



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

TESIS DE POSTGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN
ENDOCRINOLOGIA

**NIVELES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO 21 (FGF21) EN PACIENTES CON
CIRROSIS HEPATICA**

PRESENTA

DR. EDUARDO GONZALEZ FLORES

ASESOR

DR. DANIEL CUEVAS RAMOS



**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN
DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGIA Y METABOLISMO**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. FRANCISCO J. GOMEZ PEREZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGIA Y METABOLISMO
TITULAR DEL CURSO ENDOCRINOLOGIA UNAM
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

DR. DANIEL CUEVAS RAMOS
ASESOR METODOLOGICO
ESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGIA Y DIABETES
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MEDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

DR. EDUARDO GONZALEZ FLORES
AUTOR DE TESIS
RESIDENTE DE ENDOCRINOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

Agradecimientos

A mis padres, por su incondicional entrega y apoyo. Por caminar conmigo durante 12 años desde que iniciamos en este camino.

A mis hermanos, por su consejo, afecto, regaños y por ser mis mejores amigos, y claro, por traer nuevos integrantes a la familia.

A Erika, por soportarme y amarme con todo lo que soy y lo que no soy.

A mis Maestros de Endocrinología, al Dr. Francisco Gómez Perez por la oportunidad de ser parte del INNSZ, al Dr. Alfredo Reza Albarrán por su voto de confianza, al Dr. Carlos A. Aguilar Salinas por su ejemplo, al Dr. Daniel Cuevas Ramos por todo lo que aprendí con él, y por partirse en mil pedacitos para apoyarnos, al Dr. Bernardo Pérez Enríquez por compartir su experiencia y su interés en la enseñanza.

A mis Amigos en la endocrino, Toño, Joelo, Combatoni, Ceci, Marce, Wada, Cristi, que no olvidemos que solo jugamos 2 años a ser endocrinólogos, que la cancha profesional está allá afuera, y que siempre será un gusto volvernos a encontrar.

Al Ab-he y a la Nitzutz...por dibujar una sonrisa en mi interior

Contenidos

- I. Introducción
 - A. Evolución
 - B. Características estructurales
 - C. Localización
 - D. Receptor de FGF
 - E. FGF con efectos metabólicos
 - F. FGF21
 - G. FGF21 y enfermedad hepática
- II. Planteamiento
- III. Objetivos
- IV. Hipótesis
- V. Metodología
 - A. Diseño del estudio
 - B. Programa de ejercicio
 - C. Uso de alicuotas
 - D. Tamaño de muestra
 - E. Criterios de Selección
 - F. Variables a medir
- VI. Resultados
- VII. Discusión
- VIII. Conclusiones
- IX. Bibliografía
- X. Figuras y Tablas

INTRODUCCION

Los Factores de Crecimiento Fibroblástico (Fibroblast Growth Factor, FGF) constituyen una larga familia de factores de crecimiento polipeptídicos que se encuentran en muy diversos organismos desde nemátodos hasta vertebrados.

Un gen típico de *fgf* contiene tres regiones codificantes, de las cuales el exón 1 contiene al aminoácido metionina, sin embargo algunos *fgf* (*fgf* 2 y *fgf* 3) contienen secuencias 5' adicionales que inician con el codón CUG. La localización de los genes *fgf* se encuentra dispersa a través del genoma.

En el humano se han identificado 22 genes FGF de los cuales la ubicación genómica de todos a excepción del 16 se conocen. Algunos FGF se encuentran agrupados en regiones específicas del genoma, como ejemplo FGF3, FGF4 y FGF 19 se encuentran en el cromosoma 11q13 y se encuentran separados por únicamente por 40 y 10 kb respectivamente. FGF6 y FGF 23 se localizan en 12p13, FGF17 y FGF20 se localizan en 8p21-p22. La localización de estos genes indican que la familia de genes FGF, evolutivamente fue generada tanto por duplicación cromosómica y translocación.

Evolución

Los genes *fgf* han sido identificados tanto en organismos invertebrados como en vertebrados. En organismos unicelulares no se han identificado genes que codifiquen para FGF, sin embargo se ha reportado una secuencia semejante al gen *fgf* dentro del genoma del virus polihedrosis nuclear.

Entre las especies que expresan FGF, la mayoría de estas proteínas se encuentran conservadas y comparten cerca del 90% de identidad en sus secuencias de aminoácidos. Con base en esta homología, los FGF en organismos vertebrados han sido clasificados en varios subgrupos o subfamilias. Los miembros dentro de un subgrupo o subfamilia comparten mayor semejanza en sus secuencias, así como propiedades bioquímicas, y origen evolutivo semejante. Los miembros de cada subfamilia no comparten necesariamente cercanía física dentro de la misma región genómica, este hecho sugiere que las subfamilias fueron generadas por mecanismos como translocación y duplicación genómica no por duplicación local.

Características estructurales

En vertebrados el peso molecular de las FGF se encuentran entre 17 a 34 kDa. La mayoría de los FGF comparten un núcleo interno semejante de 28 aminoácidos conservados y 6 residuos de aminoácidos idénticos; 10 de estos aminoácidos interactúan con el receptor de FGF (FGFR). Los estudios estructurales identifican 12 estructuras en forma de laminas beta antiparalelas en la región nuclear conservada. Las laminas beta 10 y 11 contienen varios residuos aminoácidos básicos que forman el sitio de unión con heparina.

Localización

Los FGF 3-8, 10, 15, 17-19, y 21-23, poseen péptidos señal en la región amino-terminal que indican que son proteínas secretadas por las células. Los FGF 9, 16 y 20 carecen de péptido señal y por tanto no son secretados. FGF 1 y 2 carecen de péptido señal, no

son secretados, en cambio se encuentran localizados insertos en la superficie celular y en la matriz extracelular, siendo liberados de las células por mecanismos independientes al retículo endoplásmico. Los FGF 11-14 comprenden un grupo distinto, estos carecen de péptido señal y se considera que permanecen en el interior celular, se considera por tanto que no interactúan con el FGFR y que funcionan de forma independiente de receptor en el interior celular.

Los 22 miembros de la familia de FGF se expresan de forma diferente en la mayoría de los tejidos, sin embargo la secuencia y patrones de expresión varía considerablemente. Las subfamilias de FGF tienden a poseer patrones semejantes de expresión, aunque cada FGF parece tener sitios únicos de expresión. Algunos son de expresión única durante el desarrollo embrionario y otros se expresan tanto en el desarrollo embrionario como en la tejido adulto. Lo anterior sugiere que los FGF funcionan en fases importantes durante el desarrollo embrionario. La señalización a través de los FGF es direccional y recíproca a través de los límites epitelio-mesénquima. La integridad de estas vías de señalización requiere la regulación precisa de los FGF y la expresión de sus receptores.

Receptor de FGF

El receptor de FGF (FGFR) es un receptor tipo tirocina cinasa, contiene 2 a 3 dominios de inmunoglobulina y una secuencia de unión a heparina. A través de proceso de splicing alternativo del mRNA del FGFR se especifica la secuencia del extremo carboxilo terminal del dominio III de inmunoglobulina, esto da resultado a las isoformas la IIIb y IIIc del FGFR. El splicing alternativo esta regulado de manera tejido específica

y afecta importantemente la especificidad de la interacción ligando-receptor. El exón IIIb se expresa preferentemente en células epiteliales y el exón IIIc preferentemente en células mesenquimatosas. Los ligandos específicos de estas dos formas alternativas se expresan en tejidos adyacentes entre si, esto da como resultado una señalización direccional entre células epitelio-mesenquimatosas selectiva. Otra característica en la biología de FGF involucra la interacción entre los péptidos FGF con la heparina así como proteoglicanos ricos en heparán sulfato, como resultado de estas interacciones los FGF se estabilizan frente a la desnaturalización por calor y proteólisis, así mismo evita que su difusión o que sean vertidos al espacio intersticial.

La interacción de FGF con los residuos de heparina es necesaria para que ocurran los efectos biológicos, y permite además la formación de dímeros u oligómeros. Evidencia experimental demuestra que células que carecen de la maquinaria enzimática para producir proteoglicanos ricos en heparán sulfato, o células tratadas con enzimas que degradan estos complejos, son ineficientes para activar el FGFR.

FGF con efectos metabólicos

De entre los 22 integrantes de la familia FGF, recientemente se han hallado tres moléculas que poseen actividad metabólica y que cumplen con las características para ser considerados hormonas, estos son:

1. FGF 19 (equivalente a FGF 15 en ratones): se expresa en el epitelio intestinal, regula la biosíntesis de ácidos biliares y la adipogénesis.
2. FGF 23: regula la homeostasis del calcio y del fósforo, controlando la fosfaturia y la síntesis de vitamina D.

3. FGF 21: es la molécula descrita más recientemente, se expresa en hígado y posee efectos metabólicos descritos como incremento en la captación de glucosa por los adipocitos, incremento del gasto energético e induce pérdida de peso, reducción en los niveles de glucosa y triglicéridos en ratones obesos y en chimpancés con diabetes, y finalmente promoción de la oxidación de ácidos grasos e incremento en la formación de cuerpos cetónicos.

Estos tres miembros de la familia FGF pertenecen a una subfamilia conocida como familia FGF 19, debido a que poseen características comunes: la expresión de estas moléculas requiere la interacción de factores nucleares específicos, a saber: FXR, 1-25 OH₂ Vitamina D, y PPAR- α , con RXR para permitir la transcripción de FGF 19, FGF 23 y FGF 21 respectivamente.

Otro aspecto en común es la ausencia de dominios que interactúan con residuos de heparán sulfato, y que sus receptores carecen de residuos de heparán sulfato y requieren de interactuar con un coreceptor conocido como β -Klotho; la interacción con este coreceptor da especificidad a la unión FGF-FGFR.

FGF21

Nishimura en el año 2000, reportó el aislamiento del cDNA de una molécula de la familia FGF designada como FGF21 (fue el FGF número 21 descrito), compuesta por 209 aminoácidos y cuyo principal sitio de expresión es el hígado, músculo esquelético y células β pancreáticas. Se localiza en el cromosoma 19, cercano al sitio que ocupa el

gen de la fucosiltransferasa humana, posee considerable homología (75%) con su análogo murino.

En el año 2005, Kharitonov mostró que en ratones con diabetes, FGF21 mejoraba los niveles de glucemia, insulina y triglicéridos; la sobreexpresión transgénica en ratones resultó en un fenotipo esbelto y sensible a la insulina.

Los estudios de Badman, et al. e Inagaki et al. reportados en el año 2007, colocan a FGF21 como una hormona importante en el periodo intermedio (horas) de adaptación al ayuno e inducido por el factor de transcripción PPAR- α (blanco farmacológico de los fibratos, fármacos cuya actividad es disminuir los niveles de triglicéridos). Reportan que el ayuno o los agonistas PPAR- α incrementan los niveles de mRNA de FGF21 cerca de 25 veces el nivel basal. Por el contrario, los ratones PPAR- α $-/-$, mostraron niveles disminuidos de mRNA de FGF21, así como ausencia de respuesta a los agonistas PPAR- α y respuesta disminuida al ayuno.

Los efectos metabólicos descritos de FGF21 son:

1. Efectos sobre el metabolismo de la glucosa: la administración de FGF21 se asoció con una reducción significativa de los niveles de glucosa sanguíneos, efecto que fué aditivo con el de insulina. En cultivos de adipocitos y células 3T3-L1, la administración de FGF21 tuvo un efecto dosis-dependiente en estimular la captación de glucosa. Este incremento en la captación de glucosa parece ser específico para los adipocitos, ya que este hallazgo no se repitió en otras líneas celulares como fibroblastos, pre-adipocitos, mioblastos e hígado. Estudios in vivo han mostrado que el FGF21 regula la expresión del transportador GLUT 1 específicamente en tejido

adiposo; tras 4 horas de la administración de FGF21, el incremento en la expresión del mRNA del GLUT1 se asoció con una mayor expresión del transportador en la membrana celular de los adipocitos, este efecto no se halló en otros tejidos como músculo, hígado, riñón y cerebro. A diferencia del efecto de la insulina sobre la captación de glucosa que ocurre en segundo a minutos de su administración, el efecto de FGF21 requiere de horas. Se ha estudiado el efecto de FGF21 sobre la función de las células β pancreáticas en el modelo murino de diabetes, con la aplicación de FGF21 se observó incremento en el contenido de insulina así como secreción de insulina estimulada por glucosa.

2. Efecto en el metabolismo lipídico: Se ha observado un incremento en la síntesis hepática de FGF 21 tras la estimulación con agonistas farmacológicos de PPAR- α en ratones, y tras la administración de fibratos en humanos. La expresión hepática de FGF21 en ratones en ayuno se activa a través del receptor PPAR- α , y esta respuesta se encuentra ausente en ratones transgénicos que carecen de PPAR- α . El resultado es el incremento en la síntesis de enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y en la síntesis de acetil-CoA. En condiciones de ayuno prolongado, el producto final del metabolismo de la acetil-CoA es la producción de cuerpos cetónicos. Mediante técnicas de RNAi se redujo la expresión de FGF21 en ratones, esto produjo como resultado un incremento considerable en los niveles de triglicéridos e incremento en el contenido graso del hígado a pesar de que recibían una dieta cetogénica. Estos efectos se asociaron con disminución en la expresión de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintetasa 2 (HMGCS2) y del carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a).

3. Efecto en el metabolismo del ácido úrico: estudios en voluntarios sanos han mostrados que la activación de PPAR- α incrementa la excreción de ácido úrico, de acuerdo con lo anterior el fenofibrato (un agonista PPAR- α), disminuye las concentraciones de ácido úrico. El FGF21 incrementa su excreción hepática por el efecto agonista de PPAR-alfa. Esto pudiera explicar la asociación directa entre los niveles séricos de FGF21 y ácido úrico reportada recientemente (Cuevas-Ramos D, et al. Eur J Endocrinol 2010).

4. Efecto del ejercicio físico sobre FGF21: el estudio realizado por Cuevas-Ramos y cols. en una población de individuos con síndrome metabólico comparado contra individuos sanos, encontró que la actividad física diaria tiene una asociación positiva con los niveles de FGF21; esta asociación se sugiere es explicada debido a que el ejercicio físico estimula la lipólisis, con la consecuente liberación de ácidos grasos libres que activan a PPAR- α que a su vez estimula la secreción de FGF21.

FGF21 se ha encontrado elevado en pacientes con obesidad y se encuentra progresivamente elevado conforme los componentes del síndrome metabólico. Se ha planteado la posibilidad de que la expresión de FGF 21 en estas circunstancias constituya un mecanismo de defensa en el cual en presencia de concentraciones elevadas de ácidos grasos (elementos centrales en la fisiopatología de la resistencia a la insulina) estos al actuar como ligandos PPAR- α estimulan la oxidación de estos ácidos grasos con el objetivo final de evitar la lipotoxicidad en tejido hepático, muscular y pancreático.

FGF21 y Enfermedad hepática.

Existe poca información relativa a la biología de FGF21 en individuos con enfermedad hepática; esto cobra importancia debido a que las observaciones muestran que el principal sitio de producción de FGF21 es el hígado.

Un estudio realizado por Dushay y cols., midió los niveles de mRNA de FGF21 en pacientes con esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y estatohepatitis no alcohólica (NASH). Encontraron que los niveles de mRNA de FGF21 se encuentran significativamente incrementados en pacientes con esteatosis simple, este aumento en la actividad transcripcional se ve reflejado en el incremento en los niveles séricos de FGF21, por el contrario en pacientes con NASH se encontró incremento en los niveles séricos de FGF21 pero en ausencia de un incremento paralelo de mRNA de FGF21 hepático.

Otro estudio reciente por Yilmaz y cols., en el que se determinaron los niveles de FGF21 séricos en pacientes con esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) comprobada por biopsia y comparado contra controles sanos, encontraron que los niveles de FGF21 se incrementaron independiente de confusores como son resistencia a la insulina, índice de masa corporal, circunferencia de cintura, y prevalencia de síndrome metabólico. Este estudio descartó selectivamente a pacientes con cualquier otra forma de daño hepático.

Existen estudios (Huanting L., Journal of Hepatology 2010) en los cuales se ha encontrado que los niveles de FGF 21 se incrementan conforme al grado de esteatosis

hepática, de tal modo que en esteatosis grado 2/3 es mayor que en grado 1 y grado 0. Este mismo comportamiento se ha encontrado en pacientes con hepatitis C crónica.

PLANTEAMIENTO

Sobre la base experimental y teórica acerca de que FGF21 es un eje hormonal que influye en el metabolismo de la glucosa, lípidos, así como en la sensibilidad a la insulina, que su producción es estimulada frente al ejercicio físico y que su principal sitio de síntesis es el hígado, resulta importante determinar los niveles de FGF21 en cirrosis hepática. Además evaluar el efecto de ejercicio físico graduado en diferentes causas de insuficiencia hepática.

OBJETIVOS

Objetivo primario

1. Evaluar el nivel sérico de FGF21 en pacientes con cirrosis hepática y compararlo con sujetos control.

Objetivos secundarios

1. Evaluar el nivel sérico de FGF21 de acuerdo al puntaje de la clasificación de Child-Pugh.
2. Correlacionar el nivel sérico de FGF21 con el nivel sérico de glucosa, insulina y triglicéridos en pacientes con cirrosis hepática.
3. Comparar el nivel sérico de FGF21 antes y después de realizar actividad física supervisada en los pacientes con cirrosis hepática.

HIPOTESIS

H₁: Los niveles de FGF21 serán diferentes en pacientes con cirrosis hepática al compararlos con sujetos control.

H₀: Los niveles de FGF21 no serán diferentes en pacientes con cirrosis hepática al compararlos con sujetos control.

METODOLOGIA

Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal, comparativo, de procedimiento, observacional y retrolectivo. Este es un subestudio que se realizó utilizando los sueros almacenados de los pacientes evaluados en el proyecto titulado “Impacto de un programa de entrenamiento físico en el metabolismo de amoniaco en pacientes con cirrosis e hipertensión portal” con número de referencia GAS-09-11-1 del Comité de Ética de este Instituto. Este proyecto se realizó a partir de 2009 en el Departamento de Gastroenterología. En breve, este proyecto tiene como objetivo primario demostrar que un programa de rehabilitación mediante entrenamiento físico supervisado es capaz de mejorar el metabolismo de amoniaco (disminución de los niveles de amoniaco) en pacientes con cirrosis hepática, sin incrementar el riesgo de sangrado asociado a hipertensión portal. El trabajo propuesto en esta ocasión es un sub-estudio donde se utilizarán los sueros almacenados de los pacientes evaluados hasta el momento (n=24) para realizar la medición de FGF21 en pacientes con cirrosis hepática en ayuno. Estos resultados se compararon con controles históricos del estudio titulado “Factor de

crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) como marcador sérico del metabolismo de glucosa, lípidos y obesidad en pacientes con y sin síndrome metabólico” con autorización del comité de ética número REF 1793. En este estudio se cuenta con la medición de parámetros metabólicos y antropométricos incluyendo a FGF21 en sujetos sin síndrome metabólico que serán utilizados como población control (n=50). Estos resultados se compararán con el valor de FGF21 en ayuno de sujetos con cirrosis hepática.

Además, como objetivo secundario se determinará el valor de FGF21 en las evaluaciones después del programa de actividad física. Sobre la base experimental y teórica acerca de que FGF21 es un eje hormonal que influye en el metabolismo de la glucosa, lípidos, así como en la sensibilidad a la insulina, que su producción es estimulada frente al ejercicio físico y que su principal sitio de síntesis es el hígado, resulta importante determinar que comportamiento tiene FGF21 en insuficiencia hepática de etiologías diferentes a las dos ya estudiadas: NAFLD y NASH, tras la estimulación mediante ejercicio físico graduado.

Programa de ejercicio

El programa de ejercicio que se realizó en los 24 pacientes reunidos hasta el momento se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh). Se utilizó el programa de entrenamiento convencional para pacientes en rehabilitación cardíaca del INCICh, con algunas modificaciones. La frecuencia de las sesiones fue de 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) durante un período total de 4 meses, considerando completar entre 50-51 sesiones. El ayuno previo al inicio de cada sesión

deberá ser de al menos 2.5 hrs. En cada sesión, los pacientes realizaron cicloergometría (bicicleta) y kinesioterapia. Las mediciones con que ha proporcionado el departamento de Gastroenterología son de los 24 pacientes que han concluido el protocolo. De estos pacientes, se cuenta con alícuotas de la primera prueba de esfuerzo en los momentos basal y a las 2, 4 y 6 hrs post-ejercicio; y en la última prueba (luego de 4 meses de entrenamiento).

Uso de alícuotas

Es importante mencionar que en el trabajo propuesto en la actualidad no se contactarán a los pacientes y tampoco se realizarán nuevas intervenciones a las ya realizadas en los proyectos originales previamente autorizados por el Comité de Ética del INCMNSZ. Únicamente se realizará la medición de FGF21 en los sueros almacenados en alícuotas que ha proporcionado el Departamento de Gastroenterología al investigador principal de este proyecto. Posteriormente se comparará el nivel con los resultados obtenidos con las mediciones ya realizadas durante el transcurso de los estudios mencionados. En este trabajo únicamente se reportara los resultados obtenidos desde el punto de vista estadístico tratando de identificar una diferencia en el nivel sérico de FGF21 en ayuno en pacientes con cirrosis comparado con individuos sin cirrosis y además después de la intervención física realizada. Este diseño se planteó de esta manera por que no consideramos justificable someter a pacientes con cirrosis hepática al riesgo de realizar un plan de actividad física para únicamente realizar la medición de FGF21. En la actualidad no se conoce si realizar ejercicio es seguro y benéfico para pacientes con cirrosis hepática.

Tamaño de muestra

Dado que se desconoce el valor promedio y desviación estándar de FGF21 en pacientes con cirrosis, el resultado de las 24 muestras basales serán utilizadas como prueba piloto para determinar la dispersión en este grupo de pacientes y con ello realizar un cálculo de tamaño de muestra. El resultado permitirá calcular el poder del estudio y evaluar la necesidad de reclutar mayor número de pacientes. Estos resultados se compararán con los 50 sujetos sin cirrosis hepática ni síndrome metabólico.

Criterios de Selección

Inclusión

Los pacientes a evaluar son los casos muestreados de ambos géneros con cirrosis hepática y encefalopatía hepática del proyecto GAS-09-11-1. Los pacientes tenían la capacidad de desarrollar actividad física y aceptaron su participación firmando el consentimiento informado. Los controles a evaluar son los casos sin síndrome metabólico muestreados en el proyecto REF 1793. Estos sujetos son hombres y mujeres entre 18 a 45 años de edad, sin diagnóstico de síndrome metabólico utilizando los criterios de la ATP III, quienes también firmaron el consentimiento informado correspondiente para dicho estudio. En este subestudio se compararán los resultados de FGF21 obtenidos en dichas muestras sin reclutarse nuevos pacientes.

Exclusión

Los pacientes excluidos en el protocolo GAS-09-11-1 fueron aquellos casos con:

1. Diabetes mellitus y complicaciones crónicas asociadas (microangiopatía) o bajo tratamiento con insulina debido a los potenciales efectos secundarios del ejercicio en dicha población.
2. Casos con creatinina >1.5 mg/dL.
3. Pacientes con alto riesgo de sangrado como son la presencia de vórices esofágicas grandes, vórices pequeñas pero con datos de mal pronóstico y gastropatía congestiva grave no fueron incluidos.
4. Pacientes con criterios de hipertensión arterial pulmonar e insuficiencia cardiaca o cardiomiopatía dilatada por alcohol.

Los pacientes excluidos en el protocolo REF 1793 fueron aquellos casos con:

1. Diabetes mellitus y complicaciones crónicas asociadas.
2. Tratamiento para diabetes, dislipidemias, hipertensión, enfermedades tiroideas y obesidad.
3. Enfermedades crónicas como VIH, hepatitis o cirrosis, lupus, convulsiones o depresión.
4. Hospitalización en los últimos 6 meses.
5. Cáncer activo o bajo tratamiento
6. Mujeres embarazadas.

Variables a medir

Factor de crecimiento fibroblástico 21

Se utilizó un kit para determinación de FGF21 por ELISA (BioVendor Laboratory Medicine, Modrice, Czech Republic) que no mostró reactividad cruzada con otros miembros de la familia FGF, adipocinas (adiponectina, leptina y RBP4). Para la medición de FGF 21 las muestras de suero fueron diluidas 1:3 previo al ensayo, y 100 µl de suero diluido, calibradores, y controles de calidad fueron adicionados a 70 platillos cubiertos de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad purificado anti-FGF21. Las variaciones intra e inter-ensayo fueron de 5.1% y 6.6% respectivamente.

a. Frecuencia de las mediciones

Se realizó la medición en los sueros proporcionados en una sola ocasión.

b. Criterios de éxito y falla

Se consideró éxito la cuantificación adecuada de FGF21 así como falla el inadecuado procesamiento de las muestras y resultados.

c. Estrategia de análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva con estimación de promedios y desviación estándar para las variables continuas con distribución normal y mediana e intervalo intercuartilar para las variables con distribución no paramétrica. Se realizó transformación logarítmica de los valores de FGF21 con el objetivo de aproximar a la normalidad La prevalencia y frecuencias se expresan en términos de porcentaje. Se utilizará la prueba

de t de Student o la prueba de U de Mann Whitney para comparar los valores de FGF21 entre pacientes con cirrosis y controles. Se considerará estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

d. Mediciones de laboratorio

Todas las mediciones de laboratorio fueron realizadas en el laboratorio del departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

RESULTADOS

De los 24 pacientes reclutados, fueron estudiados 18 pacientes. De estos, ocho pacientes completaron el ciclo de ejercicio físico y tuvieron mediciones durante la prueba de ejercicio inicial y final; los diez pacientes restantes tuvieron una u otra medición (figura 1.)

Las características basales de los pacientes con cirrosis hepática, clasificados por estadio de CHILD A y B (no existió ningún paciente con CHILD C), se muestran en la tabla 1. Se estudiaron mayor número de pacientes con CHILD A, cuyo puntaje medio de CHILD fué de 5 puntos, y los valores de FGF21 basales medidos medianos fueron de 321.7 (198.34 a 796.7), en comparación con los pacientes con CHILD B que tuvieron un puntaje mediano de 7 puntos, con FGF21 basal mediano de 487 (44.4 a 614.7, $p = 0.53$).

Se realizó medición de FGF21 previo a las sesiones de ejercicio inicial y final, y en los momentos +2, +4 y +6 hrs luego de concluida cada una de ambas sesiones. El resultado de cada momento de ambas sesiones se muestran en la tabla 2.

Para comparar si los niveles de FGF21 eran diferentes conforme se modificaba el estadio CHILD (de CHILD A a CHILD B) se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de FGF21 durante cualquier momento de la prueba y el estadio CHILD A o B ($p = 0.282$).

Respecto a los valores de FGF21 en los momentos +2, +4 y +6 respecto al momento basal; no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes momentos comparado con el basal ($p = 0.06$). Tabla 2. Así mismo cuando se compararon los valores de +6 hrs de ambas sesiones de ejercicio con respecto al valor basal de la primera prueba de ejercicio, tampoco se encontró diferencia significativa ($p = 0.889$).

Se realizó correlación entre los niveles de FGF21 basal de ambas sesiones de ejercicio, con las variables: glucosa inicial y final, IMC inicial y final, GGT inicial y final, ALT y AST inicial y final respectivamente. Se encontró una correlación de 0.88 ($p = 0.019$) con el IMC final. El resto de correlaciones no resultaron estadísticamente significativas.

El objetivo primario del estudio fue conocer si existe diferencia en los niveles de FGF21 basal en los pacientes con cirrosis hepática estadios CHILD A y B, con respecto de sujetos sanos, para esto se incluyeron 50 controles sanos provenientes del estudio REF 1793, con los que se realizó la comparación.

Para el estadio CHILD A la evaluación mostró diferencia respecto a los controles sanos ($p = 0.06$) Figura 2; en cambio para el estadio CHILD B la evaluación mostró diferencia no significativa respecto a controles sanos ($p = 0.26$).

DISCUSION

En este estudio se planteó como objetivo primario conocer si existe una diferencia en los niveles de FGF21 entre pacientes con cirrosis hepática respecto a pacientes sanos. Este planteamiento fue realizado con base en estudios previos como el realizado por Yilmaz y cols., el cual mostró que los niveles de FGF21 se incrementan en pacientes con esteatosis hepática no alcohólica, conforme al grado de inflamación hepática hallado; el estudio de Li y cols, muestra hallazgos semejantes en los que los niveles de FGF21 se incrementan conforme a los grados de esteatosis, con niveles marginalmente elevados en grado 0, y francamente elevados en el grado 2-3; el estudio de Yan y cols, mostró que los niveles de FGF21 se incrementaban conforme al contenido de grasa hepática dividido por cuartiles, sin embargo, aquellos pacientes en el último cuartil mostraron disminución en los niveles de FGF21. Por lo anterior era claro que la información en pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática era insuficiente, y plantemos que conforme se incrementara el grado de severidad de cirrosis hepática clasificado mediante el puntaje de CHILD, esperábamos que los niveles de FGF21 disminuyeran.

Los resultados aquí expuestos muestran que en CHILD A los niveles tienden a ser mayores con respecto a controles sanos en el momento basal ($p = 0.06$); Sin embargo,

en sujetos con cirrosis hepática CHILD B no encontramos diferencia significativa con respecto a los controles sanos en el nivel de FGF21 ($p = 0.26$).

Planteamos como explicación para estas observaciones que es posible que en CHILD A el grado de lesión hepática aun permita la síntesis y secreción de FGF21 determinada por otros factores relacionados con la estimulación del receptor PPAR-alfa como nivel de ácidos grasos libres y glucosa reportada en trabajos previos. Es posible, que conforme progresa el grado de insuficiencia hepática a CHILD B esta capacidad posiblemente se ve disminuida. Sin embargo esta es una conclusión prematura ya que nuestros resultados no permiten su confirmación pues la muestra de sujetos con CHILD B es pequeña ($n=5$).

Dentro de los objetivos secundarios era conocer si los niveles de FGF21 mostraban un comportamiento semejante al de sujetos sanos cuando se realiza ejercicio físico. El estudio de Cuevas-Ramos y cols, mostró que los niveles de FGF21 se incrementan conforme los METS de actividad física, y en relación con los niveles de ácidos grasos libres y epinefrina. En pacientes con cirrosis hepática CHILD A y B, que realizaron ejercicio físico, no encontramos cambios significativos a las 2, 4 y 6 hrs luego de realizar ejercicio físico ($p = 0.063$, $p = 0.134$, $p = 0.836$, para 2, 4 y 6 hrs respectivamente). Resultaría interesante conocer niveles de ácidos grasos libres en los pacientes con cirrosis hepática en los mismos momentos post ejercicio físico, su elevación podría sugerir resistencia hepática a este estímulo para producir FGF21. También, es posible que el incremento de FGF21 tenga relación con la intensidad del ejercicio, la cual fue considerablemente menor en sujetos con cirrosis en comparación

con el estudio de Cuevas-Ramos donde se estudiaron mujeres jóvenes con aceptable estado de salud.

Con respecto a las correlaciones estudiadas, solo se encontró correlación entre el IMC final y los niveles de FGF21 basal ($p = 0.019$), esta relación es conocida en la que conforme se incrementa el IMC, los niveles de FGF21 se incrementan, esto explicado debido a que el tejido adiposo y los ácidos grasos libres son mayores conforme mayor es el IMC. Ambos se han relacionado con efecto agonista en la liberación de FGF21.

La mayor limitante en este estudio ha sido el tamaño de muestra, encontramos tendencias mas no francas asociaciones. Un estudio con un número mayor de pacientes con cirrosis hepática permitirá confirmar o descartar lo que en este estudio se ha mostrado como una tendencia a favor de la hipótesis planteada. La información que se obtenga en estudios con mayor número de pacientes puede contribuir al conocimiento de la fisiología de FGF21 en insuficiencia hepática y su papel como agente terapéutico en estados caracterizados por esteatosis e inflamación hepática.

CONCLUSIONES

En pacientes con cirrosis hepática CHILD A existe una tendencia a tener niveles mayores con respecto a sujetos sanos, y esta tendencia posiblemente disminuye conforme se progresa en el grado de lesión hepática (CHILD B). Aparentemente el ejercicio físico no estimula la secreción hepática de FGF21 a diferencia de lo que

ocurre en sujetos sanos, información que puede sugerir resistencia hepática a los ácidos grasos libres asociada a necrosis hepática o bien por distinto grado de intensidad del ejercicio. Existe una asociación positiva entre los niveles de FGF21 basales en pacientes con cirrosis hepática CHILD A y B, y el IMC final. Se requieren estudios con mayor número de pacientes para confirmar estas conclusiones.

BIBLIOGRAFIA

1. Ornitz DM., Itoh N. Fibroblast Growth factors. *Genome Biology* 2001, 2(3): reviews 3005.1 - 3005.12
2. Reitman Marc L., FGF21: A missing link in the biology of fasting. *Cell Metab* 5 (2007), 405-407.
3. Badman M.K., Pissios, P., Kennedy A.R., Koukos G., Flier J.S., Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 5 (2007) 426-437.
4. Inagaki T., Dutchak P., Zhao G., Ding X., Gautron L., Parameswara V., Li Y., Goetz R., Mohammadi M., Esser V., Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab* 5 (2007) 415-425.
5. Cuevas-Ramos D., Almeda Valdez P., Aguilar-Salinas CA., Cuevas-Ramos G., Cuevas-Sosa A., Gómez-Pérez FJ., The role of Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) on energy balance, glucose and lipid metabolism. *Curr Diab Rev*, 2009, Vol.5 No.4

6. Cuevas-Ramos D., Almeda Valdez P., Gómez-Pérez FJ., Meza-Arana CE., Cruz-Bautista I, Arellano-Campos O., Navarrete-López M., Aguilar-Salinas CA., Daily physical activity, fasting glucose, uric acid, and body mass index are independent factors associated with serum fibroblast growth factor 21 levels. *Eur J Endocrinol.* 2010 163: 469-477.
7. Yilmaz Y., Eren F., Yonal O., Kurt R., Aktas B., Increased serum FGF21 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Inv* 2010; 40 (10): 887-892
8. Hongmei Y, Mingfen X, Xinxia C., Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Levels Are Closely Associated with Hepatic Fat Content: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE* 6(9): e24895.
9. Huanting L, Qichen F, Fei G., Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *Journal of Hepatology* 2010 vol. 53, p.934
10. Cuevas-Ramos D, Almeda-Valdés P, et. al., Exercise Increases Serum Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Levels. *PLoS ONE* 7(5): e38022

FIGURAS Y TABLAS

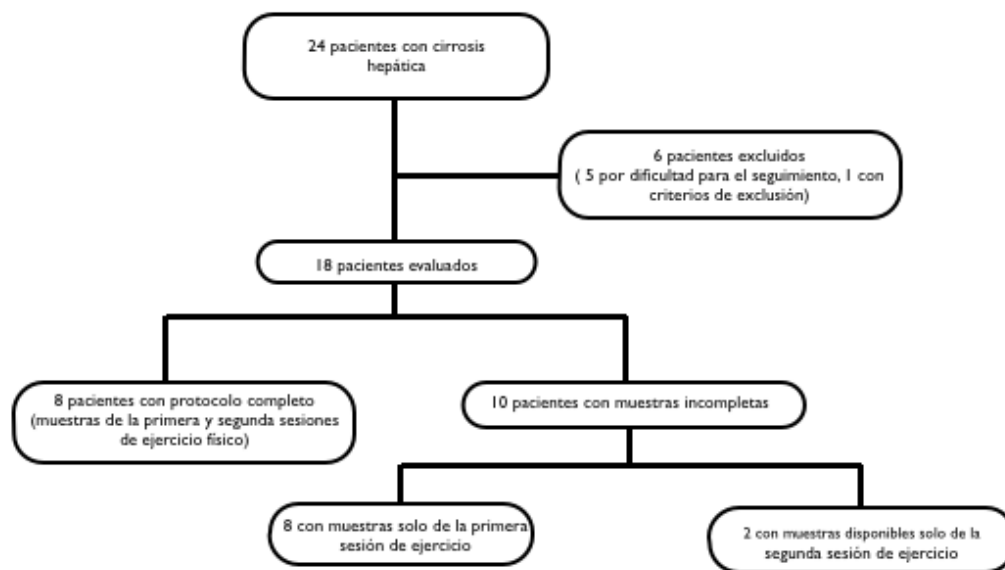


Figura 1. Pacientes evaluados con cirrosis.

<i>VARIABLE</i>	<i>CHILD A</i>	<i>CHILD B</i>	<i>p</i>
Hombres	11 (61%)	3 (16.6%)	0.26
Edad	52 (43-55.5)	48 (38-58.5)	0.76
Glucosa	91 (79.5-109)	93 (75.5-107)	0.80
Creatinina	0.76 (±0.15)	0.7(±0.05)	0.23
IMC	28.7 (25.2-30.2)	27.2 (24.7-28.3)	0.27
Puntaje CHILD	5 (5-5)	7 (7-7)	< 0.001
Bilirubina Total	1 (0.75-1.85)	2.3 (2-4.1)	0.012
Bilirubina Directa	0.3 (0.17-0.45)	1 (0.7-1.3)	0.003
Bilirubina Indirecta	0.7 (0.46-1.45)	2 (1.27-2.4)	0.014
ALT	42 (33-101.5)	41 (36.5-71)	0.882
AST	47 (39-99.5)	70 (56.5-90.5)	0.375
Albúmina	3.9 (±0.47)	3.1 (±0.43)	0.006
FGF21	321.7 (198.34-796.7)	487 (44.4-614.7)	0.533

Tabla 1. Características basales

Valores expresados como media ±DE o mediana (Intervalo intercuartilar). Frecuencias expresadas n(%)

	<i>N</i>	<i>FGF21 (ng/L)</i>
Primera sesión		
Basal	16	397.8 (186.11-647.2)
2h post-ejercicio	16	264 (87.16-580.66)
4h post-ejercicio	16	258.65 (159.4-499.5)
6h post-ejercicio	16	337.64 (151.7-534.4)
Luego de 4 meses		
Basal	10	326.2 (134.4-519.2)
2h post-ejercicio	10	234.6 (101.7-465.3)
4h post-ejercicio	10	313.3 (188-462.9)
6h post-ejercicio	10	364.6 (188-584)
Primera sesión		<i>p</i>
Basal vs 2hrs		0.063
Basal vs 4hrs		0.134
Basal vs 6 hrs		0.836
Luego de 4 meses		
Basal vs 2hrs		0.241
Basal vs 4hrs		0.721
Basal vs 6 hrs		0.285

Tabla 2. Niveles de FGF21 en pacientes con cirrosis en los diferentes basales.

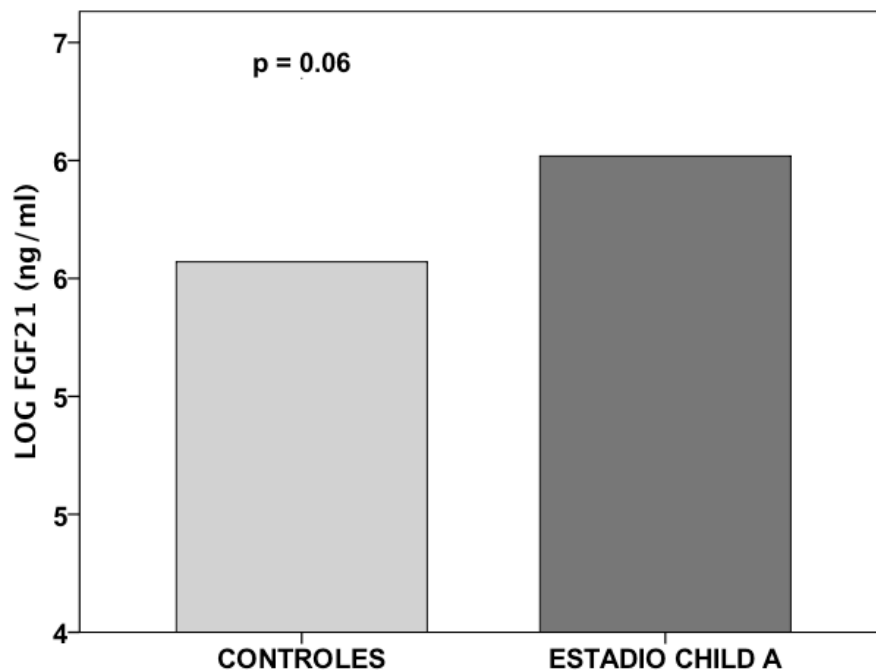


Figura 2. Diferencia en los niveles de FGF21 en pacientes con cirrosis hepática CHILD A respecto a controles sanos.