

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO 3'UTR (RS 11665896) CON LOS NIVELES SOLUBLES DE FGF21 EN PACIENTES CON DIABETES GESTACIONAL

Ríos Torres Miguel Ángel (1), Rangel Salazar Rubén (2), Cervantes Velázquez Lizbeth Karina (2), Saucedo Toral Cristian Arturo (2), Villegas Rodríguez Ma Etzabel (2), Lazo de la Vega Monrroy María Luisa (2), Ibarra Reynoso Lorena del Rocío (2) Ruiz Noa Yeniley (2).

¹ [Licenciatura en Médico Cirujano, Universidad de Guanajuato] | [len83919@gmail.com]

² [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] |

[yeni.rn@hotmail.com]

Resumen.

Introducción: La diabetes mellitus gestacional se caracteriza por alteración en la tolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante la gestación. El FGF 21 se han asociado a obesidad, síndrome metabólico y DM2, así como el polimorfismo 3'UTR (rs11665896) del gen FGF21 se asocia a enfermedades metabólicas. **Material y métodos:** Se incluyeron un total de 59 mujeres embarazadas, se genotipificaron para el polimorfismo rs 11665896 y se cuantificó los niveles de FGF21. **Resultados:** 21 pacientes fueron diagnosticadas con DMG y 37 fueron normoglucémicas, observamos un modelo dominante del polimorfismo, donde presencia de un solo alelo polimórfico aumenta el riesgo de desarrollar DMG ($p=0.046$). No se encontró una diferencia significativa entre los niveles de FGF21 según su genotipo en las pacientes con DMG ($p=0.073$). **Discusión-conclusiones:** Aunque no encontramos una diferencia significativa en las pacientes con DMG al analizar los niveles de FGF21 en cada uno de los genotipos, observamos una tendencia que muestra niveles más elevados de FGF21 en pacientes con un genotipo silvestre.

Abstract

Introduction: Gestational diabetes mellitus is characterized by impaired glucose tolerance with onset or first recognition during gestation. FGF 21 has been associated with obesity, metabolic syndrome and DM2, as well as the polymorphism 3'UTR (rs11665896) of the FGF21 gene is associated with metabolic diseases. **Material and methods:** A total of 59 pregnant women were included, genotyped for polymorphism rs 11665896 and FGF21 levels were quantified. **Results:** 21 patients were diagnosed with GDM and 37 were normoglycemic, we observed a dominant polymorphism model, where presence of a single polymorphic allele increases the risk of developing GDM ($p = 0.046$). No significant difference was found between FGF21 levels according to their genotype in patients with GDM ($p = 0.073$). **Discussion-conclusions:** Although we did not find a significant difference in patients with GDM when we analyzed FGF21 levels in each of the genotypes, we observed a trend showing higher levels of FGF21 in patients with a wild-type genotype.

Palabras Clave

1 Diabetes mellitus gestacional; 2 FGF21; 3 Polimorfismo.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es una complicación del embarazo que se caracteriza por alteración en la tolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante la gestación [1,2]. Tanto la madre como el recién nacido presentan un aumento significativo en el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidad, incluso enfermedades cardiovasculares [1,2,3].

La familia del factor de crecimiento de fibroblastos está compuesta por 22 miembros con una amplia gama de funciones biológicas, entre las cuales se encuentra el crecimiento y desarrollo celular [4], el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) pertenecen al subgrupo endocrino de esta familia. El FGF21 se secreta principalmente en el hígado, además del páncreas, el tejido adiposo y el músculo [5], actúa sobre múltiples tejidos para coordinar el metabolismo de los carbohidratos y lípidos en respuesta al estado nutricional, se secreta en respuesta al ayuno prolongado y tiene efectos similares al glucagón [2].

Los niveles de FGF21 se han asociado positivamente con obesidad y síndrome metabólico y se han reportado aumentados en pacientes con DM2 [4,6]. Estudios previos realizados en pacientes con diabetes gestacional han reportado un aumento en los niveles séricos de FGF21 en comparación con embarazadas normoglucémicas [2,3,6]. De igual forma existen estudios donde se ha encontrado una disminución los niveles de FGF21 en líquido cefalorraquídeo [6], así como un aumento en la producción de esta molécula a nivel placentario en mujeres con DMG [5,6].

Estudios previos demuestran que el polimorfismo rs11665896 de la región 3'UTR del gen FGF21 se asocia a enfermedades metabólicas como obesidad, diabetes y síndrome metabólico [7]. Basándonos en estos antecedentes el objetivo de nuestro estudio fue asociar el polimorfismo 3'UTR (rs 11665896) del gen FGF21 con los niveles solubles de esta molécula en pacientes con diabetes mellitus gestacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se incluyeron un total de 59 pacientes embarazadas atendidas en el Hospital de Especialidades Materno Infantil de León, durante el periodo de junio a julio del 2017. Se elaboró un formato de consentimiento informado y éste fue firmado, por cada paciente incluida en el estudio, además de una historia clínica breve. Las pacientes incluidas cumplían los siguientes criterios; edad entre 18 y 43 años, que se encontraran entre la semana 18 y 30 de gestación, sin diagnóstico previo de DM2. Los criterios de inclusión para los sujetos controles fueron que no tuvieran historia de DMG, preeclampsia o productos macrosómicos en embarazos previos. Para el diagnóstico de DMG se realizó una curva de tolerancia a la glucosa con 75 gramos y se usaron los criterios ADA 2016 [8]. De todas las pacientes se obtuvieron muestras de sangre periférica para la extracción de suero y DNA, se realizaron mediciones de colesterol, triglicéridos, HDL, LDL y VLDL.

Para la extracción de DNA se usó como anticoagulante EDTA. El DNA se obtuvo a partir del paquete leucocitario mediante la técnica de TSNT, las células blancas se lisaron con buffer tsnt, seguido de los reactivos fenol, cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y seguido de precipitación de ADN con etanol 100%, la resuspensión final se hizo con buffer TE 1X. Posteriormente se refrigera para su conservación a -20°C.

Se realizó la amplificación del gen FGF 21 para 3'UTR (rs 11665896) mediante PCR con los primers 5'TGTGTGGTGTCTGAGGGAAG-3' (Foward) y 5'GAAGTCAAGAGATGGAGAGCA-3' (Reverse). Las condiciones de la PCR fueron desnaturalización 94° por 5'30", seguido de una temperatura de alineación de 64° por 30', extensión a 72° por 30" y una extensión final a 72° por 10', durante 35 ciclos. EL volumen total de la reacción de PCR fue de 25µl que contenía 2 µl de DNA, 2,5 µl de buffer (1X), 3 µl de MgCl₂ (3mM), 1.5 µl de DNTPs 10mM, 10 pM de cada primer, 0.625 µl (3.1275 U) de Taq polimerasa (Thermo #EP0409), el producto amplificado fue de 360 pb. Para la identificación del polimorfismo rs11665896 cada uno de los productos de PCR se digirió usando 5 U de la enzima de restricción BlnI (ROCHE), se incubó a 37° por 120 minutos. Finalmente, los fragmentos obtenidos de la digestión se visualizaron mediante electroforesis en un gel de

agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. Después de la digestión los productos esperados fueron: GG: 360 pb GT: 360 pb, 273 pb y 87 pb TT: 273 pb y 87 pb.

Cuantificación de los niveles séricos de FGF21. Se realizó empleando la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo (ELISA) tipo sándwich, se utilizó una microplaca revestida por el anticuerpo monoclonal específico para FGF21 humano. Se pipetearon en cada pocillo las muestras de suero, inmovilizado cualquier FGF21 presente, después se realizaron lavados para eliminar las sustancias no unidas. Se añadió un anticuerpo policlonal ligado a una enzima específica, se realizó un segundo lavado para eliminar cualquier reactivo anticuerpo-enzima no unido. Se añadió una solución de sustrato para pigmentar los pocillos, donde el color se desarrolló en proporción a la cantidad de FGF21 y posteriormente se leyó la absorbancia de cada muestra. El valor mínimo detectable por el ensayo fue 4.67 pg/mL con un coeficiente de variación de 3.43.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro estudio se incluyó un total de 59 mujeres embarazadas, de las cuales 21 fueron diagnosticadas con DMG y 37 fueron pacientes normoglucémicas, con estos resultados se organizaron dos grupos el primero formado por pacientes con DMG y el segundo con normoglucémicas como grupo de sujetos control.

En cuanto a las características de las participantes, para las pacientes con DMG la media de la edad fue 30.12 (\mp 6.82), mientras que para los sujetos control fue de 27.09 (\mp 7.58). Se encontró una diferencia significativa entre los niveles de glucosa en ayuno, a la hora y a las dos horas, triglicéridos, además de VLDL entre las pacientes con DMG y los sujetos control, no así en los niveles de colesterol, HDL y LDL (Tabla 1).

En la genotipificación para el polimorfismo rs11665896 del gen FGF21, en el grupo de pacientes con DMG encontramos 16 (76.19%) con el genotipo GG, 4 (19.05%) con el genotipo GT y 1 paciente (4.76%) con el genotipo TT. Para el grupo de sujetos control encontramos 19 (51.35%) con genotipo GG, 16 (43.24%) con GT y 2 (5.40%) con genotipo TT. Para su análisis se agruparon por

genotipo, por alelos, por modelo dominante y por modelo recesivo, se realizó mediante una razón de momios.

Los resultados no muestran una diferencia significativa analizando entre la presencia de cada uno de los genotipos GT y TT con el genotipo silvestre GG, entre pacientes con DMG y sujetos control (Intervalo de confianza [IC] 95% 0.08 a 1.07, $p=0.063$ e IC 95% 0.05 a 7.17, $p=0.682$ respectivamente). De igual forma no se encontró una diferencia significativa en el modelo por alelos (IC 95% 0.16 a 1.23, $p=0.119$) (Tabla 2).

En cuanto al análisis por modelos, el análisis demostró según el modelo dominante que la presencia de un solo alelo polimórfico aumenta significativamente el riesgo para desarrollar DMG (IC 95% 0.09 a 0.98, $p=0.046$). Por otro lado, el modelo recesivo no mostró significancia (IC 95% 0.07 a 10.27, $p=0.915$) (Tabla 2).

En cuanto la cuantificación de FGF21 sérico se revisaron tanto los niveles para pacientes como para sujetos control, para su análisis estadístico se analizaron cada uno de estos grupos por separado, y posteriormente se subdividieron para su comparación según su genotipo en GG comparando con los genotipos GT más TT. Se realizó una prueba t para datos no pareados, no encontramos una diferencia significativa de los niveles de FGF21 entre las pacientes con DMG y los sujetos control ($p=0.575$) (Imagen 1). No se encontró una diferencia significativa entre los niveles de FGF21 según su genotipo en los grupos de pacientes con DMG ($p=0.073$) (Imagen 2).

En nuestra población observamos que la presencia del polimorfismo rs 11665896 del gen FGF21 tiene un comportamiento de tipo dominante, además de presentarse más en los sujetos control que en las pacientes con DMG, Zhang et al reportó que existe una relación entre este polimorfismo en su estudio en pacientes con síndrome metabólico, obesidad y DM2 [7]. En nuestro caso parece tratarse de un factor protector debido la prevalencia del polimorfismo en las embarazadas normoglucémicas.

En cuanto a los niveles de FGF21 que reportamos en nuestro estudio, no encontramos una diferencia significativa entre las pacientes con DMG y los sujetos control, igual que Stein et al [1] que no encontró una relación entre estos dos grupos, sin

embargo, más recientemente Tank et al [6] y Li et al [3] reportan que si existe una relación entre el aumento de los niveles de FGF21 en sangre en pacientes con DMG. En nuestros resultados, aunque no encontramos ninguna relación con la presencia del polimorfismo en las pacientes con DMG, se observa cierta tendencia a la presencia de niveles más elevados de FGF21 en pacientes sin la mutación.

Limitaciones del estudio, para nuestro estudio se puede destacar el tamaño de la muestra, debido a la baja cantidad de pacientes con DMG que contamos, además de sujetos control. No sabemos con exactitud, pero podemos plantear una hipótesis de que la presencia del polimorfismo altera la función final de la proteína FGF21, en base a esto explicar que exista una mayor prevalencia del polimorfismo en los sujetos control.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se realizó la genotipificación de pacientes con DMG para el polimorfismo de la región 3'UTR (rs 11665896) del FGF21 comparándolo con los niveles de FGF21. Encontramos un comportamiento dominante del polimorfismo, que nos plantea que la presencia de un solo alelo mutado aumenta el riesgo para el desarrollo de DMG. En la cuantificación de FGF21, aunque no encontramos una diferencia significativa entre las pacientes con DMG y los sujetos control, al analizar los niveles de FGF21 en cada uno de los genotipos en las pacientes con DMG, observamos una tendencia que muestra niveles más elevados de FGF21 en pacientes con un genotipo silvestre, proponemos el aumento del tamaño de la muestra ya que es una de las limitantes que encontramos en nuestro estudio. Sin embargo, con nuestros resultados podemos plantear la hipótesis de que el polimorfismo rs 11665896 genera una modificación que da como resultado en la producción menor de FGF21 en pacientes con DMG.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Hospital de Especialidades Materno Infantil de León y al Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato

Campus León, por el material y las facilidades para la realización de nuestro estudio.

REFERENCIAS

- [1] Stein, S., Stepan, H., Kratzsch, J., Verlohren, M., Verlohren, H. J., Drynda, K., Lössner, U., Blüher, M., Stumvoll, M. & Fasshauer, M. (2010). Serum fibroblast growth factor 21 levels in gestational diabetes mellitus in relation to insulin resistance and dyslipidemia. *Metabolism*, 59(1), pp. 33-37 doi: 10.1016/j.metabol.2009.07.003.
- [2] Wang, D., Zhu, W., Li, J., An, C. & Wang, Z. (2013). Serum concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in women with gestational diabetes mellitus: association with insulin resistance, adiponectin, and polycystic ovary syndrome history. *PLoS One*, 8(11), pp. e81190 doi: 10.1371/journal.pone.0081190.
- [3] Li, S. M., Wang, W. F., Zhou, L. H., Ma, L., An, Y., Xu, W. J., Li, T. H., Yu, Y. H., Li, D. S. & Liu, Y. (2014). Fibroblast growth factor 21 expressions in white blood cells and sera of patients with gestational diabetes mellitus during gestation and postpartum. *Endocrine*, 48(2), pp: 519-527 doi: 10.1007/s12020-014-0309-8.
- [4] Zhang, X., Yeung, D. C., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z. G., Liu, F., Wong, R. L., Chow, W. S., Tso, A. W., Lam, K. S. & Xu, A. (2008). Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*, 57(5), pp: 1246-1253 doi: 10.2337/db07-1476.
- [5] Dekker Nitert, M., Barrett, H. L., Kubala, M. H., Scholz Romero, K., Denny, K. J., Woodruff, T. M., McIntyre, H. D. & Callaway, L. K. (2014). Increased placental expression of fibroblast growth factor 21 in gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(4), pp: E591-E598 doi: 10.1210/jc.2013-2581.
- [6] Tan, B. K., Sivakumar, K., Bari, M. F., Vatish, M. & Randeve, H. S. (2013). Lower cerebrospinal fluid/plasma fibroblast growth factor 21

(FGF21) ratios and placental FGF21 production in gestational diabetes. PLoS One, 8(6), pp: e65254 doi: 10.1371/journal.pone.0065254.

[7] Zhang, M., Zeng, L., Wang, Y. J., An, Z. M. & Ying, B. W. (2011). Associations of fibroblast growth factor 21 gene 3' untranslated region single-nucleotide polymorphisms with metabolic syndrome, obesity, and diabetes in a Han Chinese population. DNA Cell Biol, 31(4), pp: 547-52 doi: 10.1089/dna.2011.1302.

[8] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. (2016). Diabetes Care, 39(1), pp: S1-S106.

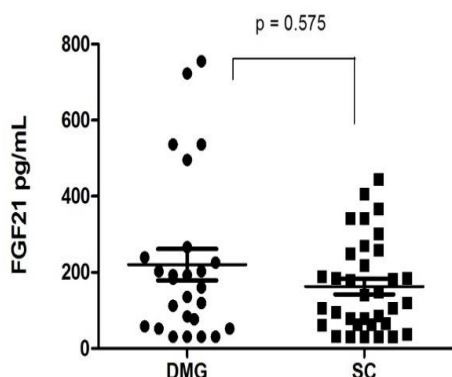


IMAGEN 1: Niveles de FGF21 en pacientes con DMG y sujetos control.

Tabla 2: Análisis genético del polimorfismo rs11665896 del gen FGF21

Genotipos	Controles n (%)	DMG n (%)	OR	IC 95%	P
GG	19 (51.36)	16 (76.19)			
GT	16 (43.24)	4 (19.05)	0.2969	0.08 a 1.07	0.063
TT	2 (5.40)	1 (4.76)	0.5938	0.05 a 7.17	0.681
Alelos					
G	54 (72.97)	36 (85.71)			
T	20 (27.03)	6 (14.29)	0.4500	0.16 a 1.23	0.119
Modelo dominante					
GG	19 (51.35)	16 (76.19)			
GT + TT	18 (48.65)	5 (23.81)	0.2961	0.09 a 0.98	0.046
Modelo recesivo					
GG + GT	35 (94.60)	20 (95.24)			
TT	2 (5.40)	1 (4.76)	0.8750	0.07 a 10.27	0.915

Tabla 1: Características generales de las participantes en el estudio

Demográficos	DMG	Sujetos control	p
Edad	30.12±6.82	27.09±7.58	0.055
SDG	25.99±5.17	25.92±2.85	0.938
IMC	29.31±5.91	27.42±5.49	0.128
Laboratorio			
Glucosa en ayuno	94.40±23.56	76.89±8.36	<0.001
Glucosa 1 h	209.78±51.74	122.83±29.27	<0.001
Glucosa 2 h	180.45±53.39	103.12±22.45	<0.001
Triglicéidos	243.74±96.40	175.36±55.99	<0.001
Colesterol	217.83±42.99	218.83±52.91	0.924
HDL	61.16±13.15	66.48±17.99	0.127
LDL	107.93±39.00	119.44±48.21	0.236
VLDL	51.40±21.20	35.44±10.65	<0.001

Valores expresados en media ± DE

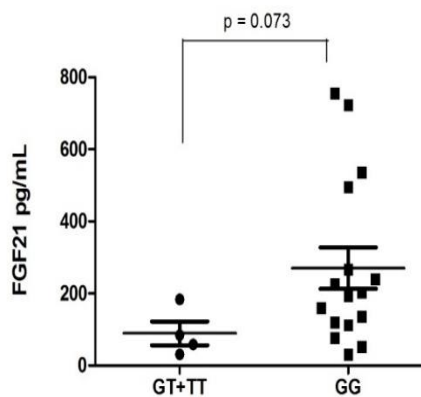


IMAGEN 2: Niveles de FGF21 en pacientes con DMG según su genotipo para el polimorfismo rs11665896 del gen de FGF21.