

Sonia Mostacero Tapia

# Polimorfismos genéticos asociados a litiasis biliar desde una perspectiva étnica

Departamento  
Farmacología y Fisiología

Director/es  
Fanlo Villacampa, Ana Julia  
Vicente Romero, Jorge

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

# POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A LITIASIS BILIAR DESDE UNA PERSPECTIVA ÉTNICA

Autor

Sonia Mostacero Tapia

Director/es

Fanlo Villacampa, Ana Julia  
Vicente Romero, Jorge

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Farmacología y Fisiología

2016





**Departamento de  
Farmacología y Fisiología**

**Universidad Zaragoza**

**TESIS DOCTORAL**

**“POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A  
LITIASIS BILIAR DESDE UNA PERSPECTIVA ÉTNICA”**

**de**

**Sonia Mostacero Tapia**

**ZARAGOZA-2015**



## **AGRADECIMIENTOS**

A la doctora Blanca Sinués Porta, por su gran implicación, disponibilidad y rigor científico, que han sido imprescindibles para la realización del presente trabajo. Así como su experiencia en investigación en el campo de la Farmacología, clave esencial en la gestación de este proyecto.

Al doctor Jorge Vicente Romero, director del presente trabajo, por su implicación, estrecha supervisión, constancia y ayuda para la realización del trabajo de laboratorio, fundamentales en el desarrollo de la presente memoria.

A la doctora Ana Fanlo Villacampa, directora también de esta tesis doctoral, por su constante estímulo, el tiempo invertido en la supervisión científica, que ha sido de ayuda inestimable y fundamental para el desarrollo de este trabajo.

A los doctores Fabricio González-Andrade, del departamento de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Ecuador en Quito y a la doctora Begoña Martínez-Jarreta, catedrática de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Zaragoza que participaron amablemente en la obtención de las muestras y en la caracterización del mestizaje de los participantes de Ecuador.

A los voluntarios participantes en este proyecto por su generosa contribución en la realización de este proyecto.

A la Dirección General de Investigación, Innovación y Desarrollo del Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón por el soporte en la financiación de este estudio.



*A Daniel, Ángel y Pablo.*



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I.INTRODUCCIÓN.....</b>                                    | <b>1</b>  |
| I.1. MORFOLOGIA Y COMPOSICION DE LOS CALCULOS BILIARES.....   | 3         |
| I.2. PATOGENIA DE LA LITIASIS BILIAR.....                     | 4         |
| I.2.1. SOBRESATURACION DE LA BILIS.....                       | 5         |
| I.2.2. FASE DE NUCLEACIÓN.....                                | 6         |
| I.2.3. HIPOMOTILIDAD DE LA VESICULA BILIAR.....               | 7         |
| I.3. EVOLUCIÓN NATURAL DE LOS CÁLCULOS BILIARES.....          | 9         |
| I.4. FACTORES DE RIESGO DE LA LITIASIS BILIAR.....            | 10        |
| I.5. ETNIA Y VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA LITIASIS BILIAR..... | 14        |
| I.6. LA POBLACIÓN AMERICANA DE ECUADOR.....                   | 23        |
| I.6.1. TEORIAS SOBRE EL POBLAMIENTO DE AMERICA.....           | 23        |
| I.6.2. POBLACIÓN DE ECUADOR.....                              | 28        |
| I.7. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....                    | 31        |
| <br>  |           |
| <b>II. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>                            | <b>34</b> |
| <br>  |           |
| II.1. MUESTRA.....  | 34        |
| II.2. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DEL ADN GENÓMICO.....           | 35        |
| II.2.1. AISLAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ADN .....              | 35        |
| II.2.2. MÉTODOS DE GENOTIPADO.....                            | 35        |
| II.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....                               | 37        |
| <br>  |           |
| <b>III. RESULTADOS.....</b>                                   | <b>39</b> |
| <br>  |           |
| III.1. AJUSTE ESTADÍSTICO.....                                | 39        |
| III.2.TABLAS DE RESULTADOS.....                               | 49        |
| <br>  |           |
| <b>IV.DISCUSIÓN.....</b>                                      | <b>81</b> |

**V.CONCLUSIONES.....99**

**VI.BIBLIOGRAFÍA.....102**





# I. INTRODUCCIÓN

La litiasis biliar (LB) representa uno de los problemas de salud más importantes que afectan a la población mundial, con serias implicaciones médicas, sociales y económicas debido a su elevada frecuencia y tasa de complicaciones, siendo el primer motivo de ingreso hospitalario secundario a patología digestiva (*Lammert and Miquel, 2008; Portincasa et al., 2006*).

Se trata de una patología multifactorial determinada por una compleja interacción entre genes y factores ambientales que se caracteriza por alteraciones en la homeostasis del colesterol, así como en el metabolismo de las sales biliares, lo que origina disminución de la solubilidad del colesterol y su precipitación en la bilis (*Johnson, 2001*).

La incidencia de litiasis biliar en las sociedades desarrolladas, que previamente no excedía del 5%, ha incrementado en las últimas décadas. Este incremento se atribuye con frecuencia a la introducción de estilos de vida occidental, que incluyen dietas ricas en carbohidratos, así como menor actividad física que representan factores de riesgo ambientales para la litiasis biliar (*Méndez-Sanchez et al., 2007*). La litiasis biliar presenta el pico de máxima prevalencia en mujeres a partir de la séptima década de la vida (*Völzke et al., 2005*), siendo una patología muy poco frecuente en niños (*Palsaciano et al., 1989*). Además, dicha prevalencia presenta una gran variabilidad en las diferentes poblaciones, ya que la padecen alrededor de un 15-20% de la población adulta occidental (*Stokes et al., 2011*). Las prevalencias más altas se observan en países latinoamericanos como Chile donde la pueden llegar a padecer más del 60% de la población, mientras que las menores

prevalencias se hallan en poblaciones del continente africano y en otras de Asia (*Lammert and Sauerbruch, 2005*).

Es de notar que el riesgo de padecer litiasis biliar es cinco veces mayor en los familiares de primer grado de los pacientes que padecen colelitiasis (CL), lo que pone de manifiesto una influencia muy importante del bagaje genético y de la potencial variabilidad interindividual e interétnica en el desarrollo de colelitiasis (*Krawczyk et al., 2011*).

En relación con el bagaje genético de la colelitiasis, cabe decir que esta enfermedad puede ser definida por dos tipos de situaciones de acuerdo con estudios de familia y gemelos: la colelitiasis común, en la que influyen los factores genéticos y ambientales, y los tipos raros o poco frecuentes de CL, que se deben a una mutación con mayores efectos pero de baja penetrancia y por tanto, menos frecuentes (*Wittenburg and Lammert, 2007*).

La frecuencia de los polimorfismos genéticos varía ampliamente entre los diferentes grupos étnicos, siendo la etnia uno de los factores más importantes que contribuyen a la variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos, por la diferente dotación enzimática. En efecto, las diferencias genéticas en el metabolismo y/o transporte afectan a la disposición de fármacos, xenobióticos y componentes endógenos, como el colesterol. Por tanto, el conocimiento de las diferencias interétnicas en las frecuencias alélicas tiene gran importancia para determinar variaciones en la respuesta a los fármacos, así como en la prevalencia de diversas patologías.

La litiasis biliar es una enfermedad silente en la mayoría de los pacientes, en los que se suele diagnosticar de forma incidental al realizar una ecografía abdominal por otro motivo. Sin embargo, en torno a un 20% de los casos debutan con síntomas y complicaciones, con la consiguiente morbimortalidad. A este respecto, no existen estudios de seguimiento a largo plazo sobre la evolución natural de la enfermedad desde la formación del primer cálculo hasta la muerte del paciente, pero sí que se conoce que las tasas anuales de complicación de esta enfermedad pueden oscilar desde el 1,2% en cálculos inicialmente asintomáticos, hasta un 2% en cálculos con síntomas desde el principio (*Browning et al., 2008*). Otro de los aspectos importantes es su asociación con el cáncer de vesícula que presenta una incidencia anual del 0,02% (*Portincasa et al., 2006*).



Existen en la actualidad múltiples opciones de tratamiento cuando dicha enfermedad se vuelve sintomática, que incluyen métodos radiológicos, endoscópicos y quirúrgicos, si bien la cirugía sigue siendo el pilar fundamental de dicho tratamiento y más en concreto, la colecistectomía laparoscópica desarrollada en los últimos años; este es el método estándar para el tratamiento programado de los pacientes con dolor abdominal secundario a colelitiasis y para el tratamiento de otras complicaciones como la colecistitis aguda, la pancreatitis aguda por colelitiasis y la coledocolitiasis (*Portincasa et al., 2006*).

En los siguientes párrafos se describen aspectos introductorios relativos a la epidemiología y fisiopatogenia de la litiasis biliar poniendo especial énfasis en la influencia genética en el desarrollo de la misma que será objeto principal de nuestro estudio experimental de comparación interétnica.

## **I.1. MORFOLOGIA Y COMPOSICION DE LOS CALCULOS BILIARES**

La bilis es una sustancia producida por el hígado que está compuesta fundamentalmente por agua, colesterol, fosfolípidos, pigmentos biliares (bilirrubina y biliverdina) y sales biliares (glicolato de sodio y taurocolato de sodio) así como iones bicarbonato. La bilis actúa como un detergente que ayuda a emulsionar las grasas, facilitando así su absorción en el intestino delgado. Las sales biliares se combinan con fosfolípidos para romper los glóbulos de grasa en el proceso de emulsión, asociando su lado hidrofóbico con los lípidos y su lado hidrofílico con el agua, esto permite su organización en micelas que aumentan la absorción, favoreciendo así mismo la absorción de vitaminas liposolubles. Además de esta función, sirve como vía de excreción para el producto del catabolismo de la parte hemo de la molécula de hemoglobina. Las sales biliares, a su vez, son bactericidas y eliminan los microbios que entran con la comida y también son detoxificantes, en especial para el alcohol y para algunos fármacos.

La vesícula biliar es un reservorio de almacenamiento que permite que los ácidos biliares se liberen en altas concentraciones y de forma controlada en el duodeno. De esta forma, la colelitiasis es la formación de cálculos en la vesícula biliar, aunque los cálculos se pueden presentar también en los conductos biliares intra y extrahepáticos. El 80-90% de los cálculos biliares están formados fundamentalmente por colesterol o sólo colesterol; el 10-20% restante vienen constituidos principalmente por pigmentos biliares. Dentro de estos últimos existen de dos subtipos: el de los cálculos de pigmentos marrones (20%), que se forman fundamentalmente en los conductos biliares y están compuestos principalmente por sales de calcio de bilirrubina no conjugada, con cantidades variables de colesterol y proteínas; éstas generalmente se asocian a infecciones por bacterias anaerobias de la bilis o infestaciones parasitarias. El segundo subtipo es de cálculos pigmentarios; son cálculos de pigmentos negros que representan aproximadamente un 5% de la totalidad y cuyo componente principal es el bilirrubinato cálcico puro y que se asocian con frecuencia a hemólisis crónica, esferocitosis hereditaria, síndrome de Gilbert, cirrosis o pancreatitis (*Browning, 2008; Tazuma et al., 2006*).

## **I.2.PATOGENIA DE LA LITIASIS BILIAR**

Los principales mecanismos que contribuyen a la formación de colelitiasis son la sobresaturación de la bilis con colesterol y/o bilirrubina, la nucleación acelerada y la hipomotilidad de la vesícula biliar. También parece existir relación entre la hipomotilidad intestinal y la formación de litiasis biliar, debido a que los pacientes que la sufren pueden presentar sobrecrecimiento bacteriano que incrementa la secreción hepática de colesterol y de mucina por parte de las células epiteliales de la vesícula (*Lammert and Miquel, 2008*).

**(Figura 1)**

### I.2.1. SOBRESATURACION DE LA BILIS

El colesterol es insoluble en agua y por tanto necesita de la actividad detergente de las sales biliares y los fosfolípidos polares (lecitina) para permanecer disuelto y no precipitar. El colesterol, los fosfolípidos y los ácidos biliares son los componentes principales de la bilis. Para la génesis de la colelitiasis por cálculos de colesterol se requiere inicialmente la formación de una bilis sobresaturada de colesterol de forma sostenida en el tiempo. Esta primera fase es causada porque el hígado hipersecreta colesterol y no por un defecto de menor secreción de sales biliares o lecitina. El hígado es el principal responsable de regular la homeostasis del colesterol en el organismo; es capaz de modificar la síntesis de colesterol endógeno y es el único órgano capaz de eliminar de forma permanente el colesterol del organismo.

El colesterol sintetizado de novo se forma en el retículo endoplásmico desde la enzima acetil CoA reductasa, siendo la 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) la enzima que regula la velocidad de síntesis. El colesterol es almacenado en el hígado como un éster de ácido graso que se produce por la acción de la Acetil-CoA transferasa. El éster de colesterol sirve como aporte constante de colesterol libre para la formación de ácidos biliares y el ensamblaje de lipoproteínas en el retículo endoplásmico, por lo que el colesterol es también la molécula precursora de todos los ácidos biliares. De ahí que la síntesis de ácidos biliares haga que se elimine indirectamente el colesterol del organismo.

Las alteraciones en el metabolismo de colesterol pueden afectar directamente a la proporción de ácidos biliares y a la secreción de colesterol en la bilis, produciendo así una bilis litogénica. La sobresaturación de colesterol, condición necesaria para formar los cálculos biliares, puede deberse tanto a un incremento de la secreción de colesterol en la bilis o bien a unos niveles disminuidos de sales biliares y/o fosfolípidos (*Van Erpecum, 2011*), siendo una de las causas más importantes la disfunción de los transportadores hepatocanaliculares de estos lípidos biliares.

En la membrana hepatocanalicular existen transportadores activos pertenecientes a la familia ATP-binding cassette (ABC). Entre estos transportadores: el transportador *ABCB11*, que es la bomba exportadora de sales biliares, el llamado *ABCB4*, que transporta la

fosfatidilcolina de dentro afuera de la membrana, y el heterodímero *ABCG5/8* que secreta colesterol y fitoesteroles a la bilis. De este modo, las variantes alélicas de genes que codifican para estas proteínas podrían contribuir a las diferencias entre individuos en la incidencia de litiasis biliar (*Rudkowska and Jones, 2008; Dixon et al., 2009*).

A su vez la bilirrubina, para su secreción, primero ha de ser mono o diglucuronizada por la enzima UDP-glucuronil transferasa (UGT), para ser posteriormente excretada. Como se discutirá posteriormente, algunos estudios han señalado que las variantes alélicas del gen *UGT1A1*, tal como la causante de la hiperbilirrubinemia no conjugada que causa el síndrome de Gilbert, están asociadas con el riesgo de desarrollar cálculos de colesterol (*Lin et al., 2009, Marschall et al., 2013*).

## **I.2.2. FASE DE NUCLEACIÓN**

La presencia de una bilis saturada es frecuente en el ser humano y no necesariamente lleva al desarrollo de cálculos. Se requiere una segunda fase en la que el colesterol cristaliza y precipita (*Sedaghat and Grundy, 1980*). El primer paso para la formación de cálculos biliares es la nucleación: en esta fase se produce agregación, dando lugar a la formación de cristales microscópicos. Posteriormente se produce la cristalización, que da origen a la formación de cristales de colesterol monohidratados que pueden agruparse para dar lugar a cálculos biliares macroscópicos. Esta fase puede ser facilitada por altos niveles de saturación de colesterol biliar, por mayor tiempo de retención de la bilis inestable en la vesícula (estasis) o por proteínas biliares. En este contexto, se ha identificado el pronucleador más importante: la glucoproteína mucina O. El núcleo de la glucoproteína mucina contiene regiones hidrófobas que pueden unirse al colesterol, los fosfolípidos y la bilirrubina. La unión de las vesículas ricas en colesterol con las regiones hidrófobas interviene en la aceleración de la nucleación (*Small et al., 1980; Holan, 1998; Jungst et al., 1991*). Asimismo, la fusión y agregación de las vesículas se ve acelerada en presencia de mucina y esta aceleración también parece ser responsable de las propiedades de pronucleación de las glicoproteínas de mucina. En los diferentes modelos animales se ha observado que la secreción de mucina está regulada, al menos en parte, por las prostaglandinas, aunque los pacientes que toman antiinflamatorios no esteroideos de forma

prolongada parecen tener la misma frecuencia de LB que los que no los toman (*Afdhal et al., 1993; Afdhal et al, 1995*).

La concentración de calcio en la bilis participa en la precipitación biliar de la bilirrubina y la formación de cálculos biliares. Los pacientes con cálculos biliares pueden tener concentraciones biliares de calcio superiores a los que no los tienen con sobresaturación de carbonato cálcico (*Yu et al., 2013*).

### **I.2.3. HIPOMOTILIDAD DE LA VESICULA BILIAR**

La vesícula biliar, (VB) como hemos comentado anteriormente, cumple la función de reservorio de la bilis durante los periodos de ayuno. La mucosa de la vesícula es capaz de absorber agua de forma muy rápida, siendo la concentración de la bilis en la vesícula variable a lo largo del día, lo que influye en la formación de cálculos (*Jones and Spring-Mills, 1983*). La bilis suele estar saturada después de un ayuno prolongado o tras la nutrición parenteral total prolongada (NPT), lo que provoca que la vesícula biliar se llene de bilis para luego absorber activamente agua y electrolitos, concentrando los solutos biliares en estos casos entre cuatro y siete veces más de lo habitual. La bilis también se acidifica en la vesícula por la absorción de bicarbonato y la secreción de iones hidrógeno; esta acidificación aumenta la solubilidad de las sales de calcio, haciendo así que la precipitación disminuya.

Frente a la presencia de una bilis litogénica, la vesícula experimenta cambios morfológicos y funcionales que favorecen la formación de cálculos. Por esta razón la mayoría de los cálculos se forman y residen en la vesícula biliar (en más del 95% de las ocasiones). Los cambios que se producen en la vesícula cuando hay una bilis litogénica son fundamentalmente los siguientes: incremento del tamaño y peso de la vesícula, llenado menos eficiente en los períodos de ayuno y disminución de la capacidad contráctil tras la ingesta de alimentos, incremento de la secreción de mucina y otras proteínas y el desarrollo de inflamación crónica y fibrosis de la pared vesicular que contribuyen a la formación de cálculos biliares.

Por otra parte, la colecistocinina (CCC) es el estimulante fisiológico más importante de la contracción de la vesícula. En los pacientes con cálculos biliares, se ha observado que la respuesta contráctil de la vesícula a la CCC está disminuida (*Chuang et al., 2013*).

Todos estos cambios de la vesícula biliar tienden a favorecer la cristalización del colesterol biliar con agregación y crecimiento de los cálculos, al existir mayor tiempo de residencia de colesterol precipitado en su lumen. La secreción incrementada de mucina favorece más este proceso formando una matriz mucinosa, viscosa y adherente en la que los cristales de colesterol pueden adherirse y crecer (*Afdhal et al., 1995*).

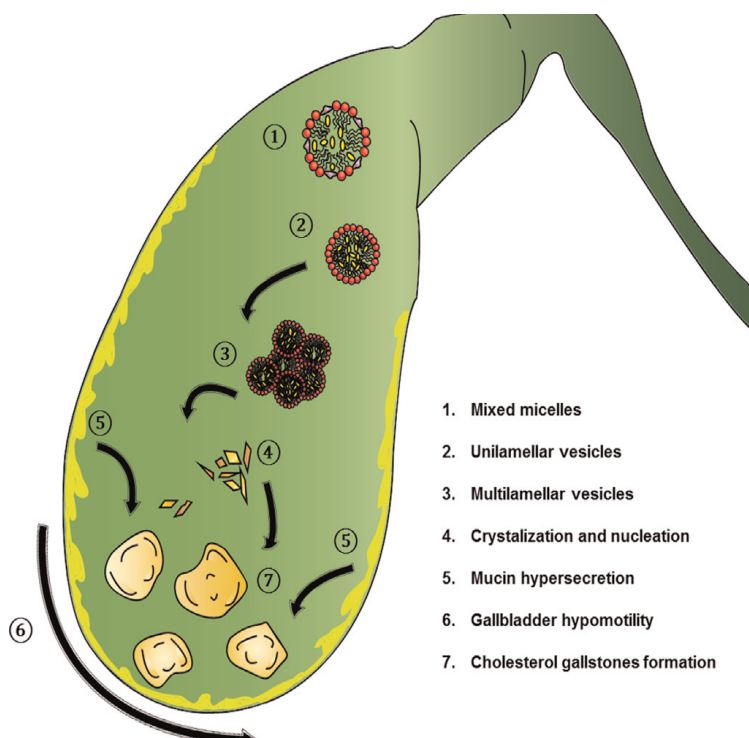


Figura 1. Formación de colelitiasis en la vesícula biliar. 1. Formación de micelas de colesterol cuando hay exceso de colesterol, fosfatidilcolina y sales biliares. 2. El colesterol libre forma vesículas con fosfatidilcolina (vesículas unilamelares). Las vesículas unilamelares se fusionan y forman vesículas multilamelares. 4. Cuando hay sobresaturación de colesterol, cristalizan y se produce nucleación y forma las estructuras precursoras de los cálculos biliares. 5. La mucina tiene la capacidad de oligomerizarse y formar gel mucinoso que promueve la formación de colelitiasis. La hipomotilidad de la vesícula biliar promueve el crecimiento de las litiasis. 7. Formación de litiasis biliar. (Tomado de Castro- Torres and Martín -Vázquez, 2015)

### I.3.EVOLUCIÓN NATURAL DE LOS CÁLCULOS BILIARES

Para explicar la evolución natural de la colelitiasis hay que dividir a los pacientes en dos grupos, dependiendo de si presentan síntomas o son asintomáticos. En la colelitiasis asintomática es muy frecuente detectar la enfermedad incidentalmente en pacientes a los que se realiza ecografía abdominal por otros motivos. Algunos estudios indican que la mayoría de los pacientes con colelitiasis asintomática permanecen así durante muchos años. Un estudio realizado en Italia mediante la práctica de ecografía abdominal a 132 pacientes demostró que el 78% no habían presentado síntomas propios de la enfermedad (*Atili, 1995*). Una experiencia similar se obtuvo siguiendo la evolución durante 15 años a 132 profesores de la Universidad de Michigan después de haber sido diagnosticados de colelitiasis en una exploración de rutina; de ellos solo un 18% se habían hecho sintomáticos al finalizar el estudio (*Gracie and Ransohoff, 1982*). Este trabajo demostró que sólo un 3% de estos pacientes presentaba además complicaciones agudas. Por lo deducido de la escasa literatura de la que se dispone, la frecuencia de complicaciones de la CL asintomática es baja, no requiriendo la realización de colecistectomía.

La evolución natural de los cálculos sintomáticos es más agresiva. El Estudio Cooperativo Nacional de Colelitiasis de EEUU demostró que en los pacientes que habían presentado dolor biliar no complicado, la frecuencia con la que se repetía este síntoma era de un 38% (*Thistle et al., 1984*). El riesgo de desarrollar complicaciones agudas en estos pacientes de CL sintomática es de un 1-2% al año, permaneciendo inalterado este porcentaje en el tiempo. Por todo lo anterior, parece razonable indicar colecistectomía preventiva en los pacientes que han comenzado a desarrollar síntomas biliares.

## I.4. FACTORES DE RIESGO DE LA LITIASIS BILIAR

Como hemos comentado anteriormente, en la patogenia de la litiasis biliar intervienen complejos factores tanto ambientales como genéticos.

El sexo es un factor de riesgo importante para la formación de cálculos biliares. En la mayoría de los estudios se ha observado que la incidencia es de 2 a 3 veces superior en las mujeres (*Shaffer, 2006*). Esta incidencia se mantiene más alta en las mujeres hasta los 50 años y después se iguala a la de los hombres. Este cambio de incidencia relativa entre varones y mujeres indica que los estrógenos participan en la secreción de colesterol hacia la bilis y disminuyen la secreción de sales biliares. La progesterona a su vez reduce la secreción de sales biliares y enlentece el vaciado vesicular; por lo tanto, la combinación de las dos hormonas favorece la saturación de colesterol, predisponiendo a una bilis litogénica. De este modo, se ha observado que el embarazo es un factor de riesgo para la formación de cálculos biliares, estimándose que aproximadamente un 30% de las embarazadas desarrolla barro biliar y un 2% litiasis, que en la mayoría de los casos desaparecen en el postparto (*Maringhini, 1993*).

El riesgo de padecer litiasis biliar incrementa de forma exponencial con la edad. A partir de los 40 años, la incidencia de LB incrementa del 1% al 3% (*Bertolotti et al, 2007*). Esto se debe fundamentalmente al aumento de la secreción hepática de colesterol y a la disminución de la síntesis de sales biliares. Estas alteraciones son atribuidas a la disminución de la actividad de la enzima limitante de la síntesis de ácidos biliares CYP7A1 (*Pullinger et al., 2002*).

La obesidad es una epidemia en los países desarrollados y un importante factor de riesgo para la colelitiasis. La asociación entre colelitiasis y obesidad puede deberse a una hipersecreción de colesterol que aparece en la bilis, debido a una mayor actividad de la HMG-CoA reductasa. Existen algunos estudios donde se observa una asociación lineal entre el índice de masa corporal y la incidencia de litiasis. La adiposidad abdominal, especialmente en mujeres, se ha descrito como uno de los factores de riesgo más importantes (*Tsai et al., 2006*). Los adolescentes obesos tienen mayor riesgo de padecer litiasis biliar a lo largo de la



vida. Un estudio de prevalencia indica que los niños y adolescentes obesos tienen un 2% de litiasis biliar frente al 0.1 de riesgo en la población pediátrica no obesa (*Li et al., 2009*).

La pérdida de peso rápida es otro de los factores de riesgo de colelitiasis. De hecho, se ha observado un incremento en el desarrollo de cálculos biliares en los pacientes obesos que siguen una dieta estricta, llegando a un incremento del 50% en pacientes a los que se realiza cirugía bariátrica. La incidencia de colelitiasis se incrementa sobre todo en los dos primeros años tras la cirugía. Los mecanismos fisiopatológicos que se han asociado son múltiples: aumento de la secreción hepática de colesterol, disminución de la motilidad de la vesícula biliar o disminución de la síntesis de ácidos biliares; otras hipótesis que se postulan son el incremento de la secreción de mucina y calcio en la vesícula (*Shiffman et al., 1993*).

La nutrición parenteral total (NPT) se ha asociado al desarrollo tanto de colelitiasis, colecistitis aguda y colecistitis acalculosa en pacientes críticos. En los servicios de cuidados intensivos se ha observado que el barro biliar aparece de 5 a 10 días tras el inicio de NPT. En la mayoría de los casos, afortunadamente, es asintomático y desaparece tras haber retirado la nutrición. El mecanismo fisiopatológico primario es la hipomotilidad de la vesícula biliar con estasis biliar (*Stinton and Shaffer, 2012*).

Algunos fármacos influyen significativamente en la frecuencia de aparición de colelitiasis. Los estrógenos son las moléculas que más se han estudiado en cuanto a su asociación con la aparición de litiasis biliar. La primera observación surgió del hecho de que las mujeres en edad fértil y que toman anticonceptivos padecían con más frecuencia esta patología. En efecto, los niveles elevados de estrógenos en suero activan la secreción de la bilis sobresaturada de colesterol, como se ha dicho antes (*Cirillo et al., 2005*). Las mujeres menores de 40 años y las que reciben una dosis mayor de 50 microgramos de estrógenos presentan un riesgo más elevado. La administración de estrógenos conjugados con progesterona también aumenta el riesgo de desarrollo de litiasis biliar hasta tasas significativas (*Etminan et al., 2011*).

El octeótrido es un fármaco análogo de la somatostatina con un amplio espectro de indicaciones entre las que destaca la acromegalia. La somatostatina inhibe la secreción de CCC y se asocia con hipomotilidad vesicular y estasis biliar. Además, disminuye la motilidad del intestino delgado, lo que aumenta la formación de ácidos biliares, produciendo un

aumento de la concentración de solutos en la bilis con formación de cálculos. Más del 50% de los pacientes tratados con octeótrido a largo plazo desarrolla colelitiasis (*Trendle et al., 1997*). Otro de los fármacos implicados en la génesis de colelitiasis es la ceftriaxona; una potente cefalosporina de tercera generación de vida media prolongada, que se elimina principalmente por la orina. Aproximadamente un 40% de la dosis del fármaco no se metaboliza y es secretada inalterada a la bilis, donde se alcanzan altas concentraciones. Cuando supera el nivel de saturación, produce complejos con el calcio, formando barro biliar en buen número de pacientes, aunque generalmente desaparece espontáneamente al interrumpir el tratamiento (*Park et al., 1991*).

Curiosamente, la hipercolesterolemia no parece ser un factor de riesgo para la formación de cálculos biliares. De hecho, en algunos estudios se ha demostrado una relación inversa entre las concentraciones de colesterol sérico y el riesgo de presentar estos cálculos. Sin embargo, la concentración sérica de triglicéridos sí que se relaciona positivamente con una frecuencia alta de cálculos (*Hui et al., 2009*). La apolipoproteína E (Apo E), componente de las proteínas de muy baja densidad (VLDL) y de alta densidad (HDL), desempeña un papel fundamental en el metabolismo y transporte del colesterol. Hay estudios contradictorios sobre la influencia del polimorfismo genético de la Apo E en la formación de cálculos biliares por lo que son necesarios más estudios para definir la función de la Apo E en la patogenia de la colelitiasis (*Hasegawa et al., 2003*).

Por lo que respecta a las enfermedades sistémicas, los pacientes con diabetes resistente a la insulina tienen un riesgo más elevado de desarrollar cálculos biliares. Dicha enfermedad se asocia también a hipertrigliceridemia, obesidad y disminución de la motilidad de la vesícula biliar. Es difícil por tanto demostrar que la diabetes resistente a la insulina, como tal, sea un factor de riesgo independiente para el desarrollo de cálculos biliares. El síndrome metabólico es definido por la presencia de obesidad abdominal, hipertensión, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, y valores disminuidos de HDL. Tanto la diabetes mellitus como el síndrome metabólico predisponen a la formación de CL (*Méndez-Sánchez et al., 2005; Ata et al., 2011*). La resistencia a la insulina predispone a la formación de CL, lo que sugiere una alteración del metabolismo del colesterol y de las sales biliares. A nivel molecular, los ácidos biliares regulan la gluconeogénesis, la síntesis de glucógeno y la sensibilidad de la insulina a través de la expresión del gen del receptor X farsenoide (*FXR*). El

citocromo CYP7A1 está regulado negativamente por el gen *FXR*. En los pacientes de diabetes se ha visto una alteración de la expresión de este gen. Se ha observado que la glucosa aumenta la expresión del gen *FXR*, mientras que la insulina la disminuye (*Duran-Sandoval et al., 2004*).

La cirrosis hepática es otro de los factores de riesgo bien establecidos para la formación de cálculos biliares, con una prevalencia del 25-30%. Normalmente son litiasis de pigmentos negros, y se deben fundamentalmente a la alteración de la secreción de pigmentos biliares, al enlentecimiento de la motilidad de la vesícula biliar y a un aumento de los niveles de estrógenos en estos pacientes (*Acalovschi et al., 1988*).

Las enfermedades del íleon son un factor reconocido para el desarrollo de cálculos biliares. La enfermedad de Crohn es la enfermedad sistémica que más frecuentemente afecta al íleon. Estos pacientes tienen un riesgo dos-tres veces mayor de colelitiasis que la población general, debido a una malabsorción de ácidos biliares en intestino delgado y a que genera una bilis saturada en colesterol. La fibrosis quística, al igual que la enfermedad de Crohn, predispone a la formación de cálculos debido a una malabsorción de ácidos biliares (*Lapidus et al., 2006*).

En otras enfermedades como la anemia falciforme, la hemólisis crónica que se produce origina un exceso de excreción de bilirrubina con formación de litiasis de pigmentos negros, compuestos por bilirrubinato cálcico. Estudios recientes han demostrado la asociación del polimorfismo del gen *UGT1A1* en la génesis de litiasis biliar en esta patología (*Ebert et al., 2010; Chaouch et al., 2013*).

Recientemente se están realizando estudios donde se ha observado la implicación de la infección por *Helicobacter Pylori* (HP) en el desarrollo de colelitiasis. Monstein et al (2002) han demostrado la presencia de ADN de esta bacteria en la litiasis biliar por colesterol. Se ha visto que el HP incrementa la precipitación de colesterol, así como que la ureasa induce la precipitación de calcio, lo que estaría implicado en la formación inicial de LB en dichos pacientes, aunque se requieren más estudios que expliquen la patogénesis de esta asociación (*Attaallah et al., 2013*).

Dentro de los factores de riesgo de la litiasis biliar destacan los factores genéticos y por consiguiente la etnia, que al constituir la piedra angular de nuestro trabajo, pasaremos a describirlo en un apartado diferenciado.

## **I.5. ETNIA Y VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA LITIASIS BILIAR**

La litiasis biliar, por la magnitud de su prevalencia, es un problema de salud pública por lo que resulta primordial conocer sus relaciones causales, lo que implica el análisis de algunos polimorfismos genéticos que puedan estar vinculados con el riesgo de desarrollo de esta enfermedad.

Existe una elevada prevalencia de litiasis biliar en familiares de primer grado de pacientes que ha sido objeto de estudio en los últimos años. Se ha observado que la litiasis biliar por colesterol es tres veces más frecuente en familiares de afectos comparado con sujetos sin historia familiar. De esta forma, Sarin et al (1995) estudiaron 330 familiares de primer grado de 150 pacientes de colelitiasis, encontrando una incidencia de litiasis biliar 4-5 veces mayor en comparación con los controles. Posteriormente, se han realizado estudios similares que sugieren de forma clara que existe una fuerte predisposición familiar en la formación de litiasis biliar.

Los estudios realizados en gemelos han permitido comenzar a conocer la epidemiología genética y han servido para diseccionar la compleja genética de esta patología mediante el análisis de la interacción de genotipos y fenotipos con la enfermedad. La evidencia más concluyente de la asociación factores genéticos-colelitiasis sintomática vino muy importantemente de la mano del estudio sueco de Katsika et al (2005) en 43141 pares de gemelos. Las tasas de concordancia fueron mayores en monozigotos que en dizigotos, calculándose que los factores genéticos contaban un 24% para la variación fenotípica. Una heredabilidad similar (24%) de colelitiasis sintomática se vio en otro estudio en 358 familias en USA (*Nakeeb et al, 2002*). En general, se sugiere que la susceptibilidad a la colelitiasis

incluye la combinación de factores ambientales y genes litogénicos. En el estudio sueco el principal factor extragenético resultó ser el índice de masa corporal, que explicó parte del 13% de la influencia total de los factores ambientales.

Asimismo, la frecuencia de los polimorfismos genéticos varía ampliamente entre los diferentes grupos étnicos, siendo la etnia uno de los más importantes factores que contribuyen a la variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos y otros xenobióticos, así como de la relación entre genética y enfermedad. Las diferencias genéticas en el metabolismo y/o transporte afectan a la disposición de los fármacos, xenobióticos y componentes endógenos, entre los que se cuenta el colesterol. El conocimiento de las diferencias interétnicas en las frecuencias alélicas tiene importancia para determinar variaciones en la respuesta a los fármacos, así como la prevalencia de diversas patologías.

Diversas regiones génicas muestran asociación con la patología colelitiasica. En la población mejicana-americana se ha demostrado un factor de heredabilidad de la enfermedad que alcanza el 30%, demostrándose una fuerte asociación con el locus 1p36.21 gen Lith (*Puppala et al., 2006*).

Existe una gran variabilidad de datos epidemiológicos de la litiasis biliar en diferentes poblaciones. Además, esta afección ha incrementado su presencia en países en vías de desarrollo en la últimas décadas, situándose actualmente en un 25-30% de la población hispánica en América Central y Sudamérica (*Miquel et al, 1998*). Cabe mención especial a esta población, ya que los estudios epidemiológicos han demostrado que presentan la prevalencia más alta y en algunos países de Sudamérica la enfermedad está alcanzando proporciones epidémicas (*Carey and Paigen, 2002; Nervi et al., 2003*). Así, por ejemplo, el primer estudio que analizó estos datos en la población amerindia, concretamente en los indios Pima, constató tasas de prevalencia del 70-80% en las mujeres jóvenes (entre 25-35 años) y un 50 % en los hombres mayores de 50 años (*Sampliner, 1970*). Posteriormente, Everhart et al, (2002) mostraron que esta alta prevalencia no sólo se daba en los indios Pima, sino que estaba ampliamente distribuida entre los indios de Norteamérica, y además que ya se presentaba en la población Amerindia pre-colombina, sugiriendo que dicha enfermedad podría ser frecuente en dichas poblaciones previo a la conquista de América. De esta forma y pese a que los estudios poblacionales sistemáticos son escasos, los datos disponibles

sugieren que esta alta prevalencia era compartida, probablemente, por todos las poblaciones nativas de las Américas.

En otras poblaciones, por ejemplo EEUU, los cálculos biliares afectan al 10% de la población (30 millones de personas) y cada año son colecistectomizadas 750.000 personas. En Méjico, la prevalencia global de litiasis biliar es del 14.3%, ligeramente mayor a la observada en países industrializados como Japón y EEUU (*Ménedez-Sánchez et al., 1993*). En los países anglosajones, la litiasis vesicular es menos frecuente que en países como Chile, Bolivia, Méjico o algunas áreas de Japón, donde puede llegar a ser del 30% en la población adulta (*Everhart et al., 2002; Lammert and Sauerbruch, 2005*), mientras que en India y China las prevalencias registradas han sido menores del 7.4 % y 5.1%, respectivamente (*Khuroo et al., 1989*).

Un factor llamativo a considerar es que la litiasis biliar ya estaba presente en los amerindios precolombinos en Perú y Chile, lo que sugiere que este rasgo fue común en las poblaciones amerindias, incluso antes de la conquista de hace 500 años. Hay muy pocos estudios acerca de la prevalencia de este rasgo en Centro y Sudamérica (*Duggirala et al., 1999; Everhart et al., 2002*).

Como podemos observar en los estudios epidemiológicos disponibles, existe una gran variabilidad interpoblacional en la prevalencia de la litiasis biliar, lo que se explica en base a diferencias interétnicas, que a su vez reflejan características genéticas, y a la impronta de continuadas influencias ambientales distintas. Todo esto sugiere, a su vez, que puede haber “genes litogénicos” específicos que estén ampliamente distribuidos en las poblaciones americanas que han podido ser trasferidos a la población mestiza contemporánea (descendientes de españoles u otros europeos y amerindios). Sin embargo, no hay estudios sistemáticos sobre la predisposición genética en poblaciones con componente amerindio.

Como hemos descrito anteriormente, la fisiopatología de la litiasis biliar es poligénica, siendo los mecanismos fundamentales: el disbalance en la secreción de colesterol (*Wang et al., 2013*), las reacciones inflamatorias del epitelio vesicular (*Maurer, 2009*), la producción de mucina (*Chuang et al., 2012*) y las alteraciones de la motilidad de la vesícula biliar (*Lavoie et al., 2012*).

El principal mecanismo por el que se forman los cálculos biliares es el producido por una alteración en la homeostasis del colesterol. Existen varios fenotipos derivados de genes que son los responsables de las variaciones de las diferentes lipoproteínas y que, a su vez, afectan a la cantidad de colesterol disponible en la vesícula. El colesterol de la bilis proviene principalmente del colesterol preformado que circula en el plasma y se une a diferentes apolipoproteínas; las moléculas transportadoras de colesterol como Apo E y Apo B controlan la disponibilidad de colesterol para la secreción biliar, aunque los estudios disponibles arrojan datos controvertidos sobre su asociación con la coleditiasis (*Mella et al., 2007*).

Una de las causas más importantes de sobresaturación de colesterol en la vesícula biliar consiste en el incremento de la secreción de colesterol a la bilis, así como una disminución de sales biliares y fosfolípidos que podría estar causada por una disfunción, tanto de los transportadores hepatocanales de los lípidos biliares como de enzimas de glucuronización que influyen en las concentraciones de solutos en la bilis.

Más del 90% de los cálculos biliares están constituidos por colesterol y se forman en la vesícula biliar. La sobresaturación de colesterol en la bilis es el prerrequisito más relevante para la formación de las piedras. La bilis contiene agua (90% del peso) y tres tipos de lípidos: colesterol, fosfolípidos y sales biliares. Para cada uno de estos compuestos hay proteínas transportadoras específicas del grupo ATP "binding-cassette" que se expresan en el dominio canalicular de la membrana de los hepatocitos: El *ABCB4* que en el ser humano se denomina también *MDR3* y que transporta fosfolípidos del interior al exterior de la membrana, el *ABCB11* o bomba de salida de sales biliares y el transportador *ABCG5* y *ABCG8* de colesterol que forman heterodímeros (*Maurer et al., 2009*). La formación de cálculos también puede verse aumentada por disminuida motilidad vesicular y por otros factores proteicos como la mucina y posiblemente por el *Helicobacter Pylori* (*Marschall et al., 2010*).

Se han identificado un amplio número de genes candidatos como litogénicos en estudios en ratones (*Lyons and Wittenburg, 2006*), todos relacionados con la regulación de la síntesis, captación y excreción de los lípidos hepatobiliares (**Figura 2**). Entre ellos, los genes que codifican para el transportador hepatocanalicular ***ABCG5/8***. Este heterodímero participa en el transporte de colesterol, entre otros esteroides, desde los enterocitos y hepatocitos al intestino y la bilis, respectivamente; por lo tanto, participan en el mantenimiento de niveles

bajos de colesterol plasmático y aumento en la excreción de colesterol a nivel biliar. La disrupción del gen *ABCG5/8* en el ratón da lugar a un aumento de la absorción de esteroides de plantas de la dieta, lo que se asocia con aumento de sitosterol en plasma y muy baja concentración de colesterol en bilis en comparación con el wild-type control y lo contrario ocurre con la sobreexpresión del transportador *ABCG5/G8*, que incrementa el contenido de colesterol en la bilis (Yu et al., 2002). El receptor hepático X (LXR) codificado por *NR1H3* es activado por oxisteroides, y el heterodímero LXR/RXR induce la expresión de *ABCG5/G8* y, consecuentemente, incrementa la secreción de colesterol hacia la bilis (Kalaany and Mangelsdorf, 2006).

En el ser humano, un análisis de genoma amplio (GWAS) en familias mejicanas identificó un locus de susceptibilidad a cálculos biliares en el cromosoma 10 1p10, y también en cromosomas 2p, 3q, 4p, 9p, 10p y 16q solapándose con el locus LITH. (Puppala et al., 2006). Otro estudio del mismo tipo de asociación en pacientes de colelitiasis de Alemania y Chile (Buch et al., 2007) identificó la variante D19H del gen *ABCG8*, localizado en el cromosoma 2, como un factor de susceptibilidad para la enfermedad colelitiasis. También esa variante fue hallada como factor de susceptibilidad en otros estudios, como el realizado en pacientes alemanes y rumanos (Grunhage et al., 2007). La misma variante alélica D19H se confirmó como de susceptibilidad a colelitiasis sintomática en China (Kuo et al., 2008). Más recientemente, Katsika et al (2010) confirmaron al D19H como factor de riesgo en gemelos suecos para el desarrollo de colelitiasis y también hallaron una tendencia para la asociación significativa ( $p=0.052$ ) de la variante Q604E del gen *ABCG5*.

En portadores europeos y americanos de la variante *rs11887534* (D19H) se observó una reducida absorción intestinal de colesterol y una síntesis hepática de colesterol aumentada, dando lugar a un colesterol total y HDL más bajos (Gylling et al., 2004). También se han encontrado niveles más bajos de colesterol y triglicéridos en otro estudio en caucásicos con esa variante alélica (Marschall et al., 2010). Consistente con esto, los portadores de la variante *rs11887534* (D19H) presentaron, junto a la regulación al alta de la síntesis de colesterol, una mejor respuesta a estatinas con mayores reducciones del HDL-colesterol (Kajinami et al., 2004). En pacientes chinos no obesos, la expresión *ABCG5/G8* en el hígado incrementó significativamente y se correlacionó con el porcentaje de colesterol biliar y con el índice de saturación del colesterol (Jiang et al., 2008). Así, tomados



conjuntamente esos datos, se deduce que la variante *rs11887534* (D19H) incrementa el transporte de colesterol hacia la bilis a través del transportador *ABCG5/G8* y, en consecuencia, origina una sobresaturación del colesterol en la bilis. Srivastava et al (2010) observaron el mismo efecto de susceptibilidad en la población del norte de la India. Sin embargo, en otro estudio en pacientes chinos no obesos se vio una asociación significativa entre el polimorfismo *rs11887534* (D19H) y niveles elevados de colesterol total y HDL (Chen et al., 2008), lo que podría atribuirse a diferente bagaje étnico y distintos hábitos dietéticos. En otro estudio de cohortes en la población general danesa (Stender et al., 2011) se ha observado una asociación significativa entre el genotipo *rs11887534* (D19H) y colelitiasis y también con el cáncer de vías biliares.

En la actualidad, el polimorfismo *rs11887534* (D19H) es el foco en el estudio en la asociación de la litiasis biliar con la dislipemia y el infarto de miocardio (Stender et al., 2014). Se ha demostrado que esta variante disminuye los niveles de colesterol LDL en plasma y consecuentemente protegería frente al infarto de miocardio. Este enlace entre el colesterol plasmático y biliar es importante porque los fármacos que disminuyen los niveles de colesterol plasmático (estatinas, ezetimibe, y fibratos) podrían producir el efecto contrario sobre el colesterol biliar, lo cual dependería de la excreción de colesterol biliar a través del transportador *ABCG5/8* y, como consecuencia, dichos fármacos podrían modular el riesgo de colelitiasis.

Otro de los genes litogénicos ampliamente estudiados es el del receptor X farnenoide (FRX), también conocido como **NR1H4** (Nuclear receptor subfamilia 1, grupo H, miembro 4), un receptor nuclear de hormonas con una actividad similar a la que poseen otros receptores de esteroides como el estrogénico o el de la progesterona, pero más similar aún a la actividad de receptores como el receptor X hepático (LXR). El receptor farnenoide es activado por los ácidos biliares, reduce la síntesis de los mismos y promueve su secreción (Kullak-Ublick et al., 2004). El FXR regula la expresión de los genes *ABCD4* y *ABCD11* y regula la síntesis de ácidos biliares hepáticos, lo que a su vez impacta en numerosos genes que regulan la compleja homeostasis del colesterol, triglicéridos y glucosa (Lefebvre et al., 2009).

Existen estudios con animales que muestran que la activación del receptor reduce la litiasis biliar causada por concentraciones elevadas de ácidos biliares (Moschetta A, 2004).

Los estudios realizados sobre cohortes de diferentes poblaciones indican que la sobreexpresión del gen del *FXR*, podría contribuir en parte a producir una bilis litogénica, disminuyendo la degradación del colesterol en la bilis y consecuentemente produciendo su sobresaturación. Esta conclusión viene refundada por la disminución de la secreción de colesterol y fosfolípidos cuando se compara con controles sanos (Kovacs, 2008).

La superfamilia de enzimas **uridinadifosfato-glucuroniltransferasas (UGT)** son unas proteínas responsables de la conjugación de sustancias endógenas y xenobióticos que las convierte en hidrosolubles y por tanto excretables por orina o bilis. Existen cuatro familias: *UGT1A*, *UGT2*, *UGT3* y *UGT8*. *UGT2* se divide en otras dos subfamilias, *UGT2A* y *UGT2B*, presentes en el cromosoma 4 (Barbarino et al., 2014). La familia *UGT1A1* está localizada en cromosoma 2q37. Estas enzimas glucuronizan gran variedad de compuestos, incluyendo gran variedad de fármacos, lo que les otorga a las enzimas un interés notable en investigación (<http://pharmgkb.org/gene/PA420>). El gen *UGT1A* capacita la transcripción de nueve enzimas: *UGT1A1* y *UGT1A3* hasta *UGT1A10* (Gong et al., 2001).

Uno de los transcritos codificados por el locus *UGT1A* es *UGT1A1* que se expresa en hígado así como en el colon, intestino y estómago (Barbarino et al, 2014). Una de sus funciones principales es el metabolismo de bilirrubina en hígado, el producto hidrofóbico del catabolismo del grupo hemo, sin que existan otras enzimas capaces de realizar esta función ni tampoco vías alternativas para la detoxificación de la bilirrubina (Schauer et al., 2003). Así, los pacientes con enfermedad de Crigler-Najjar tipo 1 son modelo de este concepto; son homo o heterocigotos para variante de la enzima inactiva y son incapaces de eliminar bilirrubina al no tener lugar la conjugación con glucurónico (Servedio et al., 2005).

Existen 113 diferentes variantes del gen. Esas variantes confieren actividad reducida o aumentada y también fenotipo inactivo o normal. ([http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/cms/ugt\\_alleles](http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/cms/ugt_alleles)).

Diferentes variantes alélicas están relacionadas con enfermedad. Así, los homocigotos o heterocigotos del alelo *UGT1A1* inactivo presentan una completa ausencia de conjugación de la bilirrubina dando lugar a la enfermedad de Crigler-Najjar tipo I. La hiperbilirrubinemia produce kernicterus con daño neurológico irreversible, severa discapacidad o muerte (Schauer at al., 2003). En el tipo II de esta enfermedad existe una

actividad residual de la enzima confiriendo un fenotipo moderado que puede ser tratado con fenobarbital para inducir la enzima.

La enfermedad de Gilbert es una alteración más moderada de hiperbilirrubinemia no conjugada, como consecuencia de una disminución parcial de la actividad de la enzima *UGT1A1* (Kadokol et al., 2000), siendo la variante alélica *UGT1A1\*28* (*rs8175347*) la más prevalente a nivel mundial (Beutler et al., 1998). Los estados de enfermedad, ayuno y estrés pueden precipitar un aumento de bilirrubina en estos pacientes manifestándose clínicamente como ictericia y, ocasionalmente, dolor abdominal, que típicamente se resuelven espontáneamente, considerándose esta enfermedad benigna y sin relevancia clínica (Bosma et al., 1995), si bien, la disminución de la actividad de la enzima podría llegar a tener relevancia en el contexto de toxicidad farmacológica.

Los datos registrados por GWAS sobre la litiasis biliar han identificado a la variante polimórfica de la *UGT1A1* como gen candidato a la formación de litiasis (Johnson et al., 2009). Otros estudios realizados en diferentes poblaciones han confirmado esta asociación (Buch S, 2010; Marschall et al., 2013). De este modo, se ha demostrado que la adición de dos bases extra (TA) a la región normal  $A(TA)_6TAA$  en el promotor y la variante  $A(TA)_7/TA_7$ , asociada a hiperbilirrubinemia en el síndrome de Gilbert (variante *UGT1A1\*28*) se considera un factor de riesgo importante para colelitiasis y recurrencia de esta enfermedad (Marschall et al., 2013). Asimismo, se han encontrado diferencias interétnicas de esta variante. Así, en la población chilena con componente amerindio dicha variante del síndrome de Gilbert, podría explicar hasta el 30 % de riesgo genético de la litiasis biliar (Méndez et al., 2013).

Una captación disminuida de ácidos biliares puede tener importancia patogénica. La variante *A105G* del gen ***SCL10A2*** que codifica para el transportador apical sodio-dependiente de ácidos biliares (ASBT) se ha identificado como factor de riesgo para la enfermedad colelitiásica y con especial relevancia el alelo menor *rs95414089* (Renner et al., 2009). Este transportador juega un papel importante en la cantidad de ácidos biliares circulantes, y por tanto en la homeostasis del colesterol. El gen *SLC10A2* codifica para la proteína transportadora de sales biliares del colangiocito cuya expresión se vio disminuida en un estudio experimental en ratones a lo que se le aportaba una dieta litogénica y que a su vez estaba mediada por la absorción intestinal de ácidos biliares (Dawson et al., 2003; Liu et

*al., 2008*). La proteína codificada por este gen está regulada por cambios en la expresión génica en respuesta a la concentración de sales biliares y citocinas inflamatorias y a su vez su vez también se encuentra regulada a nivel del colangiocito por la hormona secretina (*Alpini et al., 2005*).

Otro gen implicado en la regulación de los niveles de bilirrubina es el gen **SLCO1B1** que codifica para una proteína de membrana transportadora de aniones orgánicos independiente de sodio (OATP1B1). Esta proteína se expresa de forma predominante en la membrana basolateral del hepatocito y permite la translocación de un amplio grupo de compuestos, como los ácidos biliares, las hormonas tiroideas, xenobióticos, así como la distribución de diversos fármacos (*Oshiro et al., 2010*). Se ha descrito el importante papel de esta proteína en el transporte intrahepático de muchos fármacos, entre los que destacan los inhibidores de la HMG acetil-Coa reductasa (*Mangravite and Krauss, 2007*), lo que confiere una gran relevancia al *SLCO1B1* en farmacogenética.

Por otra parte, esta proteína es la responsable del transporte de las sales biliares que provienen de la circulación enterohepática; por lo tanto, las variaciones en esta proteína podrían disminuir la concentración de sales biliares, aumentando el riesgo de litiasis biliar. Un estudio reciente ha asociado la variante p155T (*rs11045819*) con aumento del riesgo de litiasis biliar (*Srivastava, 2011*).

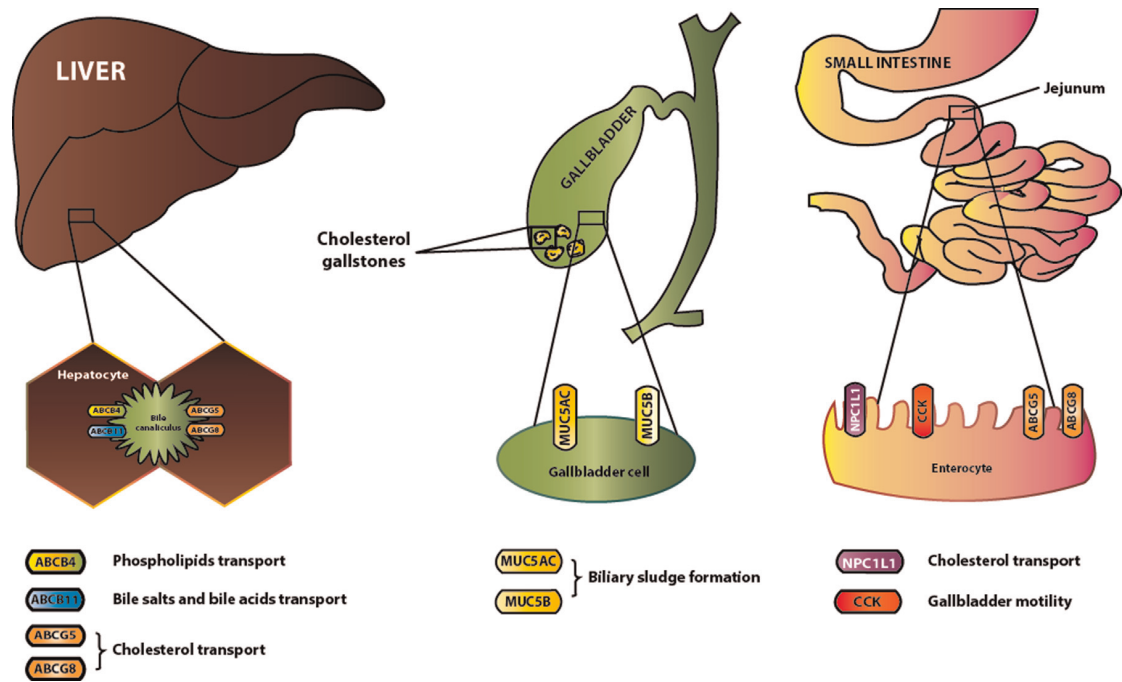


Figura 2. Claves moleculares en la formación de colelitiasis. Proteínas encargadas del transporte de colesterol a través de la membrana del hepatocito (ABCG5/8) y su regulación por otros transportadores de lípidos biliares. biliaresreguladores del transporte. La absorción intestinal de colesterol y la fisiopatología de la vesícula biliar (MUC, CCC,) junto con otras moléculas descritas en nuestro estudio, futuras dianas terapéuticas en la prevención de la formación de litiasis biliar. (Tomado de Castro-Torres and Martín-Vázquez, 2015)

## I.6.LA POBLACIÓN AMERICANA DE ECUADOR

### I.6.1. TEORIAS SOBRE EL POBLAMIENTO DE AMERICA.

A través de los años se han postulado diferentes teorías sobre el poblamiento de América, entre las que destacan la teoría del poblamiento tardío y la del poblamiento temprano.

La **teoría clásica, teoría del poblamiento tardío o teoría Clovis**, sostiene que hace aproximadamente 13.000 años, un pequeño grupo de seres humanos nómadas procedentes de Siberia había llegado al continente americano por el Estrecho de Bering en Alaska durante la era de hielo y que posteriormente migraron hacia el sur a través de valle del río Mackenzie, en la zona oeste de la actual Canadá, a medida que el glaciar retrocedía para constituir la

cultura Clovis, de la cual a su vez descienden todas las demás culturas americanas (*Michael et al., 2007*).

El término Clovis proviene de la localidad de Clovis en Nuevo Méjico (USA), próxima al lugar donde se encontraron por primera vez las piezas características de su cultura. La cultura Clovis fue considerada a mediados del siglo XX como la más antigua cultura indígena de América con una antigüedad de 13.500 años. En 1932, el examen de una excavación confirmaba un asentamiento indígena que existió durante el Pleistoceno, datado entre el 9.050 y el 8800 a.C. Asimismo, se han identificado yacimientos Clovis en Méjico y Centroamérica (*Waters et al., 2007*).

Entre los argumentos que constituyen la base del poblamiento tardío se cuentan: que la fecha más antigua de la Cultura Clovis es del 13.000 a 11.050 a.C. probado de forma rigurosa la existencia de otros hallazgos arqueológicos que contengan presencia humana anterior a Clovis, siendo éste el argumento más importante; otro argumento sería la intransitabilidad del corredor de Mackenzie hasta hace por lo menos 14.000 años al ser intransitable por estar cubierto totalmente por glaciares; asimismo, la muy escasa cantidad de huesos humanos que se atribuyen al período pre-Clovis hace que sea difícil asumir la existencia de seres cualquier cultura anterior.

En cuanto al origen de la ola migratoria Clovis, actualmente se acepta de forma unánime que el lugar de origen es Asia, apoyándose principalmente en las semejanzas antropomórficas entre el hombre asiático y el amerindio: cabellos lacios y oscuros, ojos con pliegue mongólico, pómulos anchos y salientes, dientes en forma de pala, escasa pilosidad en la cara y otras semejanzas, tales como la “mancha mongólica”, pigmentación verdosa congénita que presentan los indígenas y asiáticos al nacer y que desaparece a lo largo de los años (*Novick et al., 2006*).

Pese a que los estudios genéticos apoyan la idea de que los primeros inmigrantes procedían de Asia, no existe consenso sobre su origen geográfico preciso, siendo la población de Siberia fue la primera población que se estudió, debido al paso obligatorio por esta región en su migración hacia América.

El hecho de que las poblaciones de las montañas de Altai en Mongolia y del sureste de Siberia posean los cuatro linajes mitocondriales A, B, C y D, nombrados en 1992, ha focalizado la atención hacia este enclave como origen de las migraciones hacia América (*Derenko et al., 2003*). Además el estudio de los polimorfismos en el cromosoma Y muestra la existencia de halogrupos específicos de nativos americanos en individuos del sur de Altai (*Zegura et al., 2004*).

Por su parte, la población china está muy cerca genéticamente a los nativos americanos. La secuencia ALU de chinos, está más próxima a los grupos de Norteamérica que a los de Centroamérica y Sudamérica, por lo que se postula que se debiera a un aislamiento corto de las poblaciones de Norteamérica tras una primera ola migratoria (*Novick et al., 1998*). Se han encontrado, asimismo, fuertes afinidades genéticas entre nativos americanos y asiáticos del noreste, que son los que se corresponden con los alelos HLA y sus haplotipos. Así la población Aniu del norte de Japón, posee un patrón HLA intermedio entre los nativos americanos y la mayor parte de las poblaciones del noreste de Asia.

Las poblaciones de Asia y Siberia también poseen los cuatro grupos de haplotipos mitocondriales predominantes A, B, C y D que se encuentran en los indígenas americanos. La antigüedad de las variantes americanas de los haplotipos A, B, C y D se estiman entre 35.000 y 20.000 años antes del presente. Para el haplotipo B las cifras son menores por lo que se postula la hipótesis de migraciones diferenciadas (*Forster et al., 1996*).

De este modo, la distribución de los cuatro haplotipos mitocondriales en América no es uniforme. En Araucanía y Patagonia: predominio del haplotipo D seguido del C; en Andes: predominio del haplotipo B , seguido del D y el A (destacando Bolivia seguida de Perú, el norte de Chile, el Ecuador y la región pacífica precolombina); Este de Sudamérica: aquí los cuatro subgrupos se hayan dispersos sin que ninguno de ellos sobresalga claramente; Mesoamérica y Centroamérica: predominio marcado del haplotipo A, seguido del B; Árido América: que corresponde al norte de México y suroeste de los EEUU, prevaleciendo el haplotipo B; Amerindio del norte: el haplotipo A es el mayoritario en Norteamérica y Canadá (*Schurr, 2012*).

En 1998 se descubrió el quinto linaje mitocondrial, el haplogrupo X, que presenta una distribución filogeográfica diferente. El haplotipo X es típico de Eurasia Occidental, encontrándose en Europa en bajas frecuencias y circunscribiéndose en el Nuevo Mundo sólo a Norteamérica (*Smith et al., 1999*). La separación de la variante X americana se produjo en el Paleolítico y no parece proceder de ninguna de las variantes europeas conocidas, sino que se relaciona con una variante conocida proveniente de Irán (*Brown et al., 1998*).

La migración, la selección y la deriva genética, pueden alterar la distribución de haplotipos. Aun así, la población mongoloide comparte un elevado porcentaje de haplotipos con los nativos americanos, lo que sugiere fuertemente que esta población podría ser el origen de la población fundadora de América (*Merriwether et al., 1996*).

Esta teoría de poblamiento temprano ha sido cuestionada en los últimos años por científicos provenientes de diversas áreas (arqueólogos, genetistas, lingüistas, etc) y por la aparición de ciertas evidencias arqueológicas, lo cual ha generado un sonoro debate internacional sobre este asunto. Estas nuevas teorías sostienen una mayor antigüedad y otras rutas alternativas para el primer ingreso de las poblaciones en América, lo que conforma la teoría del poblamiento temprano o pre-clovis, anterior a estas fechas (*Fagundes et al., 2008*).

La **teoría del poblamiento temprano** parece probada actualmente por muy diversos datos empíricos y significa un cuestionamiento definitivo, tanto a la hipótesis de la migración única fundadora de los pueblos amerindios, como a la idea según la cual la entrada de poblaciones humanas al continente se produjo únicamente después del año 14.000 a.C.

Esta teoría trata de contestar a una importante pregunta: si las migraciones paleoamericanas fueron todas a través del paso de Bering, ¿cómo es posible que los asentamientos del sur sean más antiguos que los del norte?. Para dar respuesta a esta pregunta, actualmente, se está trabajando en una posible migración circunpacífica norte-sur, formulada por Bryan (1978) y Fladmark (1979) que aclararía por qué los mayores fechados en el Sur son tan antiguos, rechazando la teoría Clovis primero aunque no se opondría a la dirección mayoritariamente aceptada acerca de la entrada de Clovis por el puente de Bering.



De acuerdo a esta teoría, América fue poblada por pobladores de Oceanía, como malenesios y polinesios que habrían llegado por rutas transpacíficas y además por poblaciones asiáticas ya descritas anteriormente. Los argumentos que avalan estas teorías son: antropométricos (semejanza ósea y sanguínea con antiguos cazadores que habitaron Brasil), etnográficos (las tribus de Malasia amazónicas comparten costumbres y rituales, como por ejemplo , la cacería de cabezas trofeo y la mutilación de las falanges en señal de duelo), culturales (uso de puentes colgantes, tambores de madera, etc) y lingüísticos semejanza de vocablos malanésicos con los de los indios Hoka de Norteamérica (*Hubbe et al ., 2010*).

Otras teorías incluyen la que postula una procedencia polinésica (Rivet,1943) según la cual, los maoríes habrían cruzado el Pacífico llegando a la costa oeste de Sudamérica. Esto se sustenta en semejanzas lingüísticas y culturales de la cultura maorí y quechua de Perú. Sin embargo, estas teorías están siendo cuestionadas ya que esta semejanza cultural podría deberse a viajes realizados por navegantes peruanos en la época pre-hispánica.

Existe también la teoría de una migración Australiana a través de la Antártida, continente que podría haber sido atravesado cuando gozaba de un clima óptimo en el Holoceno. Entre las semejanzas que apoyan esta hipótesis se encontrarían los grupos sanguíneos, las formas craneales, la resistencia al frío y el uso de instrumentos musicales similares (*Bryan, 1978; Neves and Hubbe, 2005*).

Los primeros paleoamericanos podrían haber salido también de puntos como las islas Aleutianas o más al sur como de la península de Kamchatka, durante la transición pleistoceno-holocénica; habrían llegado al continente aprovechando accidentes naturales libres de barreras de hielo como la cuenca de Méjico, lo que explicaría restos paleoamericanos datados antes de 12.000 años (*Guzman, 2000*).

Desde hace muchos años que antropólogos, arqueólogos y genetistas debaten sobre el origen de los pueblos de América y las de estas conexiones. Una de las cuestiones principales corresponde a si esta colonización ocurrió por una única oleada migratoria o por varias oleadas migratorias desde Siberia. Además está sin aclarar el patrón de dispersión a través de las Américas. Para responder etas preguntas se ha realizado un estudio reciente que incluye el genotipado de grupos de nativos americanos y siberianos, demostrando que

los nativos americanos descienden de al menos tres oleadas de migración desde Asia, si bien, la mayoría desciende de una única población ancestral llamada “el Primer Americano”, sin embargo, los eskimo-aleutianos y los Na-Dene de Canadá provienen de una segunda y tercera oleada migratorias. Este estudio muestra que el poblamiento inicial siguió una expansión hacia el sur facilitado por la costa, especialmente en Sudamérica. La mayor excepción corresponde a los Chibchas a los dos lados del istmo de Panamá, cuyos ancestros provienen tanto de Norteamérica como de Sudamérica. Sin embargo estos datos permanezcan abiertos a investigaciones futuras (Reich et al, 2012; Raghavan et al, 2015).

## **I.6.2. POBLACIÓN DE ECUADOR**

Ecuador es un país situado en el noroeste de América del Sur. Limita al norte con Colombia, al sur y este con Perú y al oeste con el océano Pacífico. Tiene una extensión de 256.370 km<sup>2</sup> y una población de acuerdo con los datos de 2014 de 15.900.000 personas con la más alta densidad poblacional de América del Sur (62 habitantes por km<sup>2</sup>). Aproximadamente el 75% de la población reside en los centros urbanos, mientras que el resto habita en el medio rural; con más de cinco millones y medio que viven en la Sierra. En la costa del Pacífico son aproximadamente 7 millones, mientras que en la Amazonía hay alrededor de 600 mil habitantes y en Galápagos cerca de 17mil.

La población es étnicamente muy diversa, siendo los grupos más numerosos: el mestizo (55%) que es el mayoritario, con bagaje genético mezcla de europeos, sobre todo españoles, y amerindios originarios de Asia (y, probablemente de ancestros preclovis), el nativo amerindio (22%), el blanco (descendientes de españoles y otros países europeos) 17% y el mulato y afroamericano, que conforma el 3% del total de una población, cuya mayoría se ubica en la provincia de Esmeraldas y un pequeño porcentaje de otras etnias (3%) ([http://siteresources.worldbank.org/DATASTATISTICS/Resources/GDP\\_PPP.pdf](http://siteresources.worldbank.org/DATASTATISTICS/Resources/GDP_PPP.pdf))

Los primeros asentamientos humanos bien documentados en el territorio ecuatoriano se remontan a 12.000 años a.C (El Inga, Chobshi, Cubilán, Las Vegas). El imperio incaico conquistó la región a mediados del siglo XV, y la conquista española de este territorio se inició en 1534, siendo colonia española durante casi trescientos años. La época

independentista tuvo sus orígenes en 1809. Después de la definitiva independencia del dominio español, parte del territorio se integró rápidamente en Colombia, mientras que el territorio del litoral permaneció independiente hasta la anexión vía militar por parte de Simón Bolívar. En 1830 los territorios colombianos del sur se separaron y se creó la nación ecuatoriana (*Claiborne, 1994*).

Ecuador está dividido en cuatro regiones geográficas: la Costa, que comprende poco más de la cuarta parte del país; la Sierra, que se extiende en una doble hilera de montañas y una estrecha meseta deshabitada como valle interandino, el oriente o región amazónica, al este de los Andes y la región Insular, que a parte de las diferencias geográficas, poseen diferencias económicas y sociales, que condicionan el modus vivendi de los pueblos que albergan. Tienen orígenes muy diversos, algunos descienden de los españoles como producto de mestizaje con amerindios, tales como los cholos de la costa, los mestizos de la sierra y los montubios. Otros descienden de los esclavos africanos traídos durante la colonización, que escaparon de las costas Esmeraldas, lugar donde estaban cuando se abolió la esclavitud. Algunos descienden indirectamente de los incas, como los saraguros y los quichuas que huyeron a la selva durante la conquista de América por los españoles. La gran mayoría de las etnias son originarias de Oriente, esto es amerindios (*González-Andrade, 2006*).

En las regiones continentales conviven 14 nacionalidades indígenas con tradiciones diversas y su propia cosmovisión. Las nacionalidades indígenas amazónicas más conocidas son: Huaorani, Achuar, Shuar, Cofán, Siona-Secoya, Shiwiar y Záparo. Los tageari, parientes de los hourani, conforman otro pueblo de la zona pero éste fue declarado como “intangible” por el Estado, en su voluntad de vivir alejados de la civilización. En la sierra, están los quichuas con pueblos como los otavalos, salasacas, cañaris y saraguros, En la parte norte se encuentra la comunidad de los awa. En la costa del Pacífico están los chachis, cayapas, tsáchilas y huasncavilcas. En las ciudades y pueblos viven principalmente mestizos, blancos y afroecuatorianos.

Los Mestizos son el grupo más numeroso y representativo del país y son descendientes de españoles (caucásicos) e indígenas nativos (amerindios). Este grupo híbrido, existe desde hace 500 años. Existen, a su vez, otros grupos menores, tales como los

Mulatos, que provienen de una mezcla entre caucásicos y negros, o los Zambos, una mezcla entre amerindios y negros. La unión entre un conquistador y un amerindio tenía razones políticas o religiosas como la dominación de un territorio o la conversión al Catolicismo. Esto explicaría la fuerte carga genética indígena que se observa dentro de la sociedad moderna.

Las poblaciones amerindias nativas de los Andes se han clasificado en dos grupos según el lenguaje que practican: los que hablan Quechua y los que hablan Aymara (*Rodriguez – Delfín et al., 2001*). Quechua, con “e”, es el lenguaje que se habla hoy en día por los descendientes de los incas, especialmente en Perú y Bolivia (*Gené M et al., 1998 y 2000*). La mayoría de los indígenas en Ecuador hablan Quichua que se trata de una variación antropológica del lenguaje, derivada de la mezcla inter-indígena después del período Inca y comprenden una población de aproximadamente 3.000.000 de habitantes (20% de la población ecuatoriana), representando el grupo mayoritario amerindio de Ecuador. La mayoría viven en la región andina. Todos hablan español como segundo idioma, impuesto por la colonización.

Los Huaoranis amerindios son el último pueblo nómada de cazadores –recolectores que existe en Ecuador. Son conocidos habitualmente como “aucas” o jíbaros, pero han sido popularizados por ser capaces de reducir cabezas, proceso denominado “tzanza”. Hablan el “Huaorani”, que según estudios lingüísticos han demostrado que no hay congéneres para esta lengua. Viven en pequeños grupos aislados en la Amazonía ecuatoriana, algunos de ellos a expensas de las compañías petroleras que deforestan y destruyen su entorno natural (*Wray, 1999*); otros individuos viven aislados sin ningún contacto con el mundo occidental como son los “Tagaeri”, los “Taromenane” y los “Oñamenane” que viven dentro del territorio legalizado.

La población negra de Ecuador descende de los esclavos africanos traídos desde la costa atlántica de África a América. Posiblemente fueron traídos primero desde Guinea a Colombia, y desde allí a Ecuador en barcos de esclavos alrededor del año 1553, año donde se registran los mayores cargamentos de esclavos. Hoy en día viven en la zona andina, en el valle de Chota y en la provincia de Esmeraldas en la costa ecuatoriana. Tienen una población de aproximadamente 500.000 individuos. Hablan español y tienen una rica cultura de

tradiciones afroamericanas. Viven de las actividades agrícolas en las zonas rurales y en las ciudades han ido asimilando la cultura urbana (*Vasquez and Santos., 2003*).

Durante la última década, Ecuador ha atravesado una grave crisis económica, la misma que fue acentuada por el fenómeno de la “dolarización”, que provocó que el Sucre se devaluara a niveles nunca antes vistos, provocando su desaparición y que el país adoptara como moneda válida al dólar. En este contexto económico, gran parte de la población optó por emigrar a Europa y EE.UU. Según el Instituto Nacional de Estadística (2015) (<http://www.ine.es/>), a primeros de Enero de 2015 residían en España 4,5 millones de personas nacidas fuera de sus fronteras. Esto representa un 9,8% de una población total registrada de 46,5 millones de personas en España. Todo ello refleja un aumento extraordinario tanto del número como del porcentaje de inmigrantes a mediados de los años 90, cuando su número era de cerca de un millón y su porcentaje rondaba un 2,5% de la población total. Durante la última década no sólo el número sino también el origen de los inmigrantes ha cambiado. Considerándolos países de origen de la inmigración vemos que en 1998 las cinco nacionalidades dominantes eran marroquíes (190.497), franceses (143.023), alemanes (115.395), británicos (87.808) y argentinos (61.323). En 2015 esta lista ha cambiado sustancialmente y se veía así: rumanos (751.208), marroquíes (749,274), británicos (282.120), chinos (191.341) e italianos (179.129). La tasa de incremento de algunas de estas nacionalidades ha sido extraordinariamente alta. Así, por ejemplo, entre 1998 y 2015, se ha incrementado 36 veces, constituyendo Ecuador el primer país americano origen de la inmigración hacia España.

## **1.7. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

La litiasis biliar es una de las patologías del aparato digestivo más prevalentes a nivel mundial, siendo la principal causa de ingreso hospitalario en Gastroenterología, con la consiguiente morbilidad y consumo de recursos sanitarios.

Asimismo, es una enfermedad multifactorial, basada en una compleja interacción de factores ambientales y genéticos y cuya prevalencia presenta una gran variabilidad a nivel

global. De esta forma, planteamos el presente estudio, que ahonda en otros realizados previamente por este equipo de investigación, sobre las diferencias interétnicas en polimorfismos de genes que codifican para otras proteínas enzimáticas y transportadoras.

Se han realizado estudios sobre diferentes polimorfismos genéticos y su relación con la génesis de la litiasis biliar que son trascendentes ya que resulta necesario identificar tanto las variantes comunes como las inusuales que puedan predisponer al riesgo de padecer litiasis biliar.

Desde el punto de vista antropológico, no existen razas diferentes, ya que la única raza existente es la humana., es bien conocido que existe una gran variabilidad interétnica que puede conducir a la presencia de diferentes polimorfismos genéticos que podrían conferir más riesgo a padecer determinadas patologías, como la que nos ocupa en nuestro estudio: la litiasis biliar.

Debido a la elevada prevalencia de litiasis biliar en las poblaciones americanas pensamos sería necesario estudiar estas poblaciones en cuanto a la prevalencia de los llamados “genes litogénicos” o variantes alélicas asociadas a colelitiasis. En este punto, la hipótesis que nos planteamos fue que la frecuencia de algunos genes litogénicos podría ser superior en la población mestiza ecuatoriana que en la población española lo que podría explicar el dato aportado por la bibliografía de una mayor prevalencia de la enfermedad en alguna población latinoamericana.

La población española constituye un mosaico no completamente homogéneo en su bagaje genético, conformado por la mezcla de poblaciones que a lo largo de los años han caracterizado el perfil de los habitantes de la península ibérica. A considerar importantemente el mestizaje que ha supuesto la presencia y dominación árabe durante ocho siglos, que ha dado lugar a diferencias en las frecuencias de polimorfismos de múltiples genes entre los españoles y otros caucasianos de otras zonas geográficas.

La elección de la población mestiza de Ecuador obedece al hecho de que constituye la población inmigrante americana más presente en España adonde se ha dirigido por razones socioeconómicas y socioculturales. Esta población se corresponde con una mezcla genética biétnica entre caucasianos procedentes de Europa, y sobre todo de España, y poblaciones

amerindias (originarias de Asia), sin poder descartar la presencia de otros ancestros más antiguos. Además, esta población, no ha sido objeto de estudio en cuanto a las variantes alélicas que se plantean en este estudio.

El trabajo pensamos que permitiría ampliar el conocimiento de las variabilidades interétnicas de los genes litogénicos estudiados y determinar si existen diferencias en las frecuencias de los llamados “genes litogénicos” entre ambas poblaciones.

El conocimiento de las frecuencias de estos rasgos genéticos puede conducir, además, a mejorar el manejo de estos pacientes en la práctica clínica, ya que podría facilitar el desarrollo de líneas de investigación en nuevas dianas terapéuticas, y el desarrollo de medidas preventivas específicas en los pacientes más susceptibles al desarrollo de litiasis biliar y sus complicaciones.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo se ha desarrollado para lograr los siguientes objetivos:

1. Detectar, si existen, diferencias entre la población española del noreste de la Península Ibérica y otra población mestiza de Ecuador en la prevalencia de las siguientes variantes alélicas: *rs9514089 (SCL10A2)*; *rs4149056* y *rs11045819 (SLCO1B1)*; *rs11887534 (ABCG8)*; *rs3762108*, *rs56163822* y *rs7138843 (NR1H4\_1)*; *rs4148323*, *rs8175347* y *rs6742078 (UGT1A1)*.
2. Establecer la prevalencia del haplotipo *NR1H4\_1* en las poblaciones española y ecuatoriana mestiza.
3. Comparar las frecuencias de las variantes alélicas determinadas en este trabajo con las de otras poblaciones del resto del mundo que se hayan descrito previamente.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### II.1. MUESTRA

La población del estudio estuvo constituida por un total de 579 individuos sanos y no emparentados. De ellos, 282 fueron blancos caucasianos del Noreste de España (Aragón) (137 hombres y 145 mujeres) y 297 (147 hombres y 150 mujeres) fueron individuos mestizos de Ecuador. Las medias (y rangos) de edad en años de los participantes fueron 27.5 (18-48) años y 26.5 (18-52) años para españoles y ecuatorianos, respectivamente. Con esta muestra se procedió al estudio de las variantes alélicas de *Nr1H4*, *SCL10A2*, *ABCG8*, *UGT1A1* y *SLCO1B1*.

Todos los participantes incluidos de Ecuador fueron Mestizos (descendientes de europeos y amerindios). La naturaleza mestiza se estableció mediante observación de los rasgos morfológicos, autoidentificación y genotipado con un panel de marcadores informativos de ancestro. Para ello se utilizó el AIM (Power PlexR 16 system kit, Promega Company, Madison, WI, USA). Los individuos fueron seleccionados al azar entre estudiantes y personal de la Facultad de Medicina de Zaragoza (Zaragoza, España) y los de Ecuador, del Hospital Metropolitano y Facultad de Medicina de Quito, Ecuador.

Todos los individuos fueron sanos, de acuerdo con la historia clínica y examen físico. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio, que fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA) (Zaragoza, España) y se condujo de acuerdo con la declaración de Helsinki y sus revisiones subsiguientes.



## II.2. MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DEL ADN GENÓMICO

### II.2.1. AISLAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ADN

La extracción del ADN se realizó por dos métodos diferentes que consistieron en sangre completa (8ml) conservada en tubos con EDTA (muestras de españoles) o bien en sangre completa (unas gotas) conservada en papel (muestras de población ecuatoriana). En el primer caso la sangre se conservó a -20°C. Una vez descongelada se añadió tampón de hemólisis, usando el microkit QIAamp DNA obtenido de Izasa, Madrid, España.

### II.2.2. MÉTODOS DE GENOTIPADO

Se han realizado 2 métodos distintos para el análisis de las diferentes variantes alélicas. Estos métodos se describen a continuación.

El método 1 consistió en pirosecuenciación que se realizó en un pirosecuenciador PSQ 96MA (Biotage AB, Uppsala, Sweden). Las secuencias nucleotídicas para determinar los SNP de los genes *SLCO1B1*, *ABCG8*, *NR1H4* y *UGT1A1* fueron seleccionadas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

El diseño de los primers correspondientes para llevar a cabo la pirosecuenciación se llevó a cabo mediante el software PSQ Assay Design version 1.0.6 (Biotage AB, Uppsala, Sweden), con el que se obtuvieron los primers forward, reverse y de secuenciación correspondientes a cada SNP o rs.

La amplificación de los diferentes SNP se realizó mediante PCR en un volumen total de 25µl, usando aproximadamente 10 ng de ADN, 2,5 µl 10X buffer-SO<sub>4</sub>, 0,5 µl 100mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10mM dNTPs, 3 µl primer forward, 3µl primer reverse y 0,1 µl Ibian Taq polymerase. Tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, 45 ciclos de 94°C durante 15 sg, annealing a 55°C durante 20 sg y 72°C durante 30 sg.

La tabla M.1 contiene las secuencias nucleotídicas correspondientes a cada SNP

**Tabla M.1. Secuencias de nucleótidos y SNP**

| <b>SNP</b>              | <b>Secuencia</b>               |
|-------------------------|--------------------------------|
| SLCO1B1-rs4149056-forB  | /biotin/ CATCTTCCGCCATGATTGT   |
| SLCO1B1-rs4149056-rev   | GCGAAATCATCAATGTAAGAAAGC       |
| SLCO1B1-rs4149056-sec   | AAGCATATTACCCATGAAC            |
| SLCO1B1-rs11045819-forB | /biotin/CAACATCGACCTTATCCACTTG |
| SLCO1B1-rs11045819-rev  | GGCAGGTTTATCATCCAGTTCA         |
| SLCO1B1-rs11045819-sec  | ACCTTTTCCCACTATCTC             |
| ABCG8-rs11887534-for    | AGAGAGGGGCTGCCGAAAG            |
| ABCG8-rs11887534-revB   | /biotin/CGACTTCCCATTGCTCACTCA  |
| ABCG8-rs11887534-sec    | AGGGGCCACTCCCCAG               |
| NR1H4-rs3762108-for     | CCACCCAACCTCCCTTGATCTTT        |
| NR1H4-rs3762108-revB    | /biotin/CATGCCTGGTTTTTGTAAGAGA |
| NR1H4-rs3762108-sec     | CCTTGCTGTCCCTTAA               |
| UGT1A1-rs8175347-for    | CACGTGACACAGTCAAACATTAAC       |
| UGT1A1-rs8175347-revB   | /biotin/TTTGCTCCTGCCAGAGGT     |
| UGT1A1-rs8175347-sec    | TGTATCGATTGGTTTTTG             |

El método 2 consistió en PCR-RFLP, mediante el que se determinaron varios SNPs. Las condiciones de la amplificación de los fragmentos correspondientes a los distintos genes fueron comunes a todos. La amplificación se llevó a cabo en 25 µl, usando entre otros componentes MgCl<sub>2</sub> 25mM, dNTPs 10mM, primers 10 µM. Tras dicha amplificación se

procedió a la consiguiente digestión de los fragmentos. En el caso de la determinación del *rs9514089 (SCL10A2)*, los primers utilizados fueron 5'-CGAGGGCAAGCAGTGTGGAG-3' y 5'-GGTGGAGGGTGGGAGGAAAG-3'. Posteriormente, se utilizó la enzima *AfaI* (Takara Bio, Inc.) para la digestión enzimática. El corte produjo los siguientes genotipos: CC (140bp + 51bp + 49bp + 35bp), CT (191bp + 140bp + 51bp + 49bp + 35bp) y TT (191bp + 49bp + 35bp).

Los primers que se emplearon para la determinación del *rs56163822 (NR1H4)* fueron 5'-CGCATTCCCACAGTCACAAAC-3' y 5'-GAATCCAAGGTCCGATCTACC-3'. La digestión se realizó mediante la enzima *FokI* (Takara Bio, Inc.), que produjo los genotipos GG (243bp + 105bp), GT (348bp + 243bp + 105bp) y TT (348bp). El caso del *rs7138843 (NR1H4)*, los primers que se emplearon fueron 5'-GTATGAAGTCTCCCACCTATC-3' y 5'-TGATTGGTTGCCATTTCCGTC-3. La digestión se realizó mediante la enzima *PshBI* (Takara Bio, Inc.). El corte produjo los siguientes genotipos: AA (145bp + 91bp), AT (236bp + 145bp + 91bp) y TT (236bp).

La determinación de los *rs4148323* y *rs6742078* pertenecientes al gen *UGT1A1*, también se llevó a cabo mediante PCR-RFLP. Los primers empleados para la amplificación del *rs4148323* fueron 5'-CAGCAGAGGGGACATGAAATAG-3' y 5'-GCCAGACAAAAGCATAGCAGAG-3', y para el caso del *rs6742078* fueron 5'-GATTAGTGAGGACCAAGGCTTC-3' y 5'-CCTGTTCTGATGAGACTTCACC-3'. Para la digestión enzimática se emplearon las enzimas *BsmBI (rs4148323)* (New England Biolabs Ltd.) y *Bccl (rs6742078)* (New England Biolabs Ltd.). En el caso de la *BsmBI* el patrón de bandas fue: AA (228 bp), AG (228bp + 178bp + 50 bp) y GG (178bp + 50 bp), mientras que para *Bccl* el patrón fue: GG (189bp + 67bp + 19 bp), GT (256bp + 189bp + 67bp + 19 bp) y TT (256bp).

### II.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se determinó si las frecuencias genotípicas de los individuos se encontraban en situación de equilibrio, de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg. Esto se

realizó por medio de la comparación de las distintas frecuencias genotípicas observadas con los valores esperados mediante una tabla de contingencia  $\chi^2$ .

Las diferencias de las frecuencias genotípicas y alélicas entre las distintas poblaciones fueron determinadas mediante contraste de proporciones con dos grados de libertad o un grado de libertad, respectivamente. El programa estadístico utilizado fue MedCalc versión 11.3.1.0 (<http://www.medcalc.be>).

El análisis de desequilibrio de ligamiento entre alelos se realizó con el programa Haploview 4.2 (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>).

Los contrastes en los que los valores de probabilidad de error tipo I resultaron ser menores de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos para el rechazo de la hipótesis nula.

## III. RESULTADOS

### III.1. AJUSTE ESTADÍSTICO

En la Tabla 1 figuran las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante *rs9514089* (*SLC10A2*) determinadas en las poblaciones ecuatoriana y mestiza. El alelo mutado *G*, asociado a aumento de riesgo de padecer litiasis biliar, ha resultado ser aparentemente más prevalente en españoles que en ecuatorianos mestizos, aunque la diferencia no alcanza la significación estadística. A nivel genotípico, la población española ostenta mayor porcentaje de individuos heterocigotos y homocigotos para el alelo mutado. Además, la frecuencia de homocigotos para el alelo *A* es menor en españoles. Al evaluar estos datos en relación al género (Tabla 2) se observa que las distribuciones de la variante *rs9514089*, siguen el mismo patrón con ausencia de diferencias significativas.

Al comparar los resultados de la variante *rs9514089* encontrados en este estudio (Tabla 3) con otras poblaciones caucásicas, se observa que en españoles la frecuencia del alelo mutado es similar a la de otras poblaciones caucásicas. El porcentaje de portadores del alelo *G* en españoles se sitúa entre el de la población nigeriana ( $p < 0.05$ ) y el de poblaciones asiáticas, estando menos presente en las poblaciones americanas ( $p < 0.05$ , en relación a la mejicana). Las frecuencias genotípicas muestran que los individuos homocigotos mutados *GG* están menos representados en españoles y nigerianos en relación a poblaciones asiáticas y americana ( $p > 0.05$ , en todos los casos). Sin embargo, los heterocigotos en la población española presentan una de las frecuencias más altas, pero sin alcanzar significación estadística es su comparación con otras poblaciones. En los individuos españoles homocigotos *AA* la prevalencia encontrada es similar a otras poblaciones, aunque significativamente menor que en mejicanos y caucásicos americanos ( $p < 0.05$ , en ambos casos).

En la población ecuatoriana mestiza, la presencia del alelo puro *A* es similar a la observada en otras poblaciones como las americanas y asiáticas, y menor que en españoles y finlandeses ( $p < 0.05$ ), así como en nigerianos ( $p < 0.001$ ). La prevalencia de individuos homocigotos para el alelo puro (*AA*), únicamente presenta diferencias estadísticamente significativas cuando se la compara con la de los nigerianos ( $p < 0.05$ ), mientras que la comparación de los homocigotos *GG* arroja diferencias con los finlandeses y nigerianos ( $p < 0.05$ , en ambos casos).

En relación con el transportador *SLCO1B1*, se han evaluado los SNPs *rs4149056* y *rs11045819*. En la Tabla 4 figuran las frecuencias alélicas y genotípicas del *rs4149056* de la población española y ecuatoriana mestiza. Se observa que el alelo mutado *C*, que produce un cambio missense en la codificación del transportador, está más representado en ecuatorianos mestizos ( $p < 0.05$ ). Así, en la frecuencia de individuos homocigotos y heterocigotos para el alelo mutado no existen diferencias significativas. La comparación de ambas poblaciones respecto al género se muestra en la Tabla 5, sin apreciarse diferencias significativas.

La prevalencia del alelo *C* del *rs4149056* en españoles es similar a la de las poblaciones caucásicas y asiáticas (Tabla 6). La comparación con otras poblaciones americanas arroja únicamente diferencias con mejicanos donde el alelo está menos presente ( $p > 0.05$ ), siendo la población nigeriana en la que el porcentaje ha sido menor ( $p < 0.0001$ ). La comparación genotípica española solo muestra diferencias estadísticamente significativas con la población nigeriana, donde el porcentaje de individuos homocigotos puros ha sido superior y menor en el caso de heterocigotos ( $p < 0.0001$ , en ambos casos). Por otro lado, la población ecuatoriana mestiza presenta una frecuencia del alelo *C* similar a la colombiana, pero superior a la mejicana ( $p < 0.05$ ). Dicha frecuencia, también ha resultado ser superior respecto a otras poblaciones, siendo el gradiente como sigue: caucásicos  $>$  asiáticos  $>$  africanos, alcanzando significación estadística con esta última ( $p < 0.0001$ ). Además, los individuos ecuatorianos mestizos homocigotos *TT* presentan uno de los valores más bajos de prevalencia de todas las poblaciones comparadas, siendo los valores más altos los de asiáticos ( $p < 0.05$ ), mejicanos ( $p < 0.05$ ) y africanos ( $p < 0.0001$ ). En el caso de los

heterocigotos ocurre justo lo contrario, presentando la población ecuatoriana mestiza una de las prevalencias más elevada observándose diferencias estadísticamente significativas frente a las poblaciones asiáticas ( $p < 0.05$ ), mejicana ( $p < 0.05$ ) y africana ( $p < 0.0001$ ).

Al evaluar los resultados del segundo SNP del gen *SLCO1B1* (*rs11045819*) en las poblaciones estudiadas se observa que, al contrario que el anterior SNP de este gen, el alelo A, que genera un cambio de aminoácido missense, es más prevalente en españoles que en ecuatorianos mestizos, aunque sin alcanzarse significación estadística (Tabla 7). La prevalencia de individuos heterocigotos CA es mayor en españoles ( $p < 0.001$ ) y la de homocigotos del alelo puro CC en ecuatorianos ( $p < 0.05$ ). Al analizar estos resultados en relación al género (Tabla 8), se observa que la distribución de frecuencias en ambas poblaciones es similar a la de la población general sin encontrarse diferencias significativas en función de dicha variable.

La comparación con otras poblaciones evaluadas en otros estudios (Tabla 9), muestra que la frecuencia del alelo mutado A en españoles es similar a la de otras poblaciones caucásicas, excepto a la de finlandeses cuya prevalencia es menor ( $p < 0.05$ ). En poblaciones asiáticas el alelo mutado está ausente ( $p < 0.0001$ ) y la mayor presencia se encuentra en africanos ( $p < 0.0001$ ). Respecto a las poblaciones americanas, el alelo A en españoles tiene una mayor presencia que en mejicanos ( $p < 0.05$ ) y similar a colombianos. Además, la frecuencia de los homocigotos españoles para el alelo puro CC es similar a la observada previamente en otras poblaciones caucásicas, excepto con finlandeses donde fue mayor ( $p < 0.05$ ). La ausencia del alelo A en asiáticos provoca que todos los individuos sean homocigotos CC, cuya prevalencia es superior a la población española ( $p < 0.0001$ ). En el otro extremo se sitúa la población nigeriana con una presencia de portadores AA superior a españoles ( $p < 0.0001$ ). Los individuos AA en poblaciones americanas fueron menos prevalentes que en españoles, presentando diferencias significativas únicamente al ser comparada con la población mejicana ( $p < 0.05$ ). En el caso de los heterocigotos del *rs11045819*, la frecuencia en la población española se encuentra entre nigerianos donde es mayor ( $p < 0.05$ ) y asiáticos, cuya ausencia se ha comentado anteriormente ( $p < 0.0001$ ). Una menor presencia de individuos heterocigotos se observa también en población americana ( $p < 0.05$ , en mejicana) y en finlandesa ( $p < 0.05$ ), respecto a españoles. La frecuencia de

homocigotos AA españoles solo presenta diferencias significativas cuando se compara con la de nigerianos ( $p < 0.0001$ ), cuya frecuencia es la mayor de todas las poblaciones que figuran en la Tabla 9.

En la población ecuatoriana, la frecuencia del alelo mutado A del *rs11045819* ocupa una posición intermedia entre asiáticos ( $p < 0.0001$ ), en la que no hay presencia, y africanos ( $p < 0.0001$ ), que arroja el mayor porcentaje de las poblaciones evaluadas (Tabla 9). También se observan diferencias aunque de menor nivel con la población caucásica americana ( $p < 0.05$ ), que presenta una frecuencia mayor. Al evaluar los genotipos, se observa que la presencia de individuos homocigotos CC en población ecuatoriana mestiza es mayor que en caucásicos ( $p < 0.05$ , en caucásicos americanos) y africanos ( $p < 0.0001$ ). El valor más alto de homocigotos CC aparece en asiáticos ( $p < 0.0001$ ). Por el contrario, la frecuencia de los heterocigotos del *rs11045819* en ecuatorianos mestizos, se encuentran en una posición intermedia entre asiáticos ( $p < 0.0001$ ), arrojando el valor más bajo, y caucásicos ( $p < 0.05$ , en caucásicos americanos). La mayor prevalencia se encuentra en la población nigeriana ( $p < 0.0001$ ). Finalmente, los homocigotos AA en la población ecuatoriana mestiza son menos prevalentes que los de la población africana ( $p < 0.0001$ ).

La Tabla 10 muestra el SNP *rs11887534* (*ABCG8*), perteneciente al complejo proteico ATP-binding cassette, sin que se observen diferencias significativas entre españoles y ecuatorianos mestizos. En ambas poblaciones, el porcentaje de homocigotos para la mutación, implicados en un cambio missense a nivel de transcripción, es cercano a cero. Esto mismo ocurre, en la comparación de ambas poblaciones respecto al género (Tabla 11).

La frecuencia del alelo puro G en españoles es similar a la descrita previamente en otras poblaciones caucásicas (Tabla 12) y ligeramente inferior a la de las poblaciones asiáticas ( $p < 0.05$ , vs chinos y  $p < 0.001$ , vs japoneses). La presencia de este alelo es similar a la descrita en africanos y americanos, excepto en mejicanos en los que resultó ser inferior ( $p < 0.05$ ). Como se acaba de mencionar, la frecuencia de homocigotos mutados es prácticamente cero en la población española así como en las demás poblaciones evaluadas previamente. En el caso de los heterocigotos, la población española presenta un valor superior al observado en las asiáticas ( $p < 0.001$ ) y similar al del resto de poblaciones,



excepto a la mejicana que muestra una frecuencia mayor ( $p < 0.001$ ). En cuanto a los homocigotos puros *GG*, se observa que el porcentaje de portadores en españoles es inferior que en asiáticos ( $p < 0.001$ , en japoneses y  $p < 0.05$ , en chinos). Además, su frecuencia es similar a la población africana y americana, excepto la mejicana que ha resultado ser menor ( $p < 0.001$ ). El mismo patrón de distribución de frecuencias descrito en la población española, se observa al analizar la población ecuatoriana mestiza, exceptuando la comparativa de los individuos *GG* respecto a la población china ( $p < 0.001$ ).

De los tres SNPs determinados del gen *NR1H4*, codificante del receptor X farnenoide (FRX), el *rs3762108* ha mostrado que la variante alélica mutada *G*, asociada con mayor riesgo de colelitiasis, está más presente en ecuatorianos mestizos respecto a españoles ( $p < 0.0001$ ). La frecuencia de individuos homocigotos puros es mayor en españoles que en ecuatorianos mestizos ( $p < 0.0001$ ) y menor la de heterocigotos ( $p < 0.0001$ ). En ambas poblaciones hay ausencia de portadores de homocigotos para el alelo mutado (Tabla 13). Estos mismos resultados se evidencian al establecer dichas diferencias en relación al género en ambas poblaciones (Tabla 14).

En cuanto a la comparación del *rs3762108* frente a otras poblaciones estudiadas previamente, se observa una similar distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre españoles y otros grupos caucásicos (Tabla 15). Sin embargo, la frecuencia del alelo *G* en españoles fue significativamente menor respecto a asiáticos, americanos y africanos ( $p < 0.0001$ , en todos los casos). La prevalencia del genotipo *TT* es superior en españoles respecto a asiáticos, americanos y africanos ( $p < 0.0001$ , en todos los casos). En contraposición, los genotipos *TG* y *GG* son menos prevalentes en españoles que en asiáticos, americanos y africanos, dado que el alelo mutado *G* tiene una clara menor presencia.

Las frecuencias alélicas y genotípicas del *rs3762108* observadas en la población ecuatoriana mestiza, tienen una representación similar a otras poblaciones americanas (Tabla 15). La variante mutada *G* ocupa una posición intermedia entre caucásicos, con distinto nivel de significación estadística, y población asiática ( $p < 0.0001$ , en japonesa y  $p < 0.05$ , en china) y población nigeriana, donde resulta ser más prevalente ( $p < 0.0001$ ). La distribución de los genotipos *TT* y *TG* arroja diferencias significativas en el mismo sentido

que la distribución alélica. Sin embargo, el genotipo *GG*, prácticamente ausente en poblaciones americanas, ha mostrado diferencias con poblaciones asiáticas ( $p < 0.05$ ), siendo mucho más prevalente en nigerianos ( $p < 0.0001$ ).

El segundo SNP analizado del gen *NR1H4* fue el *rs56163822*. En la Tabla 16 se pone de manifiesto la menor presencia del alelo mutado *T*, asociado a riesgo de colelitiasis, en ambas poblaciones estudiadas no existiendo diferencias estadísticamente significativas en la comparación de frecuencias. Es de destacar, la ausencia de homocigotos para el alelo mutado en ambas poblaciones. Este mismo patrón de distribuciones se observa en la comparativa en relación al género (Tabla 17).

En la Tabla 18 se muestra la similitud existente entre las frecuencias alélicas y genotípicas, de españoles y otras poblaciones caucásicas. Además, se evidencia una menor frecuencia del alelo mutado *T* en españoles y por tanto, de homocigotos *TT* y heterocigotos, respecto a población asiática ( $p < 0.0001$ ). También es menor la frecuencia en españoles de este alelo respecto a los mejicanos ( $p < 0.001$ ), aunque en estos últimos los homocigotos *GG* están menos representados y los heterocigotos más ( $p < 0.001$ , en ambos casos).

La población ecuatoriana mestiza presenta similar porcentaje alélico y genotípico del *rs56163822* que la colombiana pero una menor presencia del alelo mutado *T* respecto a la mejicana ( $p < 0.05$ ). En las poblaciones americanas se evidencia una ausencia de portadores *TT*, que en mejicanos se traduce en una mayor presencia de heterocigotos respecto a ecuatorianos mestizos ( $p < 0.05$ ). Las mayores diferencias estadísticas tanto a nivel alélico como genotípico se han detectado en la comparativa con asiáticos, donde la presencia del alelo mutado fue muy superior ( $p < 0.0001$ ). Asimismo, no se observan diferencias en las frecuencias al comparar con poblaciones caucásicas y africana.

El tercer SNP del gen *NR1H4* evaluado en este estudio es el *rs7138843*, asociado a un superior riesgo de padecer colelitiasis. La Tabla 19 recoge la comparación entre españoles y ecuatorianos mestizos en la frecuencia alélica y genotípica, donde se ha detectado la presencia del alelo mutado en ambas poblaciones, aunque con menor porcentaje en españoles ( $p < 0.0001$ ). En cuanto al genotipo, en ambas poblaciones se observa la ausencia

de homocigotos para el alelo mutado, con una mayor presencia de homocigotos para el alelo puro en españoles frente a ecuatorianos mestizos ( $p < 0.0001$ ). Los individuos heterocigotos han sido significativamente más prevalentes en ecuatorianos mestizos ( $p < 0.0001$ ). En la Tabla 20 figuran estas mismas comparaciones en relación al género donde de nuevo no se observan diferencias estadísticamente significativas.

La frecuencia de los alelos y genotipos del *rs7138843* en nuestra población española ha resultado ser parecida a otras poblaciones caucásicas (Tabla 21), con algunas diferencias con población finlandesa, donde el alelo *T* es más prevalente ( $p < 0.001$ ) y el genotipo *AA* menos, destacando una superior presencia de heterocigotos finlandeses ( $p < 0.0001$ ). Asimismo, la población española posee una menor frecuencia del alelo mutado *T* y genotipo *TT* respecto a poblaciones asiáticas, americanas y africanas ( $p < 0.0001$ , en la mayoría de las comparativas). De forma contraria, el genotipo *AT* en españoles presenta menor prevalencia en la comparación con dichas poblaciones ( $p < 0.0001$ ). Como en las poblaciones caucásicas, destaca la ausencia de portadores homocigotos para el alelo mutado en colombianos y ecuatorianos mestizos, presentando los mejicanos un porcentaje del 6.2% ( $p < 0.001$ ). La mayor prevalencia de este genotipo se observa en poblaciones asiáticas y nigeriana ( $p < 0.0001$ ).

La presencia del alelo *T* del *rs7138843* y del genotipo *TT* en ecuatorianos mestizos es similar a la de colombianos e inferior a la de mejicanos ( $p < 0.0001$ , en ambos casos). El porcentaje de este alelo y genotipo observado en ecuatorianos mestizos ocupa una posición intermedia entre caucásicos, donde la prevalencia es menor, y asiáticos y nigerianos, con distinto nivel de significación tal y como aparece en la Tabla 21. Además, se puede observar que la frecuencia de individuos *AT* es similar en población americana, inferior respecto a población asiática y nigeriana ( $p < 0.0001$ , en ambos casos) y superior a poblaciones caucásicas, con distinto nivel de significación. Como se ha comentado anteriormente, la ausencia de individuos *TT* en ecuatorianos mestizos, determina que únicamente existen diferencias con asiáticos, africanos ( $p < 0.0001$ , en ambos casos) y mejicanos ( $p < 0.001$ ).

Los tres SNPs estudiados del gen *NR1H4* han resultado en desequilibrio de ligamiento en las dos poblaciones que han sido objeto de estudio experimental en esta memoria, con

valores  $D'$  en el análisis de 0.83 y 0.82 según el SNP considerado en españoles y 0.59 y 0.58 en ecuatorianos mestizos. (Figura III.1). El haplotipo asociado a riesgo de padecer coleditiasis tiene una prevalencia del 96% en españoles y tan solo del 77% en ecuatorianos mestizos ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 22). En dicha tabla figura la comparación con otras poblaciones, donde se aprecia la similitud de frecuencia entre españoles y alemanes, y su mayor prevalencia respecto poblaciones americanas siendo el gradiente caucásicos  $>$  chilenos  $>$  ecuatorianos mestizos y mejicanos ( $p < 0.05$ , en chilenos y  $p < 0.0001$ , en mejicanos y ecuatorianos mestizos). Respecto a la población ecuatoriana mestiza, además destaca la diferencia con la población chilena ( $p < 0.0001$ )

En relación con el análisis de la isoenzima de fase II *UGT1A1*, se han evaluado tres SNPs: el *rs4148323*, el *rs6742078* y el *rs8175347*. En la Tabla 23 se puede observar que la frecuencia del alelo mutado *A* del *rs4148323*, que conlleva actividad enzimática reducida, es prácticamente cero en la población española e inferior a la ecuatoriana mestiza ( $p < 0.05$ ). En ambas poblaciones no se han detectado individuos homocigotos *AA*. La prevalencia de individuos heterocigotos es mayor en ecuatorianos mestizos ( $p < 0.05$ ) e inferior la de homocigotos puros ( $p < 0.05$ ). La comparación de las frecuencias respecto al género (Tabla 24) sigue el mismo patrón de distribución aunque no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

El alelo mutado *A* presenta una frecuencia similar, cercana a cero, en la población española y otras poblaciones caucásicas, así como de individuos *AA* y *GA* (Tabla 25). La peculiaridad la presenta la población finlandesa donde el alelo *A* fue más prevalente ( $p < 0.001$ ), así como el genotipo *GA* ( $p < 0.001$ ), siendo menor el genotipo *GG* respecto a otros grupos caucásicos ( $p < 0.001$ ). En las poblaciones americanas la presencia del alelo *A* ha resultado ser mayor respecto a la española ( $p < 0.05$ ) y, la distribución genotípica muestra la ausencia de portadores *AA*, igual que en españoles, y una superior presencia de portadores *GA* ( $p < 0.05$ ). En los grupos asiáticos se ha comunicado una alta frecuencia del alelo *A* ( $p < 0.0001$ ), así como de individuos heterocigotos ( $p < 0.0001$ ). El porcentaje de homocigotos para el alelo mutado en asiáticos es superior al de españoles ( $p < 0.05$ , en chinos) y el de homocigotos para el alelo puro es inferior ( $p < 0.0001$ ). La distribución en la población nigeriana es similar a la encontrada en la española.

La población ecuatoriana mestiza presenta una distribución similar del alelo mutado *rs4148323* y de los genotipos con las poblaciones americanas (Tabla 25). Asimismo, la frecuencia del alelo *A* es superior respecto a poblaciones caucásicas (a excepción de la finlandesa) y nigeriana. Por el contrario, ha resultado ser muy inferior a la comunicada en otros estudios realizados en poblaciones asiáticas ( $p < 0.0001$ ). De la misma manera, a nivel genotípico solo se hallan diferencias significativas en la comparación con asiáticos, donde los individuos *AA* ( $p < 0.05$ , en chinos) y *GA* ( $p < 0.0001$ ) son más prevalentes pero con una menor presencia de *GG* ( $p < 0.0001$ ).

El segundo SNP evaluado del gen *UGT1A1* es el *rs6742078*. La Tabla 26 recoge la comparación de españoles y ecuatorianos mestizos. La distribución alélica y genotípica presenta una prevalencia similar en ambas poblaciones, sin encontrarse diferencias significativas. Esto mismo se evidencia en relación al género (Tabla 27).

En cuanto a la comparación del *rs6742078* con otras poblaciones estudiadas previamente, la población española ha mostrado el mismo patrón de distribución, tanto alélico como genotípico, al de otros grupos caucásicos, así como al de poblaciones americanas. Se pueden observar diferencias de frecuencias del alelo mutado *T*, asociado a un aumento de bilirrubina a nivel plasmático, en comparación con asiáticos, donde es menos prevalente ( $p < 0.0001$ , en japoneses y  $p < 0.001$ , en chinos), y con nigerianos, donde tiene una prevalencia mayor ( $p < 0.0001$ ). Las diferencias en la distribución de los alelos en asiáticos, se reflejan en las frecuencias genotípicas al compararlas con españoles, donde los homocigotos *TT* y heterocigotos son significativamente más prevalentes (Tabla 28). Respecto a nigerianos, los españoles presentan únicamente similitud en la frecuencia de heterocigotos.

La Tabla 28 también muestra homogeneidad en la distribución alélica y genotípica del *rs6742078* en poblaciones americanas. Como se ha comentado en el párrafo anterior, los ecuatorianos mestizos no presentan diferencias al compararlos con españoles. Por ello, al compararlos con asiáticos y africanos, se ponen de manifiesto las mismas diferencias de distribución.

El último SNP evaluado de la isoenzima *UGT1A1* ha sido el *rs8175347*. Los españoles y ecuatorianos mestizos muestran frecuencias similares de esta variante (Tabla 29) sin diferencias significativas en las comparaciones ( $p > 0.05$  en todos los casos). Asimismo, en la Tabla 30 se observa también la ausencia de significación estadística en la diferencia de distribución respecto al género.

La frecuencia de las variantes alélicas en españoles del *rs8175347* es similar a la observada previamente en otras poblaciones caucásicas, además de en americanas y en tunecina (Tabla 31). Por el contrario, en población china la presencia del alelo mutado  $(TA)_7$ , asociado a un descenso de actividad enzimática, ha resultado ser menos prevalente que en españoles ( $p < 0.0001$ ). En cuanto a las diferencias genotípicas, los resultados de nuestro estudio son similares a otra población española previamente estudiada, así como con otras poblaciones caucásicas. La prevalencia de los homocigotos  $(TA)_7 / (TA)_7$  en españoles es superior a la que presentan los chinos ( $p < 0.0001$ ).

La población ecuatoriana mestiza presenta una distribución de frecuencia alélica  $(TA)_7$  similar a la población chilena, tunecina y a diversos grupos caucásicos (Tabla 31), mostrando mayor frecuencia que la población china ( $p < 0.0001$ ). Al comparar las frecuencias genotípicas, se observa que las frecuencias de los tres genotipos son similares respecto a la población chilena. La presencia de homocigotos  $(TA)_6 / (TA)_6$  y heterocigotos entre ecuatorianos mestizos ha resultado ser estadísticamente superior respecto a los tunecinos ( $p < 0.05$ ). La mayor diferencia en ecuatorianos mestizos respecto a los individuos homocigotos  $(TA)_7 / (TA)_7$  y heterocigotos, se observa con la población china, donde fueron menos prevalentes ( $p < 0.0001$ , en ambos casos).

## III.2.TABLAS DE RESULTADOS

En las Tablas 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 25, y 28, los datos de las poblaciones de otros estudios previos que se han utilizado para la comparación con las poblaciones de este trabajo, corresponden al proyecto HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), versión 2010-08\_phaseII+III.

Tabla III.1. *rs9514089 (SLC10A2)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|          | Españoles |       |             | Ecuatorianos mestizos |      |             |
|----------|-----------|-------|-------------|-----------------------|------|-------------|
|          | N         | %     | 95% IC      | N                     | %    | 95% IC      |
| Alelo    |           |       |             |                       |      |             |
| A        | 350       | 62.06 | 55.72-68.91 | 389                   | 65.5 | 59.14-72.33 |
| G        | 214       | 37.94 | 33.03-43.38 | 205                   | 34.5 | 29.95-39.57 |
| Genotipo |           |       |             |                       |      |             |
| A/A      | 106       | 37.59 | 30.77-45.46 | 126                   | 42.3 | 35.34-50.51 |
| A/G      | 138       | 48.94 | 41.11-57.82 | 138                   | 46.4 | 39.04-54.9  |
| G/G      | 38        | 13.48 | 9.54-18.5   | 33                    | 11.3 | 7.65-15.6   |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.2. *rs9514089 (SLC10A2)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos de acuerdo al género.

|          | Españoles |       |             | Ecuatorianos mestizos |       |             |
|----------|-----------|-------|-------------|-----------------------|-------|-------------|
|          | N         | %     | 95% IC      | N                     | %     | 95% IC      |
| VARONES  |           |       |             |                       |       |             |
| A        | 173       | 63.14 | 54.08-73.28 | 192                   | 65.31 | 56.39-75.23 |
| G        | 101       | 36.86 | 30.02-44.79 | 102                   | 34.69 | 28.29-42.12 |
| Genotipo |           |       |             |                       |       |             |
| A/A      | 52        | 37.96 | 28.35-49.77 | 61                    | 41.5  | 31.74-53.3  |
| A/G      | 69        | 50.36 | 39.19-63.74 | 70                    | 47.62 | 37.12-60.16 |
| G/G      | 16        | 11.68 | 6.68-18.97  | 16                    | 10.88 | 6.22-17.68  |
| MUJERES  |           |       |             |                       |       |             |
| A        | 177       | 61.03 | 52.37-70.72 | 198                   | 66.0  | 57.13-75.86 |
| G        | 113       | 38.97 | 32.11-46.85 | 102                   | 34.0  | 27.72-41.27 |
| Genotipo |           |       |             |                       |       |             |
| A/A      | 54        | 37.24 | 27.98-48.59 | 65                    | 43.34 | 33.44-55.23 |
| A/G      | 69        | 47.59 | 37.02-60.22 | 68                    | 45.33 | 35.2-57.47  |
| G/G      | 22        | 15.17 | 9.51-22.97  | 17                    | 11.33 | 6.6-18.15   |

p >0.05 en todas las comparaciones



Tabla III.3. *rs9514089 (SLC10A2)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | n   | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%) |       |                     |
|---------------------|-----|------------------------|---------------------|---------------------------|-------|---------------------|
|                     |     | A                      | G                   | AA                        | AG    | GG                  |
| CAUCÁSICA           |     |                        |                     |                           |       |                     |
| Americana           | 99  | 69.7                   | 30.3                | 50.5 <sup>b</sup>         | 38.4  | 11.1                |
| Finlandesa          | 99  | 56.1                   | 43.9 <sup>1</sup>   | 32.3                      | 47.5  | 20.2 <sup>1</sup>   |
| Británica           | 91  | 69.8                   | 30.2                | 46.2                      | 47.3  | 6.6                 |
| Española            | 282 | 62.06                  | 37.94               | 37.59                     | 48.94 | 13.48               |
| ASIÁTICA            |     |                        |                     |                           |       |                     |
| China               | 105 | 63.3                   | 36.7                | 37.1                      | 52.4  | 10.5                |
| Japonesa            | 104 | 64.4                   | 35.6                | 42.3                      | 44.2  | 13.5                |
| AMERICANA           |     |                        |                     |                           |       |                     |
| Mejicana            | 64  | 72.7                   | 27.3 <sup>a</sup>   | 53.1 <sup>a</sup>         | 39.1  | 7.8                 |
| Colombiana          | 94  | 66.5                   | 33.5                | 42.6                      | 47.9  | 9.6                 |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 65.5                   | 34.5                | 42.3                      | 46.4  | 11.3                |
| AFRICANA            |     |                        |                     |                           |       |                     |
| Nigeriana           | 108 | 52.8                   | 47.2 <sup>a,2</sup> | 29.6 <sup>1</sup>         | 46.3  | 24.1 <sup>a,1</sup> |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

Tabla III.4. *rs4149056 (SLCO1B1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|            | Españoles |      |             | Ecuatorianos mestizos |       |             |
|------------|-----------|------|-------------|-----------------------|-------|-------------|
|            | N         | %    | 95% IC      | n                     | %     | 95% IC      |
| Alelo      |           |      |             |                       |       |             |
| <i>T</i>   | 494       | 87.5 | 80.03-95.66 | 494                   | 83.1  | 75.99-90.83 |
| <i>C</i>   | 70        | 12.5 | 9.68-15.68  | 100                   | 16.9* | 13.7-20.48  |
| Genotipo   |           |      |             |                       |       |             |
| <i>T/T</i> | 214       | 76.0 | 66.06-86.76 | 205                   | 69.0  | 59.9-79.15  |
| <i>T/C</i> | 65        | 23.0 | 17.79-29.38 | 84                    | 28.2  | 22.56-35.02 |
| <i>C/C</i> | 3         | 1.0  | 0.21-3.10   | 8                     | 2.8   | 1.16-5.30   |

\* $p < 0.05$

Tabla III.5. *rs4149056 (SLCO1B1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|            | Españoles |       |             | Ecuatorianos mestizos |       |             |
|------------|-----------|-------|-------------|-----------------------|-------|-------------|
|            | N         | %     | 95% IC      | N                     | %     | 95% IC      |
| VARONES    |           |       |             |                       |       |             |
| <i>T</i>   | 240       | 87.59 | 76.86-99.4  | 244                   | 82.99 | 72.91-94.09 |
| <i>C</i>   | 34        | 12.41 | 8.59-17.34  | 50                    | 17.01 | 12.62-22.42 |
| Genotipo   |           |       |             |                       |       |             |
| <i>T/T</i> | 105       | 76.64 | 62.69-92.78 | 100                   | 68.03 | 55.35-82.74 |
| <i>T/C</i> | 30        | 21.9  | 14.77-31.26 | 44                    | 29.93 | 21.75-40.18 |
| <i>C/C</i> | 2         | 1.46  | 0.17-5.27   | 3                     | 2.04  | 0.42-5.96   |
| MUJERES    |           |       |             |                       |       |             |
| <i>T</i>   | 253       | 87.24 | 76.82-98.68 | 250                   | 83.33 | 73.32-94.33 |
| <i>C</i>   | 37        | 12.76 | 8.98-17.59  | 50                    | 16.67 | 12.37-21.97 |
| Genotipo   |           |       |             |                       |       |             |
| <i>T/T</i> | 109       | 75.17 | 61.72-90.68 | 105                   | 70.0  | 57.25-84.74 |
| <i>T/C</i> | 35        | 24.14 | 16.81-33.57 | 40                    | 26.67 | 19.05-36.31 |
| <i>C/C</i> | 1         | 0.69  | 0.01-3.84   | 5                     | 3.33  | 1.08-7.77   |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.6. *rs4149056 (SLCO1B1)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | n   | Frecuencia alélica (%) |                    | Frecuencia genotípica (%) |                    |     |
|---------------------|-----|------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|-----|
|                     |     | T                      | C                  | TT                        | TC                 | CC  |
| CAUCÁSICA           |     |                        |                    |                           |                    |     |
| Americana           | 99  | 85.4                   | 14.6               | 71.7                      | 27.3               | 1.0 |
| Finlandesa          | 99  | 81.8                   | 18.2               | 66.7                      | 30.3               | 3.0 |
| Británica           | 91  | 85.7                   | 14.3               | 72.5                      | 26.4               | 1.1 |
| Española            | 282 | 87.5                   | 12.5               | 76.0                      | 23.0               | 1.0 |
| ASIÁTICA            |     |                        |                    |                           |                    |     |
| China               | 105 | 88.1                   | 11.9               | 79.0 <sup>1</sup>         | 18.1 <sup>1</sup>  | 2.9 |
| Japonesa            | 104 | 88.0                   | 12.0               | 78.8 <sup>1</sup>         | 18.3 <sup>1</sup>  | 2.9 |
| AMERICANA           |     |                        |                    |                           |                    |     |
| Mejicana            | 64  | 92.2                   | 7.8 <sup>1</sup>   | 84.4 <sup>1</sup>         | 15.6 <sup>1</sup>  | 0.0 |
| Colombiana          | 94  | 81.9                   | 18.1               | 67.0                      | 29.8               | 3.2 |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 83.1                   | 16.9 <sup>a</sup>  | 69.0                      | 28.2               | 2.8 |
| AFRICANA            |     |                        |                    |                           |                    |     |
| Nigeriana           | 108 | 99.1                   | 0.9 <sup>c,3</sup> | 98.1 <sup>c,3</sup>       | 1.9 <sup>c,3</sup> | 0.0 |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

Tabla III.7. *rs11045819 (SLCO1B1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|          | Españoles |      |             | Ecuatorianos mestizos |         |             |
|----------|-----------|------|-------------|-----------------------|---------|-------------|
|          | N         | %    | 95% IC      | N                     | %       | 95% IC      |
| Alelo    |           |      |             |                       |         |             |
| C        | 472       | 83.7 | 76.31-91.59 | 521                   | 87.71   | 80.34-95.58 |
| A        | 92        | 16.3 | 13.15-20.01 | 73                    | 12.29   | 9.63-15.45  |
| Genotipo |           |      |             |                       |         |             |
| C/C      | 196       | 69.5 | 60.11-79.94 | 232                   | 78.11*  | 68.39-88.84 |
| C/A      | 81        | 28.7 | 22.81-35.7  | 57                    | 19.19** | 14.54-24.87 |
| A/A      | 5         | 1.8  | 0.57-4.13   | 8                     | 2.69    | 1.16-5.30   |

\*\*p <0.001; \*p <0.05

Tabla III.8. *rs11045819 (SLCO1B1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|            | Españoles |       |             | Ecuatorianos mestizos |       |             |
|------------|-----------|-------|-------------|-----------------------|-------|-------------|
|            | N         | %     | 95% IC      | n                     | %     | 95% IC      |
| VARONES    |           |       |             |                       |       |             |
| <i>C</i>   | 226       | 82.48 | 72.08-93.97 | 257                   | 87.41 | 77.05-98.78 |
| <i>A</i>   | 48        | 17.52 | 12.92-23.23 | 37                    | 12.59 | 8.86-17.35  |
| Genotipo   |           |       |             |                       |       |             |
| <i>C/C</i> | 92        | 67.15 | 54.14-82.36 | 113                   | 76.87 | 63.35-92.42 |
| <i>C/A</i> | 42        | 30.66 | 22.09-41.44 | 31                    | 21.09 | 14.33-29.93 |
| <i>A/A</i> | 3         | 2.19  | 0.45-6.39   | 3                     | 2.04  | 0.42-5.96   |
| MUJERES    |           |       |             |                       |       |             |
| <i>C</i>   | 247       | 85.17 | 74.88-96.48 | 265                   | 88.33 | 78.02-99.63 |
| <i>A</i>   | 43        | 14.83 | 10.73-19.97 | 35                    | 11.67 | 8.13-16.23  |
| Genotipo   |           |       |             |                       |       |             |
| <i>C/C</i> | 104       | 71.72 | 58.6-86.91  | 124                   | 82.67 | 68.76-98.56 |
| <i>C/A</i> | 39        | 26.9  | 19.13-36.77 | 17                    | 11.33 | 6.6-18.15   |
| <i>A/A</i> | 2         | 1.38  | 0.16-4.98   | 9                     | 6.0   | 2.74-11.39  |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.9. *rs11045819 (SLCO1B1)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | N   | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%) |                     |                     |
|---------------------|-----|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
|                     |     | C                      | A                   | CC                        | CA                  | AA                  |
| <b>CAUCÁSICA</b>    |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Americana           | 99  | 79.8                   | 20.2 <sup>1</sup>   | 64.6 <sup>1</sup>         | 30.3 <sup>1</sup>   | 5.1                 |
| Finlandesa          | 99  | 92.4                   | 7.6 <sup>a</sup>    | 85.9 <sup>a</sup>         | 13.1 <sup>a</sup>   | 1.0                 |
| Británica           | 91  | 84.6                   | 15.4                | 70.3                      | 28.6                | 1.1                 |
| Española            | 282 | 83.7                   | 16.3                | 69.5                      | 28.7                | 1.8                 |
| <b>ASIÁTICA</b>     |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| China               | 105 | 100                    | 0.0 <sup>c,3</sup>  | 100 <sup>c,3</sup>        | 0.0 <sup>c,3</sup>  | 0.0                 |
| Japonesa            | 104 | 100                    | 0.0 <sup>c,3</sup>  | 100 <sup>c,3</sup>        | 0.0 <sup>c,3</sup>  | 0.0                 |
| <b>AMERICANA</b>    |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Mejicana            | 64  | 94.5                   | 5.5 <sup>a,1</sup>  | 89.1 <sup>a</sup>         | 10.9 <sup>a</sup>   | 0.0                 |
| Colombiana          | 94  | 85.1                   | 14.9                | 75.5                      | 19.1                | 5.3                 |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 87.71                  | 12.29               | 78.11 <sup>a</sup>        | 19.19 <sup>b</sup>  | 2.69                |
| <b>AFRICANA</b>     |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Nigeriana           | 108 | 50.5                   | 49.5 <sup>c,3</sup> | 27.8 <sup>c,3</sup>       | 45.4 <sup>a,3</sup> | 26.9 <sup>c,3</sup> |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

Tabla III.10. *rs11887534 (ABCG8)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|                 | Españoles |       |              | Ecuatorianos mestizos |      |             |
|-----------------|-----------|-------|--------------|-----------------------|------|-------------|
|                 | N         | %     | 95% IC       | n                     | %    | 95% IC      |
| <b>Alelo</b>    |           |       |              |                       |      |             |
| <i>G</i>        | 523       | 92.8  | 84.95-101.03 | 546                   | 91.9 | 84.37-99.96 |
| <i>C</i>        | 41        | 7.2   | 5.21-9.86    | 48                    | 8.1  | 5.95-10.71  |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |      |             |
| <i>G/G</i>      | 242       | 85.95 | 75.34-97.34  | 249                   | 83.8 | 73.75-94.92 |
| <i>G/C</i>      | 39        | 13.7  | 9.83-18.91   | 48                    | 16.2 | 11.92-21.43 |
| <i>C/C</i>      | 1         | 0.35  | 0.009-1.97   | 0                     | 0.0  | 0-1.24      |

p >0.05 en todas las comparaciones



Tabla III.11. *rs11887534 (ABCG8)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|                 | Españoles |       |              | Ecuatorianos mestizos |       |              |
|-----------------|-----------|-------|--------------|-----------------------|-------|--------------|
|                 | N         | %     | 95% IC       | N                     | %     | 95% IC       |
| <b>VARONES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G</i>        | 256       | 93.43 | 82.34-105.6  | 272                   | 92.52 | 81.85-104.19 |
| <i>C</i>        | 18        | 6.57  | 3.89-10.38   | 22                    | 7.48  | 4.69-11.32   |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G/G</i>      | 120       | 87.59 | 72.62-104.74 | 125                   | 85.03 | 70.78-101.31 |
| <i>G/C</i>      | 16        | 11.68 | 6.68-18.97   | 22                    | 14.97 | 9.38-22.66   |
| <i>C/C</i>      | 1         | 0.73  | 0.01-4.06    | 0                     | 0.0   | 0-2.51       |
| <b>MUJERES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G</i>        | 267       | 92.07 | 81.36- 103.8 | 274                   | 91.33 | 80.84-102.81 |
| <i>C</i>        | 23        | 7.93  | 5.02-11.9    | 26                    | 8.67  | 5.66-12.69   |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G/G</i>      | 122       | 84.14 | 69.87-100.46 | 124                   | 82.67 | 68.76-98-56  |
| <i>G/C</i>      | 23        | 15.86 | 10.06-23.8   | 26                    | 17.33 | 11.32-25.4   |
| <i>C/C</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.54       | 0                     | 0.0   | 0-2.46       |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.12. *rs11887534 (ABCG8)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | n   | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%) |                     |      |
|---------------------|-----|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|------|
|                     |     | G                      | C                   | GG                        | GC                  | CC   |
| CAUCÁSICA           |     |                        |                     |                           |                     |      |
| Americana           | 99  | 91.9                   | 8.1                 | 84.8                      | 14.1                | 1.0  |
| Finlandesa          | 99  | 89.4                   | 10.6                | 78.8                      | 21.2                | 0.0  |
| Británica           | 91  | 91.8                   | 8.2                 | 83.5                      | 16.5                | 0.0  |
| Española            | 282 | 92.8                   | 7.2                 | 85.95                     | 13.7                | 0.35 |
| ASIÁTICA            |     |                        |                     |                           |                     |      |
| China               | 105 | 98.6                   | 1.4 <sup>a,1</sup>  | 97.1 <sup>a,2</sup>       | 2.9 <sup>a,2</sup>  | 0.0  |
| Japonesa            | 104 | 99.5                   | 0.5 <sup>b,2</sup>  | 99.0 <sup>b,2</sup>       | 1.0 <sup>b,2</sup>  | 0.0  |
| AMERICANA           |     |                        |                     |                           |                     |      |
| Mejicana            | 64  | 84.4                   | 15.6 <sup>a,1</sup> | 68.8 <sup>b,2</sup>       | 31.2 <sup>b,2</sup> | 0.0  |
| Colombiana          | 94  | 93.1                   | 6.9                 | 86.2                      | 13.8                | 0.0  |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 91.9                   | 8.1                 | 83.8                      | 16.2                | 0.0  |
| AFRICANA            |     |                        |                     |                           |                     |      |
| Nigeriana           | 108 | 94.9                   | 5.1                 | 90.7                      | 8.3                 | 0.9  |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

Tabla III.13. *rs3762108 (NR1H4)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|                 | Españoles |      |              | Ecuatorianos mestizos |         |             |
|-----------------|-----------|------|--------------|-----------------------|---------|-------------|
|                 | N         | %    | 95% IC       | N                     | %       | 95% IC      |
| <b>Alelo</b>    |           |      |              |                       |         |             |
| <i>T</i>        | 555       | 98.4 | 90.39-106.94 | 534                   | 89.9    | 82.43-97.86 |
| <i>G</i>        | 9         | 1.6  | 0.73-3.02    | 60                    | 10.1*** | 7.71-13     |
| <b>Genotipo</b> |           |      |              |                       |         |             |
| <i>T/T</i>      | 273       | 96.8 | 85.66-109    | 237                   | 79.8*** | 69.96-90.63 |
| <i>T/G</i>      | 9         | 3.2  | 1.45-6.05    | 60                    | 20.2*** | 15.42-26    |
| <i>G/G</i>      | 0         | 0.0  | 0-1.31       | 0                     | 0.0     | 0-1.24      |

\*\*\*p <0.0001

Tabla III.14. *rs3762108 (NR1H4)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|                 | Españoles |       |              | Ecuatorianos mestizos |       |              |
|-----------------|-----------|-------|--------------|-----------------------|-------|--------------|
|                 | N         | %     | 95% IC       | N                     | %     | 95% IC       |
| <b>VARONES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>T</i>        | 269       | 98.18 | 86.79-110.64 | 264                   | 89.8  | 79.29-101.31 |
| <i>G</i>        | 5         | 1.82  | 0.59-4.25    | 30                    | 10.02 | 6.88-14.57   |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>T/T</i>      | 132       | 96.35 | 80.62-114.26 | 117                   | 79.59 | 65.82-95.39  |
| <i>T/G</i>      | 5         | 3.65  | 1.18-8.51    | 30                    | 20.41 | 13.77-29.13  |
| <i>G/G</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.69       | 0                     | 0.0   | 0-2.51       |
| <b>MUJERES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>T</i>        | 286       | 98.62 | 87.52-110.74 | 270                   | 90.0  | 79.58-101.4  |
| <i>G</i>        | 4         | 1.38  | 0.37-3.53    | 30                    | 10.0  | 6.74-14.27   |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>T/T</i>      | 141       | 97.24 | 81.85-114.68 | 120                   | 80.0  | 66.33-95.66  |
| <i>T/G</i>      | 4         | 2.76  | 0.75-7.06    | 30                    | 20.0  | 13.49-28.55  |
| <i>G/G</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.54       | 0                     | 0.0   | 0-2.46       |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.15. *rs3762108 (NR1H4)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | n   | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%) |                     |                     |
|---------------------|-----|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
|                     |     | T                      | G                   | TT                        | TG                  | GG                  |
| CAUCÁSICA           |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Americana           | 99  | 97.5                   | 2.5 <sup>2</sup>    | 94.9 <sup>2</sup>         | 5.1 <sup>2</sup>    | 0.0                 |
| Finlandesa          | 99  | 97.5                   | 2.5 <sup>2</sup>    | 94.9 <sup>2</sup>         | 5.1 <sup>2</sup>    | 0.0                 |
| Británica           | 91  | 96.2                   | 3.8 <sup>1</sup>    | 92.3 <sup>1</sup>         | 7.7 <sup>1</sup>    | 0.0                 |
| Española            | 282 | 98.4                   | 1.6                 | 96.8                      | 3.2                 | 0.0                 |
| ASIÁTICA            |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| China               | 105 | 83.3                   | 16.7 <sup>c,1</sup> | 69.5 <sup>c</sup>         | 27.6 <sup>c</sup>   | 2.9 <sup>a,1</sup>  |
| Japonesa            | 104 | 75.0                   | 25.0 <sup>c,3</sup> | 54.8 <sup>c,3</sup>       | 40.4 <sup>c,1</sup> | 4.8 <sup>a,1</sup>  |
| AMERICANA           |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Mejicana            | 64  | 89.1                   | 10.9 <sup>c</sup>   | 79.7 <sup>c</sup>         | 18.8 <sup>c</sup>   | 1.6                 |
| Colombiana          | 94  | 91.0                   | 9.0 <sup>c</sup>    | 79.7 <sup>c</sup>         | 18.8 <sup>c</sup>   | 1.6                 |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 89.9                   | 10.01 <sup>c</sup>  | 79.8 <sup>c</sup>         | 20.2 <sup>c</sup>   | 0.0                 |
| AFRICANA            |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Nigeriana           | 108 | 49.1                   | 50.9 <sup>c,3</sup> | 25.9 <sup>c,1</sup>       | 46.3 <sup>c,1</sup> | 27.8 <sup>c,1</sup> |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

Tabla III.16. *rs56163822 (NR1H4)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|                 | Españoles |      |              | Ecuatorianos mestizos |      |             |
|-----------------|-----------|------|--------------|-----------------------|------|-------------|
|                 | N         | %    | 95% IC       | n                     | %    | 95% IC      |
| <b>Alelo</b>    |           |      |              |                       |      |             |
| <i>G</i>        | 558       | 98.9 | 90.9-107.5   | 579                   | 97.5 | 89.7-105.75 |
| <i>T</i>        | 6         | 1.1  | 0.39-2.31    | 15                    | 2.5  | 1.41-4.16   |
| <b>Genotipo</b> |           |      |              |                       |      |             |
| <i>G/G</i>      | 276       | 97.8 | 86.67-110.13 | 282                   | 95.0 | 84.19-106.7 |
| <i>G/T</i>      | 6         | 2.2  | 0.78-4.63    | 15                    | 5.0  | 2.82-8.33   |
| <i>T/T</i>      | 0         | 0.0  | 0-1.31       | 0                     | 0.0  | 0-1.24      |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.17. *rs56163822 (NR1H4)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|                 | Españoles |       |              | Ecuatorianos mestizos |       |              |
|-----------------|-----------|-------|--------------|-----------------------|-------|--------------|
|                 | N         | %     | 95% IC       | N                     | %     | 95% IC       |
| <b>VARONES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G</i>        | 271       | 98.91 | 87.48-111.41 | 286                   | 97.28 | 86.33-109.23 |
| <i>T</i>        | 3         | 1.095 | 0.22- 3.2    | 8                     | 2.72  | 1.17-5.36    |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G/G</i>      | 134       | 97.81 | 81.95-115.84 | 139                   | 94.56 | 79.49-111.65 |
| <i>G/T</i>      | 3         | 2.19  | 0.45-6.39    | 8                     | 5.44  | 2.35-10.72   |
| <i>T/T</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.69       | 0                     | 0.0   | 0-2.51       |
| <b>MUJERES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G</i>        | 287       | 98.97 | 87.85-111.1  | 293                   | 97.67 | 86.8-109.51  |
| <i>T</i>        | 3         | 1.03  | 0.21-3.02    | 7                     | 2.33  | 0.93-4.80    |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G/G</i>      | 142       | 97.93 | 82.49-115.43 | 143                   | 95.33 | 80.35-112.3  |
| <i>G/T</i>      | 3         | 2.06  | 0.42-6.04    | 7                     | 4.667 | 1.87-9.61    |
| <i>T/T</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.54       | 0                     | 0.0   | 0-2.46       |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.18. *rs56163822 (NR1H4)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | N   | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%) |                     |                    |
|---------------------|-----|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|
|                     |     | <i>G</i>               | <i>T</i>            | <i>GG</i>                 | <i>GT</i>           | <i>TT</i>          |
| CAUCÁSICA           |     |                        |                     |                           |                     |                    |
| Americana           | 99  | 99.0                   | 1.0                 | 98.0                      | 2.0                 | 0.0                |
| Finlandesa          | 99  | 97.5                   | 2.5                 | 94.9                      | 5.1                 | 0.0                |
| Británica           | 91  | 97.8                   | 2.2                 | 95.6                      | 4.4                 | 0.0                |
| Española            | 282 | 98.9                   | 1.1                 | 97.8                      | 2.2                 | 0.0                |
| ASIÁTICA            |     |                        |                     |                           |                     |                    |
| China               | 105 | 85.7                   | 14.3 <sup>c,3</sup> | 72.4 <sup>c,3</sup>       | 26.7 <sup>c,3</sup> | 1.0                |
| Japonesa            | 104 | 72.1                   | 27.9 <sup>c,3</sup> | 51.9 <sup>c,3</sup>       | 40.4 <sup>c,3</sup> | 7.7 <sup>c,3</sup> |
| AMERICANA           |     |                        |                     |                           |                     |                    |
| Mejicana            | 64  | 93.0                   | 7.0 <sup>b,1</sup>  | 85.9 <sup>b,1</sup>       | 14.1 <sup>b,1</sup> | 0.0                |
| Colombiana          | 94  | 97.3                   | 2.7                 | 94.7                      | 5.3                 | 0.0                |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 97.5                   | 2.5                 | 95.0                      | 5.0                 | 0.0                |
| AFRICANA            |     |                        |                     |                           |                     |                    |
| Nigeriana           | 108 | 98.1                   | 1.9                 | 96.3                      | 3.7                 | 0.0                |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza



Tabla III.19. *rs7138843 (NR1H4)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|                 | Españoles |      |              | Ecuatorianos mestizos |          |             |
|-----------------|-----------|------|--------------|-----------------------|----------|-------------|
|                 | N         | %    | 95% IC       | N                     | %        | 95% IC      |
| <b>Alelo</b>    |           |      |              |                       |          |             |
| <i>A</i>        | 558       | 98.9 | 90.9-107.5   | 533                   | 89.73    | 82.27-97.68 |
| <i>T</i>        | 6         | 1.1  | 0.39-2.31    | 61                    | 10.27*** | 7.86-13.19  |
| <b>Genotipo</b> |           |      |              |                       |          |             |
| <i>A/A</i>      | 276       | 97.8 | 86.67-110.13 | 236                   | 79.46*** | 69.65-90.27 |
| <i>A/T</i>      | 6         | 2.2  | 0.78-4.63    | 61                    | 20.54*** | 15.71-26.38 |
| <i>T/T</i>      | 0         | 0.0  | 0-1.31       | 0                     | 0.0      | 0-1.24      |

\*\*\*p <0.001

Tabla III.20. *rs7138843 (NR1H4)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|                 | Españoles |       |              | Ecuatorianos-mestizos |       |              |
|-----------------|-----------|-------|--------------|-----------------------|-------|--------------|
|                 | N         | %     | 95% IC       | N                     | %     | 95% IC       |
| <b>VARONES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>A</i>        | 270       | 98.54 | 87.14-111.02 | 265                   | 89.23 | 78.81-100.64 |
| <i>T</i>        | 4         | 1.46  | 0.39-3.73    | 29                    | 9.76  | 6.53-14.02   |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>A/A</i>      | 133       | 97.08 | 81.28-115.05 | 118                   | 80.27 | 66.44-96.13  |
| <i>A/T</i>      | 4         | 2.92  | 0.79-7.47    | 29                    | 21.76 | 13.21-28.33  |
| <i>T/T</i>      | 0         | 0.0   | 0-1.31       | 0                     | 0.0   | 0-2.51       |
| <b>MUJERES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>A</i>        | 288       | 99.31 | 88.17-111.47 | 268                   | 89.33 | 78.96-100.69 |
| <i>T</i>        | 2         | 0.68  | 0.08-2.49    | 32                    | 10.67 | 7.3-15.06    |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>A/A</i>      | 143       | 98.62 | 83.12-116.17 | 118                   | 78.67 | 65.11-94.21  |
| <i>A/T</i>      | 2         | 1.379 | 0.16-4.98    | 32                    | 21.33 | 14.59-30.12  |
| <i>T/T</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.54       | 0                     | 0.0   | 0-2.46       |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.21. *rs7138843 (NR1H4)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | n   | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%) |                     |                     |
|---------------------|-----|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
|                     |     | A                      | T                   | AA                        | AT                  | TT                  |
| <b>CAUCÁSICA</b>    |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Americana           | 99  | 99.0                   | 1.0 <sup>3</sup>    | 98.0 <sup>3</sup>         | 2.0 <sup>3</sup>    | 0.0                 |
| Finlandesa          | 99  | 93.9                   | 6.1 <sup>b</sup>    | 87.9 <sup>b</sup>         | 12.1 <sup>c</sup>   | 0.0                 |
| Británica           | 91  | 98.4                   | 1.6                 | 96.7 <sup>3</sup>         | 3.3 <sup>3</sup>    | 0.0                 |
| Española            | 282 | 98.9                   | 1.1                 | 97.8                      | 2.2                 | 0.0                 |
| <b>ASIÁTICA</b>     |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| China               | 105 | 54.3                   | 45.7 <sup>c,3</sup> | 28.6 <sup>c,3</sup>       | 51.4 <sup>c,3</sup> | 20.0 <sup>c,3</sup> |
| Japonesa            | 104 | 41.8                   | 58.2 <sup>c,3</sup> | 21.2 <sup>c,3</sup>       | 41.3 <sup>c,2</sup> | 37.5 <sup>c,3</sup> |
| <b>AMERICANA</b>    |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Mejicana            | 64  | 78.9                   | 21.1 <sup>c,2</sup> | 64.1 <sup>c,1</sup>       | 29.7 <sup>c</sup>   | 6.2 <sup>b,2</sup>  |
| Colombiana          | 94  | 87.8                   | 12.2 <sup>c</sup>   | 75.5 <sup>c</sup>         | 24.5 <sup>c</sup>   | 0.0                 |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 89.73                  | 10.27 <sup>c</sup>  | 79.46 <sup>c</sup>        | 20.54 <sup>c</sup>  | 0.0                 |
| <b>AFRICANA</b>     |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Nigeriana           | 108 | 51.4                   | 48.6 <sup>c,3</sup> | 25.9 <sup>c,3</sup>       | 50.9 <sup>c,3</sup> | 23.1 <sup>c,3</sup> |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

Tabla III.22. Haplotipo *NR1H4\_1* (T/G/A): Frecuencia en españoles y ecuatorianos mestizos. Comparación con otras poblaciones

|                       | Haplotipo <i>NR1H4_1</i> |                     |              | Referencia                |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|--------------|---------------------------|
|                       | N                        | %                   | 95% IC       |                           |
| Alemanes              | 184                      | 0.96 <sup>3</sup>   | 86.43-106.76 | <i>Kovacs et al. 2008</i> |
| Españoles             | 282                      | 0.96                | 85.33-108.62 | <i>Este estudio</i>       |
| Chilenos              | 261                      | 0.91 <sup>a,3</sup> | 83-99.56     | <i>Kovacs et al. 2008</i> |
| Ecuatorianos mestizos | 297                      | 0.77 <sup>c</sup>   | 67.13-87.41  | <i>Este estudio</i>       |
| Mejicanos             | 78                       | 0.78 <sup>c</sup>   | 64.94-93.38  | <i>Kovacs et al. 2008</i> |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

Figura III.1. Perfil de desequilibrio de ligamiento de los SNPS del Haplotipo *NR1H4\_1* (T/G/A) en la población española (Figura III.1a) y ecuatoriana mestiza (Figura III.2b).

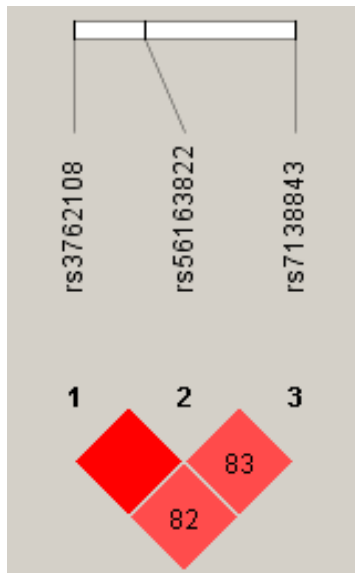


Figura III.1a.



Figura III.2b.

Tabla III.23. *rs4148323 (UGT1A1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|                 | Españoles |       |              | Ecuatorianos mestizos |       |              |
|-----------------|-----------|-------|--------------|-----------------------|-------|--------------|
|                 | n         | %     | 95% IC       | n                     | %     | 95% IC       |
| <b>Alelo</b>    |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G</i>        | 563       | 99.83 | 91.75-108.42 | 581                   | 97.8  | 90.02-106.1  |
| <i>A</i>        | 1         | 0.17  | 0.0045-0.98  | 13                    | 2.2*  | 1.16-3.74    |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G/G</i>      | 281       | 99.65 | 88.33-112    | 284                   | 95.6* | 84.82-107.42 |
| <i>G/A</i>      | 1         | 0.35  | 0.009-1.97   | 13                    | 4.4*  | 2.33-7.48    |
| <i>A/A</i>      | 0         | 0.0   | 0-1.31       | 0                     | 0.0   | 0-1.24       |

\* $p < 0.05$

Tabla III.24. *rs4148323 (UGT1A1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|                 | Españoles |       |              | Ecuatorianos mestizos |       |              |
|-----------------|-----------|-------|--------------|-----------------------|-------|--------------|
|                 | N         | %     | 95% IC       | N                     | %     | 95% IC       |
| <b>VARONES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G</i>        | 273       | 99.64 | 88.17-112.18 | 289                   | 98.3  | 87.29-110.31 |
| <i>A</i>        | 1         | 0.36  | 0.009- 2.03  | 5                     | 1.7   | 0.55-3.96    |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G/G</i>      | 136       | 99.27 | 83.29-117.43 | 142                   | 96.6  | 81.36-113.86 |
| <i>G/A</i>      | 1         | 0.73  | 0.01-4.06    | 5                     | 3.4   | 1.10-7.93    |
| <i>A/A</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.69       | 0                     | 0.0   | 0-2.51       |
| <b>MUJERES</b>  |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G</i>        | 290       | 100.0 | 88.82-112.2  | 292                   | 97.33 | 86.49-109.16 |
| <i>A</i>        | 0         | 0.0   | 0-1.27       | 8                     | 2.66  | 1.15-5.25    |
| <b>Genotipo</b> |           |       |              |                       |       |              |
| <i>G/G</i>      | 145       | 100.0 | 84.39-117.67 | 142                   | 94.67 | 79.74-111.58 |
| <i>G/A</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.54       | 8                     | 5.33  | 2.30-10.50   |
| <i>A/A</i>      | 0         | 0.0   | 0-2.54       | 0                     | 0.0   | 0-2.46       |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.25. *rs4148323 (UGT1A1)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | n   | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%) |                     |                    |
|---------------------|-----|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|
|                     |     | G                      | A                   | GG                        | GA                  | AA                 |
| <b>CAUCÁSICA</b>    |     |                        |                     |                           |                     |                    |
| Americana           | 99  | 100                    | 0.0                 | 100                       | 0.0                 | 0.0                |
| Finlandesa          | 99  | 96.5                   | 3.5 <sup>b</sup>    | 92.9 <sup>b</sup>         | 7.1 <sup>b</sup>    | 0.0                |
| Británica           | 91  | 100                    | 0.0                 | 100                       | 0.0                 | 0.0                |
| Española            | 282 | 99.83                  | 0.17                | 99.65                     | 0.35                | 0.0                |
| <b>ASIÁTICA</b>     |     |                        |                     |                           |                     |                    |
| China               | 105 | 84.3                   | 15.7 <sup>c,3</sup> | 72.4 <sup>c,3</sup>       | 23.8 <sup>c,3</sup> | 3.8 <sup>a,1</sup> |
| Japonesa            | 104 | 87.0                   | 13.0 <sup>c,3</sup> | 76.0 <sup>c,3</sup>       | 22.1 <sup>c,3</sup> | 1.9                |
| <b>AMERICANA</b>    |     |                        |                     |                           |                     |                    |
| Mejicana            | 64  | 97.7                   | 2.3 <sup>a</sup>    | 95.3 <sup>a</sup>         | 4.7 <sup>a</sup>    | 0.0                |
| Colombiana          | 94  | 97.3                   | 2.7 <sup>a</sup>    | 94.7 <sup>a</sup>         | 5.3 <sup>a</sup>    | 0.0                |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 97.8                   | 2.2 <sup>a</sup>    | 95.6 <sup>a</sup>         | 4.4 <sup>a</sup>    | 0.0                |
| <b>AFRICANA</b>     |     |                        |                     |                           |                     |                    |
| Nigeriana           | 108 | 100                    | 0.0                 | 100                       | 0.0                 | 0.0                |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza



Tabla III.26. *rs6742078 (UGT1A1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|                 | Españoles |      |             | Ecuatorianos mestizos |      |             |
|-----------------|-----------|------|-------------|-----------------------|------|-------------|
|                 | N         | %    | 95% IC      | N                     | %    | 95% IC      |
| <b>Alelo</b>    |           |      |             |                       |      |             |
| <i>G</i>        | 399       | 70.7 | 63.97-78.04 | 402                   | 67.6 | 61.22-74.63 |
| <i>T</i>        | 165       | 29.3 | 24.96-34.08 | 192                   | 32.4 | 27.91-37.23 |
| <b>Genotipo</b> |           |      |             |                       |      |             |
| <i>G/G</i>      | 137       | 48.6 | 40.79-57.43 | 138                   | 46.5 | 39.04-54.9  |
| <i>G/T</i>      | 125       | 44.3 | 36.9-52.81  | 125                   | 42.1 | 35.03-50.15 |
| <i>T/T</i>      | 20        | 7.1  | 4.33-10.95  | 34                    | 11.4 | 7.93-16     |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.27. *rs6742078 (UGT1A1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|            | Españoles |       |             | Ecuatorianos mestizos |       |             |
|------------|-----------|-------|-------------|-----------------------|-------|-------------|
|            | n         | %     | 95% IC      | n                     | %     | 95% IC      |
| VARONES    |           |       |             |                       |       |             |
| <i>G</i>   | 196       | 71.53 | 61.87-82.28 | 198                   | 67.35 | 58.29-77.41 |
| <i>T</i>   | 78        | 28.47 | 22.5-35.53  | 96                    | 32.65 | 26.45-39.87 |
| Genotipo   |           |       |             |                       |       |             |
| <i>G/G</i> | 67        | 48.91 | 37.9-62.11  | 66                    | 44.9  | 34.72-57.12 |
| <i>G/T</i> | 62        | 45.26 | 34.7-58.02  | 66                    | 44.9  | 34.72-57.12 |
| <i>T/T</i> | 8         | 5.83  | 2.52-11.50  | 15                    | 10.2  | 5.71-16.83  |
| MUJERES    |           |       |             |                       |       |             |
| <i>G</i>   | 203       | 70.0  | 60.7-80.32  | 203                   | 67.67 | 58.68-77.64 |
| <i>T</i>   | 87        | 30.0  | 24.03-37    | 97                    | 32.33 | 26.22-39.44 |
| Genotipo   |           |       |             |                       |       |             |
| <i>G/G</i> | 70        | 48.28 | 37.63-60.99 | 72                    | 48.0  | 37.56-60.45 |
| <i>G/T</i> | 63        | 43.45 | 33.39-55.59 | 59                    | 39.33 | 29.94-50.74 |
| <i>T/T</i> | 12        | 8.27  | 4.27-14.45  | 19                    | 12.67 | 7.63-19.78  |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.28. *rs6742078 (UGT1A1)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | n   | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%) |                     |                     |
|---------------------|-----|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
|                     |     | <i>G</i>               | <i>T</i>            | <i>GG</i>                 | <i>GT</i>           | <i>TT</i>           |
| CAUCÁSICA           |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Americana           | 99  | 68.2                   | 31.6                | 44.4                      | 47.5                | 8.1                 |
| Finlandesa          | 99  | 64.1                   | 35.9                | 41.4                      | 45.5                | 13.1                |
| Británica           | 91  | 73.6                   | 26.4                | 54.9                      | 37.4                | 7.7                 |
| Española            | 282 | 70.7                   | 29.3                | 48.6                      | 44.3                | 7.1                 |
| ASIÁTICA            |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| China               | 105 | 88.6                   | 11.4 <sup>c,3</sup> | 78.1 <sup>c,3</sup>       | 21.0 <sup>c,2</sup> | 1.0 <sup>a,1</sup>  |
| Japonesa            | 104 | 82.2                   | 17.8 <sup>b,2</sup> | 70.2 <sup>b,2</sup>       | 24.0 <sup>b,1</sup> | 5.8                 |
| AMERICANA           |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Mejicana            | 64  | 63.3                   | 36.7                | 37.5                      | 51.6                | 10.9                |
| Colombiana          | 94  | 66.0                   | 34.0                | 44.7                      | 42.6                | 12.6                |
| Ecuatoriana mestiza | 297 | 67.6                   | 32.4                | 46.5                      | 42.1                | 11.4                |
| AFRICANA            |     |                        |                     |                           |                     |                     |
| Nigeriana           | 108 | 49.5                   | 50.5 <sup>c,3</sup> | 26.9 <sup>b,2</sup>       | 45.4                | 27.8 <sup>c,2</sup> |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

Tabla III.29. *rs8175347 (UGT1A1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos.

|                 | Españoles |       |             | Ecuatorianos mestizos |       |             |
|-----------------|-----------|-------|-------------|-----------------------|-------|-------------|
|                 | n         | %     | 95% IC      | N                     | %     | 95% IC      |
| <b>Alelo</b>    |           |       |             |                       |       |             |
| $(TA)_6$        | 370       | 65.6  | 59.09-72.64 | 402                   | 67.68 | 61.22-74.63 |
| $(TA)_7$        | 194       | 34.4  | 29.73-39.59 | 192                   | 32.32 | 27.91-37.23 |
| <b>Genotipo</b> |           |       |             |                       |       |             |
| $(TA)_6/(TA)_6$ | 121       | 42.91 | 35.6-51.27  | 136                   | 45.79 | 38.42-54.17 |
| $(TA)_6/(TA)_7$ | 128       | 45.39 | 37.87-53.97 | 130                   | 43.77 | 36.57-51.97 |
| $(TA)_7/(TA)_7$ | 33        | 11.7  | 8.06-16.43  | 31                    | 10.44 | 7.09-14.82  |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.30. *rs8175347 (UGT1A1)*: Frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos en relación al género.

|                 | Españoles |       |             | Ecuatorianos mestizos |       |             |
|-----------------|-----------|-------|-------------|-----------------------|-------|-------------|
|                 | N         | %     | 95% IC      | N                     | %     | 95% IC      |
| VARONES         |           |       |             |                       |       |             |
| $(TA)_6$        | 182       | 66.06 | 56.78-76.41 | 202                   | 68.71 | 59.56-78.86 |
| $(TA)_7$        | 92        | 33.94 | 27.4-41.58  | 92                    | 31.29 | 25.23-38.38 |
| Genotipo        |           |       |             |                       |       |             |
| $(TA)_6/(TA)_6$ | 62        | 45.26 | 34.7-58.02  | 71                    | 48.3  | 37.72-60.92 |
| $(TA)_6/(TA)_7$ | 57        | 41.61 | 31.51-53.91 | 60                    | 40.82 | 31.15-52.54 |
| $(TA)_7/(TA)_7$ | 18        | 13.14 | 7.79-20.76  | 16                    | 10.88 | 6.22-17.68  |
| MUJERES         |           |       |             |                       |       |             |
| $(TA)_6$        | 187       | 64.48 | 55.57-74.42 | 200                   | 66.67 | 57.75-76.57 |
| $(TA)_7$        | 103       | 35.52 | 28.99-43.07 | 100                   | 33.33 | 27.12-40.54 |
| Genotipo        |           |       |             |                       |       |             |
| $(TA)_6/(TA)_6$ | 59        | 40.69 | 30.97-52.49 | 65                    | 43.33 | 33.44-55.23 |
| $(TA)_6/(TA)_7$ | 71        | 48.97 | 38.24-61.76 | 70                    | 46.67 | 36.38-58.96 |
| $(TA)_7/(TA)_7$ | 15        | 10.34 | 5.79-17.06  | 15                    | 10.0  | 5.59-16.49  |

p >0.05 en todas las comparaciones

Tabla III.31. *rs8175347 (UGT1A1)*: Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en españoles y ecuatorianos mestizos con otras poblaciones.

| Población           | n    | Frecuencia alélica (%) |                     | Frecuencia genotípica (%)            |                                      |                                      | Referencia                     |
|---------------------|------|------------------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
|                     |      | (TA) <sub>6</sub>      | (TA) <sub>7</sub>   | (TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>6</sub> | (TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>7</sub> | (TA) <sub>7</sub> /(TA) <sub>7</sub> |                                |
| CAUCÁSICA           |      |                        |                     |                                      |                                      |                                      |                                |
| Alemana             | 3727 | 66.0                   | 34.0                | 44.2                                 | 43.8                                 | 12.0                                 | <i>Mendez et al. (2013)</i>    |
| Española            | 100  | 65.5                   | 34.5                | 40.0                                 | 51.0                                 | 9.0                                  | <i>Mendez et al. (2013)</i>    |
| Sueca               | 235  | 69.6                   | 30.4                | 48.0                                 | 42.9                                 | 8.9                                  | <i>Marschall et al. (2013)</i> |
| Española            | 282  | 65.6                   | 34.4                | 42.91                                | 45.39                                | 11.7                                 | <i>Este estudio</i>            |
| ASIÁTICA            |      |                        |                     |                                      |                                      |                                      |                                |
| China               | 539  | 88.0                   | 12.0 <sup>c,3</sup> | 77.2 <sup>c,3</sup>                  | 22.0 <sup>c,3</sup>                  | 0.8 <sup>c,3</sup>                   | <i>Mendez et al. (2013)</i>    |
| AMERICANA           |      |                        |                     |                                      |                                      |                                      |                                |
| Chilena             | 487  | 69.0                   | 31.0                | 50.5                                 | 37.8 <sup>a</sup>                    | 11.7                                 | <i>Mendez et al. (2013)</i>    |
| Ecuatoriana mestiza | 297  | 67.68                  | 32.32               | 45.79                                | 43.77                                | 10.41                                | <i>Este estudio</i>            |
| AFRICANA            |      |                        |                     |                                      |                                      |                                      |                                |
| Tunecina            | 76   | 59.8                   | 36.8                | 30.0 <sup>1</sup>                    | 31.0 <sup>a,1</sup>                  | 11.0                                 | <i>Chaouch et al. (2013)</i>   |

<sup>a</sup>p <0.05; <sup>b</sup>p <0.001; <sup>c</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población española

<sup>1</sup>p <0.05; <sup>2</sup>p <0.001; <sup>3</sup>p <0.0001 comparación respecto a la población ecuatoriana mestiza

## IV.DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se han caracterizado las frecuencias de las variantes alélicas *rs9514089* (*SCL10A2*), *rs4149056* y *rs11045819* (*SLCO1B1*), *rs11887534* (*ABCG8*), *rs3762108*, *rs56163822* y *rs7138843* (*NR1H4\_1*), *rs4148323*, *rs6742078* y *rs8175347* (*UGT1A1*) en una población caucásica española y en una población americana, concretamente ecuatoriana mestiza. Las frecuencias observadas de estas variantes se comparan con las halladas en otras poblaciones estudiadas previamente por otros autores. Mediante esta aproximación se pretende obtener una visión global de las diferencias interétnicas relativas a las frecuencias de los alelos estudiados. En todos los casos, las frecuencias genotípicas, calculadas en función de las frecuencias alélicas, han demostrado seguir el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg, que establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación, estableciendo de este modo que, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual pueden ser representadas por una función binomial (2 alelos) o multinomial (varios alelos) de las frecuencias alélicas y que, éstas se mantienen si no actúan fuerzas evolutivas. Se trata de lo que sucedería si no hubiese evolución, y por tanto, sirve de hipótesis nula.

El polimorfismo *rs95414089* (*A105G*) corresponde al gen (*SCL10A2*) que codifica el transportador sodio-dependiente de ácidos biliares (ASBT) que está presente en colangiocitos y cuya función es modular la concentración de sales biliares circulantes y por tanto, con una importante implicación en la homeostasis del colesterol (*Dawson et al., 2005*).

El alelo *G*, correspondiente al alelo mutado, se ha identificado como un factor de riesgo para la génesis de la enfermedad colelitiásica, al hallarse de forma significativa, dos veces más su presencia en pacientes con litiasis biliar no obesos ( $p=0.01410$ ,  $OR=6.85$ ) respecto a controles de la misma población germánica, lo que sugiere que la prevalencia de esta variante muestra relación con el peso y género (Renner et al., 2009). Consistentemente, en un estudio experimental en ratones se había visto que la expresión del transportador *SCL10A2* disminuía en respuesta a una dieta litogénica (Liu et al., 2008). Si bien, el estudio realizado por Renner et al. (2009) en dos cohortes alemanas evidencian la relación entre el alelo *G* y la génesis de esta patología, un metanálisis posterior llevado a cabo en tres poblaciones alemanas, no está en concordancia con dicha asociación en una de esas cohortes estudiadas, ya que pueden influir factores medioambientales tales como el tipo de dieta o composición de los nutrientes, así como las posibles interacciones genéticas (Tönges et al., 2011).

En este trabajo, al comparar entre nuestra población española y la ecuatoriana mestiza, hemos detectado una menor presencia de la variante alélica *G* en ecuatorianos respecto a españoles sin alcanzarse significación estadística (Tabla 1). Asimismo, la frecuencia observada de homocigotos para el alelo *G*, asociado según el estudio, anteriormente comentado, de Renner et al. (2009) con un mayor riesgo de litiasis biliar, sigue el mismo patrón de distribución que la variante alélica siendo más prevalente en españoles (37.94%) que en ecuatorianos mestizos (34.5%), con ausencia de diferencias significativas. Estos resultados se oponen a nuestra hipótesis acerca de que su presencia fuera superior en ecuatorianos mestizos que en españoles y de que explicara una superior prevalencia de colelitiasis en la población amerindia e hispanoamericana (Everhart et al., 2002; Carey et al., 2002; Nervi et al., 2003). Este resultado fuerza el carácter multifactorial de esta patología colelitiásica y la clara dependencia de factores ambientales tal como se ha descrito en párrafos introductorios.

La diferencia de frecuencia ( $p < 0.001$ ) del alelo mutado *G* entre la población ecuatoriana mestiza (34.5%) y la nigeriana (47.2%) (Tabla 3) obedece a la limpieza de nuestra muestra donde se han utilizado marcadores genéticos de mestizaje en la selección de los individuos para caracterizar una población concreta, la mestiza,



evitando así el sesgo que significaría la inclusión involuntaria de individuos de origen africano.

Cuando se comparan las distintas poblaciones estudiadas hasta ahora (Tabla 3), el alelo *G* muestra su más alta presencia en la población africana de Nigeria (47.2%) y la menor en poblaciones latinoamericanas de México (la más baja, 27.3%), Colombia o Ecuador. Estas últimas poblaciones son similares en frecuencia del alelo *G* a las de grupos asiáticos de China y Japón. En este punto, es de notar la extraordinaria influencia oriental en el bagaje genético de las poblaciones latinoamericanas debida a la mezcla biétnica asiática y caucasiana constitutiva de la población actual mestiza.

La razón de las discrepancias en las frecuencias del alelo *G* entre grupos de individuos caucásicos está fuera de nuestro alcance (Tabla 3). Los ocho siglos de permanencia árabe y el consiguiente mestizaje en la península ibérica podría explicar la posición intermedia de la frecuencia del alelo *G* entre africanos (47.2%) y blancos caucásicos (en el entorno del 30% en británicos y americanos). La elevada presencia del alelo *G* en finlandeses resulta difícil de explicar teniendo en cuenta que, aunque con influencia lapona, la población finesa es europea en su mayoría.

El análisis de los datos obtenidos sobre el genotipo *GG* de esta variante *rs95414089*, muestra la alta proporción de este genotipo de alto riesgo en la población africana (24.1%) respecto a población española (13.48%) y la ecuatoriana mestiza (11.3%), con diferencias estadísticamente significativas en ambos casos ( $p < 0.05$ ), lo que de ser confirmado en estudios de cohortes posteriores, podría representar un factor de riesgo importante en la génesis de la litiasis biliar en la población africana respecto a otras etnias. Es de destacar que aunque el genotipo *GG* se ha relacionado con mayor riesgo de padecer esta patología, todavía no está claro cómo afecta esta variante a la función del transportador ASBT y cómo afectaría al desarrollo de la misma (*Renner et al., 2009*).

Por otra parte, las diferencias en relación al género (Tabla 2) muestran que la distribución de la variante *rs9514089*, sigue el mismo patrón descrito anteriormente con una ausencia de diferencias significativas, si bien en estudios previos (*Tönjes et al.,*

2011) esta variante se ha asociado a un aumento de riesgo de litiasis biliar en mujeres, probablemente debido a un sesgo de la distribución de género.

Las variantes *rs4149056* y *rs11045819* evaluadas en este estudio, pertenecen al gen *SLCO1B1*, codificante para una proteína de membrana transportadora para aniones orgánicos pero de forma independiente de sodio (OATP1B1). Esta proteína se expresa exclusivamente en la membrana basolateral del hepatocito y media la captación celular de bilirrubina, además permite el transporte de un amplio grupo de compuestos, como los ácidos biliares y otros productos endógenos (*Oshiro et al., 2010*). Asimismo, juega un papel importante en el transporte intrahepático de muchos fármacos, entre los que destacan los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (*Mangravite and Krauss, 2007*). Un estudio experimental en ratones, ha demostrado que estas variantes producen una bilis litogénica (*Lyons et al., 2006*).

En relación al SNP *rs4149056*, el alelo mutado C da lugar a un cambio de valina a alanina en la secuencia de la proteína resultante que codifica una proteína con actividad reducida para el transporte hepático y con alta afinidad por bilirrubina (*Lee et al., 2005*). En el presente estudio, el alelo C aparece sobrerrepresentado en ecuatorianos mestizos en comparación con los españoles ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4), lo que podría suponer una menor captación de bilirrubina y una mayor predisposición a colelitiasis en ecuatorianos mestizos en relación a la población española. Sin embargo, aunque el alelo C se ha asociado a niveles altos en suero de bilirrubina en un meta-análisis (GWAS) realizado en aproximadamente 9500 caucásicos (*Johnson et al., 2009*) y también con el contenido en bilirrubina en cálculos biliares, no se ha visto asociado al riesgo de enfermedad *per se* (*Buch et al., 2010; Jindal et al., 2009*).

La frecuencia del alelo mutado observada en este estudio es similar en españoles y otros caucásicos sin encontrarse diferencias con la población asiática (Tabla 6). Sin embargo, llama la atención la práctica ausencia del alelo C en la población nigeriana, donde la incidencia de litiasis biliar parece ser baja aunque se observa un aumento en los últimos años como consecuencia de cambios en el estilo de vida (*Rahman, 2005*). Estudios previos en dos poblaciones caucásicas han mostrado

que los portadores de esta variante *rs4149056* exhiben una concentración mayor de bilirrubina plasmática (Zhang et al., 2007; Van der Deure et al., 2008).

Nuestros resultados en la población ecuatoriana mestiza (16.9%) muestran que la frecuencia del alelo C es similar a la colombiana (18.1%) al igual que en otros rasgos genéticos y sin embargo difieren ambas poblaciones de la mejicana (7.8%), lo que podría explicarse por una diferente selección de la muestra (Tabla 6). Sin embargo estas diferencias no se han hallado en relación al genotipo de alto riesgo (CC) para colelitiasis. Por otra parte, la frecuencia de individuos heterocigotos TC de la población ecuatoriana mestiza presenta una de las prevalencias más elevadas (28.2%) observándose diferencias estadísticamente significativas frente a las poblaciones asiáticas (18.1% y 18.3 % en chinos y japoneses, respectivamente), mejicana (15.6%) y africana (1.9%), concluyendo que esta variante tendría escaso peso en la génesis de litiasis biliar en la población africana cuando lo comparamos con otras etnias. Estos datos están en concordancia con el trabajo de Santos et al. (2011) donde se analizó la frecuencia de la variante *rs4149056* en la población brasileña, que es una de las más heterogéneas en el mundo, mostrando la mayor prevalencia en amerindios y la menor en la población africana de forma estadísticamente significativa, ligándose esta variable de forma débil a la etnia.

Al analizar estos resultados en relación al género (Tabla 5), se observa que la distribución de frecuencias en ambas poblaciones es similar a la de la población general sin encontrarse diferencias significativas en función del sexo. Estudios previos, como el de Johnson et al. (2009) muestran concordancia con nuestros resultados.

El segundo *SNP rs11045819* del gen *SLCO1B1*, asociado a una cambio de Pro155Thr, se ha analizado en cuanto a frecuencias en las dos poblaciones debido a la asociación estadísticamente significativa encontrada en varios estudios entre esta variante y el aumento del riesgo de litiasis biliar para el alelo mutado A ( $p = 0.029$ ; OR =2.31), así como para la forma heterocigota (CA) ( $p = 0.034$ ; OR =2.22) y homocigota (AA) (Srivastava et al., 2011; Srivastava et al., 2013), si bien los trabajos realizados hasta la fecha son escasos.

En nuestro trabajo la frecuencia de la variante alélica ligada a función disminuida del transportador, alelo *A*, ha estado menos representada en ecuatorianos que en españoles lo que está en desacuerdo con nuestra hipótesis sobre la presencia de alelos mutados y prevalencia de litiasis biliar, aunque los portadores homocigotos *AA* son más prevalentes en ecuatorianos (Tabla 7). Sin embargo, en ausencia de selección, ligamiento o mutación, la frecuencia mayor de homocigotos recesivos para dicho genotipo debería darse en la población española puesto que la prevalencia del alelo en cuestión es mayor en los españoles. Esto se deduce al comparar la frecuencia genotípica de los heterocigotos españoles con la de los ecuatorianos, esperando que el resultado de la mezcla de españoles debiera ser mendelianamente mayor que la de los ecuatorianos y, sin embargo, se observa todo lo contrario. Con todo ello, se podría inferir que existe alguna razón por la cual no se cumple la segregación independiente de alelos, pudiendo deberse a un desequilibrio de ligamiento.

Los resultados de este trabajo muestran una similitud de distribución del alelo mutado *A* en caucásicos (Tabla 9) aunque de nuevo hallamos diferencias con la población finlandesa. Destaca la ausencia de este alelo en asiáticos y una significativa mayor presencia en nigerianos. Por su parte, las poblaciones americanas muestran un similar porcentaje de portadores del alelo que la población española, aunque ambas poblaciones presentan mayor porcentaje que en mejicanos ( $p < 0.05$ , en ambos casos). A pesar de estas diferencias, en el estudio de Sortica et al. (2012) realizado en población brasileña, no se observa asociación de esta mutación con la etnia.

La distribución de frecuencias en ambas poblaciones estudiadas es similar a la de la población general sin encontrarse diferencias significativas en función del sexo (Tabla 8). Estudios previos realizados en otra variante de este mismo gen, muestran concordancia en relación al género, al no observar diferencias significativas ni en la frecuencia de alelos ni de genotipos (Jindal et al., 2009).

El transportador *ABCG8*, perteneciente a la familia ATP binding-cassette está involucrado en el transporte de colesterol del hepatocito en la bilis. Los estudios clínicos han demostrado que los polimorfismos de este gen, especialmente el polimorfismo *rs11887534 (D19H)* es uno de los principales determinantes genéticos en

la formación de litiasis biliar en humanos, con especial prevalencia en las poblaciones europeas y americanas, cuyo mecanismo patogénico sería la producción de una bilis litogénica por sobresaturación de colesterol (*Acalovschi et al., 2006; Grünhage et al., 2007; Buch et al., 2007, Katsika et al., 2010*). De este modo en el estudio realizado por Buch et al. (2007) en población alemana, el más amplio realizado a nivel mundial, se demuestra una asociación estadísticamente significativa en cuanto a un incremento de riesgo de litiasis biliar para los portadores de la variante C. ( $p < 0.0001$ , OR = 2.2), mostrando un riesgo mayor en los pacientes homocigotos CC (OR= 7.1).

En nuestro estudio, la frecuencia del alelo mutado C del transportador ABCG8 en la población española ha sido de un 7.2 %, siendo similar al 8.1% hallada en la población ecuatoriana mestiza (Tabla 10), sin que existan diferencias significativas entre ambas poblaciones. Al analizar el porcentaje de homocigotos CC para la mutación, que conllevaría un riesgo más elevado de padecer litiasis biliar, observamos que es cercano a cero en ambas poblaciones (0.35% y 0 para españoles y ecuatorianos respectivamente). El genotipo GC con riesgo intermedio presenta una frecuencia similar en ambas poblaciones.

La comparación de la frecuencia del alelo puro G en la población española con otras poblaciones caucásicas, muestra una elevada homogeneidad intraétnica (Tabla 12). Sin embargo, la frecuencia de este alelo en poblaciones asiáticas es ligeramente superior lo cual podría inferir un mayor riesgo de litiasis biliar de la población caucásica. Además, las frecuencias del genotipo GC de riesgo intermedio son significativamente mayores en españoles en comparación con asiáticos. Los resultados obtenidos de este genotipo en el resto de poblaciones es similar a españoles, salvo en la población mejicana donde los heterocigotos fueron más prevalentes. Estos resultados están en consonancia con los datos obtenidos en la población estudiada por Duggirala et al. (1999), reproducidos posteriormente por el mismo grupo en 2006, donde se pone de manifiesto que la población mejicana es una de las que presenta mayor heredabilidad de litiasis biliar, que llegaría a alcanzar el 53 % en los casos de litiasis biliar sintomática. Así, en nuestro estudio la población mejicana también presenta un riesgo intermedio de litiasis biliar significativamente mayor a la población ecuatoriana mestiza ( $p < 0.001$ ).

Cuando analizamos los resultados hallados en la población ecuatoriana mestiza, en relación al alelo C (Tabla 12), observamos que éste es similar en frecuencia a poblaciones caucásicas. Estos datos serían acordes con los encontrados por Buch et al. (2007), que al comparar la prevalencia del alelo C, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cohorte chilena (con alto componente mestizo) y europeos. Es de notar que de nuevo la población mejicana arroja resultados interesantes al mostrar un porcentaje significativamente mayor que como se ha comentado anteriormente, representa a la población con mayor riesgo intermedio de colelitiasis. Así, la comparación de éste grupo con otros americanos es un claro ejemplo de diferencias intraétnicas, dentro de un gran grupo étnico. Cuando comparamos los resultados de la población ecuatoriana mestiza con la población africana, si bien en ésta última es menor (5,1%), no se encuentran diferencias significativas. Las poblaciones asiáticas presentan la menor prevalencia del alelo mutado, confiriéndoles el menor riesgo de litiasis biliar.

Respecto a las comparaciones en la población española y ecuatoriana mestiza en relación al género, no se ha encontrado diferencias significativas entre ambas etnias. Si bien es una patología más frecuente en el género femenino, ésta se debe fundamentalmente a causas hormonales por el efecto de estrógenos y progesterona en el metabolismo del colesterol y la alteración de la motilidad de la vesícula biliar (*Cirillo et al., 2005*).

En los últimos años la variación genética *D19H* ha sido estudiado en la población danesa por Stender et al. (2011) como factor predictor de colelitiasis sintomática y cáncer biliar concluyendo que el polimorfismo *D19H* es un importante predictor de ambas patologías en esta población concreta, que podría ser confirmado con estudios en otras poblaciones.

Asimismo, la colelitiasis se ha asociado al síndrome metabólico relacionando las variaciones genéticas de este transportador de colesterol con una disminución de los niveles de LDL en plasma, cobrando un papel importante en su implicación en la reducción del riesgo de padecer cardiopatía isquémica (*Stender et al., 2014*). A pesar de que nuestro estudio, no se ha realizado por este motivo, los datos obtenidos junto

con la obtención de otros parámetros analíticos podrían servir para completar estudios de otros autores sobre esta asociación, así como la respuesta al tratamiento con estatinas en pacientes con hipercolesterolemia (*Srivastava et al., 2010*).

En nuestro estudio, hemos determinado la frecuencia de tres variantes del gen *NR1H4* que codifica el receptor nuclear farnesoide X (FXR). El FXR provoca una respuesta a la acumulación intracelular de sales biliares, modulando sus síntesis y favoreciendo su eliminación. Las variantes de este gen, cuya expresión se produce tanto a nivel hepático como ileal, originan acumulación de sales biliares y por tanto una bilis litogénica lo que provoca un aumento del riesgo de colelitiasis (*Kullak-Ublick et al., 2004; Moschetta et al., 2004*).

Las tres variantes analizadas del gen *NR1H4* en este estudio han sido las siguientes: *rs3762108*, *rs56163822* y *rs7138843*. El primer SNP estudiado ha sido el *rs3762108* (-20647 T>G), el cual se ha asociado con mayor riesgo de colelitiasis. Como se observa en la Tabla 13 el alelo mutado en la población española tiene escasa presencia (1.6%), a diferencia de la población ecuatoriana mestiza (10.1%), sin encontrarse en ambas poblaciones individuos homocigotos para el alelo G. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el estudio de Kovacs et al. (2008), donde la población caucásica germana presenta menor prevalencia respecto a población mejicana (4% y 11% en alemanes y mejicanos, respectivamente).

Las frecuencias alélicas y genotípicas observadas en población caucásica son similares entre sí (Tabla 15). Por otro lado, la frecuencia del alelo G en españoles fue significativamente menor respecto a asiáticos, americanos y africanos ( $p < 0.0001$ , en todos los casos), al igual que ocurre con los genotipos *TG* y *GG* que presentan una frecuencia escasa e incluso nula en el caso de *GG*.

En lo referente a la población ecuatoriana mestiza las frecuencias alélicas y genotípicas del *rs3762108* observadas tienen una prevalencia similar a otras poblaciones americanas (Tabla 15). Sin embargo, en el estudio de Kovacs et al. (2008) donde se compara la frecuencia del alelo entre una cohorte mejicana (11%) y chilena (4%), se observa una frecuencia diferente entre ambas poblaciones. La frecuencia de la variante mutada *G* ocupa una posición intermedia entre caucásicos, con distinto nivel

de significación estadística, y población asiática ( $p < 0.0001$ , en japonesa y  $p < 0.05$ , en china) y población nigeriana, donde resulta ser más prevalente ( $p < 0.0001$ ), lo que iría en consonancia con el mestizaje entre amerindios y caucásicos. La distribución de los genotipos  $TT$  y  $TG$  arroja diferencias significativas en el mismo sentido que la distribución alélica. Sin embargo, el genotipo  $GG$ , prácticamente ausente en poblaciones americanas, ha mostrado diferencias con poblaciones asiáticas ( $p < 0.05$ , en ambos casos), siendo mucho más prevalente en nigerianos ( $p < 0.0001$ ). Hasta la fecha son escasas las publicaciones de las prevalencias de esta variante en diferentes poblaciones, con lo cual los datos de la comparación precisan ser confirmados en futuros estudios de cohortes poblacionales.

El segundo SNP analizado del gen *NR1H4* ha sido el *rs56163822*. En la Tabla 16 se pone de manifiesto la menor presencia del alelo mutado  $T$ , asociado a riesgo de colelitiasis, en ambas poblaciones estudiadas no existiendo diferencias estadísticamente significativas en la comparación de frecuencias. Es de destacar, al igual que ocurre con el anterior SNP, la ausencia de homocigotos para el alelo mutado en ambas poblaciones.

En la Tabla 18 se muestra la similitud existente en las frecuencias alélicas y genotípicas, entre españoles y otras poblaciones caucásicas. Además, se evidencia una menor frecuencia del alelo mutado  $T$  en españoles y por tanto, de homocigotos  $TT$  y heterocigotos, respecto a población asiática ( $p < 0.0001$ ). También es menor la frecuencia en españoles de este alelo respecto a poblaciones americanas aunque solo aparece significación en relación a mejicanos ( $p < 0.001$ ).

De manera muy similar a la española se comporta la población ecuatoriana mestiza al presentar únicamente diferencias con asiáticos y mejicanos, mostrando el alelo mutado mayor presencia en ambos casos (Tabla 18). En las poblaciones americanas se evidencia una ausencia de portadores  $TT$ , que en mejicanos se traduce en una mayor presencia de heterocigotos respecto a ecuatorianos mestizos ( $p < 0.001$ ). Al igual que para la variante *rs3762108*, nuestros datos concuerdan con los comunicados por Kovacs et al. (2008) donde de nuevo la población mejicana (7%) tiene una superior prevalencia respecto la chilena y alemana (2% en ambos casos).



El tercer SNP evaluado en este estudio es el *rs7138843 (NR1H4)*, ha sido asociado a superior riesgo de padecer coleditiasis. La Tabla 19 recoge la comparación entre españoles y ecuatorianos mestizos en la frecuencia alélica y genotípica, donde se ha detectado la presencia del alelo mutado en ambas poblaciones, aunque con menor porcentaje en españoles ( $p < 0.0001$ ). En cuanto al genotipo, se vuelve a poner de manifiesto la ausencia en ambas poblaciones de homocigotos para el alelo mutado, con una mayor presencia de homocigotos para el alelo puro en españoles frente a ecuatorianos mestizos ( $p < 0.0001$ ). Los individuos heterocigotos fueron significativamente más prevalentes en ecuatorianos mestizos ( $p < 0.0001$ ).

La frecuencia de los alelos y genotipos del *rs7138843* en nuestra población española ha resultado ser parecida a otras poblaciones caucásicas (Tabla 21), con algunas diferencias con población finlandesa, donde el alelo *T* es más prevalente y el genotipo *AT* menor ( $p < 0.001$ , en ambos casos), destacando una superior presencia de heterocigotos finlandeses ( $p < 0.0001$ ). Asimismo, la población española posee una menor frecuencia del alelo mutado *T* y genotipo *TT* respecto a poblaciones asiáticas, americanas y africanas ( $p < 0.0001$ , en todos los casos). Como en las poblaciones caucásicas, destaca la ausencia de portadores homocigotos para el alelo mutado en colombianos y ecuatorianos mestizos, presentando los mejicanos un porcentaje del 6.2% ( $p < 0.001$ ). La mayor prevalencia de este genotipo se observa en poblaciones asiáticas y nigeriana ( $p < 0.0001$ ).

La presencia del alelo *T* y del genotipo *TT* del *rs7138843* en ecuatorianos mestizos es similar a la de colombianos e inferior a la de mejicanos ( $p < 0.001$ , en ambos casos). El porcentaje de este alelo y genotipo en ecuatorianos mestizos ocupa una posición intermedia entre caucásicos, donde la prevalencia es menor, y asiáticos y nigerianos (Tabla 21). Como se ha comentado anteriormente, la ausencia de individuos *TT* en ecuatorianos mestizos, determina que únicamente existen diferencias con asiáticos, africanos ( $p < 0.0001$ , en ambos casos) y mejicanos ( $p < 0.001$ ). Estos resultados están en consonancia con los datos que cabrían esperar debido al bagaje genético de la población mestiza de Ecuador, con un pool genético derivado de europeos, fundamentalmente españoles y amerindios originarios de Asia.

El escaso número de trabajos previos en los que se han analizado los tres SNPs del *NR1H4* (-20647 T>G; -1 G>T; IVS7 -31 A>T) de forma individual, que se han determinado en nuestro estudio, se debe a que se encuentran ligados formando el haplotipo *NR1H4\_1* (T-G-A). Dicho haplotipo, es el más común de los existentes en el gen *NR1H4*. En nuestro trabajo, los tres SNPs han resultado en desequilibrio de ligamiento en las dos poblaciones estudiadas, con valores  $D'$  en el análisis de 0.83 y 0.82 según el SNP considerado en españoles y 0.59 y 0.58 en ecuatorianos mestizos. (Figura 1 y 2). La prevalencia del haplotipo ha sido del 96% en españoles y tan solo del 77% en ecuatorianos mestizos ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 22). En dicha tabla figura la comparación con otras poblaciones, donde se aprecia la similitud de frecuencia entre españoles y alemanes, y su mayor prevalencia respecto poblaciones americanas siendo el gradiente caucásicos > chilenos > ecuatorianos mestizos y mejicanos ( $p < 0.05$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente). Respecto a la población ecuatoriana mestiza, destaca la diferencia de presencia del haplotipo comparada con la población chilena ( $p < 0.0001$ ). En este caso la diferencia entre ambas poblaciones podría deberse al tipo de muestreo realizado. La menor presencia del haplotipo en población ecuatoriana mestiza respecto a la población española, estaría asociada a mayor riesgo de padecer colestiasis, al igual que ocurre en la población mejicana donde se observó mayor prevalencia del haplotipo en pacientes con colestiasis que en controles. Por el contrario, en población alemana no se encontró asociación entre colestiasis y el haplotipo *NR1H4\_1* debido a que es casi el único haplotipo existente, lo que le confiere poca variabilidad genética, perdiendo quizás el poder analítico para detectar cualquier relación a nivel clínico (Kovacs et al., 2008).

Desde hace tiempo se sabe que en los núcleos de los cálculos de colesterol se encuentran de forma frecuente pequeñas partes de pigmento de bilirrubina. Así, este hecho ha servido como base de la hipótesis de que el pigmento de bilirrubina pudiera servir como núcleo primario de precipitación de colesterol en la formación de colestiasis, siendo objeto de investigación en los últimos años (Van Erpecum et al., 2011). Esta hipótesis relaciona diversos factores genéticos implicados en la génesis de litiasis biliar con la aparición de dichos pigmentos. En este sentido, uno de los principales factores de riesgo genético que se han estudiado son las variantes de la

isoenzima *UGT1A1*, encargada de la conjugación de la bilirrubina, y cuyas variaciones a nivel de expresión genética determina cambios en la actividad enzimática que se han relacionado con estados de hiperbilirrubinemia (*Ostrow and Tiribelli, 2001*).

La importancia de las variantes de esta enzima se puede observar en el estudio de Buch et al. (2009) donde se determinó la relación entre la variante *ABCG8* (*rs11887534*) y *UGT1A1* (*rs6742078*) en una población alemana, encontrándose que la asociación de ambas determina un factor de riesgo de heredabilidad de litiasis biliar del 21.2%, siendo dicho factor bastante menor si no aparecen ambas. Asimismo en un estudio reciente de cohortes realizado sobre una amplia población danesa (n =3.322) se pone de manifiesto también la relación entre el riesgo de colelitiasis y la enzima *UGT1A1*, mostrando los heterocigotos y homocigotos para la variante *rs8175347* mayor riesgo (OR =1.09 y OR =1.22, respectivamente) (*Krawczyk et al., 2013*).

En este trabajo se han analizado y comparado poblacionalmente la prevalencia de tres SNPs de esta enzima, el *rs4148323*, el *rs6742078* y el *rs8175347*. La primera variante analizada del gen *UGT1A1* es el *rs4148323* cuyo cambio aminoacídico es Gly71Arg (G>A). El alelo mutado A, que conlleva una actividad reducida de la enzima, y por lo tanto estaría implicado en la patogénesis de litiasis biliar, esta prácticamente ausente en la población española estudiada (0.17%), sin que se hayan encontrado homocigotos AA en dicha población (Tabla 23). Cuando lo comparamos con la población ecuatoriana mestiza (2.2%), observamos que en esta población la prevalencia del alelo mutado A es mayor (p <0.05). Este resultado está en consonancia con los datos que cabrían esperar debido al bagaje genético de la población mestiza de Ecuador que comparte un claro componente asiático (15.7% en chinos y 13.0% en japoneses). En ninguna de las dos poblaciones estudiadas hemos encontrado la forma homocigota AA que conferiría mayor riesgo de colelitiasis, por lo que en estas poblaciones, estas variantes no parecerían comportar un factor de riesgo en la génesis de litiasis biliar por sí mismas.

En la Tabla 25 se aprecian las frecuencias de otras poblaciones con las que se han comparado nuestros resultados, observándose una distribución homogénea en las poblaciones caucásicas, salvo de nuevo con la comparación con fineses tanto a nivel

alélico como genotípico ( $p < 0,001$ ), a excepción de los homocigotos mutados donde tampoco se hallaron portadores. Este resultado va en consonancia con el estudio previo de Kaniwa et al. (2005), que pone de manifiesto la rareza de este polimorfismo en la población caucásica donde encontraron únicamente dos individuos portadores del alelo mutado en una muestra de 150 caucásicos.

La comparación de la población española con la población asiática para este SNP, arroja resultados diferentes, ya que tanto la prevalencia del alelo mutado A (15.7% en chinos y 13% en japoneses) como el genotipo GA han mostrado ser significativamente más altos en la población asiática ( $p < 0.0001$ ). Además, es interesante resaltar que son las únicas poblaciones en la que se ha hallado el genotipo AA. Estos resultados están de acuerdo con lo comunicado en otros estudios en población asiática donde dichas prevalencias alélicas han oscilado entre el 5-15% (Teh et al., 2012; Jada et al., 2007; Huang et al., 2000). Destaca también la nula presencia del alelo mutado en población africana, lo que coincide con los datos previos existentes ya que esta variante se considera característica de poblaciones asiáticas no encontrándose ni en caucásicos ni en africanos (Kaniwa et al. 2005).

Las frecuencias del alelo mutado en españoles respecto al resto de las poblaciones americanas, ha sido significativamente menor ( $p < 0.05$ ) al igual que ocurría con la población ecuatoriana mestiza.

Al comparar las poblaciones americanas entre sí, se observa una homogeneidad en las prevalencias, donde el alelo A es poco frecuente, lo que conlleva que también el genotipo GA lo sea y halla una ausencia de portadores del genotipo AA en estas poblaciones. La comparación con asiáticos, al igual que ocurría en la comparación de la población caucásica, muestra una discrepancia de frecuencias alélicas y genotípicas (Tabla 25). A tenor de los resultados obtenidos y existentes se evidencia que la variabilidad intraétnica presentada por la variante *rs4148323 (UGT1A1)* conferiría mayor riesgo de padecer litiasis biliar en poblaciones asiáticas.

Los datos existentes en relación a esta variante y por tanto al género son escasos. Sin embargo, estudios de otras variantes muestran un mayor riesgo en varones que en mujeres (Buch et al, 2009). Esto no concuerda con nuestros datos, ya

que al analizar las diferencias de la variante *rs4148323* en relación al género, no se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa (Tabla 24).

El segundo SNP estudiado ha sido el *rs6742078* ( $G > T$ ). Este SNP, se ha asociado a altos niveles de bilirrubina endógena correlacionándose tanto con un aumento de riesgo de colestasis como de colestasis sintomática en pacientes con niveles altos de bilirrubina alta (*Stender et al., 2013*). Así, se ha asociado un incremento de bilirrubina plasmática del 61.3% para homocigotos mutados *TT* frente a un 27.0% para los portadores de este alelo, lo que confiere un mayor riesgo a los homocigotos del alelo recesivo (*Buch et al, 2010*).

En las dos poblaciones estudiadas en este trabajo esta variante ha mostrado el mismo patrón de distribución tanto alélica como genotípica (Tabla 26), siendo el genotipo de alto riesgo *TT* del 7.1% y 11.4% para la población española y ecuatoriana mestiza, respectivamente. Esta variante ha resultado ser más prevalente en las dos poblaciones objeto de nuestro estudio en comparación con la variante *rs4148323* anteriormente comentada. Destaca en esta variante la similitud en el patrón de distribución en caucásicos, incluidos los finlandeses, y en americanos. Sin embargo, la población asiática, si presenta diferencias con ambas poblaciones, ya que sus prevalencias han sido significativamente menores (Tabla 28). Las mayores prevalencias para el genotipo de alto riesgo se han encontrado en la población nigeriana, con diferencias significativas respecto a españoles y ecuatorianos mestizos ( $p < 0.0001$ ). Los datos de frecuencias alélicas y genotípicas *rs6742078* que aportan este estudio son acordes con los hallados en poblaciones caucásicas, americanas y asiáticas (*Mendez et al., 2013*).

En cuanto a las diferencias de género, existen pocos datos en la literatura. En un estudio caso-control realizado en 2606 pacientes alemanes se observó asociación de la variante mutada en varones (OR =2.34) pero no en mujeres (OR =1.10). Estas diferencias fueron constatadas también en un pequeño estudio de cohortes en sudamericanos (210 pacientes de litiasis biliar) (*Buch et al., 2010*). Por el contrario, *Stender et al. (2013)* no evidenciaron diferencias de género en una población de

61.212 individuos de los cuales 3.374 padecían colelitiasis sintomática. Esto está en la misma línea que nuestros datos en relación al género (Tabla 27).

En los últimos años, entre las potenciales implicaciones clínicas para la variante mutada *rs6742078 (UGT1A1)* ha cobrado relevancia su asociación con el debut de diabetes mellitus tipo 2 y con mayor riesgo de padecer patología cardiovascular (*Kunustsor et al, 2015; Abbasi et al, 2015*). Si bien estos datos precisan ser estudiados en cohortes más amplias, los resultados de nuestro estudio podrían contribuir al mejor conocimiento de poblaciones más susceptibles.

El tercer SNP (*rs8175347*) evaluado en este trabajo, al contrario que lo que ocurre con el primero, ha sido ampliamente estudiado. Este SNP produce variaciones en el número de secuencias de nucleótidos repetidos *TA* en la región promotora *A(TA)<sub>6</sub>TAA* del gen *UGT1A1*. De este modo, la adición de una secuencia extra *A(TA)<sub>7</sub>TAA* produce una proteína que origina una reducción en la glucuronidación e hiperbilirrubinemia, que se ha relacionado con el síndrome de Gilbert, asociado a mayor riesgo de colelitiasis. Esta variación en el promotor parece interferir con la unión de un factor de transcripción necesario para la correcta síntesis de la isoenzima *UGT1A1* (*Chaouch et al., 2013*).

En nuestro estudio la prevalencia de esta variante alélica ha sido la más frecuente entre las tres variantes estudiadas del *UGT1A1* y ha mostrado prevalencia similar tanto en la población española como en la ecuatoriana mestiza (Tabla 29). Así, los datos de prevalencia que hemos obtenido concuerdan con los previamente encontrados en otra población española descrita por Mendez et al. (2013). Además, tal como se observa en la Tabla 31, las frecuencias alélicas y genotípicas no han presentado diferencias al compararlas con otras poblaciones caucásicas, americanas o africanas. Sin embargo, en la población china tanto la presencia del alelo mutado como los homocigotos *TA<sub>7</sub>TA<sub>7</sub>* y heterocigotos han resultado menos prevalentes que en la población española ( $p < 0.0001$ ).

La población ecuatoriana mestiza presenta la misma distribución alélica respecto a una población chilena, así como a la población caucásica y tunecina (Tabla 31). Las diferencias las encontramos, al igual que ocurre con la población española, al

comparar con los chinos ( $p < 0.0001$ ) donde la adición del dinucleótido TA es menos frecuente. Es de notar que aunque no hay diferencia alélica entre ecuatorianos mestizos y tunecinos, sí que hallamos mayor presencia en ecuatorianos mestizos tanto de homocigotos puros como de heterocigotos.

Los datos de nuestro estudio están en consonancia con estudios previos donde hay un predominio de la variante en caucasianos y africanos respecto a la población asiática (*Beutler et al., 1998; Hall et al., 1999; Barbarino et al., 2014*). En este caso, el motivo por el cual la prevalencia de la mutación en la población tunecina no es tan elevada como la encontrada en población africana, se ha asociado con las diferentes rutas de esclavos a la que ha sido sometida esta población a lo largo de su historia (*Chaouch et al., 2013*).

Un aspecto clínico de gran interés en relación con las variaciones polimórficas de este gen UGT1A1, se asocia con el proceso de eliminación de diversos fármacos utilizados en terapéutica ya que es responsable de catalizar su glucuronización, contribuyendo así a su eliminación. Esto le confiere importancia en el campo de la farmacogenética a la hora de prever posibles reacciones adversas a fármacos tan ampliamente utilizados en la práctica clínica como el irinotecan, quimioterápico utilizado como primera línea en el tratamiento del cáncer de colon metastásico, donde la determinación de sus polimorfismos, especialmente el *rs8175347*, previa al tratamiento para prevenir efectos adversos como la neutropenia sería coste-efectivo en aquellas poblaciones que presentan altas prevalencias aunque son necesarios más estudios para fortalecer estas recomendaciones (*Obradovic et al., 2008; Gold et al., 2009*). Nuevamente, tal y como figura en la Tabla 30, al evaluar el *rs8175347* en relación al género no se encuentran diferencias significativas. Mendez et al. (2013) muestran que la prevalencia poblacional fenotípica del síndrome de Gilbert presenta diferencias significativas entre hombres y mujeres, no atribuibles al genotipo. Se postula que las hormonas sexuales femeninas pueden incrementar la conjugación y secreción hepática de bilirrubina. En efecto, en modelos animales estas diferencias de género desaparecen con la gonadectomía (*Maruca and Fevery, 1984*).

Cabe destacar la ausencia de diferencias de género en los polimorfismos estudiados en esta memoria de tesis doctoral. Este dato, además de ser consistente con la naturaleza puramente autosómica de los rasgos estudiados, confiere una fuerte robustez a nuestros resultados, de forma que no sería necesaria en ningún caso la replicación de los mismos. Otro punto fuerte de la metodología de este trabajo viene constituido por la selección de la muestra para la que se han utilizado marcadores genéticos de mestizaje. Esta es la diferencia más favorable de nuestro estudio en relación a otros trabajos realizados en poblaciones de múltiple y muy diverso origen étnico.

En resumen los datos de este trabajo profundizan en la existencia de una amplia heterogeneidad interétnica e intraétnica de los diversos genes analizados en este estudio implicados en la génesis de litiasis biliar, y a su vez, algunos datos refuerzan la noción acerca del origen biétnico de la población mestiza de Ecuador.



## V. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que pueden extraerse del presente trabajo son las siguientes:

1. La frecuencia de la variante alélica *G* del *rs9514089*, asociada en estudios epidemiológicos, con aumento de riesgo de padecer litiasis biliar, es similar en españoles y ecuatorianos mestizos. La comparación interétnica de la prevalencia de este alelo muestra la similitud de estas dos poblaciones con otras caucásicas y asiáticas, y la superior presencia del alelo en población africana y finlandesa.
2. En la población española, la frecuencia del alelo *C* del *rs4149056* del gen *SLCO1B1*, que produce un cambio missense en la codificación del transportador, es similar a la que presentan otras poblaciones caucásicas y asiáticas. Este alelo mutado está menos presente en españoles que en ecuatorianos mestizos que junto a colombianos y finlandeses presentan la mayor prevalencia a nivel global.
3. El alelo *A* del *rs11045819* del gen *SLCO1B1*, que genera un cambio de aminoácido missense, presenta una prevalencia similar en españoles y ecuatorianos mestizos. En poblaciones asiáticas este alelo está ausente y la más alta presencia se presenta en africanos.
4. El *rs11887534* del gen *ABCG8*, perteneciente al complejo proteico ATP-binding cassette, presenta una similar distribución alélica entre españoles y ecuatorianos mestizos, encontrándose la menor presencia en asiáticos.
5. La variante mutada *G* del *rs3762108* del gen *NR1H4*, codificante del receptor X farsenoide (FRX), asociada con mayor riesgo de colelitiasis es estudios epidemiológicos, está más presente en ecuatorianos mestizos respecto a españoles. La frecuencia alélica del *rs3762108* en la población ecuatoriana

- mestiza, dispone de una representación similar a otras poblaciones americanas, ocupando una posición intermedia entre caucásicos y población asiática y nigeriana, donde resulta ser más prevalente.
6. El *rs56163822* perteneciente al gen *NR1H4*, asociado epidemiológicamente a riesgo de colelitiasis, esta escasamente presente en ambas poblaciones estudiadas destacando, la ausencia de homocigotos para el alelo mutado *T* en ambas poblaciones. Además, este alelo ha sido menos prevalente que en asiáticos y mejicanos.
  7. La variante *T* del *rs7138843* del gen *NR1H4*, asociado a un superior riesgo de padecer colelitiasis, esta menos presente es españoles que en ecuatorianos mestizos, sin que se hayan encontrado individuos homocigotos *TT*. La presencia del alelo *T* del *rs7138843* en ecuatorianos mestizos ocupa una posición intermedia entre la de caucásicos, cuya prevalencia es menor, y asiáticos y nigerianos.
  8. Los tres SNPs estudiados del gen *NR1H4* han resultado en desequilibrio de ligamiento en las dos poblaciones estudiadas formando el haplotipo *NR1H4\_1*, previamente hallado asociado a riesgo de padecer colelitiasis, siendo el gradiente: caucásicos > chilenos > ecuatorianos mestizos y mejicanos.
  9. El alelo mutado *A* del *rs4148323* (*UGT1A1*), que conlleva actividad enzimática reducida, es prácticamente inexistente en la población española e inferior a la ecuatoriana mestiza, con ausencia en las dos poblaciones de individuos homocigotos *AA*. En la población española la frecuencia es similar a la de otras poblaciones caucásicas e inferior a poblaciones americanas y asiáticas.
  10. La distribución de frecuencias del alelo del *rs6742078* del gen *UGT1A1* es similar en población española y ecuatoriana mestiza. En estas poblaciones, la prevalencia del alelo mutado *T*, asociado previamente a un aumento de bilirrubina a nivel plasmático, se encuentra entre la de asiáticos, donde es menor y africanos de Nigeria.
  11. El *rs8175347* de la isoenzima *UGT1A1* muestra una frecuencia similar en españoles y ecuatorianos mestizos. En estas poblaciones, la presencia del alelo mutado (*TA*)<sub>7</sub>, asociado a un descenso de actividad enzimática, es más prevalente que en asiáticos y menos que en africanos.

12. No existen diferencias de género en la frecuencia de ninguna de las variantes alélicas analizadas en este estudio.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

Abbasi A, Deetman PE, Corpeleijn E, Gansevoort RT, Gans RO, Hillege HL, van der Harst P, Stolk RP, Navis G, Alizadeh BZ, Bakker SJ Bilirubin as a potential causal factor in type 2 diabetes risk: a Mendelian randomization study. *Diabetes*. 2015 Apr;64(4):1459-69.

Acalovschi M, Badea R, Dumitracco D, et al. Prevalence of gallstone in liver cirrhosis: a sonographic survey. *Am J Gastroenterol*.1988; 83:954-6.

Acalovschi M, Ciocan A, Mostean O, et al. Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones.*Eur J Intern Med*. 2006 Nov;17(7):490-4.

Afdhal NH, Niu N, Gantz D, et al. Bovine gallbladder mucine accelerates cholesterol monohydrate cristal growth in model bile. *Gatroenetrology*. 1993; 104:1515.

Afdhal NH, Niu N, Nunes DP, et al. Mucine-vesicle interactions in moldel bile: Evidence for vesicle aggregation and fusión before colesterol cristal formation. *Hepatology*.1995,;22:865.

Alpini G, Glaser S, Baiocchi L, et al. Secretin activation of the apical Na +-dependent bile acid transporter is associated with cholehepatic shunting in rats. *Hepatology*. 2005;41:1037-4 5.

Ata N, Kucukazman M, Yavuz B, et al. The metabolic syndrome is associated with complicated gallstone disease. *Can J Gastroenterol*.2011;25:274–276.

Attaallah W, Yener N, Urgulu MU et al, Gallstones and concomitant gastric *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Res Pract*. 2013:643109.

Attili AF, Capocaccia R, Carulli N, et al. Factors associated with gallstone disease in the MICOL experience. Multicenter Italian study on epidemiology of cholelithiasis. *Hepatology*, 1997;26:809-18.

Barbarino JM, Haidar CE, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for UGT1A1.*Pharmacogenet Genomics*. 2014 Mar;24(3):177-83.

Bertolotti M, Gabbi C, Anzivino C, et al. Age-related changes in bile acid synthesis and hepatic nuclear receptor expression. *Eur J Clin Invest.*2007;37:501-8.

Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 7;95(14):8170-4.

Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C et al. "The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med.*1995 Nov 2;333(18):1171-5.

Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, et al. mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *Am J Hum Genet.*1998;63(6):1852-61.

Browning J, Sreenarasimhaiah J. Colelithiasis. En : Feldman M, FRIEDMAN L, Brandt L, eds. Sleisenger & Fordtran. Enfermedades digestivas y hepáticas. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento, 8.ª Ed. Elsevier España S.A.2008:1387-1418.

Bryan, A.L. "Early man in America from a circum-Pacific perspective", en Occasional Papers 1. Edmonton: Department of Anthropology, University of Alberta.1978.

Buch S, et al. Loci from a Genome-Wide analysis of bilirubin levels are associated with gallstone risk and composition. *Gastroenterology.*2010;139:1942-1951.

Buch S, Schafmayer C, Völzke H, et al. A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet.*2007 Aug;39(8):995-9.

Buch S, Schafmayer C, Völzke H, et al. Loci from a genome-wide analysis of bilirubin levels are associated with gallstone risk and composition. *Gastroenterology.*2010 Dec;139(6):1942-51.

Carey MC, Paigen B. Epidemiology of the American Indians' burden and its likely genetic origins. *Hepatology.*2002 Oct;36:781-91.

Castro-Torres I.G, Martín-Vázquez M. Transportadores de lípidos biliares: una revisión actualizada. *Gen.* 2013;67:49-57.

Chaouch L, Kalai M, Darragi I, Boudrigua I, Chaouachi D, Ammar SB, Mellouli F, Bjaoui M, Abbes S. Genetic link with cholelithiasis among pediatric SCA Tunisian patients: Examples of UGT1A1, SLCO1A2 and SLCO1B1. *Hematology.* 2015 Jul 6.

Chaouch L, Talbi E, Moumni I, Chaabene B, et al. Early complication in sickle cell anemia children due to A(TA)<sub>n</sub>TAA polymorphism at the promoter of UGTA1A1 gene. *Dis Markers*. 2013;35(2):67-72.

Chen ZC, Shin SJ, Kuo KK, ET AL. Significant association of ABCG8:D19H gene polymorphism with hypercholesterolemia and insulin resistance. *J Hum Genet*. 2008;53(8):757-63.

Chuang SC, Hsi E, Lee KT. Genetics of gallstone disease. *Adv Clin Chem*. 2013;60:143-85.

Chuang SC, Hsi E, Lee KT. Mucin genes in gallstone disease. *Clin Chim Acta*. 2012 Oct 9;413(19-20):1466-71

Cirillo DJ, Wallace RB, Rodabough RJ, et al. Effect of estrogen therapy on gallbladder disease. *JAMA*. 2005;293:330–339.

Claiborne, Robert. *Los Primeros Americanos*, Ediciones Folio. Barcelona. 1994.

Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, et al. Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enteropathic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* 2003. 278:339,20-27.

Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, et al. The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):6960-8.

Derenko MV, Grzybowski T, Malyarchuk BA, et al. Diversity of mitochondrial DNA lineages in South Siberia. *Ann Hum Genet*. 2003 Sep;67(Pt 5):391-411.

Dixon PH, van Mil SW, Chambers J, et al. Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut*. 2009;58(4):537-544.

Duggirala R, Mitchell BD, Blangero J, Stern MP. Genetic determinants of variation in gallbladder disease in the Mexican-American population. *Genet Epidemiol*. 1999;16(2):191-204.

Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, et al. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*. 2004;53:890-898.

Ebert EC, Nagar M, Hagspiel KD. Gastrointestinal and hepatic complications of sickle cell disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8:483–489.

Etminan M, Delaney JA, Bressler B, Brophy JM. Oral contraceptives and the risk of gallbladder disease: a comparative safety study. *CMAJ*. 2011;183:899–904.

Everhart JE, Yeh F, Lee ET, Hill MC, Fabsitz R, Howard BV, Welty TK. Prevalence of gallbladder disease in American Indian populations: findings from the Strong Heart Study. *Hepatology*. 2002 Jun;35(6):1507-12.

Fagundes NJ, Kanitz R, Eckert R, et al. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *AM J Hum Genet*. 2008;82(3): 583-92.

Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. Origin and evolution of Native American mt DNA variation: a reappraisal. *Am J Hum Genet*. 1996;59(4).935-45.

Gold HT, Hall MJ, Blinder V, Schackman BR. Cost effectiveness of pharmacogenetic testing for uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 before irinotecan administration for metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2009; 115:3858–3867.

Gong QH, Cho JW, Huang T, et al. Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics*. 2001 Jun;11(4):357-68.

González- Andrade , F. Ensayos medicos sobre genética. La genática molecular en la medicina ecuatoriana. Imprenta Noción. Quito. 2006.

Gracie WA, Ransohoff DF. The natural history of silent gallstones. The innocent gallstone is not a myt. *N Eng J Med*.1982;307:798.

Grünhage F, Acalovschi M, Tirziu S, et al. Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology*. 2007 Sep;46(3):793-801.

Guzman Palomino, Luis. Hombre, Espacio y Tiempo en la construcción de la Sociedad, Universidad Nacional de Educación Enrique Guzmán Y Valle, La Cantuta.2000.

Gylling H1, Hallikainen M, Pihlajamäki J, et al Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res*. 2004 Sep;45(9):1660-5.

Hall D, Ybazeta G, Destro-Bisol G, et al. Variability at the uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1 promoter in human populations and primates. *Pharmacogenetics*. 1999 Oct;9(5):591-9.

Hasegawa K, Terada S, Kubota K, et al. Effect of apolipoprotein E polymorphism on bile lipid composition and the formation of cholesterol gallstone. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:1605.

Holan KR, Holzbach RT, Hermann RE, et al. Nucleation timer: a key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Gastroenterology.* 1998;77:611.

<http://pharmgkb.org/gene/PA420>

[http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/cms/ugt\\_alleles](http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/cms/ugt_alleles)

[http://siteresources.worldbank.org/DATASTATISTICS/Resources/GDP\\_PPP.pdf](http://siteresources.worldbank.org/DATASTATISTICS/Resources/GDP_PPP.pdf)

(<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>,

Hubbe M, Neves WA, Harvati K. Testing evolutionary and dispersion scenarios for the settlement of the new world. *PLoS One.* 2010 Jun 14;5(6):e11105

Huang CS, Luo GA, Huang MJ, et al. A novel compound heterozygous variation of the uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 gene that causes Crigler-Najjar syndrome type II. *Pharmacogenetics.* 2001 Oct;11(7):639-42.

Hui S, Hong T, Shan J et al. Gender and metabolic differences of gallstone disease. *World J Gastroenterol.* 2009 Apr 21; 15(15): 1886–1891.

Jada SR, Lim R, Wong CI, et al. Role of UGT1A1\*6, UGT1A1\*28 and ABCG2 c.421C>A polymorphisms in irinotecan-induced neutropenia in Asian cancer patients. *Cancer Sci.* 2007 Sep;98(9):1461-7.

Jiang ZY, Parini P, Eggertsen G, et al. Increased expression of LXR alpha, ABCG5, ABCG8, and SR-BI in the liver from normolipidemic, nonobese Chinese gallstone patients. *J Lipid Res.* 2008 Feb;49(2):464-72.

Jindal C, Kumar S, Choudhari G, Goel H, Mittal B. Organic anion transporter protein (OATP1B1) encoded by SLCO1B1 gene polymorphism (388A>G) & susceptibility in gallstone disease. *Indian J Med Res.* 2009 Feb;129(2):170.

Johnson AD, Kavousi M, Smith AV, et al. Genome-wide association meta-analysis for total serum bilirubin levels. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 15;18(14):2700-2710.



Johnson CD. ABC of the upper gastrointestinal tract. Upper abdominal pain: gallbladder. *BMJ*, 2001;323:1170-1175.

Jones AL, Spring-Mills E. The liver and gallbladder. In Weis L (ed). *Modern concepts in Gastrointestinal Histology*. Elsevier. 1983. 738.

Jungst D, Lang T, von Ritter C, et al. Role of high total protein in gallbladder in the formation of cholesterol gallstones. *Gastroenterology*. 1991;100:1724.

Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, et al. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat*. 2000 Oct;16(4):297-306.

Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM, Schaefer EJ. Interactions between common genetic polymorphisms in ABCG5/G8 and CYP7A1 on LDL cholesterol-lowering response to atorvastatin. *Atherosclerosis*. 2004 Aug;175(2):287-93.

Kaniwa N, Kurose K, Tinno H, et al. Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel single nucleotide polymorphism 686 C>T (P229L9 found in an African-American). 2005. *Drug Metabol Dispos*;33:458-65.

Kalaany NY1, Mangelsdorf DJ. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:159-91.

Katsika D, Magnusson P, Krawczyk M, Grünhage F, Lichtenstein P, Einarsson C, Lammert F, Marschall HU. Gallstone disease in Swedish twins: risk is associated with ABCG8 D19H genotype. *J Intern Med*. 2010 Sep;268(3):279-85.

Katsika D1, Grijbovski A, Einarsson C, Lammert F, Lichtenstein P, Marschall HU. Genetic and environmental influences on symptomatic gallstone disease: a Swedish study of 43,141 twin pairs. *Hepatology*. 2005 May;41(5):1138-4.

Khuroo MS, Mahajan R, Zargar SA, et al. Prevalence of biliary tract disease in India: a sonographic study in adult population in Kashmir. *Gut*. 1989 Feb;30(2):201-5.

Kovacs P, Kress R, Rocha J, Kurtz U, Miquel JF, Nervi F, Méndez-Sánchez N, Uribe M, Bock HH, Schirin-Sokhan R, Stumvoll M, Mössner J, Lammert F, Wittenburg H. Variation of the gene encoding the nuclear bile salt receptor FXR and gallstone susceptibility in mice and humans. *J Hepatol*. 2008 Jan;48(1):116-24.

Krawczyk M, Miquel JF, Stokes CS, Zuniga S, Hampe J, Mittal B, Lammert F. Genetics of biliary lithiasis from an ethnic perspective. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013 Apr;37(2):119-25.

Krawczyk M, Wang DQ, Portincasa P, Lammert F. Dissecting the genetic heterogeneity of gallbladder stone formation. *Semin Liver Dis*. 2011 May;31(2):157-72.

Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*. 2004 Jan;126(1):322-42.

Kunutsor SK. Serum total bilirubin levels and coronary heart disease - Causal association or epiphenomenon? *Exp Gerontol*. 2015 Sep 25;72:63-66.

Kuo KK, Shin SJ, Chen ZC, et al. Significant association of ABCG5 604Q and ABCG8 D19H polymorphisms with gallstone disease. *Br J Surg*. 2008 Aug;95(8):1005-11

Lammert F, Miquel JF. Gallstone disease: from genes to evidence-based therapy. *J Hepatol*. 2008;48 Suppl 1:S124-35.

Lammert F, Sauerbruch T. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2(9):423-433.

Lapidus A, Akerlund JE, Einarsson C. Gallbladder bile composition in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12:70-74.

Lavoie B, Nausch B, Zane EA, et al. Disruption of gallbladder smooth muscle function is an early feature in the development of cholesterol gallstone disease. *Neurogastroenterol Motil*. 2012 Jul;24(7):e313-24

Lee E, Ryan S, Birmingham B, et al. Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clin Pharmacol Ther*. 2005 Oct;78(4):330-41

Lefebvre P, Cariou B, Lien F, et al. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*. 2009;9:147-91.

Li VK, Pulido N, Fajnwaks P, et al. Predictors of gallstone formation after bariatric surgery. A multivariate analysis of risk factors comparing gastric bypass, gastric banding, and sleeve gastrectomy. *Surg Endos*. 2009;23:1640-4-

Lin JP, Schwaiger JP, Cupples LA, et al. Conditional linkage and genome-wide association studies identify UGT1A1 as a major gene for anti-atherogenic serum bilirubin levels-The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2009;206(1): 228-233.

Liu JJ, Glickman JN, Masyuk AI, Larusso NF. Cholangiocyte bile salt transporters in cholesterol gallstone-susceptible and resistant inbred mouse strains. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 ;23: 1596-602.

Lyons MA, Wittenburg H. Cholesterol gallstone susceptibility loci: a mouse map, candidate gene evaluation, and guide to human LITH genes. *Gastroenterology*. 2006 Dec;131(6):1943-70.

Mangravite LM, Krauss RM. Pharmacogenomics of statin response. *Curr Opin Lipidol*. 2007 Aug;18(4):409-14.

Maringhini A, Ciambra M, Baccelliere P, et al. Biliary sludge and gallstones in pregnancy: Incidence, risk factors, and natural history. *Ann Intern Med*. 1993;119:116-20.

Marschall HU, Katsika D, Rudling M, Einarsson C. The genetic background of gallstone formation: an update. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 21;396(1):58-62.

Marschall HU, Krawczyk M, Grünhage F, Katsika D, Einarsson C, Lammert F. Gallstone disease in Swedish twins is associated with Gilbert variant of UGT1A1. *Liver int*. 2013 Jul;33(6):904-8

Maurer KR, Everhart JE, Ezzati TM, Johannes RS, Knowler WC, Larson DL, Sanders R, Shawker TH, Roth HP. Prevalence of gallstone disease in Hispanic populations in the United States. *Gastroenterology*. 1989 Feb;96(2 Pt 1):487-92.

Maurer KJ, Carey MC, Fox JG. Roles of infection, inflammation, and the immune system in cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology*. 2009 Feb;136(2):425-40

Mella JG, Schirin-Sokhan R, Rigotti A, et al. Genetic evidence that apolipoprotein E4 is not a relevant susceptibility factor for cholelithiasis in two high-risk populations. *J Lipid Res*. 2007 Jun;48(6):1378-85.

Mendez I, Lagos M, Quiroga T, et al. Prevalencia del síndrome de Gilbert y sus determinantes genéticas en población chilena. *Rev Med Chile*. 2013;141:1266-1274.

Méndez-Sánchez N, Chavez-Tapia NC, Motola-Kuba D, et al. Metabolic syndrome as a risk factor for gallstone disease. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1653-1657.

Méndez-Sánchez N, Jessurum J, Ponciano-Rodríguez G, Alonso de Ruiz P, Uribe M, Hernández-Ávila M. Prevalence of gallstone disease in México. A necropsy study. *Dig Dis Sci*, 1993;38:680-683.

Méndez-Sánchez N, Zamora-Valdés D, Chávez-Tapia NC, Uribe M. Role of diet in cholesterol gallstone formation. *Clin Chim Acta*. 2007 Feb;376(1-2):1-8.

Merriwether DA, Hall WW, Valhne A, Ferrell RE. mtDNA variation indicates Mongolia may have been the source for the founding population for the New World. *Am J Hum Genet*. 1996,59(1).204-12.

Michael R. Waters y Thomas W. Stafford Jr. Redefining the age of clovis: implications for the peopling of the Americas. *Science*, 2007;315:1122-26,5815:1122-6.

Miquel JF, Covarrubias C, Villaroel L, et al. Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroenterology*. 1998 Oct;115(4):937-46.

Monstein HJ, Jonsson Y, Zdolsek J, Svanvik J. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in human cholesterol gallstones. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(1):112-119.

Moschetta A, Bookout AL, Mangelsdorf DJ. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonist in a mouse model. *Nat Med*. 2004;10:1352-58.

Muraca M, Fevery J. Influence of sex and sex steroids on bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activity of rat liver. *Gastroenterology*. 1984 Aug;87(2):308-13.

Nakeeb A, Comuzzie AG, Martin L, et al. Gallstones: genetics versus environment. *Ann Surg*. 2002 Jun;235(6):842-9.

Nervi F, Miquel JF, Marshall G. The Amerindian epidemics of cholesterol gallstones: the North and South connection. *Hepatology*. 2003 Apr;37(4):947-78.

Neves W and Hubbe M. Cranial morphology of early Americans for Lagoa Santa, Brazil: Implication for the settlement of the New World. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005, 102(51):18309-14.

Novick GE, Novick CC, Yunis J, et al. Polymorphic Alu insertions and the Asian origin of Native American populations. *Hum Biol*. 1998,70(1):23-39.

Obradovic M, Mrhar A, Kos M. Cost-effectiveness of UGT1A1 genotyping in second-line, highdose, once every 3 weeks irinotecan monotherapy treatment of colorectal cancer. *Pharmacogenomics*. 2008; 9:539–549.

Oshiro C, Mangravite L, Klein T, Altman R. PharmGKB very important pharmacogene: SCL01B1. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 March;20(3):211-216.

Ostrow JD, Tiribelli C. Variation in UGT1A1 activity in Gilbert's syndrome. *J Hepatol*. 2001 Apr;34(4):636-9.

Palsaciano G, Portincasa p, Vinciguerra V, et al. gallstone prevalence and gallbladder volume in children and adolescents. An epidemiological ultrasonographic survey and relationship to body mass index. *Am j gastroenterol* 1989;84(11):1378-1382.

Park HZ ,Lee SP, SchyAL. Ceftriaxone-associated gallbladder sludge. *Gastroenterology*. 1991; 100: 1665-1670.

Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Cholesterol gallstone disease. *Lancet*. 2006 Jul 15;368(9531):230-9.

Portincasa P, Moschetta A, Petruzzelli M, Palsaciano G, Di Ciaglia A, Pezzolla A. Gallstone disease: Symptoms and diagnosis of gallbladder stones. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:1017-29

Pullinger CR, Eng C, Salen G, et al. Human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest*. 2002;110(1):109-117.

Puppala S, Dodd GD, Fowler S, Arya R, Schneider J, Farook VS, Granato R, Dyer TD, Almasy L, Jenkinson CP, Diehl AK, Stern MP, Blangero J, Duggirala R. A genomewide search finds major susceptibility loci for gallbladder disease on chromosome 1 in Mexican Americans. *Am J Hum Genet*. 2006 Mar;78(3):377-92.

Raghavan M, et al. Genomic evidence for the pleistocene and recent population history of native americans. *Science*. 2015 Aug 21;349(6250).

Rahman GA. Cholelithiasis and cholecystitis: changing prevalence in an African community. *J Natl Med Assoc*. 2005 Nov;97(11):1534-8.

Reich D, et al. Reconstructing native American population history. *Nature*. 2012 Aug 16;488(7411):370-4.

Renner O, Harsch S, Schaeffeler E, et al. A variant of the SLC10A2 gene encoding the apical sodium-dependent bile acid transporter is a risk factor for gallstone disease. *PLoS One*. 2009 Oct 13;4(10):e7321.

Rodriguez –Delfín LA, Rubin-de-Celis VE, Zago MA. Genetic diversity in an Andean population from Peru and regional migration patterns of Amerindians in South America: data from Y chromosome and mitochondrial DNA. *Hum Hered*. 2001, 51(1-2):97-106.

Rudkowska I, Jones PG. Polymorphisms in ABCG5/G8 transporters linked to hypercholesterolemia and gallstone disease. *Nutr Rev*. 2008;343-348.

Sampliner RE, Bennett PH, Comess LJ, Rose FA, Burch TA. Gallbladder disease in pima indians. Demonstration of high prevalence and early onset by cholecystography. *N Engl J Med*. 1970 Dec 17;283(25):1358-64.

Santos PC, Soares RA, Nascimento RM, et al. SLCO1B1 rs4149056 polymorphism associated with statin-induced myopathy is differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population: Amerindians as a high risk ethnic group. *BMC Med Genet*. 2011 Oct 12;12:136.

Sarin SK, Negi VS, Dewan R, et al .High familial prevalence of gallstones in the first-degree relatives of gallstone patients. *Hepatology*.1995;22:138.

Schauer R, Stangl M, Lang T, et al.Treatment of Crigler-Najjar type 1 disease: relevance of early liver transplantation.*J Pediatr Surg*. 2003 Aug;38(8):1227-31.

Schurr T. A molecular anthropological perspective on the peopling of the Americas. 2002 *Athena review*.2002; 3(2):62-106.

Sedaghat A, Grundy SM. Cholesterol crystals and the formation of cholesterol gallstones.*N Engl J Med*. 1980;302:1274.

Servedio V, d'Apolito M, Maiorano N, et al.Spectrum of UGT1A1 mutations in Crigler-Najjar (CN) syndrome patients: identification of twelve novel alleles and genotype-phenotype correlation.*Hum Mutat*. 2005 Mar;25(3):325.

Shaffer EA. Gallstone disease: Epidemiology of gallbladder stone disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20(6):981-96.

Shiffman ML, Shamburek RD, Schwartz CC, et al. Gallbladder mucin, arachidonic acid, and bile lipids in patients who develop gallstones during weight reduction, *Gastroenterology*.1993;105:1200-8.

Small DM. Cholesterol nucleation and growth in gallstone formation. *N Engl J Med*.1980;302:1305.

Smith DG, Malhi RS, Eslaman J, Lorenz JG, Kaestle FA. Distribution of mtDNA haplogroup X among Native North Americans. *Am J Phys Anthropol*. 1999; 110(3): 271-84.

Sortica Vde A, Ojopi EB, Genro JP, et al. Influence of genomic ancestry on the distribution of SLCO1B1, SLCO1B3 and ABCB1 gene polymorphisms among Brazilians. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 May;110(5):460-8.

Srivastava A, Garg N, Srivastava A, Srivastava K, Mittal B. Effect of genetic variant (rs11887534) in ABCG8 gene in coronary artery disease and response to atorvastatin therapy. *Dis Markers*. 2010;28(5):307-13.

Srivastava A, Srivastava A, Srivastava K, Choudhuri G, Mittal B. Role of ABCG8 D19H (rs11887534) variant in gallstone susceptibility in northern India. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Nov;25(11):1758-62

Srivastava A, Mishra A, Singh R, et al. Multi-analytic approach elucidates significant role of hormonal and hepatocanalicular transporter genetic variants in gallstone disease in North Indian population. *PLoS One*. 2013;8(4):e59173.

Srivastava A, Srivastava A, Srivastava N, et al. Organic anion transporter 1B1 (SLCO1B1) polymorphism and gallstone formation: High incidence of Exon4 CA genotype in female patients in North India. *Hepatol Res*. 2011 Jan;41(1):71-8.

Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard B, Tybjaerg-Hansen A. Sterol transporter Adenosine Triphosphate-Binding Cassette transporter G8, Gallstones, and biliary cancer in 62,000 individuals from the general population. *Hepatology*. 2011. Feb ;53(2) 640-48.

Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard B, Tybjaerg-Hansen. The ABCG5/8 cholesterol transporter and myocardial infarction versus gallstone disease. *J Am Coll Cardiol*.2014 May 27;63(20):2121-8.

Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Extreme bilirubin levels as a causal risk factor for symptomatic gallstone disease. *JAMA Intern Med.* 2013 Jul 8;173(13):1222-8.

Stinton LM, Shaffer EA. Epidemiology of gallbladder disease:Cholelithiasis and cancer.*Gut liver.* 2012 Apr;6(2):172-187.

Stokes CS, Krawczyk M, Lammert F. Gallstones: environment, lifestyle and genes. *Dig Dis.* 2011;29(2):191-201.

Tazuma S.Gallstone disease: Epidemiology,pathogenesis, and classification of biliary stones (common bile duct and intrahepatic). *Best prac Res Clin Gastroenterol.* 2006;20:1075-83.

Teh LK1, Hashim H, Zakaria ZA, Salleh MZ. Polymorphisms of UGT1A1\*6, UGT1A1\*27 & UGT1A1\*28 in three major ethnic groups from Malaysia. *Indian J Med Res.* 2012 Aug;136(2):249-59.

Thistle JL, Clearly PA, Lachin JM, et al. The natula history of cholelithiasis: The national Cooperative Gallstone Study. *Ann Inter Med.* 1984;101:606.

Tönjes A, Henning W, Halbritter J et al. Effects os SCL10A2 variant rs9514089 on fallstone disease risk and serum cholesterol levels-meta-analysis of three independent cohorts. *BMC Med Genet.*Nov 2011.17;12:149.

Tönjes A, Wittenburg H, Halbritter J, Renner O, Harsch S, Stange EF, Lammert F, Stumvoll M, Kovacs PEffects of SLC10A2 variant rs9514089 on gallstone risk and serum cholesterol levels-meta-analysis of three independent cohorts. *BMC Med Genet.* 2011 Nov 17;12:149.

Trendle MC, Moertel CG, Kvols LK. Incidence and morbidity of cholelithiasis in patients receiving chronic octreotide for metastatic carcinoid and malignant islet cell tumors. *Cancer.* 1997;79:830–834.

Tsai CJ, Leitzman MF, Willet WC, et al. Central adiposity, regional fat distribution, and the risk of cholecystectomy in women. *Gut.*2006;55:708-14.

Van der Deure WM, Friesema EC, et al.Organic anion transporter 1B1: an important factor in hepatic thyroid hormone and estrogen transport and metabolism. *Endocrinology.* 2008 Sep;149(9):4695-701.

Van Erpecum KJ. Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: An update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011. Apr;35(4):281-7.



Vásquez, L. and N. Saltos. Ecuador: Su realidad. Quito, Ecuador Fundación José Peralta. Quito. Ecuador. 2003.

Völzke H, Baumeister SE, Alte D, et al. Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence. *Digestion* 2005; 71(2):97-105.

Wang HH, Portincasa P, de Bari O, et al. Prevention of cholesterol gallstones by inhibiting hepatic biosynthesis and intestinal absorption of cholesterol. *Eur J Clin Invest*. 2013 Apr ;4 3(4) :413-26.

Waters, Michael R. and Thomas W. Stafford Jr. "Redefining the Age of Clovis: implications for the Peopling of the Americas"; *Science*. 2007,315.5815.

Wittenburg H, Lammert F. Genetic predisposition to gallbladder stones. *Semin Liver Dis*. 2007 Feb;27(1):109-21.

Wray N. Nacionalidades y pueblos de Ecuador. Consejo de Desarrollo de las Nacionalidades y Pueblos de Ecuador (CODENPE).

Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*. 2002 Sep;110(5):671-80.

Yu JK, Pan H, Huang SM, et al. Calcium content of different compositions of gallstones and pathogenesis of calcium carbonate gallstones. *Asian J Surg*. 2013 Jan;36(1):26-35.

Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA, Hammer MF. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y Chromosomes into the Americas. *Mol Biol Evol*. 2004,21(1).164-75.

Zhang W, He YJ, Gan Z, ET AL. OATP1B1 polymorphism is a major determinant of serum bilirubin level but not associated with rifampicin-mediated bilirubin elevation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007. Dec; 34(12):1240-4.