



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO  
Ingeniería Genética

Asociaciones entre el hígado graso no alcohólico, la metilación  
del ADN y el número de copias de ADN mitocondrial.

**Tesis que presenta**

**IBT. MARÍA AZUCENA PESCADOR TAPIA**

**Para Obtener el Grado de**

**Maestra en Ciencias**

En la Especialidad de

**Biotecnología en plantas**

**Director de la Tesis:** Dra. Gertrud Lund

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato; bajo la asesoría de la Doctora Gertrud Lund en el laboratorio de Epigenética.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de la maestría (Registro CONACYT: 614011)

Agradezco a mi familia, la cual siempre me ha estado apoyando y alentando en los momentos más difíciles, todos ellos han sido parte importante en mi formación con enseñanzas y consejos; a mi padre Marco Antonio Pescador Cardona por sus largas horas de pláticas en el carro , a mi madre Caritina Tapia Nieto, por su amor incondicional, por sus palabras de aliento cuando sentía que nada salía y por ser mi mayor confidente y a mi hermano Marco Antonio Pescador Tapia, por hacerme ver que podría con cualquier cosa y tener una confianza ciega en mí.

De igual manera agradezco al CINVESTAV Unidad Irapuato, al laboratorio de la Doctora Gertrud Lund por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. A mi comité conformado por el Doctor Luis Brieba y la Doctora Mercedes López, por sus consejos y tiempo dedicados a mi trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio por hacer la estancia más agradable, principalmente a Dalia por su ayuda en los experimentos, su guía y amistad; a Nicolás por su apoyo y chistes crueles. A Alex, Atenea y José por las salidas para librarnos del estrés.

Por último y no menos importante a mis amigos “Los gorditos” (Mau, Iris, Jaime, Javi y Shivis) que siempre me han apoyado, que me ayudaron en los momentos más estresantes con bromas y risas, que aguantaron mis cambios de humor por el estrés, pero sobre todo por siempre estar presentes cuando los necesitaba.

## ÍNDICE

I.	ANTECEDENTES.....	9
1.1	Enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo .....	9
1.2	Hígado graso no alcohólico .....	10
1.2.1	Definición de hígado graso y categorías .....	10
1.2.2	Diagnóstico del HGNA.....	11
1.3	Condiciones que coexisten frecuentemente con el HGNA.....	12
1.3.1	La obesidad .....	12
1.3.2	Síndrome metabólico .....	12
1.4.	La metilación del ADN (mADN) y la función mitocondrial en HGNA, SM, DT2 y obesidad .....	13
1.4.1.	La mADN.....	13
1.4.2.	Mitocondrias y su asociación con la mADN.....	14
1.4.3.	Cambios en la mADN asociadas con HGNA, SM, DT2 y la obesidad. ....	16
II.	HIPÓTESIS.....	18
III.	OBJETIVOS .....	18
3.1.	Objetivo General .....	18
3.2.	Objetivos Específicos .....	18
IV.	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	19
4.1.	Cohorte poblacional.....	19
4.2.	Estandarización del método de extracción de biopsia embebida en parafina.....	19
4.3.	Estandarización del método de cuantificación de ADNmt por PCR para sangre y biopsia. ....	20
4.4.	Estandarización del método de cuantificación de metilación global para sangre y biopsia .....	21
V.	RESULTADOS.....	22
5.1.	Características generales de la cohorte.....	22
5.2.	Cuantificación del ADN mitocondrial y la mADN global.....	22
5.3.	La mADN y el ADNmt en individuos con HGNA y SM discordantes por obesidad. ....	23
5.3.1.	Hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico .....	23
5.3.2.	Severidad de hígado graso no alcohólico .....	25
5.3.3.	Hígado graso no alcohólico y la obesidad. ....	27
5.3.4.	Síndrome metabólico y la obesidad.....	28
5.4	Correlaciones de la mADN y en número de copias de mtADN con los datos paramétricos.....	30
VI.	DISCUSIÓN .....	31
6.1	La mADN en HGNA, SM y obesidad. ....	31
6.2	El ncADNmt en HGNA, SM y obesidad .....	31
6.3	La mADN y/o ncADNmt: ¿un marcador sanguíneo del HGNA?.....	32
VII.	CONCLUSIONES.....	33
VIII.	PERSPECTIVAS.....	34
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	35
X.	MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Categorías histológicas del hígado graso no alcohólico.....	10
Figura 2. Fragmento amplificado, donde se puede observar que se encuentran fragmentos de los genes ND6, TRNE y CYTB .....	20
Figura 3. Diferencias significativas entre los grupos experimentales respecto a la mADN y al ncADNmt en biopsias y sangre.....	24
Figura 4. Diferencias significativas entre los pacientes con diferente grado de severidad de HGNA, respecto a la mADN y al ncADNmt en biopsia .....	25
Figura 5. Diferencias significativas entre los pacientes con diferente grado de severidad de HGNA sin SM, respecto a la mADN y al ncADNmt en biopsia y sangre. ....	26
Figura 6. Diferencias significativas entre los pacientes con diferente IMC e HGNA, respecto a la mADN y al ncADNmt en sangre y biopsia. ....	28
Figura 7 Diferencias significativas entre los pacientes con diferente IMC y SM, respecto a la mADN y al ncADNmt en sangre y biopsia.....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del NAFLD activity score .....	11
Tabla 2. Criterios ATP III para la identificación clínica del SM .....	13
Tabla 3. Características de la cohorte.....	22
Tabla 4. Grupos utilizados en el análisis.....	23
Tabla 5. Grupos utilizados en el análisis de Kleiner.....	25
Tabla 6. Grupos utilizados en el análisis de Kleiner sin SM.....	26
Tabla 7. Grupos utilizados en el análisis de HGNA e IMC.....	27
Tabla 8. Grupos utilizados en el análisis de SM e IMC .....	29
Tabla S1. Datos generales.....	43
Tabla S2. Datos antropométricos.....	47
Tabla S3. Datos bioquímicos.....	51
Tabla S4. Concentraciones de las muestras de ADN en sangre y biopsia.....	57
Tabla S5. Cuantificación del mtADN en sangre.....	60
Tabla S6. Cuantificación del ncADNmt en biopsia.....	63
Tabla S7. Cuantificación de la metilación global en sangre.....	66
Tabla S8. Cuantificación de la metilación global en biopsia.....	69
Tabla S9. Correlaciones entre el mtADN y la metilación global por grupo.....	71
Tabla S10. Correlaciones entre tejidos.....	72
Tabla S11. Correlaciones entre los datos paramétricos, la mADN y el mtADN.....	73
Tabla S12. Clasificación de la severidad de HGNA por Kleiner.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

HGNA	Hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ES	Esteatosis simple
SM	Síndrome metabólico
ECV	Enfermedad Cardiovascular
DT2	Diabetes mellitus tipo 2
IMC	Índice de Masa Corporal
ALT	Alanina aminotransferasa
AG	Ácidos grasos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácidos ribonucleicos
ncADNmt	Número de copias de ADN mitocondrial
PAH	Puntaje de actividad de HGNA
WHO	World Health Organization
EGIR	European Group for the study of Insulin Resistance
NCEP ATP III	the National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III
AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
IDF	the International Diabetes Federation
µl	Microlitros
Tamra-dCTP	dCTP 5-propargylamino-dCTP5/6-carboxytetramethyl-rhodamine
ICC	Índice cintura/cadera
LAD	Lipoproteínas de alta densidad
LBD	Lipoproteínas de baja densidad
LMBD	Lipoproteínas de muy baja densidad
BT	Bilirrubina total
BD	Bilirrubina directa
BI	Bilirrubina indirecta
AST	Aspartato aminotrasnferasas
ALT	Alanina aminotransferasas
GGT	Gamma-glutamil transpeptidasa
ANOVA	Análisis de la varianza
mADN	Metilación del ADN

## RESUMEN:

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos y según indican datos de la Organización Mundial de la Salud actualmente son la principal causa de muerte a nivel mundial. Las condiciones más conocidas que predisponen a estas enfermedades son el síndrome metabólico (SM), diabetes tipo 2 (DT2), la obesidad y el hígado graso no alcohólico (HGNA). Es importante destacar que muchas de estas enfermedades coexisten, en parte debido a la superposición en los criterios de dichas enfermedades. A nivel molecular, SM, DT2, la obesidad y el HGNA están asociadas con cambios en la metilación del ADN (mADN) y/o el número de copias de ADN mitocondrial (ncADNmt). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios los individuos analizados tenían más de una de estas condiciones, dificultando la interpretación y la relevancia de los cambios en la mADN y/o ncADNmt de cada condición.

Para entender si la mADN y/o el ncADNmt en el HGNA son independientes del SM y/o el IMC, se analizó una cohorte de 104 individuos que fueron sometidos a una operación por cálculos biliares. Para cada individuo, se contó con una biopsia de hígado, ADN de sangre total y medidas bioquímicas y antropométricas. En ambos tejidos, se cuantificó el nivel de la mADN global y el ncADNmt. Después se evaluó si estos difieren estadísticamente entre diferentes grupos discordantes en HGNA, SM o IMC, además de incluir un análisis con respecto a la severidad del HGNA. También se analizó si la mADN global y/o el ncADNmt correlacionaban con los parámetros antropométricos y bioquímicos.

Se encontró que el ADN estaba hipometilado en estadios tempranos de HGNA independiente de la presencia de SM e IMC. El ncADNmt fue menor en el estado "borderline" del HGNA, también independientemente de la presencia de SM y la IMC. Además, se observó una correlación positiva entre la mADN y los niveles de las enzimas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa que frecuentemente están sobre expresadas en el HGNA. Todas estas asociaciones fueron específicas para el hígado.

En conclusión, se encontró que la mADN y el ncADNmt varían según la severidad de HGNA pero específicamente en el hígado, indicando que estos parámetros no sirven para distinguir esteatosis simple de esteatohepatitis en muestras sanguíneas. Además, concluimos que la hipometilación es una firma de NAFLD temprano.

## ABSTRACT:

Cardiovascular diseases (CVD) are a group of disorders of heart and blood vessels and data from the World Health Organization indicates, that they are currently the leading cause of death worldwide. The most well-known conditions that predispose to CVD are metabolic syndrome (MS), type 2 diabetes (T2D), obesity and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). It is important to note that these conditions often coexist, in part due to overlap in the criteria of disease diagnostics. At the molecular level, MS, T2D, obesity and NAFLD are associated with changes in DNA methylation (DNAm) and/or mitochondrial DNA copy number (mtDNAcn). However, in most of these studies analyzed individuals had one or more of these metabolic conditions, making interpretation and relevance of alteration in DNAm and/or mtDNAcn of each condition difficult.

To understand if DNAm and/or mtDNAcn in NAFLD is independent of MS or BMI, a cohort of 104 individuals who underwent surgery for gallstones was analyzed. For each individual, a liver biopsy, whole blood DNA, in addition to anthropometric and biochemical measurements were done. In both tissues, the level of global DNAm and mtDNAcn were quantified. We then tested whether these differed statistically between individuals with NAFLD discordant for MS or BMI and with respect to NAFLD severity. Furthermore, we probed for correlations between DNAm and mtDNAcn and anthropometric and biochemical parameters.

We found that the DNA was hypomethylated in early stages of NAFLD in a MS and BMI-independent manner. We also observe that mtDNAcn was lower in the "borderline" stage of NAFLD, also independently of MS and BMI. Furthermore, we uncovered a positive correlation between DNAm and levels of the enzymes aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase that are frequently overexpressed in NAFLD. All the described associations were specific for the liver and not found in blood tissue.

In conclusion, we show that DNAm and mtDNAcn vary with NAFLD severity specifically in liver. That indicates that these parameters are not useful for distinguishing between NAFLD stages in blood samples. Furthermore, we conclude that liver hypomethylation is a hallmark of early NAFLD.



## I. ANTECEDENTES

### 1.1 Enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de desórdenes que afectan el corazón y los vasos sanguíneos y son la primera causa de mortalidad a nivel mundial (WHO, 2017). Los principales factores de riesgo son una dieta no saludable, inactividad física, el consumo de tabaco y alcohol, además de la presión arterial, el colesterol total y la intolerancia a la glucosa (Anderson et al., 1991). Estos factores de riesgo están frecuentemente asociados con otras condiciones como diabetes tipo 2 (DT2), síndrome metabólico (SM) e hígado graso no alcohólico (HGNA) y está bien establecido que en conjunto confieren un mayor riesgo que cada uno por separado (Cornier et al., 2008; García-Fernández et al., 2014).

Tradicionalmente se tenía el supuesto que el HGNA era una manifestación hepática del SM, debido a que compartían factores de riesgo como la edad, la resistencia a insulina (RI), la DT2, la obesidad y la hipertrigliceridemia. En particular se pensaba que la RI era el principal mecanismo patogénico en el desarrollo de HGNA. Sin embargo datos recientes indican que es probable que estas condiciones son la consecuencia y no la causa del HGNA (Vanni et al., 2010). Otros estudios epidemiológicos han demostrado que la esteatosis hepática es capaz de predecir el desarrollo de ECV independientemente de los factores de riesgo tradicionales (Vanni et al., 2010).

Además, en una cohorte japonesa, se demostró que la incidencia a ECV fue mayor en personas con HGNA sin sobrepeso que, en individuos con sobrepeso (Yoshitaka et al., 2017).

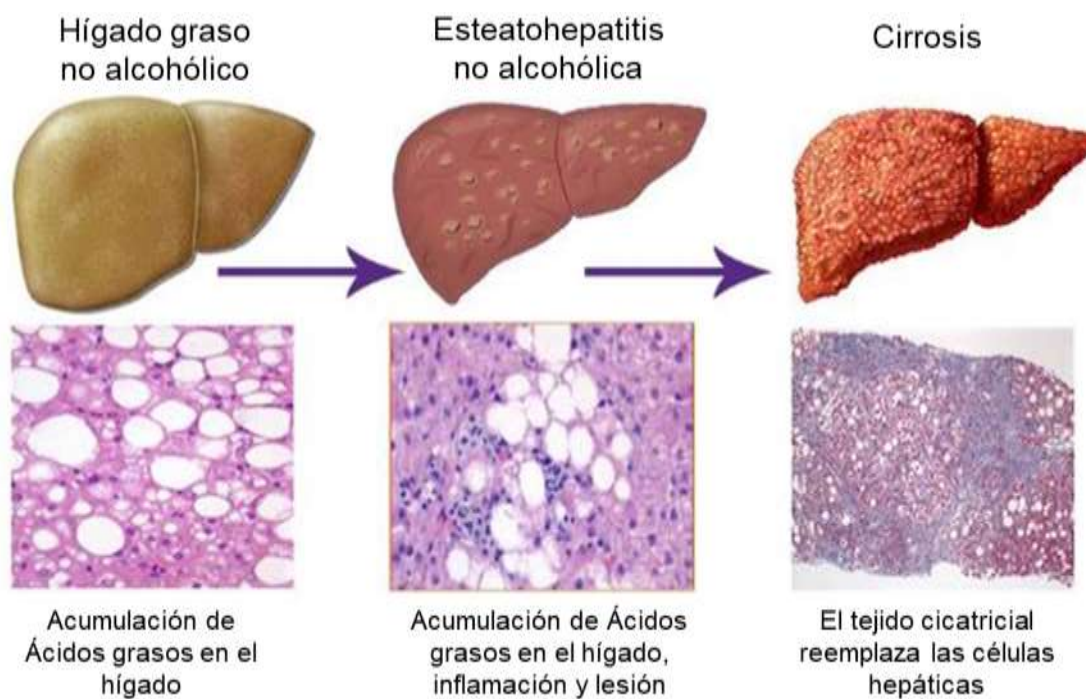
En conjunto, los datos sugieren que el desarrollo de HGNA puede ser independiente de: SM, DT2 y obesidad, además de que juega un papel importante en la incidencia de las ECV.

## 1.2 Hígado graso no alcohólico

### 1.2.1 Definición de hígado graso y categorías

HGNA fue descrito por la primera vez en 1980 por Ludwig y se estima que la prevalencia a nivel mundial es entre 10-40% en adultos, con una frecuencia más alta en indios de asia oriental, seguidos por los hispanos (Ludwig et al., 1980; Pan & Fallon, 2014). Además, el HGNA representa la enfermedad de hígado más común en niños y adolescentes (Temple et al., 2016).

El HGNA se caracteriza por presentar una acumulación de lípidos mayor al 5% en hepatocitos (esteatosis) en ausencia del consumo de alcohol en exceso. Es una enfermedad progresiva, que pasa de una acumulación de lípidos (HGNA) a Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) caracterizada por inflamación y lesiones en las células hepáticas. Por último el HGNA puede llegar a desarrollar cirrosis (Figura 1) (Chalasani et al., 2012; Benedict & Zhang, 2017; Cohen, Horton, & Hobbs, 2011).



*Figura 1. Categorías histológicas del hígado graso no alcohólico. Se muestra la progresión del HGNA, así como el estado de las células hepáticas en cada categoría.*

## 1.2.2 Diagn osis del HGNA

Desde un punto de vista clínico, es sumamente importante tener herramientas sólidas que pueden detectar y diferenciar los diferentes estadios de HGNA. Sobre todo, porque los estadios más severos están asociados con una mayor mortalidad hepática, cardiovascular y la posibilidad de desarrollar carcinoma hepatocelular. Además, mientras que a los pacientes con HGNA se les recomienda un cambio de estilo de vida, a los pacientes con NASH se les debe de incluir otros tratamientos clínicos para esta afección.

Hasta la fecha, la histología de una biopsia hepática es la técnica más utilizada para el diagn osis de los estadios de HGNA (Yki-J rvinen, 2016).

El sistema de puntuación histológica más utilizado es el “NAFLD activity score (NAS)” publicado en 2005 por Clinical Research Network (CRN) (Kleiner et al., 2005). El NAS representa la suma de los puntajes individuales para esteatosis, inflamación lobular y balonamiento de hepatocitos, el cual es un aumento de los hepatocitos en las células y su agrupamiento de manera irregular en el citoplasma; el NAS varía de 0 a 8 (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes del NAS			
Component	Puntuación	Grado	
Esteatosis	0	<5%	Se refiere a la superficie que presenta esteatosis.
	1	5-33%	
	2	>33-66%	
	3	>66%	
Inflamación Lobular	0	ausencia de inflamación	
	1	<2 focos/200x	
	2	2-4 focos/200x	
	3	>4 foco/200x	
Balonamiento de hepatocitos	0	No	
	1	Pocas células con balonamiento	El termino pocos significa que son raros los hepatocitos con balonamiento.
	2	Muchas células o balonamiento prominente	

Según los puntajes de NAS, el diagnóstico del HGNA se divide en tres grupos: 1) NAS 1-2, no EHNA; 2) NAS 3-4, casos “borderline”; 3) NAS 5-8, EHNA (Kleiner et al., 2005).

## 1.3 Condiciones que coexisten frecuentemente con el HGNA

### 1.3.1 La obesidad

El sobrepeso y la obesidad se caracterizan por la acumulación anormal de lípidos en el cuerpo debido al desequilibrio entre la energía almacenada y la energía consumida (Yang et al., 2017).

Existen diferentes parámetros para el diagnóstico de la obesidad. El índice de masa corporal (IMC) es el parámetro antropométrico más utilizado que se define como la relación entre el peso y el cuadrado de la altura (en  $m^2$ ). En base a lo anterior, se clasifican personas con un  $IMC < 18.5 \text{ Kg/m}^2$  como delgadas, un IMC entre  $18.5 - 24.9 \text{ Kg/m}^2$  como normopesos, un IMC entre  $25 - 29.9 \text{ Kg/m}^2$  como sobrepesos y  $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$  como obesos (OMS et al., 2017). Además, se usan otros parámetros para el diagnóstico de la obesidad como la circunferencia de la cintura y la relación cintura:cadera (Yang et al., 2017).

La obesidad está asociada con el incremento en la incidencia de ECV, DT2, RI, HGNA y ciertos tipos de cáncer. Además, se sabe que individuos con HGNA con  $IMC > 24.9$  tienen una mayor probabilidad de desarrollar EHNA y un porcentaje de estos individuos evoluciona a formas más graves de enfermedades hepáticas, como carcinoma (Caballería et al., 2008).

### 1.3.2 Síndrome metabólico

El SM está definido por un conjunto de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos que aumenta directamente el riesgo de tener una ECV. Entre los que están: dislipidemia aterogénica, hipertensión, intolerancia a la glucosa, estado proinflamatorio. Ha habido varias definiciones de SM, pero las más utilizadas son las generadas por las siguientes instituciones: World Health Organization (WHO), the European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR), the National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III), American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), and the International Diabetes Federation (IDF) (Kaur, 2014).

La Tabla 2 muestra los criterios de NCEP ATP III. Cuando tres de las cinco características enumeradas están presentes, se puede hacer un diagnóstico del SM (Grundy et al., 2004).

<b>TABLA 2. Criterios ATP III para la identificación clínica del SM</b>	
<b>Factor de Riesgo</b>	<b>Limites</b>
<b>Obesidad abdominal (dada por la circunferencia de la cintura)</b>	
<b>Hombres</b>	> 102 cm
<b>Mujeres</b>	> 88 cm
<b>Triglicéridos</b>	> 150 mg/dL
<b>LAD</b>	
<b>Hombres</b>	< 40 mg/dL
<b>Mujeres</b>	< 50 mg/dL
<b>Presión sanguínea</b>	≥ 130 / ≥ 85 mm Hg
<b>Glucosa en ayunas</b>	≥ 110 mg/ dL

#### **1.4. La metilación del ADN (mADN) y la función mitocondrial en HGNA, SM, DT2 y obesidad**

##### **1.4.1. La mADN**

La metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es una modificación epigenética clave en los genomas de vertebrados que está implicada en procesos biológicos tales como la regulación de la expresión génica y el control de elementos transponibles. A pesar del creciente conocimiento sobre la mADN, todavía falta una comprensión completa de sus funciones específicas respecto a la expresión génica en diversos organismos (Varriale, 2014).

La mADN consiste en una modificación covalente mediante la unión de un grupo metilo (CH<sub>3</sub>), a la base de la citosina en una secuencia 5'CpG3' (CpG es una abreviatura donde un nucleótido de citosina es seguido por una citosina, separados solo por un fosfato, en la dirección 5'-3'). En los mamíferos, los patrones de mADN se establecen durante el desarrollo embrionario por las DNMTs (enzimas de mADN

de novo) las cuales son: DNMT3A y DNMT2B. Una vez metilados, DNMT1 se encarga de mantener la mADN mediante un mecanismo de copiado durante la división celular, donde cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina a la citosina del ADN hemimetilado producto de la replicación semiconservativa del ADN (E. Li & Zhang, 2017).

Aunque la mayoría de los patrones de mADN establecidos durante el desarrollo embrionario se mantienen durante la replicación celular, existen genes o regiones genómicas donde este proceso no está conservado. Por ejemplo, una gran cantidad de estudios han demostrado que el desarrollo y progresión de muchas enfermedades están asociadas con cambios en la mADN (Jin & Liu, 2018). Algunos de dichos cambios pueden ser una respuesta fisiológica a los cambios ambientales, por ejemplo la dieta del individuo (de la Rocha et al., 2016).

#### **1.4.2. Mitocondrias y su asociación con la mADN**

Típicamente, un desequilibrio a largo plazo en la entrada y eliminación de grasa conduce a la acumulación de grasa en los adipocitos, el hígado, los músculos y el corazón. De hecho, el aumento del almacenamiento de lípidos es una característica común de la obesidad DT2 y HGNA. Aún si se han definido varios mecanismos de metabolismo de los ácidos grasos (AGs) anormal, la disfunción mitocondrial y del retículo endoplásmico (RE), además de la ocurrencia de contactos mitocondria-RE anormales, están emergiendo como determinantes importantes en esos trastornos metabólicos (Hotamisligil, 2006). Los contactos mitocondria-RE anormales permiten entre otros fenómenos el flujo de calcio y lípidos entre los dos organelos y por lo tanto tienen un papel fundamental en la lipogénesis y la regulación de procesos mitocondriales como la biogénesis, autofagia y la respiración. Además, la evidencia creciente vincula la función mitocondrial a la mADN de los genes nucleares (Zaina & Lund, 2017; Xie et al., 2007; Smiraglia et al., 2008; Matilainen et al., 2017).

Las mitocondrias se destacan por poseer sus propios genomas. El ADN mitocondrial (ADNmt) humano tiene una estructura circular de doble cadena de ADN de 16 569 pb. Esto contiene 37 genes codificantes, dos ácidos ribonucleicos (RNA)

ribosomales, 22 RNAs de transferencia y 13 polipéptidos que forman parte del sistema de fosforilación oxidativa. Se mantiene separado del ADN nuclear, pero trabajan en conjunto para asegurar el correcto funcionamiento de la mitocondria (Taanman, 1999).

Aunque el ADNmt es bastante diverso en el reino eucariótico, la organización del genoma mitocondrial de los mamíferos está significativamente conservada. La replicación del ADNmt ocurre independientemente de la replicación del ADN nuclear. Sin embargo, todos los factores asociados con la replicación del ADNmt se encuentran codificados por el ADN nuclear, lo que indica que el núcleo desempeña un papel importante en la regulación de copias del ADNmt. (Taanman, 1999).

El ncADNmt no es aleatorio y puede variar entre células, tipo de tejido y a etapa de desarrollo (García et al., 2016). También, se ha visto una disminución de mitocondrias en enfermedades como cáncer, DT2 e HGNA (Montier et al., 2016). Por ejemplo se encontró que el ncADNmt esto era 3.7 veces mayor en biopsias hepáticas de individuos con HGNA respecto individuos sin HGNA (Kamfar et al., 2016). Los cambios en el ncADNmt están asociados con menores niveles de oxidación de AGs y mayor estrés oxidativa provocando la acumulación de lípidos.

El gen PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) es un regulador importante de genes relacionadas con la biogénesis mitocondrial como son NRF-1 (nuclear transcription factor nuclear respiratory factor-1), NRF-2 y TFAM (transcription factor A, mitocondrial) (Wu et al., 1999).

Esta regulación ocurre vía la interacción de PGC-1 $\alpha$  con peroxisome proliferator-activated receptor alfa PPAR $\alpha$  o PPAR $\gamma$  y resulta en un incremento de la transcripción y replicación mitocondrial y la beta oxidación de AGs (Puigserver et al., 1998)

De manera interesante, la activación de PGC-1 $\alpha$  y PPAR $\alpha$  por el ácido araquidónico (AA) está asociada con un incremento en la mADN total en la línea celular THP-1 (Silva-Martinez et al., 2016). Además, se sabe que la respuesta de hipermetilación inducida por AA depende de los reguladores conocidos de la beta oxidación de AGs,



que incluyen Sirtuin 1 (SIRT1), PPAR $\alpha$  y la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) (Silva-Martínez et al., 2016). Otros investigadores han mostrado que la metilación del promotor PGC-1 $\alpha$  aumenta en el músculo esquelético de individuos con DT2. Este incremento en la mADN se correlaciona inversamente con el contenido ADNmt, una reducción en TFAM, además de la expresión reducida de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (Barrès et al., 2009).

En conjunto, estos datos subrayan el importante papel de los cambios inducidos por AGs en la mADN en todo el genoma y de genes específicos que dependen de la beta oxidación de AGs y afectan la biogénesis mitocondrial.

#### **1.4.3. Cambios en la mADN asociadas con HGNA, SM, DT2 y la obesidad.**

Estudios sobre los cambios globales en la mADN en biopsias de hígado muestran que la progresión de ES a EHNA en personas con obesidad (IMC>35) se asociado con la pérdida de mADN total y gen-especifico en el hígado (Murphy et al., 2012; de Mello et al., 2017), De igual manera un estudio del metiloma de gemelos discordantes al mismo tiempo por el IMC y por el exceso de grasa hepática, reveló que el gemelo con peso más alto presento niveles reducidos de mADN en leucocitos (Ollikainen et al., 2015).

La obesidad también está asociada con cambios en la mADN. Un estudio de nuestro laboratorio analizó la relación entre IMC, mADN global de células de sangre periférica y AGs sanguíneos totales en una cohorte de hombres mexicanos distribuidos igualmente entre las tres clases convencionales de IMC (de la Rocha 2016). El análisis de los perfiles de mADN durante un día de ayuno o en el estado postprandial demostró que sujetos con IMC normal muestran altos niveles de mADN en comparación con sujetos obesos y con sobrepeso. De manera importante, ninguno de los sujetos analizados mostró anomalías en la presión arterial, lipoproteínas, triglicéridos y glucosa que están asociadas con el SM o DT2. Sin embargo, no tuvimos datos acerca de la prevalencia del HGNA. De igual manera, se mostró recientemente que la hipometilación precede al DT2 en hígados de individuos obesos con o sin DT2 (Kirchner et al., 2016). Además, en ratas machos



alimentados con una dieta alta en grasa la hipometilación del ADN y la obesidad preceden al SM (Sánchez et al., 2015)

En conjunto, los datos indican que la hipometilación del ADN asociada con la obesidad precede a los trastornos metabólicos SM y DT2. Sin embargo, en gemelos discordantes para la obesidad y el HGNA, la hipometilación del ADN parece estar asociada con el HGNA.

Hasta la fecha, los estudios sobre la mADN y ncADNmt en HGNA han involucrado cohortes de individuos que tienen HGNA, además de DT2, SM y/o obesidad. Por lo tanto, el enfoque principal de esta tesis fue investigar los cambios en ncADNmt y mADN en individuos con HGNA, pero sin SM, DT2 y obesidad. Dado que hay asociación entre la función mitocondrial y la mADN analizamos también si existe una correlación entre la mADN y ncADMmt.

## II. HIPÓTESIS

La hipometilación del ADN de individuos con HGNA precede al SM y/o la obesidad, además de estar asociada con cambios en el ncADNmt.

## III. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

Comparar niveles de la Metilación del ADN y número de copias de ADN mitocondrial, en el hígado y sangre, en la enfermedad de hígado graso no alcohólico así como su papel en el síndrome metabólico y la obesidad.

### 3.2. Objetivos Específicos

- Extraer el ADN de las biopsias de una cohorte de 90 individuos operados por cálculos biliares
- Cuantificar el ADN extraído de las biopsias y el ADN de sangre proporcionado por la Universidad de Guanajuato, campus León.
- Medir el nivel de la mADN y ncADNmt de las muestras, para su posterior análisis.
- Analizar estadísticamente la diferencia entre individuos con o sin HGNA, discordantes o no por SM u obesidad respecto a la mADN y el ncADNmt, con la finalidad de dilucidar el papel mADN y ncADNmt en estas enfermedades.
- Analizar si existe una correlación entre parámetros biométricos y la mADN y/o ncADNmt.

## **IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **4.1. Cohorte poblacional**

Se cuenta con una cohorte poblacional de 104 muestras de sangre y 90 de biopsias embebidas en parafina, de individuos que fueron operados por cálculos biliares. La cohorte fue realizada por la Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy del Departamento de Ciencia Médicas, División de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guanajuato, Campus León. De igual manera se proporcionó una base de datos con información acerca del uso de tabaco, alcohol, escolaridad, edad, DT2, presión arterial, estos dos últimos datos cuentan con los datos del historial médico donde se registra si tienen estas enfermedades, además de mediciones de glucosa y de la presión sistólica y la diastólica en el momento de la toma de muestra, las cuales pueden tener valores normales debido a los tratamientos de las enfermedades (Tabla S1), además parámetros antropométricos (talla, IMC, porcentaje de agua, porcentaje de músculo, porcentaje de grasa visceral, medida de cintura, medida de cadera, Índice cintura/cadera (ICC)), parámetros bioquímicos (glucosa, urea, creatinina, colesterol, lipoproteínas de alta baja densidad (LBD), lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD), triglicéridos, relación LBD/LAD, bilirrubina total (BT), bilirrubina directa (BD), bilirrubina indirecta (BI), ácido úrico, aspartato aminotransferasas (AST), alanina aminotransferasas (ALT), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasas alcalinas, amilasa, lipasa, albumina y globulina) (Tabla S2 y S3). El criterio de exclusión fue si el individuo mostraba un consumo considerable de consumo alcohólico.

### **4.2. Estandarización del método de extracción de biopsia embebida en parafina**

La Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy proporcionó un método utilizado en su laboratorio para la extracción de ADN a partir de biopsias embebidas en parafina.

A los cortes de las biopsias se les añadió 400 µl de aceite mineral. Después se calentó por 20 minutos a 90°C en el thermoblock; se añadió 500 µl de buffer de lisis (50mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS y 50 mM NaCl) y 20µl de Proteinasa K; se mezcló con vortex. Posteriormente se dejó incubar toda la noche a una temperatura de 65°C para disolver el tejido. Terminando la incubación se retiró el exceso de aceite natural, se añadió 500 µl de cloroformo y se mezcló por dos

minutos con vortex. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos (para separar la fase orgánica donde quedan las proteínas y otros contaminantes). Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadió 50 µl de acetato de sodio 3M y 500 µl de isopropanol, se agitó por inmersión y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm para precipitar el ADN. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Esta fue resuspendida en 50 µl de H<sub>2</sub>O estéril.

#### 4.3. Estandarización del método de cuantificación de ADNmt por PCR para sangre y biopsia.

Para la cuantificación del ncADNmt se utilizó el protocolo descrito por Palmeira y Rolo en el 2014. Primero, se cuantificó la concentración de ADN por nanodrop y con SYBR Green 1.

Se realizó la reacción de PCR, usando primers que amplifican un fragmento de ADNmt (14620 al 14841 pb) que contiene los genes *ND6*, subunidad de la NADH deshidrogenasa que participa en la cadena transportadora de electrones; *TRNE*, gen del RNA de transferencia del ácido glutámico y *CYTB*, (citocromo b) subunidad principal de los complejos b6f ybc1 los cuales forman parte de la cadena respiratoria. (Figura 2).

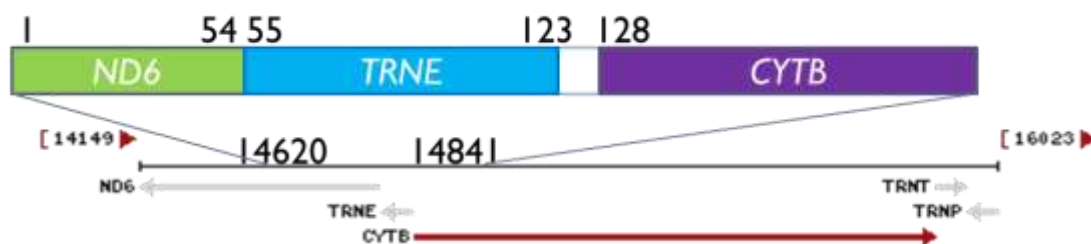


Figura 2. Fragmento amplificado donde se puede observar que se encuentran fragmentos de los genes *ND6*, *TRNE* y *CYTB*.

Con las siguientes condiciones: 95°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, una extensión final de 5 minutos a 72°C. Para asegurar que el producto de PCR fuera proporcional al templado inicial, cuantificamos los productos de PCR de muestras de ADN diluidas 1:1 y muestras sin diluir utilizando diferentes números de ciclos de PCR. El número adecuado de ciclos

se identificó cuando el producto de PCR de la muestra diluida representaba ~ 50% de la muestra sin diluir. Las condiciones para las muestras de biopsias de hígado y sangre fueron: 25 y 18 ciclos usando 15 y 30 ng de ADN, respectivamente. Por último, se cuantificó el producto del PCR con SYBR Green 1, agregando 5 µl del producto de PCR con 45 µl de Máster Mix (94 µl de TE y 1 µl de SYBR Green 1 1%).

#### **4.4. Estandarización del método de cuantificación de metilación global para sangre y biopsia**

Para cuantificar la mADN global se usó el método descrito por Shiratori y colaboradores en el 2016. Este método se basa en el uso de las enzimas de restricción, *MspI* y *HpaII* que reconocen el mismo sitio de restricción CCGG. Sin embargo, *MspI* es capaz de cortar este sitio cuando está metilado, mientras que *HpaII* solo corta sitios no metilados. Al incubar el ADN cortado con *MspI* y *HpaII* junto con 5-propargylamino-dCTP/5/6-carboxytetramethyl-rhodamine (Tamra-dCTP), esta última se incorpora solo en los sitios cortados. Al unirse con el ADN, Tamra-dCTP genera fluorescencia y al cuantificar esta se puede calcular el nivel de la mADN en los sitios CCGG (Shiratori et al., 2016).

Primero se estandarizó la cantidad de ADN para llevar a cabo la digestión en reacciones de 50 µl; se analizó la cantidad de ADN desde 50 – 500 ng. Para el ADN de la sangre la concentración óptima fue 80 ng, mientras que para la biopsia hepática se usó 500 ng. Se digirió el ADN con 1 µl de *HpaII* y *MspI* por 16 horas.

Después, se incorporaba el TAMRA-dCTP en una reacción de 25 µl en un buffer de extensión que contenía: 1x buffer de PCR, 1 U de TAQ polimerasa, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 0.5 nM de TAMRA-dCTP por 2 horas a 57°C. Para medir la fluorescencia generada de la unión de TAMRA-dCTP al ADN, se colocaban 20 µl de la reacción en una placa negra y se midió la fluorescencia con el equipo Tecan. Los valores de fluorescencia fueron calculados usando el software i-control de Tecan y se calculó el % de mADN con la siguiente fórmula:

$\% \text{ de mADN} = (1 - \text{HpaII}/\text{MspI}) * 100\%$ , donde *HpaII* y *MspI* son las lecturas de fluorescencia obtenidas del ADN digerida con cada una de las enzimas, incubadas con TAMRA-dCTP.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Características generales de la cohorte.

La cohorte consistió en 104 individuos operados por cálculos biliares. De éstos 91 eran mujeres y 13 hombres con una edad promedio de 40 años. La mayoría eran fumadores (Tabla 3). En promedio los valores de presión arterial y glucosa estaban dentro de los valores normales; es decir <130/85 mmHg y <110 respectivamente. De hecho, solo el 17 y 13% tenían un diagnóstico de hipertensión y DT2, respectivamente (Tabla 3). Por otro lado, la mayoría de los individuos tenían sobrepeso u obesidad (IMC>24.9) e HGNA y casi la mitad tenían SM.

Tabla 3: Características de la cohorte		
	MUJERES	HOMBRES
EDAD	40	46
TABAQUISMO	85%	94%
PRESION ARTERIAL	19%	10%
SOBREPESO U OBESIDAD	77%	94%
HGNA	58%	42%
SM	47%	42%
DT2	11%	21%

Se muestra el porcentaje de la población que presenta la enfermedad en nuestra cohorte, la edad y el IMC son el promedio en la cohorte

### 5.2. Cuantificación del ADN mitocondrial y la mADN global

De cada individuo (90 personas) se extrajo ADN de biopsias de hígado. Por otro lado, el ADN de sangre (104 muestras) fue proporcionado por el laboratorio de la Dra. Monroy. Para ambos tejidos se midió la concentración de ADN, primero con el equipo Nanodrop, seguido por fluorescencia con SYBR Green 1. En promedio obtuvimos 0.48 y 0.42 ug/ul de ADN de biopsia de hígados y sangre, respectivamente (Tabla S4).

Para cuantificar el ncADNmt se amplificó una sección de 221 pb del ADN mitocondrial, utilizando 10 y 30 ng de ADN de sangre y biopsia, respectivamente. Para las reacciones de PCR se determinó el número de ciclos como se describió en la metodología. Posteriormente se midió la concentración de los productos de PCR

por fluorescencia por duplicado a una excitación de 485 nM y una emisión de 535 nM (Tabla S5 y S6). En promedio las lecturas de fluorescencia de las biopsias de hígados y sangre fue 1627 y 510 UAF $\pm$  (Unidades arbitrarias de fluorescencia), respectivamente. Esto concuerda con estudios previos que muestran un menor nivel de ADNmt en sangre respecto al hígado (Skuratovskaia et al., 2018). Para medir los niveles de mADN se usó 80 y 500 ng para sangre y biopsias de hígado, respectivamente. Después de la digestión con *MspI* y *HpaII*, el ADN fue incubado con TAMRA-dCTP. Se midió la fluorescencia por duplicado a una emisión de 590 nM y una excitación de 535 nM y se calculó el % de la mADN como se describió en la metodología. En promedio la mADN en las biopsias de hígados y sangre era de 7% en ambos (Tabla S7 y S8).

### 5.3. La mADN y el ADNmt en individuos con HGNA y SM discordantes por obesidad.

Como nuestra hipótesis de trabajo dicta que la hipometilación del ADN está asociada con el HGNA y que esto precede o es independiente del SM y/o la obesidad, separamos la cohorte de los 104 individuos en grupos experimentales discordantes para cada condición.

#### 5.3.1. HGNA y SM

Primero, se compararon los niveles de la mADN o ncADNmt en grupos de individuos discordantes para HGNA y SM usando un Análisis de Varianza (ANOVA). La Tabla 3 muestra el número de individuos en cada grupo. El grupo control consistió en individuos que no tenían ni HGNA ni SM; el grupo HGNA & SM eran individuos con ambas condiciones (Tabla 4).

Tabla 4. Grupos utilizados en el análisis		
	Sangre (n)	Biopsia (n)
<b>CONTROL</b>	32	30
<b>HGNA</b>	24	19
<b>SM</b>	15	13
<b>HGNA &amp; SM</b>	33	28
<b>TOTAL</b>	104	90

Observamos solo diferencias significativas en las biopsias del hígado respecto al mADN y el ncADNmt entre los grupos (Figura 3).

En particular, el grupo con HGNA tenía menores niveles de mADN y ncADNmt respecto al grupo control. Además, se detectó una diferencia significativa en la mADN entre HGNA e HGNA & SM y para el ncADNmt entre HGNA & SM y el control. Sin embargo, el grupo de SM no fue diferente respecto al grupo control, ni respecto a la mADN, ni al ncADNmt. Esto sugiere que el HGNA está asociado con un menor nivel de la mADN y ncADNmt. Sin embargo, en individuos con HGNA y SM la diferencia en la mADN desaparece.

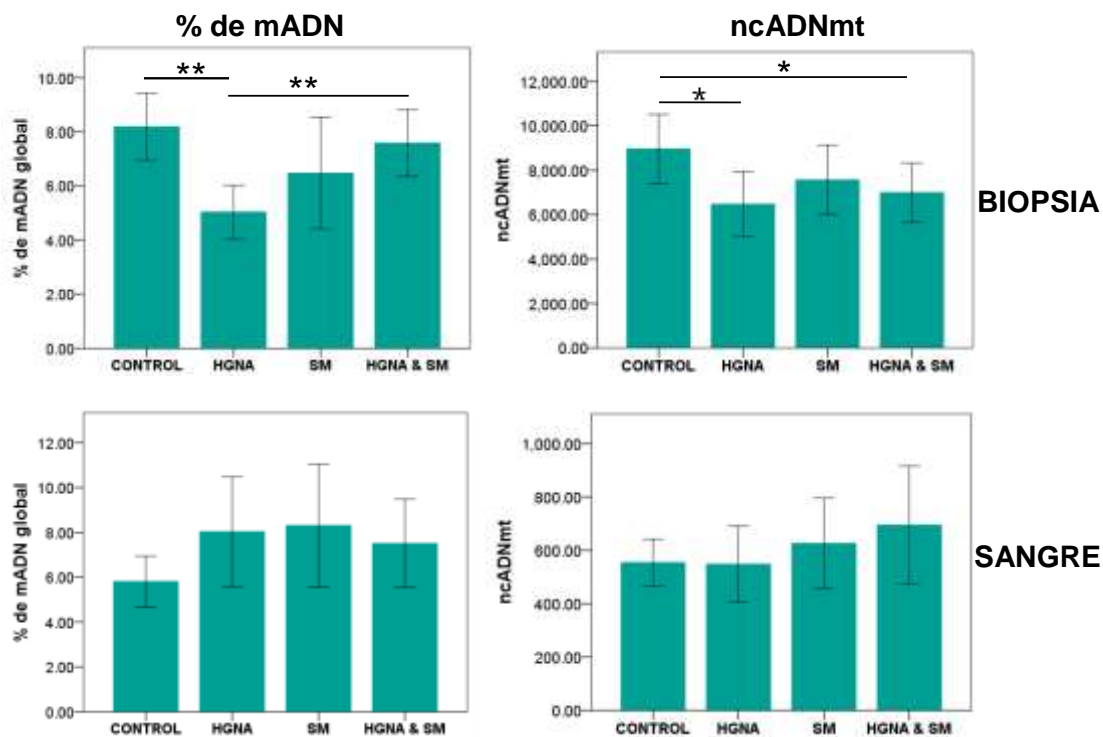


Figura 3. Diferencias significativas entre los grupos experimentales respecto a la mADN y al ncADNmt en Biopsias y Sangre. Los gráficos muestran valores promedios; La significancia está señalada por: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Como se pudo observar en la Figura 3, las tendencias entre la mADN y el ncADNmt fueron muy similares. Sin embargo, no se detectó ninguna correlación significativa entre éstos, en ninguno de los dos tejidos (Tabla S9). A su vez no se observaron correlaciones entre las biopsias y sangre respecto a la mADN y ncADNmt (Tabla S10).



### 5.3.2. Severidad de HGNA

Dado que existe evidencia que la mADN y el ncADNmt puede cambiar durante el desarrollo de HGNA, se repitió el análisis de ANOVA separando la cohorte en cuatro grupos según el “NAS score” por Kleiner: Controles (NAS=0), ES (Esteatosis simple; NAS=1-2), Borderline (NAS=3-4) y EHNA (NAS >5) (Tabla 5).

Tabla 5 . Grupos utilizados en el análisis de Kleiner.		
	Sangre (n)	Biopsia (n)
<b>Control</b>	47	43
<b>ES</b>	11	11
<b>Borderline</b>	28	22
<b>EHNA</b>	18	14
<b>TOTAL</b>	104	90

Se observó solo diferencias estadísticas en las biopsias de hígado entre grupos, tanto para la mADN y para el ncADNmt (Figura 4). Específicamente, el nivel de mADN fue menor en ES respecto al control, mientras que el ncADNmt fue menor en el estadio “Borderline” de HGNA comparado con el control o ES.

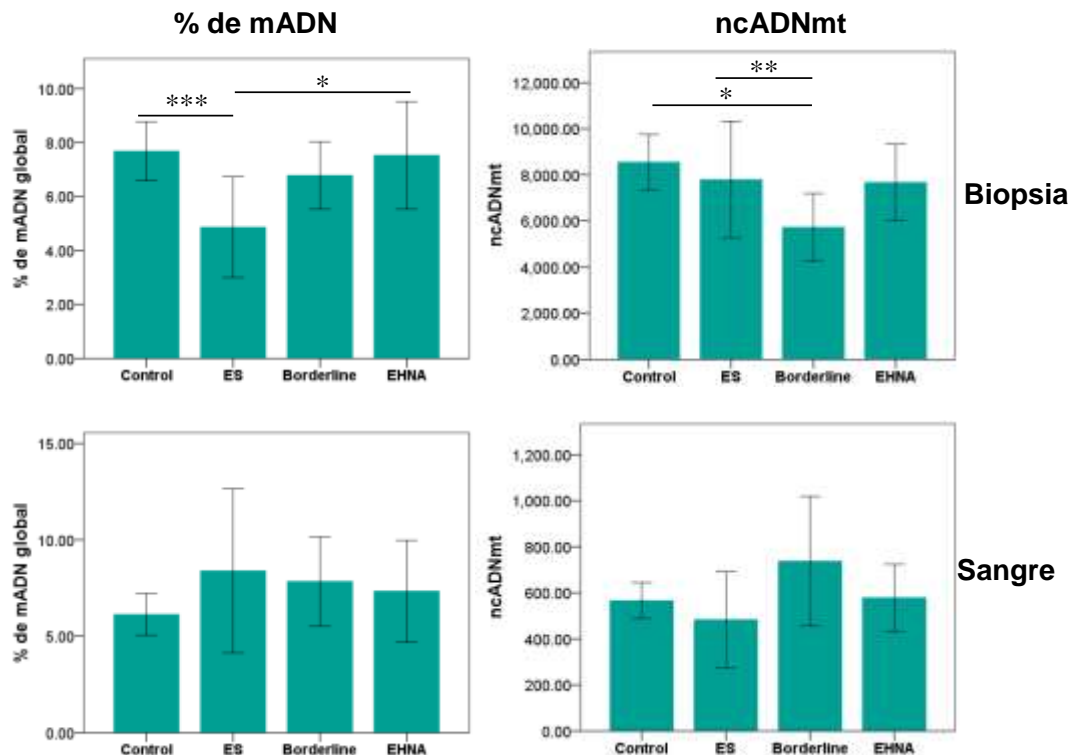


Figura 4. Diferencias significativas entre los pacientes con diferente grado de severidad de HGNA, respecto a la mADN y al ncADNmt en Biopsia y Sangre. La significancia está señalada por: \* = 0.1, \*\*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.01$

Para analizar si el SM afectaba estos resultados, se restringió el análisis a individuos con HGNA sin SM (Tabla 6).

Tabla 6 . Grupos utilizados en el análisis de Kleiner sin SM.		
	Sangre (n)	Biopsia (n)
<b>Control</b>	32	30
<b>ES</b>	6	6
<b>Borderline</b>	11	9
<b>EHNA</b>	7	4
<b>TOTAL</b>	56	49

De manera interesante se volvió a ver la disminución en la mADN global en ES en comparación con el control (Figura 5). Además, se observó lo mismo en el grupo Borderline respecto al control. Se vio una disminución paulatina del ncADNmt, pero sin llegar a ser significativo, esto solo en biopsia. Esto sugiere que la asociación de la hipometilación con el hígado graso es específica para esa afección y ocurre temprano en el desarrollo del HGNA. Respecto al ncADNmt, observamos solo un efecto en individuos con HGNA y SM.

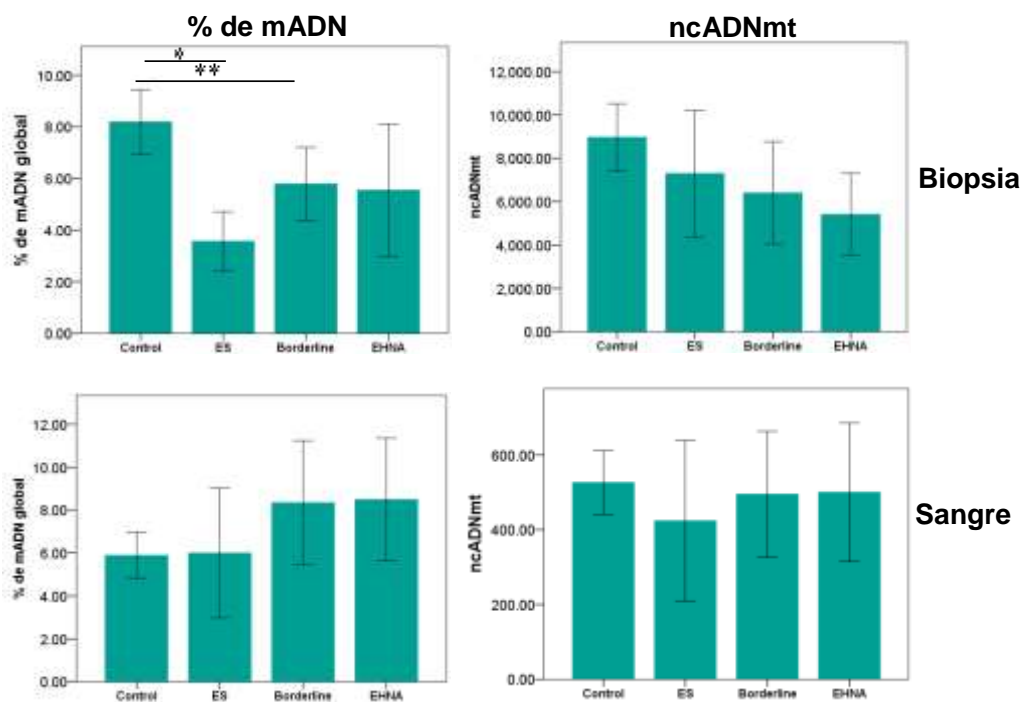


Figura 5. Diferencias significativas entre los pacientes con diferente grado de severidad de HGNA sin SM, respecto a la mADN y al número de copias de mtADN en Biopsia y Sangre. La significancia está señalada por: \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p = 0.001$

### 5.3.3. Hígado graso no alcohólico y la obesidad.

Después analizamos si la hipometilación del ADN asociada con HGNA está afectada por el IMC. Para este fin, hicimos la comparación entre individuos discordantes para HGNA con normopeso ( $IMC < 24.9$ ), con sobrepeso  $24.9 < IMC < 29.9$  u obesidad ( $IMC > 29.9$ ) en biopsia y sangre. La Tabla 7 muestra el número de individuos analizado por grupos. Se excluyeron las personas con un bajo peso.

		Sangre (n)	Biopsia (n)
HGNA	Normopeso	4	3
	Sobrepeso	6	6
	Obesidad	14	10
Sin HGNA	Normopeso	8	7
	Sobrepeso	15	15
	Obesidad	9	8
	<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>49</b>

A través del IMC encontramos solo diferencias significativas entre la mADN en biopsias y sangre de individuos sin y con HGNA, respectivamente (Figura 6). En biopsias, los individuos obesos (sin HGNA) tenían menor niveles en comparación con los normopesos. También observamos que los individuos con HGNA tienden a mostrar niveles menores en la mADN en comparación con los individuos sin HGNA, aunque solo son significativos en el grupo con sobrepeso.

Por otro lado, en la sangre los individuos con sobrepeso (e HGNA) tenían mayores niveles de la mADN respecto a los normopesos. También observamos que los individuos con sobrepeso (e HGNA) muestran mayores niveles de la mADN en comparación con los sin HGNA.

Respecto a ncADNmt, este no fue afectado por el IMC, ni en biopsias, ni en la sangre en individuos con HGNA. Sin embargo, en el hígado en personas sin HGNA observamos que el ncADNmt fue mayor en individuos con obesidad relativo a los normopesos. También observamos que los individuos con obesidad (sin HGNA) muestran mayor ncADNmt en comparación con los con HGNA.

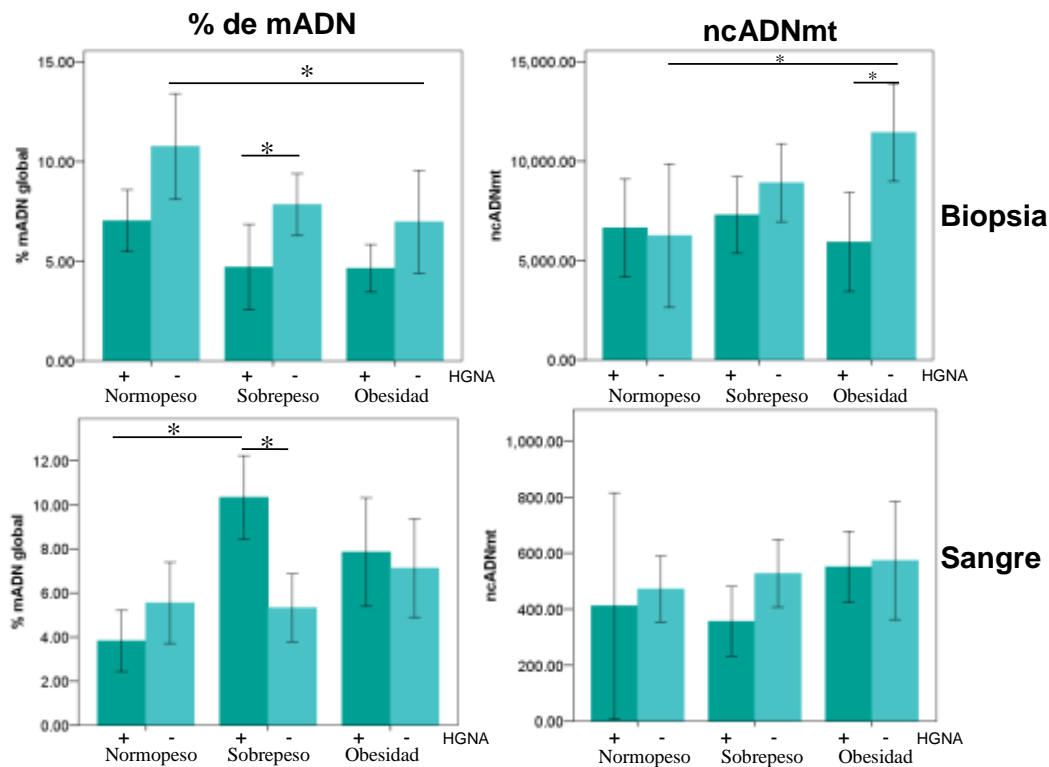


Figura 6. Diferencias significativas entre los pacientes con diferente IMC e HGNA, sin SM respecto a la mADN y al ncADNmt en sangre y biopsia. Los gráficos muestran los valores promedios por grupo. La significancia está señalada por: \*  $p < 0.05$ .

En conjunto los datos indican que la hipometilación asociada con HGNA en el hígado es independiente de IMC, pero no en individuos sin HGNA. Por otro lado, se vio un efecto de IMC sobre la mADN en la sangre de individuos con HGNA, pero no sin HGNA.

#### 5.3.4. Síndrome metabólico y la obesidad

Dado que la hipometilación de ADN asociada con la obesidad se detectó en individuos obesos sanos, es decir sin SM (de La Rocha et al., 2016), se decidió, comparar los niveles de la mADN y el ncADNmt en individuos con diferentes IMC con o sin SM afectaba. Se analizó tres grupos de IMC: los normopesos ( $IMC < 24.9$ ), sobrepesos ( $24.9 < IMC < 29.9$ ) y obesos ( $IMC > 30$ ) en sangre y biopsias, respectivamente. La Tabla 8 muestra el número de individuos analizado por grupos.

Tabla 8. Grupos utilizados en el análisis de SM e IMC.			
		Sangre (n)	Biopsia (n)
SM	Normopeso	4	4
	Sobrepeso	3	3
	Obesidad	8	6
Sin SM	Normopeso	8	8
	Sobrepeso	15	15
	Obesidad	9	8
Total		47	44

Ni la mADN, ni el ncADNmt fueron afectados por el IMC en individuos con o sin SM (Figura 7). Se observó solo una diferencia significativa entre individuos con o sin SM en el grupo de normopesos en las biopsias; en lo particular observamos mayores niveles de la mADN en individuos con SM respecto a los sin SM. Esto indica que por lo general el IMC no afecta el nivel de la mADN y el ncADNmt en individuos con SM ni en el hígado, ni en la sangre.

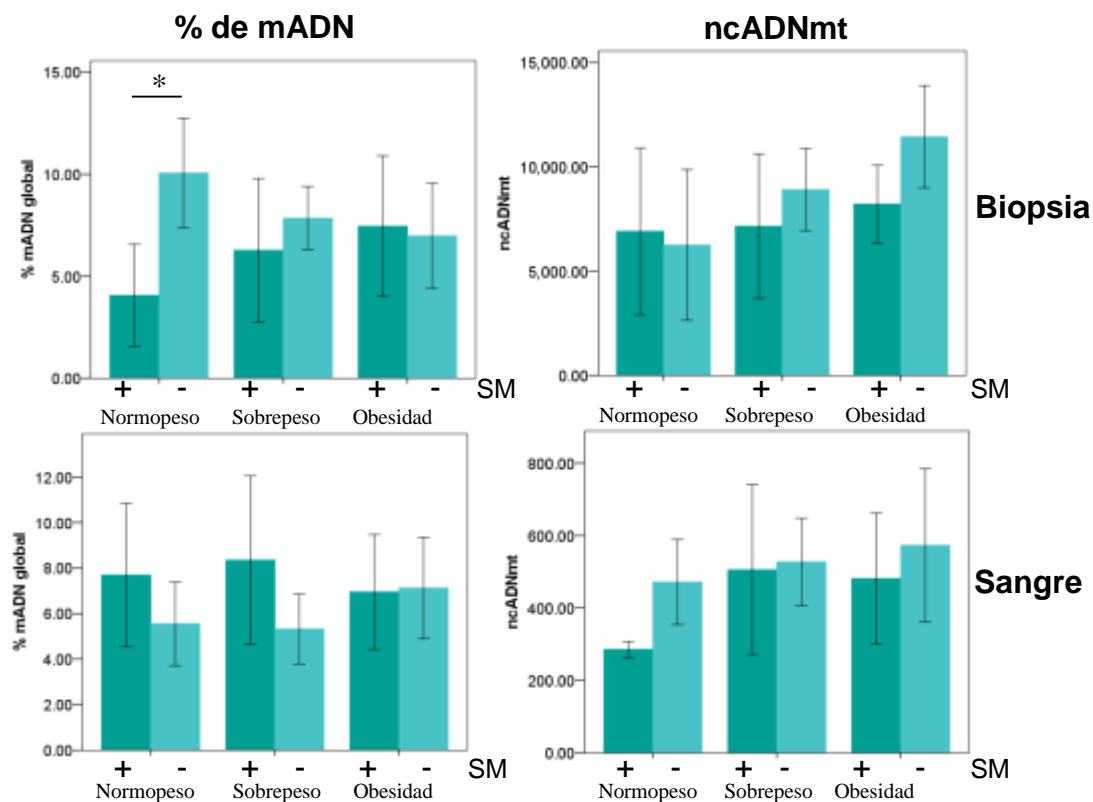


Figura 7. Diferencias significativas entre los pacientes con diferente IMC y SM, respecto a la mADN y al ncADNmt en sangre y biopsia. Los gráficos muestran los valores promedios por grupo; \* $p < 0.05$ .

#### **5.4 Correlaciones de la mADN y en número de copias de mtADN con los datos paramétricos.**

Por cada individuo contamos con parámetros antropométricos y bioquímicos de la sangre (Tablas S1 y S2) y se analizó si hubo correlaciones entre estos y la mADN o ncADNmt de sangre e hígado. Se detectó solo correlaciones en el hígado. Específicamente, encontramos correlaciones positivas entre la mADN y: 1) el % de musculo ( $r=0.3027$ ,  $p<0.026$ ); 2) la actividad de las enzimas AST y ALT ( $r=0.3569$ ,  $p<0.0006$ , y  $r=0.2339$ ,  $p<0.0265$ , respectivamente) que son indicadores de falla hepática. Con respecto al ncADNmt no se encontraron correlaciones (Tabla S11).

## VI. DISCUSIÓN

### 6.1 La mADN en HGNA, SM y obesidad.

En estos análisis encontramos que el HGNA en ausencia de SM está asociada con la hipometilación de ADN en el hígado. Esto ocurre principalmente en la ES, un estadio temprano del HGNA, y en individuos con sobrepeso. Esto indica que la hipometilación es una marca temprana del HGNA y precede al SM, lo cual es semejante a un reporte en ratas bajo una dieta alta en grasas (Sánchez et al., 2015).

Otro estudio analizó los perfiles de la mADN en una cohorte de individuos con HGNA y obesidad usando microarreglos de metilación (450k, Illumina). Estos arreglos incluyen ~450.000 sitios CpGs (~1.5% de todos los sitios CpGs en el genoma humano) que están localizados en regiones génicas, pero no incluyen secuencias repetidas como son los transposones. Encontraron cambios en la mADN durante la progresión de HGNA; en lo particular el 11 y 3% de los sitios CpGs se encontraban hipo e hipermetilados, respectivamente, en EHNA respecto a ES (Murphy et al., 2013). Sin embargo, en nuestro estudio donde se midió la mADN total, se observó hipometilación en ES. Esto podría señalar que en estadios tempranos del HGNA (ES) se caracteriza por un hipometilación global de secuencias repetidas, seguido por hipometilación de genes específicas en EHNA.

Observamos también que la mADN en hígado es menor en personas con obesidad sin HGNA y SM, confirmando nuestros datos anteriores de una cohorte de hombre metabólicamente sanos. Como la mayoría de los individuos analizados en nuestra cohorte fueron mujeres, esto indica que la hipometilación asociada con la obesidad en personas metabólicamente sanos es independiente del sexo.

### 6.2 El ncADNmt en HGNA, SM y obesidad

Con respecto al ncADNmt, encontramos una disminución en los individuos con HGNA respecto a los controles, en el hígado. Existen pocos otros estudios que analizaron el ncADNmt en HGNA. En dos casos, observaron las mismas tendencias que nosotros (Pirola et al., 2015; Sookoian et al., 2010), mientras que otros tres estudios observaron un mayor ncADNmt en individuos con HGNA (Kamfat et al., 2016; Chiappini et al., 2006 y Po-Jung et al., 2018). Al hacer el análisis por la

severidad de HGNA, observamos que el grupo Borderline mostraba un menor ncADNmt respecto a individuos sin HGNA o ES. De manera similar, Kamfar y colaboradores mostraban que estadios avanzados de la HGNA (es decir EHNA contra ES) eran asociados con una disminución en el ncADNmt, aunque ambos estadios mostraban mayor ncADNmt comparadas con individuos sin HGNA (Kamfar et al., 2016).

Existe también evidencia de una asociación negativa entre el ncADNmt y el IMC cuando comparaban individuos con normopeso y sobrepeso con individuos obesos que tenían también otros problemas metabólicos como dislipidemia y DT2 (Skuratovskaia et al., 2018). Sin embargo, en nuestro análisis de individuos metabólicamente sanos encontramos el efecto opuesto. Esto podría indicar que la presencia de DT2 y o dislipidemia (ambas características de SM) tengan efectos opuestos sobre la mADN. Nuestros datos no apoyan esta posibilidad, ya que la presencia de SM no afectaba el ncADNmt.

### **6.3 La mADN y/o ncADNmt: ¿un marcador sanguíneo del HGNA?**

Nuestro trabajo muestra que la hipometilación de ADN en el hígado es una característica de ES. Sin embargo, no encontramos esta asociación en la sangre. Además, observamos que la hipometilación es una característica de individuos con obesidad sin HGNA. Dadas estas observaciones la hipometilación global de ADN no sería útil como un marcador sanguíneo para HGNA.

Al hacer correlaciones entre los datos bioquímicos y la mADN encontramos una relación positiva entre la mADN y las enzimas AST y ALT en el hígado que son indicadores de daño hepático. De manera interesante, un trabajo reciente muestra que existe una relación positiva entre la mADN de CpGs específicas de ALT en la sangre de pacientes con ES (Wu et al., 2018). La falla para detectar ambas asociaciones en la sangre puede ser por cuestiones técnicas, ya que el análisis de la mADN fue hecho con una baja cantidad de ADN.

En conjunto, los datos sugieren que sería importante centrarse en los niveles de mADN de genes específicos en lugar de la mADN para distinguir la ES de la EHNA



## VII. CONCLUSIONES

- La hipometilación en el hígado es una firma de los estadios tempranos del HGNA y la obesidad sin HGNA.
- Hay un menor ncADNmt en los estadios más severos de HGNA, siendo más notable en el estadio Borderline.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Repetir el análisis de la mADN en la sangre usando mayores cantidades de ADN.
- Aumentar el tamaño de la cohorte para incrementar la significancia de los resultados.
- Identificar los genes que están hipometilados en estadios tempranos de HGNA y obesidad usando microarreglos de metilación de ADN (850K Illumina).
- Analizar si algunos de estos blancos pueden servir como marcadores moleculares sanguíneos específicos para HGNA.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Harems, M., Ammerpohl, O., Von Schönfels, W., Kolarova, J., Bens, S., Itzel, T., Hampe, J. (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>

Alam, S., Mustafa, G., Alam, M., & Ahmad, N. (2016). Insulin resistance in development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 7(2), 211. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v7.i2.211>

Anderson, K. M., Odell, P. M., Wilson, P. W. F., & Kannel, W. B. (1991). Cardiovascular disease risk profiles. *American Heart Journal*, 121(1), 293–298. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(91\)90861-B](https://doi.org/10.1016/0002-8703(91)90861-B)

Anwar, M. S., Dillon, J. F., Miller, M. H., Anwar, M. S., Dillon, J. F., & Miller, M. H. (2014). *World Journal of Pharmacology*, 3(4), 209–216. <https://doi.org/10.5497/wjp.v3.i4.209>

Atanesyan, L., Steenkamer, M. J., Horstman, A., Moelans, C. B., Schouten, J. P., & Savola, S. P. (2017). Optimal fixation conditions and DNA extraction methods for MLPA analysis on FFPE tissue-derived DNA. *American Journal of Clinical Pathology*, 147(1), 60–68. <https://doi.org/10.1093/AJCP/AQW205>

Bedogni, G., Miglioli, L., Masutti, F., Tiribelli, C., Marchesini, G., & Bellentani, S. (2005). Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*, 42(1), 44–52. <http://doi.org/10.1002/hep.20734>

Benedict, M., & Zhang, X. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World Journal of Hepatology*, 9(16), 715–732. <http://doi.org/10.4254/wjh.v9.i16.715>

Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., & Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7(1), 221–239. <https://doi.org/10.2147/CEG.S62831>

Byrne, C. D., & Targher, G. (2015). HGNA: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*, 62(S1), S47–S64. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>

Caballería, L., Auladell, M. A., Torán, P., Pera, G., Miranda, D., Alumà, A., Alcaraz, E. (2008). Risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in subjects from primary care units. A case-control study. *BMC Gastroenterology*, 8, 1–6. <http://doi.org/10.1186/1471-230X-8-44>

Chiappini, F., Barrier, A., Domart, M., Franc, B., Dagues, N., Azoulay, D., Lemoine, A. (2006). Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray, 154–165. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700374>

Cheng, H. Y., Wang, H. Y., Chang, W. H., Lin, S. C., Chu, C. H., Wang, T. E., Shih, S. C. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence, influence on age and sex, and relationship with metabolic syndrome and insulin resistance. *International Journal of Gerontology*, 7(4), 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijge.2013.03.008>

Cohen, J. C., Horton, J. D., & Hobbs, H. H. (2011). Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science*, 332(6037), 1519–1523. <https://doi.org/10.1126/science.1204265>

Cornier, M. A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., Eckel, R. H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 29(7), 777–822. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0024>

De La Rocha, C., Pérez-Mojica, J. E., León, S. Z. De, Cervantes-Paz, B., Tristán-Flores, F. E., Rodríguez-Ríos, D., Lund, G. (2016). Associations between whole peripheral blood fatty acids and DNA methylation in humans. *Scientific Reports*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep25867>

Del Campo, J. A., Gallego-Durán, R., Gallego, P., & Grande, L. (2018). Genetic and epigenetic regulation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 5–10. <https://doi.org/10.3390/ijms19030911>

Duseja, A., & Chawla, Y. K. (2014). Obesity and HGNA. *Clinics in Liver Disease*, 18(1), 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.09.002>

Gan, L., Chitturi, S., & Farrell, G. C. (2011). Mechanisms and implications of age-related changes in the liver: Nonalcoholic fatty liver disease in the elderly. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/831536>

García-Fernández, E., Rico-Cabanas, L., Estruch, R., Estruch, R., Estruch, R., & Bach-Faig, A. (2014). Mediterranean diet and cardiometabolic disease: A review. *Nutrients*, 6(9), 3474–3500. <https://doi.org/10.3390/nu6093474>

García, I., Jones, E., Ramos, M., Innis-Whitehouse, W., & Gilkerson, R. (2016). The little big genome: the organization of mitochondrial DNA. *Front. Front Biosci*, 22, 710–721. <https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000000256>. Prenatal

Grundey, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004). Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*, 109(3), 433–438. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6>

Jin, Z., & Liu, Y. (2018). DNA methylation in human diseases. *Genes and Diseases*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.01.002>

Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>

Kamfar, S., Alavian, S. M., Houshmand, M., Yadegarazari, R., Zarei, S. B., Khalaj, A., Saidijam, M. (2016). Liver Mitochondrial DNA Copy Number and Deletion Levels May Contribute to Nonalcoholic Fatty Liver Disease Susceptibility. *Hepat. Mon.*, 16(12), 1–7. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.40774>.Research

Kaur, J. (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practie*, 2014. Retrieved from <http://hindawi.com>

Kim, M., Long, T. I., Arakawa, K., Wang, R., Yu, M. C., & Laird, P. W. (2010). DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk. *PLoS ONE*, 5(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009692>

Kleiner, D. E. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease, pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Seminars in Liver Disease*, 32(1), 3–13.

Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313–1321. <http://doi.org/10.1002/hep.20701>

Koo, S.-H. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 19(3), 210. <https://doi.org/10.3350/cmh.2013.19.3.210>

Li, E., & Zhang, Y. (2017). DNA Methylation in Mammals.

Li, Y., Xu, C., Yu, C., Xu, L., & Miao, M. (2009). Association of serum uric acid level with non-alcoholic fatty liver disease: A cross-sectional study q. *Journal of Hepatology*, 50(5), 1029–1034. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.11.021>

Love-Osborne, K. A., Nadeau, K. J., Sheeder, J., Fenton, L. Z., & Zeitler, P. (2008). Presence of the Metabolic Syndrome in Obese Adolescents Predicts Impaired Glucose Tolerance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Adolescent Health*, 42(6), 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2007.11.136>

Ludwig, J, Viggiano, TR, McGill, DB, and Ott, BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980; 55: 434–438

Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Rizzetto, M. (n.d.). Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis, and the Metabolic Syndrome, 917–923. <http://doi.org/10.1053/jhep.2003.50161>

Masuoka, H. C., & Chalasani, N. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: An emerging threat to obese and diabetic individuals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281(1), 106–122. <https://doi.org/10.1111/nyas.12016>

Montier, L. L. C., Deng, J., & Bai, Y. (2016). Number, 36(3), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60099-5](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60099-5).Number

Moylan, C. A., Yang, H., Pang, H., Dellinger, A., Suzuki, A., Tillmann, H. L., Diehl, A. M. (2012). Epigenetic regulation of gene expression in HGNA. *Gastroenterology*, 142(5), S929. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(12\)63603-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(12)63603-8)

Nakajima, K., Nemoto, T., Muneyuki, T., Kakei, M., Fuchigami, H., & Munakata, H. (2011). Low serum amylase in association with metabolic syndrome and diabetes: A community-based study. *Cardiovasc Diabetol*, 10, 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-34>

Nemes, K., & Åberg, F. (2017). Interpreting lipoproteins in nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Lipidology*, 28(4), 355–360. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000427>

Ollikainen, M., Ismail, K., Gervin, K., Kylliäinen, A., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Kaprio, J. (2015). Genome-wide blood DNA methylation alterations at regulatory elements and heterochromatic regions in monozygotic twins discordant for obesity and liver fat. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0073-5>

Palmeira, C. M., & Rolo, A. P. (2014). Mitochondrial Regulation: Methods and Protocols. *Mitochondrial Regulation: Methods and Protocols*, 1–194.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1875-1>

Paschos, P., & Paletas, K. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia General Hospital of Thessaloniki*, 13(1), 9–19.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011578>

Pirola, C. J., Scian, R., Ferna, T., Rohr, C., Martino, J. S., Castan, G. O., & Sookoian, S. (2015). Epigenetic Modifications in the Biology of Nonalcoholic, 94(36), 1–10.

<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001480>

Rinella, M. E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease a systematic review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 313(22), 2263–2273.

<http://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>

Sánchez, I., Reynoso-Camacho, R., & Salgado, L. M. (2015). The diet-induced metabolic syndrome is accompanied by whole-genome epigenetic changes. *Genes and Nutrition*, 10(4). <https://doi.org/10.1007/s12263-015-0471-5>

Silva-Martínez, G. A., Rodríguez-Ríos, D., Alvarado-Caudillo, Y., Vaquero, A., Esteller, M., Carmona, F. J., Lund, G. (2016). Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome. *Epigenetics*, 11(5), 321–334.

<https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1161873>

D. A. Skuratovskaia, J. K. Sofronova, P. A. Zatolokin, K. Y. Popadin, M. A. Vasilenko, L. S. Litvinova & I. O. Mazunin (2018): Additional evidence of the link between mtDNA copy number and the body mass index, *Mitochondrial DNA Part A*, DOI: 10.1080/24701394.2018.1436170

Son, D., Le, N. T., Pannacciulli, N., Chen, K., Salbe, A. D., Hill, J. O., Krakoff, J. (2007). *NIH Public Access*, 86(3), 573–579.

<https://doi.org/10.1109/TMI.2012.2196707>. Separate



Sookoian, S., Rosselli, M. S., Gemma, C., Burgueño, A. L., Fernández Gianotti, T., Castaño, G. O. and Pirola, C. J. (2010), Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  promoter. *Hepatology*, 52: 1992-2000. doi:10.1002/hep.23927

Taanman, J. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication, 1410. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/106358/>

Tian, J., Zhong, R., Liu, C., Tang, Y., Gong, J., Chang, J., Miao, X. (2016). Association between bilirubin and risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease based on a prospective cohort study. *Scientific Reports*, 6(August), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep31006>

Vanni, E., Bugianesi, E., Kotronen, A., De Minicis, S., Yki-Järvinen, H., & Svegliati-Baroni, G. (2010). From the metabolic syndrome to HGNA or vice versa? *Digestive and Liver Disease*, 42(5), 320–330. <http://doi.org/10.1016/j.dld.2010.01.016>

Varriale, A. (2014). DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates: Facts and Challenges. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/475981>

Verma, S., Jensen, D., Hart, J., & Mohanty, S. R. (n.d.). Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (8), 11–13. <https://doi.org/10.1111/liv.12226>

Vítek, L. (2012). The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 3 APR(April), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00055>

Wei, Y., Rector, R. S., Thyfault, J. P., & Ibdah, J. A. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.*, 14(2), 193–199. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.193>

World Health Organization. (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). Recuperado de [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Wu, S., Zou, H., Zhu, G., Wang, L., & Zhang, Q. (2015). Increased Levels of Systolic Blood Pressure Within the Normal Range Are Associated with Significantly Elevated Risks of Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *94*(19), 1–8.

<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000842>

Wu, J., Zhang, R., Shen, F., Yang, R., Zhou, D., Cao, H., Fan, J. (2018). Altered DNA Methylation Sites in Peripheral Blood Leukocytes from Patients with Simple Steatosis and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Medical Science Monitor*, *24*, 6946–6967. <https://doi.org/10.12659/MSM.909747>

Wu, P., Chen, J., Lee, W., Ng, H., Lien, S., Tsai, P., Chiou, T. T. (2018). Oxidative Stress and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Hemodialysis Patients, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3961748>

Yin, H., & Blanchard, K. L. (2000). DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood*, *95*(1), 111–119.

Yki-Järvinen, H. (2016). Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (HGNA). *Diabetologia*, *59*(6), 1104–1111. <http://doi.org/10.1007/s00125-016-3944-1>

Yoshitaka, H., Hamaguchi, M., Kojima, T., Fukuda, T., Ohbora, A., & Fukui, M. (2017). Nonoverweight nonalcoholic fatty liver disease and incident cardiovascular disease, *18*(March), 1–5.

Zeybel, M., Hardy, T., Robinson, S. M., Fox, C., Anstee, Q. M., Ness, T., Mann, J. (2015). Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Clinical Epigenetics*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0056-6>

## X. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Datos generales						
Grupo	# de Individuo	SEXO	EDAD	DT2	PRESIÓN SISTÓLICA	PRESIÓN DIASTÓLICA
Experimental						
Control	8	M	43	2	112	62
Control	18	M	22	2	124	81
Control	19	M	39	2	135	85
Control	27	M	26	2	110	70
Control	41	M	43	2	111	71
Control	79	M	27	2	110	73
Control	97	M	18	2	110	71
Control	55	H	55	1	130	79
Control	13	M	56	2	115	67
Control	33	M	38	2	106	55
Control	34	M	25	2	117	81
Control	43	M	27	2	120	85
Control	69	M	41	2	104	60
Control	76	M	39	2	112	75
Control	82	M	21	2	110	74
Control	83	M	29	2	96	55
Control	86	M	54	2	113	69
Control	95	M	42	2	111	73
Control	98	M	34	2	104	58
Control	63	H	27	2	114	68
Control	12	M	38	2	117	65
Control	22	M	48	1	122	66
Control	29	M	63	2	105	53
Control	57	M	37	2	126	74
Control	89	M	32	2	117	70
Control	101	M	25	2	124	72
Control	28	H	57	2	120	80

Control	7	M	26	2	130	75
Control	51	M	22	2	135	95
Control	47	M	22	2	135	78
Control	105	M	26	2	130	85
Control	107	M	44	2	117	79
Control	109	M	29	2	111	64
HGNA	3	M	42	2	122	75
HGNA	9	M	38	2	112	79
HGNA	91	M	37	2	135	87
HGNA	100	M	18	2	108	80
HGNA	62	H	47	2	127	76
HGNA	93	H	58	2	133	81
HGNA	1	M	29	2	109	60
HGNA	14	M	45	2	115	66
HGNA	42	M	62	2	102	64
HGNA	68	M	36	2	113	66
HGNA	75	M	24	2	111	64
HGNA	78	M	34	2	111	66
HGNA	92	M	45	2	104	56
HGNA	36	M	32	2	148	78
HGNA	53	M	50	2	138	78
HGNA	50	M	35	2	136	89
HGNA	84	M	33	2	117	63
HGNA	112	H	43	1	117	75
HGNA	125	M	56	2	134	87
HGNA	126	M	39	2	108	47
HGNA	130	M	37	2	99	51
HGNA	148	M	33	2	96	58
HGNA	150	M	60	2	100	60
HGNA	155	M	52	2	100	52
SM	103	H	40	1	99	65
SM	30	M	35	2	115	76
SM	46	M	48	1	139	73

SM	88	M	61	2	140	61
SM	24	H	27	1	130	85
SM	71	M	43	2	112	68
SM	102	M	27	2	92	66
SM	110	M	62	2	135	90
SM	111	M	65	2	120	80
SM	118	M	40	2	126	87
SM	134	M	28	2	111	64
SM	139	M	58	2	160	92
SM	164	M	30	2	118	65
SM	171	M	46	2	115	75
HGNA & SM	72	M	54	1	112	74
HGNA & SM	25	M	34	2	125	80
HGNA & SM	52	M	45	1	142	83
HGNA & SM	5	M	29	1	116	74
HGNA & SM	26	M	55	2	158	87
HGNA & SM	31	M	47	1	113	76
HGNA & SM	54	M	51	2	143	95
HGNA & SM	67	M	63	1	135	63
HGNA & SM	45	H	57	1	130	80
HGNA & SM	6	M	40	2	130	85
HGNA & SM	37	M	29	2	127	62
HGNA & SM	39	M	58	2	140	85
HGNA & SM	49	M	41	1	114	72
HGNA & SM	61	M	46	1	120	70
HGNA & SM	77	M	36	2	130	76
HGNA & SM	80	M	44	2	155	93
HGNA & SM	90	M	24	2	100	60
HGNA & SM	94	M	50	1	113	65
HGNA & SM	106	M	30	2	106	45
HGNA & SM	70	H	50	2	132	72
HGNA & SM	73	H	46	2	139	95
HGNA & SM	113	M	46	2	123	69
HGNA & SM	121	M	49	1	106	72

HGNA & SM	<b>123</b>	M	53	2	156	64
HGNA & SM	<b>132</b>	M	51	2	134	75
HGNA & SM	<b>138</b>	H	47	1	140	65
HGNA & SM	<b>141</b>	M	37	2	154	80
HGNA & SM	<b>146</b>	H	50	2	124	77
HGNA & SM	<b>151</b>	M	39	2	122	78
HGNA & SM	<b>153</b>	M	31	2	110	75
HGNA & SM	<b>156</b>	M	38	1	118	65
HGNA & SM	<b>157</b>	M	31	2	121	83
HGNA & SM	<b>158</b>	M	50	2	120	80

En la columna Sexo, H son hombres y M mujeres, DT2: Diabetes Mellitus, DM el 1 simboliza la presencia de la enfermedad y el 2 que el paciente no lo presentaba.

Tabla S2. Datos antropométricos

Grupo	# de Individuo	Datos antropométricos									
		PESO(KG)	TALLA(M)	IMC	%AGUA	%MÚSCULO	%VISCERAL	CINTURA	CADERA	ICC	
Control	8	56.8	1.57	23.04	50	57		5	83	90	0.92
Control	18	55	1.64	20.45					73	75	0.97
Control	19	56.9	1.57	23.08	48	35.5		5	86	95	0.91
Control	27	56.1	1.57	22.76	50.8	36.7		3	86	88	0.98
Control	41	63.5	1.7	21.97	50.4	41.4		4	85	88	0.97
Control	79	51.6	1.52	22.33					85	88	0.97
Control	97	47	1.48	21.46					79	84	0.94
Control	55	64.4	1.63	24.24	55.4	47.1		10	87	89	0.98
Control	13	65	1.5	28.89		na	na		103	112	0.92
Control	33	66.1	1.58	26.48	49.8	42.3		5	101	103	0.98
Control	34	69.7	1.62	26.56	48.5	43.1		4	100	102	0.98
Control	43	64.8	1.52	28.05	46.9	39		5	90	94	0.96
Control	69	62.3	1.56	25.6	49.1	39.6		5	85	87	0.98
Control	76	74	1.65	27.18					103	105	0.98
Control	82	65.5	1.55	27.26	40.3	40.3		4	108	110	0.98
Control	83	65.6	1.57	26.61	52.3	43.9		3	109	111	0.98
Control	86	65	1.6	25.39					100	103	0.97
Control	95	62.1	1.52	26.88	49	39.4		5	88	92	0.96
Control	98	73	1.7	25.26					104	102	1.02
Control	63	67.7	1.51	29.69					85	87	0.98
Control	12	82	1.6	32.03	51.3	53.5		6	100	118	0.85
Control	22	71.4	1.52	30.9	46.4	43		8	95	99	0.96
Control	29	79.1	1.56	32.5					96	105	0.91
Control	57	88.3	1.58	35.37	42.8	47.9		10	99	97	1.02
Control	89	92.4	1.6	36.09					105	113	0.93
Control	101	84.4	1.6	32.97	43.7	46.6		7	105	107	0.98
Control	28	83.3	1.61	32.14	40.5	45.9		21	105	107	0.98

Control	7	69.6	1.61	26.85	47.7	41.8	5	91	96	0.95
Control	51	75.3	1.63	28.34	46.9	44.8	5	93	95	0.98
Control	47	84.3	1.57	34.2	39.2	48.6	7	105	107	0.98
Control	105	82.5	1.6	32.23	41	42.8	8	105	107	0.98
Control	107	54.7	1.46	25.66	52.9	37.8	5	83	85	0.98
Control	109	47	1.54	19.82	63.4	38.4	1	85	87	0.98
HGNA	3	42	1.62	16				78	83	0.94
HGNA	9	54.9	1.57	22.27	51.4	36.8	4	72	84	0.86
HGNA	91	59.3	1.72	20.04	51.3	39.3	3	83	85	0.98
HGNA	100	52.1	1.67	18.68	62.6	41.9	1	77	79	0.97
HGNA	62	67.7	1.51	29.69	54.4	48.9	10	89	90	0.99
HGNA	93	81.8	1.7	28.3	49.6	54.3	15	98	100	0.98
HGNA	1	95	1.62	36.2	41.3	49.4	10	104.5	111	0.94
HGNA	14	71.8	1.53	30.67	46.2	42.7	8	96	101	0.95
HGNA	42	81.7	1.51	35.83	59.6	41.6	14	107	115	0.93
HGNA	68	67.7	1.42	33.57	45.6	39.7	8	105	107	0.98
HGNA	75	87.2	1.65	32.03	41.8	46	7	108	110	0.98
HGNA	78	88	1.64	32.72				105	107	0.98
HGNA	92	82.5	1.6	32.23	44.4	46.8	9	108	110	0.98
HGNA	36	66.4	1.55	27.64	48.6	41.4	5	105	108	0.97
HGNA	53	71.6	1.56	29.42	44.9	41.5	9	106	109	0.97
HGNA	50	82.6	1.58	33.09	42.2	44.4	9	104	106	0.98
HGNA	84	92.6	1.59	36.63				130	132	0.98
HGNA	112	98	1.75	32				110	112	0.98
HGNA	125	62	1.57	25.15				103	105	0.98
HGNA	126	74	1.49	33.33				104	105	0.99
HGNA	130	78.5	1.5	34.89				103	113	0.91
HGNA	148	70	1.51	30.7				103	108	0.95
HGNA	150	70	1.6	27.34				107	108	0.99
HGNA	155	90	1.54	37.95				116	122	0.95
SM	103	68.4	1.56	28.11				102	105	0.97
SM	30	68.7	1.48	31.36	44.6	39.3	7	95	98	0.97
SM	46	76.7	1.55	31.93	43	42.4	10	105	110	0.95



SM	<b>88</b>	77.5	1.55	32.26				109	112	0.97
SM	<b>24</b>	85.6	1.63	32.22	40.2	43.5	8	106	110	0.96
SM	<b>71</b>	94.3	1.55	39.25				105	108	0.97
SM	<b>102</b>	70	1.5	31.11				107	110	0.97
SM	<b>110</b>	62	1.45	29.49				94	96	0.98
SM	<b>111</b>	58.3	1.62	22.21	44.5	34.7	8	94	96	0.98
SM	<b>118</b>	52.4	1.56	21.53	51.7	35.4	4	76	80	0.95
SM	<b>134</b>	73	1.7	25.26				102	105	0.97
SM	<b>139</b>	64.2	1.62	24.46				100	99	1.01
SM	<b>164</b>	90.8	1.5	40.36	44.7	51.2	10	111	124	0.9
SM	<b>171</b>	88.7	1.69	31.06				96	110	0.87
HGNA & SM	<b>72</b>	72.8	1.61	28.09	59.1	55	10	102	105	0.97
HGNA & SM	<b>25</b>	62.8	1.61	24.23	47.2	38.2	5	95	98	0.97
HGNA & SM	<b>52</b>	55.5	1.57	22.52	52.7	38.2	4	90	92	0.98
HGNA & SM	<b>5</b>	64.8	1.52	28.05	46.2	38.4	5	85	95	0.89
HGNA & SM	<b>26</b>	64.4	1.52	27.87	47.3	39.7	8	95	98	0.97
HGNA & SM	<b>31</b>	68.1	1.51	29.87	38.8	34.3	11	111	114	0.97
HGNA & SM	<b>54</b>	71.8	1.68	25.44	44.2	41.1	8	102	106	0.96
HGNA & SM	<b>67</b>	61.5	1.55	25.6	48.4	39.2	8	87	90	0.97
HGNA & SM	<b>45</b>	71.7	1.63	26.99	54	51	12	97	95	1.02
HGNA & SM	<b>6</b>	66	1.45	31.39	47.5	40.7	7	91	100	0.91
HGNA & SM	<b>37</b>	80.1	1.56	32.91	43.8	44.5	8	104	110	0.95
HGNA & SM	<b>39</b>	72.5	1.52	31.38	42.1	41.3	11	104	106	0.98
HGNA & SM	<b>49</b>	97.4	1.59	38.53	40.6	50.1	12	123	130	0.95
HGNA & SM	<b>61</b>	84	1.66	30.48				105	108	0.97
HGNA & SM	<b>77</b>	112	1.62	42.68				115	117	0.98
HGNA & SM	<b>80</b>	77.5	1.5	34.44	44.8	44.5	9	110	112	0.98
HGNA & SM	<b>90</b>	70	1.45	33.29				102	104	0.98
HGNA & SM	<b>94</b>	74.7	1.53	31.91	44.9	9	43.2	105	107	0.98
HGNA & SM	<b>106</b>	92.7	1.53	39.6	41.4	48.4	11	113	124	0.91
HGNA & SM	<b>70</b>	75.3	1.56	30.94				102	105	0.97
HGNA & SM	<b>73</b>	88.5	1.65	32.51				104	107	0.97
HGNA & SM	<b>113</b>	80	1.55	33.3				109	111	0.98

HGNA & SM	<b>121</b>	73.7	1.57	29.9	46.3	44	8	98	101	0.97
HGNA & SM	<b>123</b>	77	1.57	31.24				106	108	0.98
HGNA & SM	<b>132</b>	85.3	1.66	30.96	49.2	55.7	15	106	108	0.98
HGNA & SM	<b>138</b>	105.5	1.52	45.66				120	132	0.91
HGNA & SM	<b>141</b>	68.5	1.52	29.65				104	105	0.99
HGNA & SM	<b>146</b>	87.8	1.62	33.46				107	112	0.96
HGNA & SM	<b>151</b>	73	1.54	30.78				106	104	1.02
HGNA & SM	<b>153</b>	107	1.64	39.78				119	120	0.99
HGNA & SM	<b>156</b>	74	1.44	35.69				114	116	0.98
HGNA & SM	<b>157</b>	76	1.66	27.58				112	113	0.99
HGNA & SM	<b>158</b>	72	1.53	30.76				102	106	0.96

**ICC: Índice Cintura/Cadera**

Tabla S3. Datos bioquímicos										
Grupo	# de Individuo	GLUCOSA	UREA	CREATININA	COLESTEROL TOTAL	HDL	LDL	VLDL	TRIGLÍERIDOS	INDICE ATEROGÉNICO
Control	8	90	29	0.7	177	58	13.8	13.8	69	1.68
Control	18	90	28	0.9	131	39	78.8	13.2	66	3.36
Control	19	93	25	0.7	157	53	80.2	23.8	119	2.96
Control	27	81	39	0.7	145	45	90	12	60	3.22
Control	41	84	24	0.6	176	36	99.8	40.2	201	4.89
Control	79	86.3	19.23	0.8	122	36	72	14	68	3.39
Control	97	60	22.38	0.57	155.9	61.7	81.54	12.66	63.3	2.53
Control	55	113	28.3	0.69	119	38.4	71.1	22.8	114	3.1
Control	13	94	43	0.6	137	53	67.2	16.8	84	2.58
Control	33	79	26	0.6	103.3	53.2	36.26	13.84	133	1.94
Control	34	93	27	0.7	134	31	91	12	60	4.32
Control	43	89	26	0.6	155	39	107	9	46	3.97
Control	69	94	38	0.9	190	51.7	104.64	33.66	168.3	3.68
Control	76	102	27	0.7	184.8	63	68.5	53.3	266.5	2.93
Control	82	72	21	0.6	139	34	81.6	23.4	117	4.09
Control	83	98.4	10.21	0.86	151.4	48.6	84.72	18.08	90.4	3.12
Control	86	93.2	10.87	1.24	146.5	50.5	75.92	20.08	100.4	2.9
Control	95	92	11.21	0.64	128.6	40	68	20	102.2	3.22
Control	98	94.6	12.99	0.66	161	54.4	92.7	13.9	69.5	2.96
Control	63	102	36.7	0.63	126	35	76.2	14.8	74	3.6
Control	12	84	28	0.8	218	42	149.9	26.4	133	5.19
Control	22	134	24	0.6	190	59	109.2	21.8	109	3.22
Control	29	107	32.1	0.7	130	32	88.2	23.8	141	4.06
Control	57	104	30.9	0.8	237	45	171	21	105	5.27
Control	89	79.8	10.75	0.52	186.7	45.8	119.26	21.64	108.2	4.08
Control	101	84.3	20	0.53	127.6	43.5	69.54	14.56	72.8	2.93
Control	28	95	32	0.8	189	45	120.6	23.6	117	4.2
Control	7	88	23	0.8	122	40	60.4	21.6	108	3.05
Control	51	95	20.8	0.8	122	30.7	81.6	24.4	122	3.97
Control	47	85	15.3	0.67	19.8	29.9	160.4	21.8	109	0.66
Control	105	72.3	17	0.62	148.6	33	86.68	28.92	144.6	4.5
Control	107	73.6	9.95	0.73	137.5	26	72.86	38.64	193.2	5.29
Control	109	83.9	24	0.58	145	57.7	75	12.8	64.2	2.51
HGNA	3	93	35	0.7	192	69	91.4	9.6	65	2.78

HGNA	<b>9</b>	107	23	0.8	208	52	130.8	25.2	126	4
HGNA	<b>91</b>	74.7	9.84	0.67	154.6	49.4	92.42	12.78	63.9	3.13
HGNA	<b>100</b>	88	31.9	0.8	132	51.1	78.9	11.6	58	2.58
HGNA	<b>62</b>	88	23.3	0.77	154	42.5	105.6	27.2	136	3.62
HGNA	<b>93</b>	88	33	1.1	198	47	81	69.4	347	4.21
HGNA	<b>1</b>	89	23	0.7	163	54	88	21	105	3.02
HGNA	<b>14</b>	89	27	0.7	235	53	162.4	19.6	98	4.43
HGNA	<b>42</b>	106	29	0.6	165	31	101	12	100	3.17
HGNA	<b>68</b>	93	37.9	0.53	129	39.9	90.1	16.6	83	3.23
HGNA	<b>75</b>	87	13	0.64	155.56	49.7	86.34	19.56	97.8	3.13
HGNA	<b>78</b>	95	16.04	0.89	104.3	54.2	36.26	13.84	69.2	1.92
HGNA	<b>92</b>	84.7	11.22	1.17	180.3	36.6	119.26	24.44	122.2	4.93
HGNA	<b>36</b>	93	34	0.7	134	47	78	9	44	2.85
HGNA	<b>53</b>	93	47	0.8	227	59	130	38	190	3.85
HGNA	<b>50</b>	61	29.8	1.1	116	35	68.4	12.6	63	3.31
HGNA	<b>84</b>	89	24	0.7	146	58	67.6	20.4	102	2.52
HGNA	<b>112</b>	121.6	23	1.23	139.6	58.9	61.72	18.98	94.9	2.37
HGNA	<b>125</b>	79.2	8.5	0.73	178.5	45.2	107.74	25.56	127.8	3.95
HGNA	<b>126</b>	95	31	0.8	175.5	64.3	81.86	29.34	146.7	2.73
HGNA	<b>130</b>	98	18.9	0.7	193	51.3	124.68	17.22	86.1	3.76
HGNA	<b>148</b>	107	16.66	0.63	186.6	33.5	128.68	24.42	122.1	5.57
HGNA	<b>150</b>	89.9	11.91	1.21	259.9	55.5	156.1	7.49	241.5	4.68
HGNA	<b>155</b>	83	31	1.44	229.1	59.5	144.06	25.54	127.7	3.85
SM	<b>103</b>	119	11.8	0.66	171.5	32.4	92.8	46.3	231.5	5.29
SM	<b>30</b>	93	28	0.8	138	26	77.6	34.4	172	5.31
SM	<b>46</b>	121	29	0.7	195	41	124	30	150	4.76
SM	<b>88</b>	79.2	26.79	1.18	166.1	49.1	63.5	53.5	267.5	3.38
SM	<b>24</b>	120	34	0.7	149	33	55.4	60.6	303	4.52
SM	<b>71</b>	92	22.4	0.83	192	39	88.2	64.8	324	4.92
SM	<b>102</b>	87.6	20	0.62	192.9	42.1	117.92	32.88	164.4	4.58
SM	<b>110</b>	104	31.2	0.78	238	29	163.4	45.6	228	8.21
SM	<b>111</b>	108	42	1.05	149.4	48.7	83.64	17.06	85.3	3.07
SM	<b>118</b>	93	29	0.6	137	37	61	39	195	3.7

SM	134	69.4	14	0.61	191	46	108	37	186	2.29
SM	139	88.9	27	0.82	131.3	43.6	72.2	15.5	77.5	3.01
SM	164	72.4	13	0.57	222	31	35.22	155.78	778.9	7.16
SM	171	92	31.4	0.7	191.5	38.6	128.24	24.66	164	4.96
HGNA & SM	72	96.9	21.37	0.7	234	44	170	20	104	5.32
HGNA & SM	25	93	34	0.6	165	45	88.6	31.4	157	3.67
HGNA & SM	52	110	29	0.6	180	29	136.6	65	72	6.21
HGNA & SM	5	120	20	0.7	200	42	109.8	48.2	241	4.76
HGNA & SM	26	97	30	0.6	158	39	94.6	27.4	356	4.05
HGNA & SM	31	132	28	0.5	177	37	98.8	41.2	206	4.78
HGNA & SM	54	103	30	0.76	191	27	123.6	40.4	202	7.07
HGNA & SM	67	123	16	0.5	162	33	58.6	70.4	360	4.91
HGNA & SM	45	158	27	0.9	198	38	98.6	61.4	307	5.21
HGNA & SM	6	106	26	0.7	189	40	109.8	39.2	196	4.73
HGNA & SM	37	100	20	0.6	152	44	75.2	32.8	164	3.45
HGNA & SM	39	112	23	0.7	209	27	133	49	246	7.74
HGNA & SM	49	146	12.3	0.59	168	35	60.6	72.4	362	4.8
HGNA & SM	61	144	28.6	0.66	134	39.8	87.2	20	100	3.37
HGNA & SM	77	84	28	0.7	204	45	92	67	339	4.53
HGNA & SM	80	91.4			177.4	42.2	82.48	52.72	263.6	4.2
HGNA & SM	90	96.7	8.13	1.08	206.1	45.5	92.62	67.98	339.9	4.53
HGNA & SM	94	157	24.2	0.65	196	31	139	26	130	6.32
HGNA & SM	106	81.8	20	0.65	159	24	93.06	41.94	209.7	6.63
HGNA & SM	70	129	36	0.8	197	33	132.4	31.6	154	5.97
HGNA & SM	73	88.6	24.46	0.94	168	39.8	87.34	40.86	204.3	4.22
HGNA & SM	113	83.9	33	0.52	156.2	48.1	72.5	35.6	178	3.25
HGNA & SM	121	111	29	0.6	158	67	48	43	215	2.36
HGNA & SM	123	98	35	1	255	42	148.2	64.8	324	6.07
HGNA & SM	132	103.4	13.2	1.29	137.2	42.9	56.18	38.18	190.6	3.2
HGNA & SM	138	123	31	0.8	208.8	38.7	84.8	85.3	426.5	5.4
HGNA & SM	141	113.1	19	0.62	183.1	46.7	114.92	21.48	107.4	3.92
HGNA & SM	146	81.7	45	0.85	142	36.2	71.08	34.72	173.6	3.92
HGNA & SM	151	80.1	30	0.74	129.1	30.6	58.62	39.88	199.4	4.22
HGNA & SM	153	80	23.9	1.21	194.4	39.8	119.66	34.94	174.7	4.88
HGNA & SM	156	114.1	12.1	0.52	175.1	49.7	96.68	28.72	143.6	3.52
HGNA & SM	157	92	19	0.8	190	42	108	39.8	199	4.52
HGNA & SM	158	91.9	37	0.81	204.5	38.9	116.24	49.36	246.8	5.26

Tabla S3. Datos bioquímicos														
Grupo	# de Individuo	RELAC LDL/HDL	BT	BD	BI	ÁCIDO ÚRICO	AST	ALT	GGT	FOSFATASA ALCALINA	AMILASA	LIPASA	ALBUMINA	GLOBULINA
Control	8	0.13	0.4	0.3	0.1	4.4	41	27	19	80	82	89	4.5	2.3
Control	18	2.02	0.7	0.2	0.5	6.1	14	21	11	57	47	53	4.9	2.8
Control	19	1.51	0.4	0.2	0.2		20	23	10	90	60	185	4.3	3.4
Control	27	2	0.4	0.2	0.2	4	20	24	13	81	83	61	4	3.6
Control	41	2.77	0.3	0.3	0	3.4	17	40		89	68	36	4.3	2.9
Control	79	2	0.31	0.06	0.25		19.1	28.8		97.1			4.61	2.85
Control	97	1.32	0.34	0.07	0.27	3.4	12	10	8.6	60	48.1	23.8	4.07	2.53
Control	55	1.85	0.58	0.24	0.3	3.9	20	24	33	60			5	2
Control	13	1.27	0.8	0.2	0.6	5.3	36	21	46	89	32	63	4.4	2.7
Control	33	0.68	0.8	0.5	0.3		19	21	13	48			4.2	3
Control	34	2.94	0.7	0.4	0.3	3.9	46	62	33	72	38	26	4.4	3.8
Control	43	2.74	0.7	0.6	0.1	5.3	23	30	13	93			3.9	
Control	69	2.02	0.5	0.3	0.2	4.85	24	32	31.9	75	59.9	40.9	4.65	3.39
Control	76	1.09	0.69	0.13	0.56	6.5	20.9	23	153.5	83.2	60.7	14.9	4.4	2.9
Control	82	2.4	0.57	0.1	0.47	3.4	20	39	24	45	76.4	23.7	4.52	2.65
Control	83	1.74	0.53	0.07	0.46	4.07	25	13.1	27	81.7	45.7	28.8	4.53	3.11
Control	86	1.5	0.6	0.16	0.44	4.75	184	225.6	214.1	145.39			3.72	4.47
Control	95	1.7	0.69	0.13	0.56	3.9	27.9	20.9	34.1	90	54		4.2	3.4
Control	98	1.7	0.86	0.13	0.73	4.02	15.03	13.5	12.7	100.7	44.6	16.8	4.61	2.99
Control	63	2.18	0.48	0.1	0.38	2.6	22	31	19	120	56	34	4.38	3.03
Control	12	3.57	0.4	0.3	0.1		32	39	26	99	57	66	4.4	3.2
Control	22	1.85	0.8	0.2	0.6	3.8	24	31	17	138	78	208	4.2	2.8
Control	29	2.76	0.6	0.3	0.3	5.3	23	26	12	17	92	53	3.9	4.5
Control	57	3.8	0.64	0.41	0.23	4	19	23.3	15		27	105		
Control	89	2.6	1.14	0.17	0.97	5.1	13.2	17.4	14.8	73	27.9	19.7	4.05	2.84
Control	101	1.6	0.42	0.09	0.33	4.68	16.7	16.8	16.8	88.1	36.9	20.1	4.28	3.39
Control	28	2.68	0.3	0.2	0.1	5.1	25	45	44	113	118	85	4.3	3.2
Control	7	1.51	0.4	0.3	0.1	6.9	29	19	12	65	48	128	5.2	3.4
Control	51	2.66	0.48	0.19	0.3	4.6	21	19	61	86	46	25.3	4.6	2.2
Control	47	5.36	0.36	0.12	0.2	6	20	23	28	94			4.4	3
Control	105	2.63	0.28	0.06	0.22	3.97	18.3	15	21.7	47.3	37.8	22.3	4.12	3.2
Control	107	2.8	0.36	0.07	0.29		22.7	25.6	12.8	91.2			3.97	2.41

Control	109	1.3	0.64	0.13	0.51	3.54	11.8	8.2	7.5	126.8	68.8	15.6	4.41	2.82
HGNA	3	1.32	0.5	0.3	0.2	4.5	23	33	15	62	58	245	4.7	2.6
HGNA	9	2.52	0.7	0.4	0.3	5.8	51	36	41	128	97	114	5.1	3.6
HGNA	91	1.87	0.62	0.16	0.46	3.79	15.2	20.8	25.7	65.3	65.9	29.8	4.33	4.2
HGNA	100	1.54	0.54	0.21	0.3	5.1	17	12	4	127			5	2.7
HGNA	62	2.48	0.69	0.23	0.5	4.3	21	25	80	126	80	29	4.8	2.3
HGNA	93	1.72	0.5	0.2	0.3	5.2	52	21	34.9	57.4	77.6		4.6	2.84
HGNA	1	1.63	0.5	0.3	0.2	6.5	21	34	16	95	39	28	4.5	3.3
HGNA	14	3.06	0.5	0.2	0.3	3.8	37	54	42	139	69	150	4.3	3.1
HGNA	42	1.94	0.8	0.2	0.6	3.3	24	27	136	133	69	29	4.1	3.16
HGNA	68	2.26	1.22	0.38	0.8	3.4	23	24	88	87			4.5	2.4
HGNA	75	1.74	0.6	0.4	0.2	4.71	35	44	35	70	56.9	32.3	4.42	3.22
HGNA	78	0.67	0.85	0.22	0.63	5.78	20.3	25.1	186	76.5	40.8	19.2	4.27	3.14
HGNA	92	3.26	0.87	0.13	0.74	4.74	18.5	11.6	160.6	100.4			4.07	2.71
HGNA	36	1.66	0.6	0.5	0.1		30	44	29	61			4	3.4
HGNA	53	2.2	0.6	0.5	0.1		33	54	45	104			4.2	3.2
HGNA	50	1.95	0.5	0.2	0.3		14	11	17	68	65	29	4.17	2.75
HGNA	84	1.17	0.8	0.4	0.4		25	20	63	122			4.1	3.1
HGNA	112	1.05	2.08	0.51	1.57		142	97.3	45	88.4	35.2	29.5	4.76	3.46
HGNA	125	2.38	1.04	0.16	0.88		22.2	25.6	18.8	104.7	17.2	21.5	4.4	3.04
HGNA	126	1.27	0.7	0.4	0.3	5.2	16	27	10.7	66	43	42	4.1	2.9
HGNA	130	2.43	0.64	0.1	0.54	6.4	22	16	20.7	92	84	13	3.78	3.02
HGNA	148	3.84	0.69	0.13	0.56	6.39	17.3	16.7	21.1	57.9			4.17	2.7
HGNA	150	2.81	0.64	0.09	0.55	6.03	21.3	21.3	27.7	161.5			4.42	3.08
HGNA	155	2.42	0.36	0.07	0.29	5.2	24.2	15.7	18	45.6	41.4	22.9	4.61	2.98
SM	103	2.86	0.45	0.09	0.15	6.64	69.3	18.4	23.8	137	44.2	17.2	4.48	3.14
SM	30	2.98	0.1	0.1	0	3.2	29	72	73	127	31	34	3.7	3.6
SM	46	3.02	0.6	0.5	0.1	5.6	35	58	47	111	58	42	4	3.4
SM	88	1.29	0.32	0.05	0.27	4.49	18.1	16	19.3	119.2	40.9	47.3	3.75	3.23
SM	24	1.68	0.4	0.4	0	3.6	35	40	33	91			4.2	3.3
SM	71	2.26	0.42	0.27	0.15		18	10.6	41	96			4.4	2.78
SM	102	2.8	0.41	0.08	0.33	4.19	16.6	29.6	5	88.1	35.1	25.9	4.37	3.07
SM	110	5.63	0.45	0.39	0.06	4.92	13.6	14.6	34.6	90.1	56.5	51	4.44	4.08
SM	111	1.72	0.4	0.26	1.4	4.4	26.1	16.8	17	90	45.2	32.5	5.08	2.6
SM	118	1.65	0.45	0.11	0.36	4.3	16	26.9	42	111	56	112	4.3	3
SM	134	1.5	0.55	0.12	0.43	3.62	14.7	16	17.6	92.4			4.55	2.24
SM	139	1.65	0.57	0.12	0.45	4.16	26	31.1		150.1	46	24.7	4.56	3.33
SM	164	1.14	0.62	0.12	0.5	4.67	18.1	10.6	28	86.3	18.5	20.2	4.32	3.16
SM	171	3.32	0.28	0.03	0.25	3.8	14.6	10.5	14.3	88	32.4	33.8	3.98	2.46

HGNA & SM	72	3.86	0.65	0.12	0.53	4.8	30	23	14	90				
HGNA & SM	25	1.97	0.5	0.3	0.2	4.9	20	27	15	98	84	69	4.6	3.2
HGNA & SM	52	4.71	0.41	0.33	0.08	4.2	43	29	41	115	65	21.7	4.55	2.58
HGNA & SM	5	2.61	0.4	0.3	0.1	5.8	20	37	14	115	55	54	4.5	3.3
HGNA & SM	26	2.43	0.6	0.3	0.3	3.3	20	27	21	88	52	109	4.2	
HGNA & SM	31	2.67	0.9	0.6	0.3	4.7	52	21	176	142	43	48	5.4	3.2
HGNA & SM	54	4.58	0.49	0.3	0.19	5.4	66	34.2	48	94	76	39	4.76	3.44
HGNA & SM	67	1.78	0.5	0.4	0.1	2.8	28	27	55	112			3.73	3.43
HGNA & SM	45	2.59	0.7	0.6	0.1		43	73	165	112	81	47	4.69	
HGNA & SM	6	2.75	0.5	0.4	0.1	4.9	35	21	15	100	41	135	4.4	3.7
HGNA & SM	37	1.71	0.6	0.5	0.1		15	21	17	121	38	41	4	3.4
HGNA & SM	39	4.93	0.7	0.2	0.5		52	62	85	122				
HGNA & SM	49	1.73	0.2	0.1	0.1	5.1	36	49	85		60	34	4.83	2.61
HGNA & SM	61	2.19	0.23	0.13	0.1	5.1	13	18	19	76			4	2.3
HGNA & SM	77	2.04	0.69	0.15	0.54	7	99.6	94.7	36.1	91	35	83	4.4	3.7
HGNA & SM	80	1.95	0.41	0.6	0.35		19.3	26	56.3	107.5	47.8	37.3	3.67	2.86
HGNA & SM	90	2.04	0.33	0.1	0.3	4.94	18.6	16.6	14	62.1	26.5	21.9	3.32	2.81
HGNA & SM	94	4.48	0.58	0.33	0.25	5.5	15.4	15.8	32	88	29.8	22.8	4.11	3.3
HGNA & SM	106	3.88	0.48	0.08	0.4	6.36	14.1	14.1	20.5	86.4	31.6	22.1	4.29	3.2
HGNA & SM	70	4.01	0.6	0.3	0.3	5.5	32	44	31	113	30.2	19.4	4.7	3.3
HGNA & SM	73	2.19	1.08	0.17	0.91		62.8	97.6	73.8	86.1	34.7	9.34	4.21	3.13
HGNA & SM	113	1.51	0.38	0.07	0.31	4.35	28.2	43.9	32	66.3	32.8	31.1	4.27	3
HGNA & SM	121	0.72	0.7	0.6	0.1		36	24	206.6	106.1	37.5	18.9	4.02	3.48
HGNA & SM	123	3.53	0.7	0.7	0	6.44	44	36	185	101	45	47	4.8	2.91
HGNA & SM	132	1.31	0.6	0.12	0.48	4.41	12.7	17.8	23	75.6	52.1	14.2	4.2	2.59
HGNA & SM	138	2.19	0.45	0.09	0.36		18.7	29.1	54	45.1	45.2	3.94	1.85	2.13
HGNA & SM	141	2.46	0.33	0.07	0.26	5.19	16.8	18.8	17.8	83.7	33.9	18.4	4.02	2.88
HGNA & SM	146	1.96	0.65	0.14	0.51	5	13.2	19.3	352.1	73.3	18		4.12	2.89
HGNA & SM	151	1.92	0.46	0.09	0.37		18.3	21.1	27.9	86.5	23.1	20.2	4.11	3.07
HGNA & SM	153	3.01	0.44	0.24	0.2	5.9	19.9	37	24.5	271	32.9	20.2	4.34	0.08
HGNA & SM	156	1.95	0.76	0.12	0.64	4.87	29.1	17	22.7	89.4	23.5	16.4	4.12	3.12
HGNA & SM	157	2.57	0.51	0.09	0.42		24.2	35.2	65.9	67			4.36	3.31
HGNA & SM	158	2.99	0.38	0.07	0.31	4.17	33.9	33.2	17.5	84.8			4.12	3.53



**Tabla S4. Concentraciones de las muestras de ADN en sangre y biopsia.**

Folio	Ng/ul ADN totales	
	Biopsia hígado	Sangre
8	942.1	71.9
18	80	158.6
19	659.1	125
27	41.6	603.7
41	674.8	121.6
79	505.2	93.5
97	91.6	258
55	109	238.1
13	526	172.9
33	584	124.5
34	247.1	242.8
43	160.4	92.6
69	257.5	288.5
76	268.3	438.2
82	192.3	772.5
83	83	744
86	114.5	1215
95	157.4	291.5
98	142.7	604.5
63	251.4	422.5
12	204.4	417.8
22	180.3	638.6
29	246.9	175.9
57	53.8	594.2
89	475.5	213.4
101	401.3	416.7
28	277.1	166.2
3	140.1	206.4
9	431.6	208.4
91	731.5	339.6
100	273.7	370.9
72	169.5	274.2
62	175.3	765.5
93	344.3	522.4
1	1209.7	175.2
14	143.8	263.5
42	2147.9	979.7
68	588.4	218.6
75	1828.9	98.3

78	39.7	479.1
92	489.1	589.6
7	232	258.8
51	2220.1	222.6
103	578	2554.4
30	309.4	154
46	250.3	301.9
47	505.9	361.9
88	984.9	560.1
24	66.5	437.3
25	448.5	467
52	253.2	83
5	212.5	285.3
26	438.3	426.1
31	1217.7	284.9
36	106	3168.1
53	93	425.6
54	558.9	248.4
67	1550.4	555.3
45	576.8	970.5
6	350.6	101.6
37	1083.9	167.3
39	1009.4	150.7
49	2236.9	108.8
61	1066.1	197
77	405.7	112.8
80	141	179.1
90	591.8	158.9
94	475.3	178.5
106	1334.4	217
50	1135.9	249.4
70	87.6	99.8
73	91.3	263.1
71	111.4	273.9
84	74.2	309.2
102	443.8	186.8
105	310	149.8
107	751.6	285.3
109	1159.1	122.3
110	14.2	348
111	230.1	98.9
112	339	834.7
113	130.3	142
118	576.4	1075.9
121	190	280.4

<b>123</b>	143.8	434
<b>125</b>	37.2	532.9
<b>126</b>	762.8	654.2
<b>130</b>	195.5	427
<b>132</b>	127.2	392
<b>134</b>	166.5	445.6
<b>138</b>	219.3	345.2
<b>139</b>	21.3	438.9
<b>141</b>	143.4	218.6
<b>146</b>	149.4	365
<b>148</b>	91.4	541.9
<b>150</b>	82.8	2630.6
<b>151</b>	776.3	402.9
<b>153</b>	2708	252.6
<b>155</b>	789	656.8
<b>156</b>	208	222.5
<b>157</b>	92	376.6
<b>158</b>	475	386.2
<b>164</b>	220	428.5
<b>171</b>	769.7	462.8

**Tabla S5. Cuantificación del mtADN en sangre.**

<b>FOLIO</b>	<b>PCR1</b>		<b>PCR2</b>		<b>Promedio</b>
	<b>C.1</b>	<b>C.1</b>	<b>C.1</b>	<b>C.2</b>	
<b>8</b>	410	355.92	352.5	354.21	368.1575
<b>18</b>	-17	555.83	576.5	566.17	420.375
<b>19</b>	-96	353.5	762.5	558	394.5
<b>27</b>	3290	409.75	597	503.38	1200.033
<b>41</b>	7728	242.17	477	359.58	2201.688
<b>79</b>	418	922.5	329	625.75	573.8125
<b>97</b>	232	95.17	420	257.58	251.1875
<b>55</b>	1100	516.58	0	258.29	468.7175
<b>13</b>	607	563.67	483	523.33	544.25
<b>33</b>	182	766.92	1040	903.46	723.095
<b>34</b>	474	332.08	543.5	437.79	446.8425
<b>43</b>	248	521.83	363	442.42	393.8125
<b>69</b>	-8	649.75	204.5	427.13	318.345
<b>76</b>	823	877.08	612	744.54	764.155
<b>82</b>	665	806.08	707.5	756.79	733.8425
<b>83</b>	124	664.08	434	549.04	442.78
<b>86</b>	503	904.92	287	595.96	572.72
<b>95</b>	-215	553	683	618	409.75
<b>98</b>	54	659.33	512	585.67	452.75
<b>63</b>	660	1852.08	897	1374.54	1195.905
<b>12</b>	204	859.33	586.5	722.92	593.1875
<b>22</b>	405	594.25	1063.5	828.88	722.9075
<b>29</b>	-81	379.08	517.5	448.29	315.9675
<b>57</b>	168	850.58	939	894.79	713.0925
<b>89</b>	903	871.75	610.5	741.13	781.595
<b>101</b>	316	467.42	255	361.21	349.9075
<b>28</b>	345	702.42	130	416.21	398.4075
<b>3</b>	477	1073.5	96	584.75	557.8125
<b>9</b>	444	604.33	1003	803.67	713.75
<b>91</b>	181	660.17	273	466.58	395.1875
<b>100</b>	450	317.08	274	295.54	334.155
<b>72</b>	92	1332	1870	1601	1223.75
<b>62</b>	158	767.33	397.5	582.42	476.3125
<b>93</b>	67	339.58	204	271.79	220.5925
<b>1</b>	848	722.58	347.5	535.04	613.28
<b>14</b>	333	999.5	435	717.25	621.1875
<b>42</b>	440	807.17	711.5	759.33	679.5
<b>68</b>	508	527.5	646	586.75	567.0625

<b>75</b>	415	1020.58	780.5	900.54	779.155
<b>78</b>	206	861	849.5	855.25	692.9375
<b>92</b>	857	830.92	859	844.96	847.97
<b>7</b>	-322	611.92	504	557.96	337.97
<b>51</b>	67	955.83	403.5	679.67	526.5
<b>103</b>	-15	348.58	642	495.29	367.7175
<b>30</b>	559	899.42	857.5	878.46	798.595
<b>46</b>	380	589	617	603	547.25
<b>47</b>	244	547.83	777	662.42	557.8125
<b>88</b>	204	440	767	603.5	503.625
<b>24</b>	259	298.83	249.5	274.17	270.375
<b>25</b>	359	1191.83	1083	1137.42	942.8125
<b>52</b>	75	302.83	410.5	356.67	286.25
<b>5</b>	212	582	376.5	479.25	412.4375
<b>26</b>	1003	1171.67	875.5	1023.58	1018.438
<b>31</b>	428	871.08	843	857.04	749.78
<b>36</b>	288	368.67	331.5	350.08	334.5625
<b>53</b>	234	305.25	627	466.13	408.095
<b>54</b>	298	848.17	262	555.08	490.8125
<b>67</b>	571	357.58	670	513.79	528.0925
<b>45</b>	1289	977.33	555.5	766.42	897.0625
<b>6</b>	409	393.42	166.5	279.96	312.22
<b>37</b>	417	286.92	661.5	474.21	459.9075
<b>39</b>	752	1504.58	276.5	890.54	855.905
<b>49</b>	3694	496.42	365.5	430.96	1246.72
<b>61</b>	3722	809.33	519.5	664.42	1428.813
<b>77</b>	1607	905.17	741.5	823.33	1019.25
<b>80</b>	603	691.92	263.5	477.71	509.0325
<b>90</b>	977	483.83	2178.5	1331.17	1242.625
<b>94</b>	540	560.58	917.5	739.04	689.28
<b>106</b>	1598	774.25	621	697.63	922.72
<b>50</b>	1461	597.17	934	765.58	939.4375
<b>70</b>	1226	337.75	479	408.38	612.7825
<b>73</b>	1509	457.75	448.5	453.13	717.095
<b>71</b>	130.23	130.23	130.2	130.23	130.2225
<b>84</b>	340.38	340.38	340.4	340.38	340.385
<b>102</b>	343.65	343.65	343.7	343.65	343.6625
<b>105</b>	280.68	280.68	280.7	280.68	280.685
<b>107</b>	236.79	236.79	236.8	236.79	236.7925
<b>109</b>	259.74	259.74	259.7	259.74	259.73
<b>110</b>	271.08	271.08	271.1	271.08	271.085

<b>111</b>	267.29	267.29	267.3	267.29	267.2925
<b>112</b>	301.7	301.7	301.7	301.7	301.7
<b>113</b>	350.37	350.37	350.4	350.37	350.3775
<b>118</b>	306.13	306.13	306.1	306.13	306.1225
<b>121</b>	310.49	310.49	310.5	310.49	310.4925
<b>123</b>	266.31	266.31	266.3	266.31	266.3075
<b>125</b>	229.94	229.94	229.9	229.94	229.93
<b>126</b>	475.14	475.14	475.1	475.14	475.13
<b>130</b>	444.1	444.1	444.1	444.1	444.1
<b>132</b>	467.94	467.94	467.9	467.94	467.93
<b>134</b>	603.09	603.09	603.1	603.09	603.0925
<b>138</b>	351.04	351.04	351	351.04	351.03
<b>139</b>	283.27	283.27	283.3	283.27	283.2775
<b>141</b>	212.86	212.86	212.9	212.86	212.87
<b>146</b>	272.1	272.1	272.1	272.1	272.1
<b>148</b>	265.83	265.83	265.8	265.83	265.8225
<b>150</b>	348.71	348.71	348.7	348.71	348.7075
<b>151</b>	301.96	301.96	302	301.96	301.97
<b>153</b>	307.66	307.66	307.7	307.66	307.67
<b>155</b>	318.98	318.98	319	318.98	318.985
<b>156</b>	343.06	343.06	343.1	343.06	343.07
<b>157</b>	279.44	279.44	279.4	279.44	279.43
<b>158</b>	413.15	413.15	413.2	413.15	413.1625
<b>164</b>	356.14	356.14	356.1	356.14	356.13
<b>171</b>	529.75	529.75	529.8	529.75	529.7625
Promedio	577.25	563.71	509.84	536.77	546.89

*C.1 y C.2 = Los valores de XX por duplicado de dos PCRs independientes (PCR1 y PCR2).*

Tabla S6. Cuantificación del ncADNmt en biopsia de hígado.

#Muestra	PCR 1		PCR2		Promedio
	C.1	C.2	C.1	C.2	
8	4503	4009.5	7422	7395	5832.375
18	829	335.5	1576	670	852.625
19	5112.5	4619	9761	7235	6681.875
27	ND	ND	ND	ND	ND
41	8870	8376.5	17117	13892	12063.875
79	7594.5	7101	15636	12120	10612.875
97	14950	14456.5	28282	24703	20597.875
55	4587	4093.5	10329	7096	6526.375
13	9597	9103.5	19119	15551	13342.625
33	6264	5770.5	10686	10368	8272.125
34	7190.5	6697	12356	13752	9998.875
43	2291.5	1798	3129	3268	2621.625
69	4362.5	3869	9485	7465	6295.375
76	5898.5	5405	10830	10452	8146.375
82	9125.5	8632	17405	16026	12797.125
83	12043	11549.5	22266	21190	16762.125
86	10868.5	10375	21613	18462	15329.625
95	11034.5	10541	22963	17422	15490.125
98	15275	14781.5	28266	27283	21401.375
63	10375	9881.5	19406	18581	14560.875
12	11939	11445.5	17545	23130	16014.875
22	11083.5	10590	20561	19194	15357.125
29	12908	12414.5	22278	22133	17433.375
57	18324.5	17831	34634	31716	25626.375
89	11333	10839.5	20094	18408	15168.625
101	11048	10554.5	23992	20972	16641.625
28	8536.5	8043	17830	12023	11608.125
3	6921.5	6428	12900	11487	9434.125
9	4387.5	3894	7960	7424	5916.375
91	ND	ND	ND	ND	ND
100	8620.5	8127	14416	15654	11704.375
72	4520.5	4027	8080	8431	6264.625
62	10522	10028.5	19739	21246	15383.875
93	9200	8706.5	17338	16158	12850.625
1	12013.5	11520	23074	24150	17689.375

<b>14</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>42</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>68</b>	6625.5	6132	11671	11766	9048.625
<b>75</b>	4428	3934.5	8920	6214	5874.125
<b>78</b>	3282.5	2789	5812	5292	4293.875
<b>92</b>	9196	8702.5	16780	16742	12855.125
<b>7</b>	11420.5	10927	21068	21829	16311.125
<b>51</b>	13999	13505.5	25106	24868	19369.625
<b>103</b>	7640	7146.5	13664	13878	10582.125
<b>30</b>	10006	9512.5	20723	16865	14276.625
<b>46</b>	8083	7589.5	13645	12765	10520.625
<b>47</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>88</b>	9343	8849.5	17056	18039	13321.875
<b>24</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>25</b>	7922	7428.5	14522	13734	10901.625
<b>52</b>	10458.5	9965	20022	19114	14889.875
<b>5</b>	7377.5	6884	13425	13648	10333.625
<b>26</b>	10873.5	10380	20420	19535	15302.125
<b>31</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>36</b>	7432	6938.5	14314	13380	10516.125
<b>53</b>	6492	5998.5	14040	10256	9196.625
<b>54</b>	13756.5	13263	26044	24528	19397.875
<b>67</b>	7864	7370.5	15341	13093	10917.125
<b>45</b>	10170.5	9677	17944	18647	14109.625
<b>6</b>	7501	7007.5	14682	12949	10534.875
<b>37</b>	9854	9360.5	17039	19006	13814.875
<b>39</b>	5948.5	5455	9996	10165	7891.125
<b>49</b>	10163.5	9670	18120	17511	13866.125
<b>61</b>	8640	8146.5	17668	14708	12290.625
<b>77</b>	13551.5	13058	23686	23622	18479.375
<b>80</b>	25	-468.5	-258	-532	-308.375
<b>90</b>	3867	3373.5	7700	4590	4882.625
<b>94</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>106</b>	8995.5	8502	16946	14745	12297.125
<b>50</b>	11936	11442.5	21325	21540	16560.875
<b>70</b>	6439	5945.5	12185	11212	8945.375
<b>73</b>	3890	3396.5	7329	6546	5290.375
<b>71</b>	5768	5274.5	11293	10340	8168.875
<b>84</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>102</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>105</b>	6364.5	5871	11312	12394	8985.375



<b>107</b>	3955.5	3462	7014	6191	5155.625
<b>109</b>	1908	1414.5	3560	3130	2503.125
<b>110</b>	9876.5	9383	19066	17171	13874.125
<b>111</b>	10396	9902.5	19541	17163	14250.625
<b>112</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>113</b>	6502.5	6009	12227	11230	8992.125
<b>118</b>	10184.5	9691	17762	17066	13675.875
<b>121</b>	8328	7834.5	16178	14948	11822.125
<b>123</b>	9317.5	8824	19239	13865	12811.375
<b>125</b>	3788	3294.5	6466	6353	4975.375
<b>126</b>	1591	1097.5	3501	2769	2239.625
<b>130</b>	5260.5	4767	9968	9227	7305.625
<b>132</b>	5235	4741.5	10043	9129	7287.125
<b>134</b>	3944	3450.5	8154	6317	5466.375
<b>138</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>139</b>	2464.5	1971	3228	4205	2967.125
<b>141</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>146</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>148</b>	3656.5	3163	7240	6289	5087.125
<b>150</b>	6357	5863.5	13254	8528	8500.625
<b>151</b>	2284.5	1791	4173	5373	3405.375
<b>153</b>	1741	1247.5	3955	2086	2257.375
<b>155</b>	1316.5	823	2400	2151	1672.625
<b>156</b>	1312	818.5	2340	1928	1599.625
<b>157</b>	6399.5	5906	13025	10818	9037.125
<b>158</b>	3051.5	2558	5742	5104	4113.875
<b>164</b>	5263	4769.5	10333	8264	7157.375
<b>171</b>	10848.5	10355	19953	19676	15208.125

*C.1 y C.2 = Los valores de XX por duplicado de dos PCRs independientes (PCR1 y PCR2); ND, no determinados por falta de muestra.*

**Tabla S7. Cuantificación de la metilación global en sangre.**

# MUESTRA	D1 c1	D1 2
8	5.23	5.23
18	5.09	5.09
19	3.82	4.57
27	11.31	7.4
41	13.06	2.01
79	7.29	5.2
97	2.51	10.82
55	15.27	6.25
13	9.56	4.72
33	8.95	8.95
34	15.37	7.31
43	5.73	5.24
69	7.34	1.75
76	10.22	3.64
82	2.02	3.22
83	9.81	1.58
86	7.31	7.31
95	6.28	11.84
98	1.62	1.62
63	8.2	2.95
12	11.04	6.2
22	5.25	5.92
29	2.39	11.57
57	13.69	9.32
89	4.18	8.08
101	2.65	2.65
28	8.61	7.74
3	3.3	1.83
9	3.96	3.96
91	12.06	4.71
100	4.81	4.81
72	7.04	7.04
62	17.61	12.02
93	7.08	13.59
1	8.66	3.16
14	7.44	17.41
42	8.1	8.91
68	10.86	11.33
75	8.05	11.7
78	2.09	2.09

92	10.11	11.32
7	7.11	7.11
51	7.72	6.8
103	4.39	8.74
30	7.92	7.92
46	9.48	6.23
47	1.84	1.84
88	8.55	8.55
24	10.1	12.02
25	2.49	2.49
52	4.98	4.98
5	6.48	6.48
26	7.77	2.32
31		7.8
36	10.62	11.38
53	8.09	8.61
54	13.22	14.59
67	6.32	6.32
45	11.89	11.89
6	8.96	8.96
37	5.96	4.81
39	5.29	7.07
49	8.84	12.46
61	14.33	5.72
77	9.56	9.56
80	6.67	6.67
90	2.11	5.09
94	10.75	10.75
106	6.53	12.24
50	10.8	1.71
70	11.44	7.82
73	2.26	5.71
71	2.92	2.92
84	11.85	11.85
102	7.07	7.07
105	10.76	10.76
107	5.9	5.9
109	4.06	4.06
110	4.97	4.97
111	12.41	12.41
112	9.08	9.08
113	11.08	11.08
118	5.96	5.96
121	7.94	7.94
123	3.69	3.69

<b>125</b>	8	8
<b>126</b>	5.11	5.11
<b>130</b>	6.41	6.41
<b>132</b>	4.63	4.63
<b>134</b>	11.33	11.33
<b>138</b>	5.49	5.49
<b>139</b>	6.14	6.14
<b>141</b>	6.93	6.93
<b>146</b>	8.36	8.36
<b>148</b>	3.05	3.05
<b>150</b>	8.37	8.37
<b>151</b>	10.88	10.88
<b>153</b>	3.95	3.95
<b>155</b>	6.77	6.77
<b>156</b>	1.59	1.59
<b>157</b>	10.8	10.8
<b>158</b>	9.23	9.23
<b>164</b>	9.84	9.84
<b>171</b>	1.03	1.03

**Tabla S8. Cuantificación de la metilación global en biopsia.**

<b># Muestra</b>	<b>D1 c1</b>	<b>D1 2</b>
8	11.25	11.25
18	13.77	13.77
19	9.09	14.3
27	5.11	5.11
41	5.55	5.55
79	8.17	11.62
97	3.35	12.62
55	5.48	5.48
13	7.59	6.83
33	3.6	7.69
34	6.07	9.36
43	5.46	5.46
69	9.2	9.23
76	8.44	8.44
82	5.48	4.72
83	10.2	10.2
86	13.74	13.74
95	4.69	8.85
98	6.99	3.41
63	11.4	11.4
12	11.9	11.9
22	5.39	2.5
29	8.71	4.12
57	9.94	9.08
89	7.52	6.07
101	9.91	9.51
28	4.02	10.08
3	7.8	6.62
9	8.53	8.53
91		
100	3.35	5.93
72	10.06	6.75
62	5.88	3.32
93	7.89	8.22
1	7.29	3.22
14		
42		
68	6.25	6.81
75	4.76	4.76
78	7.91	7.91
92	7.18	6.22
7	9.61	4.32

<b>51</b>	9.99	9.99
<b>103</b>	9.72	9.72
<b>30</b>	5.53	4.59
<b>46</b>	7.55	12.98
<b>47</b>		
<b>88</b>	2.26	3.75
<b>24</b>		
<b>25</b>	7.22	6.73
<b>52</b>	7.41	7.41
<b>5</b>	6.12	8.24
<b>26</b>	7.44	2.78
<b>31</b>		
<b>36</b>	7.22	7.22
<b>53</b>	7.22	2.29
<b>54</b>	6.71	5.13
<b>67</b>	6.76	7.69
<b>45</b>	5.78	5.78
<b>6</b>	13.32	13.32
<b>37</b>	8.28	7.89
<b>39</b>	12.67	12.67
<b>49</b>	6.7	10.9
<b>61</b>	9.64	4.43
<b>77</b>	10.24	11.35
<b>80</b>	5.33	13.38
<b>90</b>	4.07	11.19
<b>94</b>		
<b>106</b>	5.33	11.08
<b>50</b>	10.03	2.87
<b>70</b>	3.59	3.59
<b>73</b>	5.16	5.16
<b>71</b>	5.99	9.22
<b>84</b>		
<b>102</b>		
<b>105</b>	6.48	2.55
<b>107</b>	4.03	4.03
<b>109</b>	7.22	6.22
<b>110</b>	6.84	5.15
<b>111</b>	5.71	6.27
<b>112</b>		
<b>113</b>	6.32	5.44
<b>118</b>	3.36	3.87
<b>121</b>	12.33	6.3
<b>123</b>	6.53	9.76
<b>125</b>	4.34	1.87
<b>126</b>	6.05	5.11

130	5.79	4.36
132	7.45	9.96
134	7.42	3.95
138		
139	7.97	0.62
141		
146		
148	4.51	3.05
150	7.29	5.27
151	9.31	6.6
153	8.61	3.95
155	8.84	2.11
156	11.29	4.07
157	11.73	1.85
158	5.8	9.02
164	12.01	11.16
171	4.76	3.03

**Tabla S9. Correlaciones entre el mtADN y la metilación global por grupo**

Sangre			
		mADN global	
		R	P
ncADNmt	Todos	-0.072	0.467
	Sanos	0.085	0.643
	HGNA	-0.074	0.732
	SM	0.139	0.622
	HGNA & SM	-0.193	0.282
Biopsia			
		mADN global	
		R	P
ncADNmt	Todos	0.054	0.613
	Sanos	-0.047	0.803
	HGNA	0.014	0.95
	SM	-0.01	0.972
	HGNA & SM	-0.015	0.939
<b>Valores de R y P según el test de Pearson</b>			

Tabla S10. Correlaciones entre tejidos			
ncADNmt			
		Sangre	
		R	P
Biopsia	Todos	0.084	0.429
	Sanos	0.274	0.143
	HGNA	0.017	0.946
	SM	0.349	0.243
	HGNA & SM	-0.041	0.83
mADN global			
		Sangre	
		R	P
Biopsia	Todos	0.017	0.873
	Sanos	-0.062	0.742
	HGNA	0.12	0.624
	SM	0.124	0.687
	HGNA & SM	0.119	0.545

**Valores de R y P según el test de Pearson**



Tabla S11. Correlaciones entre los datos paramétricos, la mADN y el mtADN.

Parámetros		Sangre				Biopsia			
		mADN		mtADN		mADN		mtADN	
		R	P	R	P	R	P	R	P
Biométricos	EDAD	0.18862048	0.05516679	-0.04192505	0.67260781	-0.14230908	0.17842012	-0.00606804	0.95473455
	PRESIÓN SIST	0.06900299	0.48641601	-0.1250384	0.2059772	-0.00110058	0.99173904	0.06057584	0.57060477
	PRESIÓN DIA	0.08475661	0.39230474	-0.0873655	0.37784368	0.01438168	0.89237235	0.0158937	0.88180414
	PESO(KG)	0.12777514	0.19614516	0.08457995	0.39329576	0.0303108	0.77547945	0.09951662	0.35070647
	TALLA(M)	0.08849385	0.37169088	0.11533814	0.24365388	-0.06879777	0.51699475	0.16471545	0.1208054
	IMC	0.08945295	0.36650934	0.03834727	0.69913929	0.0643768	0.54434513	0.01197128	0.91083453
	%AGUA	-0.08018888	0.5389979	-0.06518928	0.61767871	-0.11889892	0.39181841	-0.24829487	0.07302088
	%MÚSCULO	0.04133874	0.7517583	0.03898937	0.76545105	.303*	0.02601904	0.08724351	0.53447895
	%VISCERAL	.296*	0.02033308	0.07355013	0.57321376	0.11981301	0.38816198	0.09465825	0.50018006
	CINTURA	0.18674931	0.05767054	0.00169155	0.98640312	-0.0539203	0.61171575	-0.05838482	0.58464587
CADERA	0.14834077	0.13288319	-0.00036665	0.99705265	0.0120056	0.91007257	-0.03554684	0.73942255	
ICC	0.14876592	0.13176336	0.02382689	0.81026447	-0.19612678	0.06243327	-0.05028335	0.63788387	
Lípidos y Colesterol	LAD	-0.14256553	0.14882271	-0.13617815	0.16808113	-0.01731875	0.87056672	-0.12298217	0.24817548
	LBD	0.0066895	0.94626641	0.0641164	0.51787489	-0.10038119	0.34377529	0.08624792	0.41892371
	LMBD	0.08973276	0.36500611	-0.00229693	0.98153775	0.17290511	0.10121783	-0.05566031	0.60232283
	TRIGLÍERIDOS	0.09395959	0.3427613	0.03983976	0.6880252	0.1335266	0.20701601	-0.06131765	0.5658869
	INDICE ATERC	0.1475593	0.13496045	0.08036701	0.41736956	0.06271839	0.55478411	0.08779398	0.41060195
	RELAC LBD/L	0.03066532	0.75730696	0.09904956	0.3171337	-0.04986174	0.63880701	0.1562125	0.14148352
	COLESTEROL	0.07703631	0.43699349	0.00180606	0.98548276	0.06689128	0.52870288	-0.05767189	0.58924852
GLUCOSA	0.10612507	0.28362197	0.14539367	0.14084621	0.08796687	0.40701432	0.09315955	0.38247974	
Función Hepática	BT	0.03970606	0.68901816	-0.07250938	0.46448609	-0.06072381	0.56746524	-0.09757961	0.36020878
	BD	0.12535577	0.20481927	-0.03072113	0.75687896	0.07169538	0.49945619	-0.0048501	0.96381309
	BI	0.040898	0.68018472	-0.08363358	0.39863015	-0.11304545	0.28601619	-0.08670215	0.41646875
	ÁCIDO ÚRICO	-0.13642649	0.21876661	-0.1296534	0.24271658	0.15977881	0.17692575	-0.15100921	0.20543952
	AST	0.14999582	0.12856442	0.00042183	0.99660914	.357**	0.00051658	0.13640764	0.19984653
	ALT	0.12776221	0.19619083	0.13355198	0.17651279	.234*	0.02571787	0.08246838	0.43967324
	GGT	0.12355804	0.2183192	0.04539019	0.65219124	0.19207281	0.07300936	0.0576318	0.59595964
	FOSFATASA A	-0.02410269	0.80997367	-0.00864364	0.93128975	0.01770765	0.86917619	-0.04426851	0.68214445
	AMILASA	0.01913671	0.86620136	0.1648651	0.14390269	-0.05653988	0.64200219	0.10727279	0.38030681
	LIPASA	-0.05007805	0.66536562	0.05525772	0.63313534	0.13136843	0.28559098	0.13552692	0.27416832
	ALBUMINA	0.09318341	0.35400768	-0.04708175	0.64011676	0.0532549	0.62216659	0.10620763	0.32753885
	GLOBULINA	0.11856091	0.24742077	-0.02049821	0.84203771	0.18667016	0.08909246	0.20710582	0.06029469
	UREA	0.15547729	0.11683039	-0.03151192	0.75201274	-0.07480155	0.48349474	0.07402143	0.49057687
	CREATININA	0.01267781	0.89886084	-0.11674322	0.2402448	0.03535266	0.74079549	-0.12036519	0.26119927

Tabla S12. Clasificación de la severidad de HGNA por Kleiner						
FOLIO	ESTEATOSIS	INFLAMACIÓN	BALONAMIENTO	HGNA	Suma	INDICE DE KLEINER
8	0	2	1	NO	0	0
18	0	1	1	NO	0	0
19	0	1	1	NO	0	0
27	0	0	0	NO	0	0
41	0	0	0	NO	0	0
79	0	0	0	NO	0	0
97	0	0	0	NO	0	0
55	0	0	0	NO	0	0
13	0	1	1	NO	0	0
33	0	1	1	NO	0	0
34	0	1	1	NO	0	0
43	0	0	0	NO	0	0
69	0	0	0	NO	0	0
76	0	0	0	NO	0	0
82	0	1	1	NO	0	0
83	0	1	1	NO	0	0
86	0	3	1	NO	0	0
95	0	0	0	NO	0	0
98	0	0	0	NO	0	0
63	0	1	1	NO	0	0
12	0	2	1	NO	0	0
22	0	1	1	NO	0	0
29	0	1	0	NO	0	0
57	0	0	0	NO	0	0
89	0	1	0	NO	0	0
101	0	0	0	NO	0	0
28	0	1	1	NO	0	0
3	1	1	1	SI	3	2
9	1	1	1	SI	3	2
91	3	1	1	SI	5	3
100	1	1	0	SI	2	1
72	2	1	1	SI	4	2
62	1	0	1	SI	2	1
93	1	1	1	SI	3	2
1	1	1	1	SI	3	2
14	1	1	1	SI	3	2
42	1	1	1	SI	3	2
68	1	1	1	SI	3	2
75	3	2	1	SI	6	3
78	3	1	1	SI	5	3
92	0	2	1	SI	3	2

7	0	1	1 NO	0	0
51	0	0	0 NO	0	0
103	0	1	0 NO	0	0
30	0	0	0 NO	0	0
46	0	0	0 NO	0	0
47	0	1	1 NO	0	0
88	0	1	1 NO	0	0
24	0	1	1 NO	0	0
25	2	2	2 SI	6	3
52	1	0	0 SI	1	1
5	1	2	3 SI	6	3
26	2	2	1 SI	5	3
31	1	1	1 SI	3	2
36	3	1	1 SI	5	3
53	2	2	1 SI	5	3
54	1	0	0 SI	1	1
67	1	1	1 SI	3	2
45	3	1	1 SI	5	3
6	1	3	1 SI	5	3
37	1	1	1 SI	3	2
39	3	2	1 SI	6	3
49	3	1	1 SI	5	3
61	1	1	1 SI	3	2
77	3	2	1 SI	6	3
80	1	1	1 SI	3	2
90	3	0	0 SI	3	2
94	3	1	1 SI	5	3
106	1	1	0 SI	2	1
50	1	0	0 SI	1	1
70	2	1	1 SI	4	2
73	3	2	1 SI	6	3
71	0	0	0 NO	0	0
84	3	2	1 SI	6	3
102	0	1	1 NO	0	0
105	0	0	0 NO	0	0
107	0	0	0 NO	0	0
109	0	0	0 NO	0	0
110	0	1	0 NO	0	0
111	0	0	0 NO	0	0
112	3	2	1 SI	6	3
113	1	1	1 SI	3	2
118	0	0	0 NO	0	0
121	3	2	1 SI	6	3
123	2	1	1 SI	4	2
125	1	0	0 SI	1	1

126	1	1	1	SI	3	2
130	1	0	0	SI	1	1
132	1	1	1	SI	3	2
134	0	0	0	NO	0	0
138	2	1	1	SI	4	2
139	0	0	0	NO	0	0
141	2	1	1	SI	4	2
146	1	1	1	SI	3	2
148	1	0	1	SI	2	1
150	2	1	1	SI	4	2
151	1	0	1	SI	2	1
153	1	1	1	SI	3	2
155	1	1	1	SI	3	2
156	2	1	1	SI	4	2
157	1	0	1	SI	2	1
158	1	1	1	SI	3	2
164	0	0	0	NO	0	0
171	0	0	0	NO	0	0