

BIOMARCADORES MOLECULARES EN SUERO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (EHGNA)

Proaños Mahecha Yanitza (1), Velázquez Villafaña Marion (2), Ibarra Reynoso Lorena del Rocío (2), Ruiz Noa Yeniley (2), Lazo de la Vega Monroy Maria Luisa (2), García Ramírez Juana Rosalba (3), Preciado Puga Mónica del Carmen (4), Garnelo Cabañes Serafín (3), Jordán Pérez Benjamín (3)

1 [Biología, División de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas] | [yanitza.1711314838@ucaldas.edu.co]

2 [Departamento De Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [mlazo@ugto.mx]

3 [Hospital General de León, Secretaría de Salud del Estado de Guanajuato]

4 [Departamento De Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato]

Resumen

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se define por la acumulación de grasa en al menos 5-10% del peso del hígado, en ausencia de un consumo excesivo de alcohol, incluyendo una gran variedad de trastornos hepáticos. La importancia de EHGNA radica en su elevada prevalencia a nivel mundial. El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), está relacionado con la enfermedad del hígado graso no alcohólico, lo que lo ubica como posible biomarcador para la detección de la enfermedad. El presente estudio incluyó a 90 pacientes con análisis histopatológico de hígado a los que se les midieron niveles circulantes de FGF21 y se genotipificaron para el polimorfismo rs499765. No se encontraron diferencias significativas de FGF21 entre pacientes sanos y pacientes con EHGNA, se encontró correlación con FGF21 y TG y VLDLs. Los genotipos de rs499765 de la población estudiada no presentaron asociación con el índice de actividad o las concentraciones de FGF21.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined as the accumulation of fat by at least 5-10% of liver weight in the absence of excessive alcohol consumption, including a wide variety of liver disorders. The importance of NAFLD lies in its high prevalence worldwide. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is related to nonalcoholic fatty liver disease, which places it as a possible biomarker for the detection of the disease. The present study, 90 patients with liver histopathological analysis were included. Circulating levels of FGF21 were measured and DNA was genotyped for the rs499765 polymorphism. No significant differences in FGF21 were found between healthy patients and patients with NAFLD, correlation was found between FGF21 and TG and VLDLs. The rs499765 genotypes of the studied population had no association with the activity index or the concentrations of FGF21.

Palabras Clave:

FGF21; rs499765; EHGNA.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la principal causa de enfermedad hepática en todo el mundo [1]. Se define por la acumulación de grasa en al menos 5-10% del peso del hígado, en ausencia de un consumo excesivo de alcohol [2]. Incluye una gran variedad de trastornos hepáticos que abarcan desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis pudiendo progresar a fibrosis, cirrosis, carcinoma hepatocelular y muerte [3].

La importancia de EHGNA radica en su elevada prevalencia a nivel mundial. Para Estados Unidos, Europa y Asia se reportan tasas entre el 10 al 30% [1]. En el caso latinoamericano en países como: Chile, Brasil y México se estima una prevalencia de 17 a 33% [4]. En pacientes obesos puede llegar a ser 4.6 veces más frecuente [4,5].

La biopsia hepática es la técnica estándar de oro para el diagnóstico histopatológico de esta enfermedad. Sin embargo, en virtud de su naturaleza invasiva se han buscado nuevas formas de detección [4]. A través de análisis serológicos se ha ensayado la capacidad diagnóstica de biomarcadores no invasivos, obteniendo resultados favorables para la predicción de la enfermedad y sus estadios de progresión [2,6].

El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) es una hormona secretada principalmente en el hígado y con múltiples funciones metabólicas [7]. FGF21 regula directamente el metabolismo de los lípidos y reduce la acumulación de lípidos hepáticos, revierte la esteatosis hepática y contrarresta la obesidad [8]. Se ha encontrado que el aumento de los niveles circulantes de FGF21 está relacionado con la enfermedad del hígado graso no alcohólico [7, 8]. A demás se ha reportado que el polimorfismo de un solo nucleótido rs499765 de FGF21 está asociado con EHGNA en población no diabética china, siendo el alelo C quien otorga un mayor riesgo de enfermedad [9].

Dada la estrecha relación que presenta la enfermedad de hígado graso no alcohólico con la obesidad, diabetes mellitus, síndrome metabólico y otras enfermedades, de las cuales se ha documentado la alta incidencia en la población mexicana, es necesario buscar técnicas más eficaces, menos invasivas y menos costosas que

permitan diagnosticar la enfermedad. Este estudio propone analizar si FGF21 y su polimorfismo rs499765 pueden ser biomarcadores moleculares para EHGNA en la población mestiza mexicana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyó a 90 pacientes de una cohorte previamente estudiada. El protocolo fue aprobado por el Comité de ética e investigación del Hospital General de León, siguiendo los lineamientos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y obteniendo el consentimiento informado de cada participante. Se incluyó población de León, mexicanos de entre 18 y 60 años programados para colecistectomía laparoscópica. Los criterios de no inclusión fueron consumo regular de alcohol (mujeres >20 g /día, hombres >30 g /día), enfermedad hepática previamente conocida, esteatosis secundaria, ingestión de medicamentos, como glucocorticoides, metrotexate, amioradona, tamoxifén y algunos agentes antivirales, o bien secundarias a la pérdida de peso intensa y rápida, a otras alteraciones metabólicas como la betalipoproteinemia, enfermedades inflamatorias intestinales y coledocolitiasis en pacientes demostrada antes, durante o después de la cirugía.

La evaluación histopatológica y diagnóstico de EHGNA fueron realizados por una patóloga experimentada del HGRL, usando el índice de actividad de Kleiner [10], el cual se basa en la evaluación y puntuación semicuantitativa de cuatro parámetros histopatológicos: grado de esteatosis (de 0 a 3), grado de inflamación lobulillar (de 0 a 3), grado de balonización de los hepatocitos (de 0 a 2) y estadio de fibrosis (de 0 a 4). La sumatoria de la puntuación obtenida permite diferenciar los casos con EHGNA (índice ≥ 3) de aquellos sin la enfermedad (índice 0-2).

Se llevó a cabo la extracción de ADN de leucocitos por medio del método TSNT, fenol-cloroformo-isoamílico. La integridad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio, a 80 V por 30 minutos, los geles se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en un equipo de fotodocumentación de geles. La genotipificación se realizó por PCR en tiempo real usando el kit TaqMan® Genotyping Master Mix y los primers

específicos para el polimorfismo rs499765, en un termociclador CFX96 (BioRad).

Los niveles séricos de FGF21 se midieron mediante una prueba ELISA en sándwich de fase sólida empleando el kit FGF-21 Quantikine® ELISA (R&D systems®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

El equilibrio Hardy-Weinberg se evaluó mediante la prueba χ^2 . A través de un análisis de varianza (ANOVA) con significancia de 0.05 se compararon los datos sobre el genotipo y el índice de actividad, el genotipo y la concentración de FGF21 y el genotipo de pacientes sanos y enfermos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según el proyecto 1000 genomas, la frecuencia del alelo menor (MAF) del polimorfismo rs499765 para la población mexicana pertenece al alelo ancestral (C) con un 0.4453. En relación a la población estudiada, el alelo (C) presenta la menor frecuencia alélica pero con un valor de 0.4855 (Figura 1). La población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

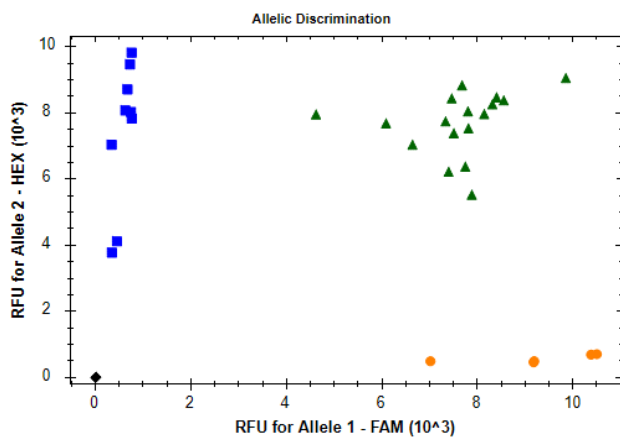


Figura 1. Genotipificación. Los cuadrados azules y círculos naranjas representan homocigotos para el alelo G y C correspondientemente. Los triángulos verdes, heterocigotos.

La tabla 1 muestra los genotipos, números de pacientes y concentración promedio de FGF21 según el índice de actividad. A pesar de que no se

encontraron diferencias significativas de FGF21 entre pacientes sanos y pacientes con EHGNA en esta población (índice de actividad > 2) como lo han sugerido otros estudios [11], los niveles de FGF21 si fueron mayores en pacientes con índice 6 a comparación de los pacientes con índices inferiores ($p < 0.05$). Por otra parte se encontró correlación con FGF21 y TG y VLDLs al igual que lo reportado en otro estudio [12], y en diferencia a lo encontrado por Gälman et al., en el 2008 [13].

Tabla 1. Resultados según índice de Actividad.

| Ind. Actividad* | Genotipo | Cantidad | FGF21** (pg/ μ l) |
|-----------------|----------|----------|-----------------------|
| 0 | CC | 5 | 343,50 \pm 131,27 |
| | CG | 7 | 497,44 \pm 169,80 |
| | GG | 6 | 406,48 \pm 188,66 |
| 1 | CC | 4 | 370,17 \pm 179,42 |
| | CG | 3 | 499,23 \pm 104,80 |
| | GG | 4 | 446,38 \pm 43,70 |
| 2 | CC | 4 | 548,93 \pm 285,55 |
| | CG | 9 | 538,17 \pm 97,73 |
| | GG | 5 | 391,57 \pm 116,54 |
| 3 | CC | 4 | 491,69 \pm 256,32 |
| | CG | 9 | 481,37 \pm 184,90 |
| | GG | 3 | 472,44 \pm 229,02 |
| 4 | CC | 2 | 565,56 \pm 383,77 |
| | CG | 3 | 525,14 \pm 6,72 |
| | GG | 4 | 382,48 \pm 199,74 |
| 5 | CC | 3 | 243,29 \pm 183,85 |
| | CG | 5 | 549,96 \pm 239,88 |
| | GG | 1 | 334,24 |
| 6 | CC | 1 | 464,65 |
| | CG | 5 | 642,19 \pm 333,57 |
| | GG | 3 | 623,85 \pm 293,60 |

*índice de actividad de 0-2: pacientes sanos. > 2 : pacientes EHGNA.

**Promedio de la concentración de FGF21.

Los genotipos de la población estudiada no presentaron asociación con el índice de actividad o las concentraciones de FGF21 a un nivel de significancia de 0.05. En contraste a lo reportado en una población china, en donde se mostró una correlación de rs499765 con los niveles séricos de FGF21 y una asociación del alelo C con un mayor riesgo de EHGNA [9]

CONCLUSIONES

Es necesario seguir en la búsqueda de un biomarcador molecular que permita diagnosticar de una forma menos invasiva y de menor costo la enfermedad de hígado graso no alcohólico para la población mexicana.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal del Hospital General de León por la colaboración y facilidades brindadas para la realización del estudio. Agradecemos también al Dr. Rubén Rangel Salazar por el apoyo técnico y académico brindado.

REFERENCIAS

- [1]. Younossi, Z., Koenig, A., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73-84.
- [2]. Cuenca, J. (2014). Hígado graso no alcohólico. *Sx Cardiometabólico Diabetes*, 1(2), 73.
- [3]. Hernandez, Y. (2015). Hígado graso no alcohólico. *Medicina Interna*, 31(4).
- [4]. Castro-Martínez, M., Banderas-Lares, D., Ramírez-Martínez, J., & Escobedo-de la Peña, J. (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in subjects with metabolic syndrome. *Cirugía y cirujanos*, 80(2), 128-133.
- [5]. Tagle, M. (2003). Hígado graso no alcohólico. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 23(1), 49-57.
- [6]. Poynard, T., Lassailly, G., Diaz, E., Clement, K., Cañazzo, R., Tordjman, J., ... & Pattou, F. (2012). Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta analysis of individual patient data. *PLoS One*, 7(3), e30325.
- [7]. Inagaki, T. (2015). Research Perspectives on the Regulation and Physiological Functions of FGF21 and its Association with NAFLD. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 147. <http://doi.org/10.3389/fendo.2015.00147>
- [8]. Liu, J., Xu, Y., Hu, Y., & Wang, G. (2014). The role of fibroblast growth factor 21 in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease and implications for therapy. *pathways*, 24, 25.
- [9]. Jiang, S., Zhang, R., Li, H., Fang, Q., Jiang, F., Hou, X., ... & Jia, W. (2014). The single nucleotide polymorphism rs499765 is associated with fibroblast growth factor 21 and nonalcoholic fatty liver disease in a Chinese population with normal glucose tolerance. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*, 7(3), 121-129.
- [10]. Kleiner, D., Brunt, E., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M., & Cummings, O. et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321.
- [11]. Li, H., Dong, K., Fang, Q., Hou, X., Zhou, M., Bao, Y., ... & Jia, W. (2013). High serum level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of non-alcoholic fatty liver disease: a 3-year prospective study in China. *Journal of hepatology*, 58(3), 557-563.
- [12]. Lee, Y., Lim, S., Hong, E. S., Kim, J. H., Moon, M. K., Chun, E. J., ... & Jang, H. C. (2014). Serum FGF21 concentration is associated with hypertriglyceridaemia, hyperinsulinaemia and pericardial fat accumulation, independently of obesity, but not with current coronary artery status. *Clinical endocrinology*, 80(1), 57-64.
- [13]. Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitonov, A., Bina, A., Eriksson, M., Hafström, I., ... & Rudling, M. (2008). The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPAR α activation in man. *Cell metabolism*, 8(2), 169-174.