui. 2017. "Liver NF-KB-Inducing Kinase Promotes Liver Steatosis and Glucose Counterregulation in Male Mice With Obesity." *Endocrinology* 158 (5): 1207–16. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1582>.
- Liu, Yang-Lin, Helen L Reeves, Alastair D Burt, Dina Tiniakos, Stuart McPherson, Julian

- B S Leathart, Michael E D Allison, et al. 2014. "TM6SF2 Rs58542926 Influences Hepatic Fibrosis Progression in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Nature Communications* 5 (June): 4309. <https://doi.org/10.1038/ncomms5309>.
- Lizardi-Cervera, Javier, Dra Ivonne Becerra Laparra, Norberto C Chávez-Tapia, Martha E Ramos Ostos, and Misael Uribe Esquivel. 2006. "[Prevalence of NAFLD and metabolic syndrome in asymptomatic subjects]." *Revista de gastroenterología de México* 71 (4): 453–59.
- Loomba, Rohit, and Arun J Sanyal. 2013. "The Global NAFLD Epidemic." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. England. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.171>.
- Mandato, Claudia, Stefania Lucariello, Maria Rosario Licenziati, Adriana Franzese, Maria I Spagnuolo, Romina Ficarella, Maria Pacilio, et al. 2005. "Metabolic, Hormonal, Oxidative, and Inflammatory Factors in Pediatric Obesity-Related Liver Disease." *The Journal of Pediatrics* 147 (1): 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.02.028>.
- Marchesini, Giulio, Elisabetta Bugianesi, Gabriele Forlani, Fernanda Cerrelli, Marco Lenzi, Rita Manini, Stefania Natale, et al. 2003. "Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis, and the Metabolic Syndrome." *Hepatology* 37 (4): 917–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50161>.
- Mayeux, Richard. 2004. "Biomarkers: Potential Uses and Limitations." *NeuroRx : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 1 (2): 182–88. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182>.
- Mencin, Ali A, and Joel E Lavine. 2011. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children." *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 14 (2). https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2011/03000/Nonalcoholic_fatty_liver_disease_in_children.8.aspx.
- Michelotti, Gregory A, Mariana V Machado, and Anna Mae Diehl. 2013. "NAFLD, NASH and Liver Cancer." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 10 (11): 656–65. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.183>.

- Middleton, Jeremy P, R Constance Wiener, Barrett H Barnes, Matthew J Gurka, and Mark D DeBoer. 2014. "Clinical Features of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Need for Increased Awareness and a Consensus for Screening." *Clinical Pediatrics* 53 (14): 1318–25. <https://doi.org/10.1177/0009922813520072>.
- Mitra, Souveek, Arka De, and Abhijit Chowdhury. 2020. "Epidemiology of Non-Alcoholic and Alcoholic Fatty Liver Diseases." *Translational Gastroenterology and Hepatology* 5 (April): 16. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.09.08>.
- Moylan, Cynthia A, Herbert Pang, Andrew Dellinger, Ayako Suzuki, Melanie E Garrett, Cynthia D Guy, Susan K Murphy, et al. 2014. "Hepatic Gene Expression Profiles Differentiate Presymptomatic Patients with Mild versus Severe Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (2): 471–82. <https://doi.org/10.1002/hep.26661>.
- Nachit, Maxime, Wilhelmus J Kwanten, Jean-Paul Thissen, Bart Op De Beeck, Luc Van Gaal, Luisa Vonghia, An Verrijken, et al. 2021. "Muscle Fat Content Is Strongly Associated with NASH: A Longitudinal Study in Patients with Morbid Obesity." *Journal of Hepatology*, April. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.02.037>.
- "NATIONAL CANCER INSTITUTE." 2021. 2021.
- Pennisi, Grazia, Vito Di Marco, Carola Buscemi, Giovanni Mazzola, Cristiana Randazzo, Federica Spatola, Antonio Craxì, Silvio Buscemi, and Salvatore Petta. 2021. "Interplay between Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk in an Asymptomatic General Population." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* n/a (n/a). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jgh.15523>.
- Perumpail, Brandon J, Muhammad Ali Khan, Eric R Yoo, George Cholankeril, Donghee Kim, and Aijaz Ahmed. 2017. "Clinical Epidemiology and Disease Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *World Journal of Gastroenterology* 23 (47): 8263–76. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i47.8263>.
- Plessis, Johann du, Jos van Pelt, Hannelie Korf, Chantal Mathieu, Bart van der Schueren, Matthias Lannoo, Tom Oyen, et al. 2015. "Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease."

Gastroenterology 149 (3): 635-648.e14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.044>.

Rada, Patricia, Águeda González-Rodríguez, Carmelo García-Monzón, and Ángela M Valverde. 2020. “Understanding Lipotoxicity in NAFLD Pathogenesis: Is CD36 a Key Driver?” *Cell Death & Disease* 11 (9): 802. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03003-w>.

Regev, Arie, Mariana Berho, Lennox J Jeffers, Clara Milikowski, Enrique G Molina, Nikolaos T Pylsopoulos, Zheng-Zhou Feng, Rajender K Reddy, and Eugene R Schiff. 2002. “Sampling Error and Intraobserver Variation in Liver Biopsy in Patients With Chronic Hcv Infection.” *Official Journal of the American College of Gastroenterology* | *ACG* 97 (10). https://journals.lww.com/ajg/Fulltext/2002/10000/Sampling_Error_and_Intraobserver_Variation_in.28.aspx.

Roberts, Michael D, C Brooks Mobley, Ryan G Toedebush, Alexander J Heese, Conan Zhu, Anna E Krieger, Clayton L Cruthirds, et al. 2015. “Western Diet-Induced Hepatic Steatosis and Alterations in the Liver Transcriptome in Adult Brown-Norway Rats.” *BMC Gastroenterology* 15 (October): 151. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0382-3>.

Romeo, Stefano, Julia Kozlitina, Chao Xing, Alexander Pertsemlidis, David Cox, Len A Pennacchio, Eric Boerwinkle, Jonathan C Cohen, and Helen H Hobbs. 2008. “Genetic Variation in PNPLA3 Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Nature Genetics* 40 (12): 1461–65. <https://doi.org/10.1038/ng.257>.

Ruscica, Massimiliano, Nicola Ferri, Chiara Macchi, Marica Meroni, Claudia Lanti, Chiara Ricci, Marco Maggioni, et al. 2016. “Liver Fat Accumulation Is Associated with Circulating PCSK9.” *Annals of Medicine* 48 (5): 384–91. <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1188328>.

Ryaboshapkina, Maria, and Mårten Hammar. 2017. “Human Hepatic Gene Expression Signature of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Progression, a Meta-Analysis.” *Scientific Reports* 7 (1): 12361. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10930-w>.

Said, Adnan, Veronika Gagovic, Kristen Malecki, Marjory L Givens, and F Javier Nieto.

2013. "Primary Care Practitioners Survey of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Annals of Hepatology* 12 (5): 758–65. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31317-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31317-1).
- Schwimmer, Jeffrey B, Perrie E Pardee, Joel E Lavine, Aaron K Blumkin, and Stephen Cook. 2008. "Cardiovascular Risk Factors and the Metabolic Syndrome in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Circulation* 118 (3): 277–83. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.739920>.
- Scicali, Roberto, Antonino Di Pino, Francesca Urbano, Viviana Ferrara, Simona Marchisello, Stefania Di Mauro, Alessandra Scamporrino, et al. 2021. "Analysis of Steatosis Biomarkers and Inflammatory Profile after Adding on PCSK9 Inhibitor Treatment in Familial Hypercholesterolemia Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Single Lipid Center Real-World Experience." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 31 (3): 869–79. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.11.009>.
- Seto, Wai-Kay, and Man-Fung Yuen. 2017. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Asia: Emerging Perspectives." *Journal of Gastroenterology* 52 (2): 164–74. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1264-3>.
- Singh, Siddharth, Alina M Allen, Zhen Wang, Larry J Prokop, Mohammad H Murad, and Rohit Loomba. 2015. "Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Paired-Biopsy Studies." *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 13 (4): 643-e40. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.04.014>.
- Starmann, Julia, Maria Fälth, Walter Spindelböck, Katja-Lauren Lanz, Carolin Lackner, Kurt Zatloukal, Michael Trauner, and Holger Sülthmann. 2012. "Gene Expression Profiling Unravels Cancer-Related Hepatic Molecular Signatures in Steatohepatitis but Not in Steatosis." *PloS One* 7 (10): e46584–e46584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046584>.
- Strimbu, Kyle, and Jorge A Tavel. 2010. "What Are Biomarkers?" *Current Opinion in HIV*

- and AIDS* 5 (6): 463–66. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>.
- Trépo, Eric, and Luca Valenti. 2020. “Update on NAFLD Genetics: From New Variants to the Clinic.” *Journal of Hepatology* 72 (6): 1196–1209. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.02.020>.
- Vernon, G, A Baranova, and Z M Younossi. 2011. “Systematic Review: The Epidemiology and Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Adults.” *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 34 (3): 274–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>.
- Vieira Barbosa, Joana, and Michelle Lai. 2020. “Nonalcoholic Fatty Liver Disease Screening in Type 2 Diabetes Mellitus Patients in the Primary Care Setting.” *Hepatology Communications* 5 (2): 158–67. <https://doi.org/10.1002/hep4.1618>.
- Wainwright, P, E Scorletti, and C D Byrne. 2017. “Type 2 Diabetes and Hepatocellular Carcinoma: Risk Factors and Pathogenesis.” *Current Diabetes Reports* 17 (4): 20. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0851-x>.
- Wang, Xuemei, Jialin Xia, and Changtao Jiang. 2019. “Role of Gut Microbiota in the Development of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Liver Research* 3 (1): 25–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.01.006>.
- Wargny, Matthieu, Pierre-Henri Ducluzeau, Jean-Michel Petit, Cédric Le May, Sarra Smati, Lucie Arnaud, Matthieu Pichelin, et al. 2018. “Circulating PCSK9 Levels Are Not Associated with the Severity of Hepatic Steatosis and NASH in a High-Risk Population.” *Atherosclerosis* 278 (November): 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.008>.
- Weston, Shiobhan R, Wendy Leyden, Rose Murphy, Nathan M Bass, Beth P Bell, M Michele Manos, and Norah A Terrault. 2005. “Racial and Ethnic Distribution of Nonalcoholic Fatty Liver in Persons with Newly Diagnosed Chronic Liver Disease.” *Hepatology* 41 (2): 372–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.20554>.
- Wilson, Camella G, Jennifer L Tran, Derek M Erion, Nicholas B Vera, Maria Febbraio, and Ethan J Weiss. 2016. “Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver

- and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice.” *Endocrinology* 157 (2): 570–85.
<https://doi.org/10.1210/en.2015-1866>.
- Wruck, Wasco, and James Adjaye. 2017. “Meta-Analysis Reveals up-Regulation of Cholesterol Processes in Non-Alcoholic and down-Regulation in Alcoholic Fatty Liver Disease.” *World Journal of Hepatology* 9 (8): 443–54.
<https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i8.443>.
- Xia, Ming-Feng, Hua Bian, and Xin Gao. 2019. “NAFLD and Diabetes: Two Sides of the Same Coin? Rationale for Gene-Based Personalized NAFLD Treatment.” *Frontiers in Pharmacology* 10 (August): 877. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00877>.
- Yang, Ju Dong, Pierre Hainaut, Gregory J Gores, Amina Amadou, Amelie Plymoth, and Lewis R Roberts. 2019. “A Global View of Hepatocellular Carcinoma: Trends, Risk, Prevention and Management.” *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (10): 589–604. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>.
- Yilmaz, Yusuf, Engin Ulukaya, Ozlen Atug, and Enver Dolar. 2009. “Serum Concentrations of Human Angiopoietin-like Protein 3 in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Association with Insulin Resistance.” *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 21 (11).
https://journals.lww.com/eurojgh/Fulltext/2009/11000/Serum_concentrations_of_human_angiopoietin_like.3.aspx.
- Younossi, Zobair M, Deirdre Blissett, Robert Blissett, Linda Henry, Maria Stepanova, Youssef Younossi, Andrei Racila, Sharon Hunt, and Rachel Beckerman. 2016. “The Economic and Clinical Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States and Europe.” *Hepatology* 64 (5): 1577–86.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.28785>.
- Younossi, Zobair M, Aaron B Koenig, Dinan Abdelatif, Yousef Fazel, Linda Henry, and Mark Wymer. 2016. “Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes.” *Hepatology* 64 (1): 73–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- Younossi, Zobair, Frank Tacke, Marco Arrese, Barjesh Chander Sharma, Ibrahim Mostafa,

- Elisabetta Bugianesi, Vincent Wai-Sun Wong, et al. 2019. “Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis.” *Hepatology* 69 (6): 2672–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.30251>.
- Zhang, Chuan, Mandy Berndt-Paetz, and Jochen Neuhaus. 2020. “Bioinformatics Analysis Identifying Key Biomarkers in Bladder Cancer.” *Data* . <https://doi.org/10.3390/data5020038>.
- Zhang, S.-Y., and S.-L. Liu. 2013. “Bioinformatics.” In , edited by Stanley Maloy and Kelly B T - Brenner’s Encyclopedia of Genetics (Second Edition) Hughes, 338–40. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00155-8>.
- Zhao, Lei, Chang Zhang, Xiaoxiao Luo, Pei Wang, Wei Zhou, Shan Zhong, Yunxia Xie, et al. 2018. “CD36 Palmitoylation Disrupts Free Fatty Acid Metabolism and Promotes Tissue Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis.” *Journal of Hepatology* 69 (3): 705–17. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.04.006>.

