

# ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES SOLUBLES DE LA MOLÉCULA FGF21 CON PERFILES DE CITOCINAS TH1/TH2/TH17 EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

Cervantes Velázquez, Lizbeth Karina (1), Ríos Torres, Miguel Ángel (2), Saucedo Toral, Cristian Arturo (5) Navarro Celio, Margarita (3) Deveze Álvarez, Martha Alicia (4) Villegas Rodríguez, Ma. Etzabel (5), Ruiz Noa, Yeniley (5)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [lk.cervantesvelazquez@gmail.com]

2 [Médico Cirujano, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato]

3 [Hospital de Especialidades Materno Infantil, León Guanajuato]

4 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato]

5 [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [yeni.rn@hotmail.com]

## Resumen

La Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) es una alteración de la tolerancia a la glucosa de severidad variable que es reconocida durante el embarazo. Estas pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en los años siguientes a su embarazo y sus bebés tienden a ser macrosómicos. El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) constituye un regulador clave del metabolismo de la glucosa y los lípidos. Varios estudios reportan la relación entre FGF21 y enfermedades como diabetes mellitus y obesidad debido a que se ha demostrado que es capaz de ser inducido por la inflamación. Durante el embarazo es esencial un adecuado balance entre las citocinas proinflamatorias e inmunoreguladoras. Ciertas evidencias sugieren que la respuesta de tipo Th1 disminuye notablemente durante un embarazo sano, mientras que el perfil Th2 se incrementa. Sin embargo, el balance entre citocinas que se manifiesta en pacientes con DMG es controversial.

## Abstract

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is an impaired glucose tolerance of variable severity that is recognized during pregnancy. These patients are at an increased risk of developing type 2 diabetes mellitus (DM2) in the years following their pregnancy and their babies tend to be macrosomic. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) makes a key regulator of glucose and lipid metabolism. Several studies report the relationship between FGF21 and diseases such as diabetes mellitus and obesity because it has been shown to be capable of being induced by inflammation. A suitable balance between proinflammatory and immunoregulatory cytokines is essential during pregnancy. Some evidence suggests that the Th1 type response decreases markedly during a healthy pregnancy, while the Th2 profile increases. However, the balance between cytokines that manifests in patients with GDM is controversial.

## INTRODUCCIÓN

La prevalencia de diabetes mellitus gestacional a nivel mundial se ha estimado en 7%. Y en México, dependiendo de los criterios diagnósticos utilizados y de la población estudiada se ha reportado entre 3% a 19.6%. Más del 90% de los casos de diabetes que complican a un embarazo son casos de diabetes gestacional. Las mujeres que desarrollan diabetes gestacional tienen alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en los 10 años que siguen al embarazo [1]. La exposición del feto a concentraciones elevadas de glucosa plasmática de la madre, durante el segundo y tercer trimestres, resulta en crecimiento fetal excesivo, hipoglucemia, ictericia, hipocalcemia, policitemia y enfermedad por deficiencia de surfactante pulmonar en el neonato y posteriormente, en niños y adultos en obesidad y diabetes [2].

### Diabetes Mellitus Gestacional

La diabetes mellitus gestacional es un padecimiento caracterizado por la intolerancia a los carbohidratos con diversos grados de severidad, que se reconoce por primera vez durante el embarazo, y que puede o no resolverse después de éste. La glucosa cruza la placenta por difusión facilitada, por lo que los niveles séricos maternos determinan transitoriamente los niveles fetales y una hiperglucemia fetal condiciona hiperinsulinemia; la cual se asocia con mal pronóstico fetal, macrosomía, lipogénesis, organomegalia, polihidramnios; así como, disminución en la maduración pulmonar, hipoxia, acidemia, policitemia, hiperbilirrubinemia e hipoglucemia [2].

- FGF21

El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) es una hormona secretada por el hígado, páncreas y tejido adiposo, identificado como regulador del metabolismo de la glucosa y la homeostasis lipídica. De acuerdo a estudios recientes FGF21 puede ser regulado en múltiples condiciones fisiopatológicas en el cuerpo humano y recientemente se ha demostrado que es capaz de ser inducido por la inflamación además de que protege de la toxicidad inducida por inflamación en

obesidad e hiperlipidemia [3]. In vitro, promueve la captación de glucosa independiente de la insulina a través de la transcripción de GLUT1 en modelos animales como roedores y en adipocitos humanos [4]. FGF21 suprime a NF- $\kappa$ B así como el nivel de expresión de las citocinas proinflamatorias. También ha sido probado para prevenir el estrés oxidativo y posee un potente antioxidante. Por lo tanto, FGF21 puede desempeñar un papel importante en las enfermedades inflamatorias e inmunomediadas, como las enfermedades autoinmunes [3].

- *Citocinas proinflamatorias e inmunoreguladoras*

Las citocinas pertenecen a una diversa familia de proteínas pequeñas y solubles que se expresan por varios tipos de células y tejidos y actúan como mediadores inmunológicos. Las subpoblaciones de células productoras de citocinas, que clásicamente incluyen las células T helper1 (Th1) y T helper 2 (Th2), juegan un papel fundamental en la diferenciación de la naturaleza de la respuesta inmune [5].

En el embarazo, el sistema inmunológico desempeña un papel importante, un embarazo exitoso parece basarse en un discreto equilibrio entre las citoquinas Th1 y Th2, que están involucrados en el crecimiento fetal y el desarrollo [7]. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 son algunas de las citocinas fundamentales en el inicio del embarazo. A medida que el embarazo se desarrolla, altas concentraciones de TNF- $\alpha$  se han relacionado con el desarrollo de la preeclampsia y la diabetes mellitus gestacional (DMG), la reducción de los niveles de IL-10 y el parto prematuro [6].

Interleucina-6 (IL-6) es una citocina pleiotrópica que regula varios procesos fisiológicos incluyendo inflamación, hematopoyesis, respuestas inmunes y mecanismos de defensa del huésped [6]. Los niveles elevados de IL-6 se han encontrado repetidamente en pacientes con diabetes mellitus gestacional (DMG) en comparación con las mujeres embarazadas sanas [8], lo que sugiere fuertemente que la IL-6 puede contribuir al desarrollo de intolerancia a la glucosa durante el embarazo. Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el aumento de la secreción de IL-6 puede promover la diferenciación de los linfocitos Th17, lo que resulta en elevados niveles

de IL-17 que a su vez promueve la inflamación, desencadena la acción del factor nuclear kB y la producción de diversas citocinas [9].

*Por lo tanto, con la finalidad de conocer más sobre la Diabetes Mellitus Gestacional en el presente estudio analizamos los niveles solubles de la molécula FGF21 y su asociación con los perfiles de citocinas Th1/Th2/Th17 tanto en mujeres embarazadas con DMG como en embarazadas normoglucémicas. Siendo FGF21 una hormona muy importante que controla la sensibilidad a insulina y que suprime la expresión de las citocinas proinflamatorias se esperaba encontrar niveles elevados en pacientes con respecto a los sujetos control y una marcada correlación de los niveles solubles de la molécula y las citocinas estudiadas.*

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio comparativo de corte transversal. Se incluyeron 86 mujeres embarazadas atendidas en el Hospital de Especialidades Materno Infantil de León Guanajuato que se sometieron a pruebas de DMG con una prueba oral de tolerancia a la glucosa. Se elaboró un formato de consentimiento informado y este fue firmado para 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, semana de gestación (SDG) entre 18 y 30, 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. La prueba de tolerancia a la glucosa consistió en la obtención de una muestra sanguínea para medir glucemia en ayuno y dos determinaciones posteriores a la ingesta de 75g de glucosa realizadas a los 60 y 120 min. La DMG fue diagnosticada según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) con los siguientes niveles umbral de glucosa: ayuno  $\geq 95$  mg / dl, 1 h  $\geq 180$  mg / dl y 2 h  $\geq 155$  mg/dl.

Se obtuvo suero sanguíneo de la muestra en ayuno para la determinación de los niveles solubles de citocinas Th1/Th2/Th17 que se realizaron por citometría de flujo utilizando el kit de citocinas Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 BD™ mediante tecnología de matriz de perlas para detectar simultáneamente múltiples citocinas en las muestras problema. Las siete poblaciones de perlas con intensidades de fluorescencia distintas estaban recubiertas con anticuerpos de captura específicos para las proteínas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17A. Se mezclaron las perlas de captura de citocinas con los estándares y con las muestras desconocidas, se incubaron con los anticuerpos de detección conjugados con Ficoeritrina (PE) para formar complejos tipo sándwich. La intensidad de la fluorescencia de PE de cada complejo reveló la concentración de cada una de las citocinas. Después se analizaron las muestras en un citómetro de flujo, utilizando el software BD FCAP™ para generar los resultados en formato gráfico y tabular. Por su parte, los niveles solubles de FGF21 en suero se midieron mediante un ensayo de inmunoabsorción enzimática utilizando el kit Quantikine® ELISA Human FGF-21 R&D Systems® el cual se basa en un ensayo tipo sándwich, el anticuerpo inmovilizado anti-FGF21 se pone en contacto con la muestra problema y con el conjugado enzima-anticuerpo marcado, una reacción de competición resulta entre el antígeno nativo y los anticuerpos sin competencia para formar un complejo soluble. El rango de detección del ensayo se encuentra entre 31.3 - 2.000 pg/ mL.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

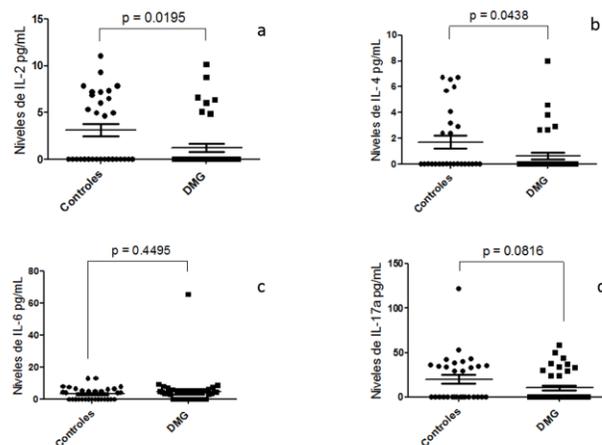
En el presente estudio se incluyeron un total de 44 sujetos control y 42 pacientes con DMG. Las características clínicas de estas pacientes se muestran en la tabla 1.

Características	Sujetos control n = 44	Pacientes con DMG n = 42	p
<b>Demográficas</b>			
Edad	27.09 ± 7.58	30.11 ± 6.82	0.055
SDG	25.91 ± 2.85	25.98 ± 5.17	0.938
<b>Clinicas</b>			
Glucosa en ayuno	76.88 ± 8.35	94.40 ± 23.56	0.000
Glucosa 1h	122.82 ± 29.27	209.78 ± 51.74	0.000
Glucosa 2h	103.12 ± 22.45	180.45 ± 53.39	0.000
Peso actual	72.34 ± 16.60	76.74 ± 15.73	0.225
Peso anterior	65.60 ± 12.64	71.79 ± 16.94	0.101
IMC	27.41 ± 5.49	29.31 ± 5.91	0.128
Triglicéridos	175.35 ± 55.98	243.73 ± 96.40	0.000
Colesterol total	218.83 ± 52.91	217.83 ± 42.98	0.924
HDL	66.47 ± 17.99	61.16 ± 13.14	0.127
LDL	119.44 ± 48.21	107.93 ± 39.00	0.236
VLDL	35.43 ± 10.64	51.40 ± 21.20	0.000
IL-2	3.126 ± 0.6632	1.257 ± 0.4531	0.0195
IL-4	1.729 ± 0.4889	0.6489 ± 0.2749	0.0438
IL-6	3.484 ± 0.7141	5.004 ± 1.706	0.4495
IL-17a	20.14 ± 4.924	10.55 ± 2.862	0.0816

Comparación entre variables cuantitativas se realizaron con chi<sup>2</sup>. Valores expresados en media ± desviación estándar

**Tabla 1: Tabla de características clínicas de los pacientes con DMG y de los sujetos control SC**

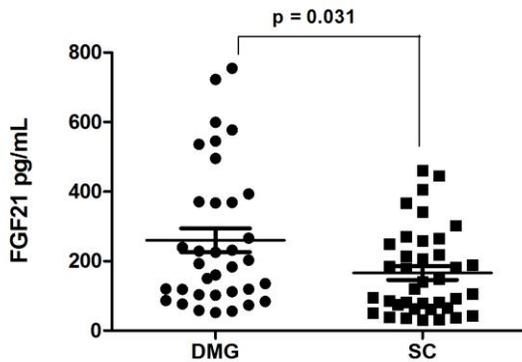
En la misma se muestra que existen diferencias significativas en edad, es decir, tener un embarazo a una edad mayor a 30 años puede ser factor de riesgo para tener Diabetes Mellitus Gestacional, además de, niveles elevados de glucosa en ayuno a la hora y a las dos horas, los niveles de triglicéridos en sangre y de colesterol VLDL también muestran diferencias significativas, mientras que la semana de gestación en la que se encuentran, peso actual, peso anterior, IMC, colesterol total, HDL y LDL no se encontraron diferencias significativas.



**Figura 1: Niveles de citocinas en mujeres embarazadas con DMG en comparación con los sujetos controles\* $p < 0.05$  intervalo de confianza al 95%**

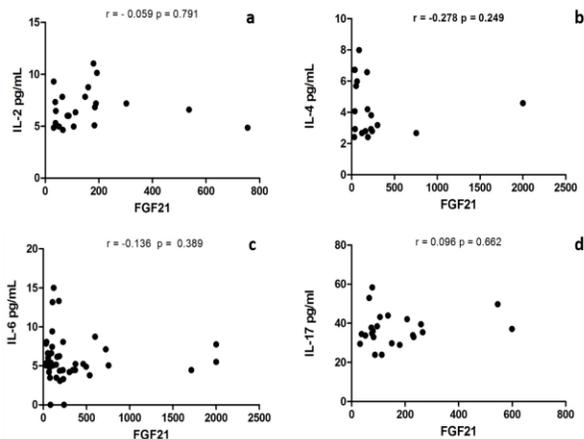
Los resultados de la citometría de flujo en la Figura 1, muestran que los niveles de citocinas IL-2 (a) e IL-4 (b) muestran diferencias significativas, se ven disminuidas en los pacientes (DMG) en comparación con los sujetos controles, como se sabe IL-2 interviene en la respuesta innata del sistema inmune y el papel de IL-4 está enfocado en la activación de linfocitos B y estos dependen de la inmunidad mediada por anticuerpos [5], puede verse disminuidos por la acción de la molécula FGF21 que recientemente diversos estudios demuestran que puede ser capaz de ser inducido por la inflamación y que además suprime el nivel de expresión de las citocinas proinflamatorias [3] y como se muestra en la Figura 2, los niveles de la molécula FGF21 se muestran elevados en los pacientes (DMG) en comparación con los sujetos controles y esta diferencia es significativa. Este resultado también explica la disminución, aunque no es una diferencia significativa, de IL 17a (Figura 1b), una citocina pro-inflamatoria que activa a NF-kB. Los valores de la citocina IL-6 (Figura 1c) tampoco mostró diferencias significativas, sin embargo la tendencia de este estudio concuerda con la literatura sobre que los niveles elevados de IL-6 se han encontrado en pacientes (DMG) en

comparación con los controles [8] y el estudio de IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no se incluyeron porque la cantidad de citocinas no fueron detectables en la mayor parte de las pacientes.



**Figura 2:** Niveles de la molécula FGF-21 en mujeres con DMG en comparación con los sujetos controles.  $*=p<0.05$  intervalo de confianza al 95%.

Como se observa en la Figura 3, en nuestros resultados no se muestra una correlación entre las citocinas estudiadas y la molécula FGF21, esto puede deberse al tamaño de la muestra.



**Figura 3:** Correlación de la molécula FGF-21 con respecto a los niveles de citocinas a) IL-2, b) IL-4, c) IL-6, d) IL-17,  $*=p<0.05$  intervalo de confianza al 95%.

## CONCLUSIONES

No se puede realizar una resolución concluyente de la asociación de los niveles de la molécula FGF21 con respecto a los perfiles de citocinas Th1/Th2/Th17 en pacientes con Diabetes Mellitus Gestacional, más experimentos y repeticiones son necesarias; sin embargo, es evidente en nuestros resultados que las pacientes con DMG presentan una elevación en los niveles de la molécula FGF21 y que probablemente esto influye en los niveles de las diferentes citocinas estudiadas o viceversa.

## AGRADECIMIENTOS

Al Hospital de Especialidades Materno Infantil y a todo su personal por el apoyo otorgado para realizar el estudio, a mis compañeros de ciencias médicas, y finalmente a la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato, por darme la oportunidad de participar en el Verano de Investigación Científica UG, 2017.

## REFERENCIAS

- [1] Kim C, Newton K, Knopp P: Gestational diabetes and The incidence of type 2 diabetes Diabetes Care 2002; 25:1862-1868.
- [2] Persson B, Hanson U. Neonatal Morbidities in Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1998;21:B79-83
- [3] Yinhang Yua, SimingLia,e,YaonanLiua, Guiyou Tiana, Qingyan Yuana, Fuliang Baia, Wenfei Wanga,b,Zhiyi Zhangd, Guiqing Rena,YuZhangc,DeshanLi. 2015 Fibroblast growth factor 21 (FGF21) ameliorates collagen-inducedarthritis through modulating oxidative stress and suppressing nuclearfactor-kappa B pathway, International Immunopharmacology, 25, (78-80).
- [4] Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R,Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, et al.FGF-21 as a novel metabolic regulator. J Clin Invest 2005; 115: 1627–35.
- [5] S. Patial and N. Parameswaran, "Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages,"Critical Reviews in Eukaryotic GeneExpression, vol. 20, no. 2, pp. 87–103, 2010
- [9] Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. Eur J Biochem 2001; 268: 160–167.1