

Fundación Clínica Médica Sur, A.C.

Investigación

Protocolo

Determinación de la expresión de receptores de proteínas G en mucosa duodenal y colónica de pacientes con hígado graso no alcohólico

Varenka J. Barbero Becerra, Luis Antonio Manzo Francisco, Eva Juárez Hernández, Iván López Méndez, Norberto C. Chávez Tapia, Alejandro Álvarez Arce

Afiliación: **Fundación Clínica Médica Sur, A.C.**

Resumen:

ANTECEDENTES

El hígado graso no alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés) es un conjunto de enfermedades hepáticas, que puede incluir esteatosis que pasa a esteatohepatitis, con riesgo de progresión a fibrosis e incluso cirrosis y complicaciones, como carcinoma hepatocelular. Se calcula que en los próximos 20 años será la principal causa de enfermedad hepática a nivel mundial con una prevalencia estimada del 20-30%. En México, la prevalencia varía de acuerdo a la región, desde 14% hasta 60%. [1]

Existen varios factores implicados en el desarrollo de NAFLD, dentro de los principales se encuentran: Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), obesidad, resistencia a la insulina y el desequilibrio entre la ingesta y remoción de lípidos, para culminar en un denominador común que es el depósito de triglicéridos (TG) a nivel hepático.

La obesidad genera disfunción del tejido adiposo, en estas circunstancias, hay un exceso de ácidos grasos libres (AGL) que ingresan al hígado a través del sistema porta hepático, lo cual genera un aumento de la lipogénesis y gluconeogénesis; así, el daño no es generado por los TG, sino por sus precursores. Así mismo, los AGL también contribuyen a generar inflamación, al ser ligandos de receptores tipo Toll (TLR) 4 e inducir la producción y acumulación de citocinas y quimiocinas inflamatorias. [2] En presencia de obesidad se presenta una disminución de adiponectina, la cual es una hormona antiinflamatoria y sensibilizadora de la insulina, que también regula la oxidación de ácidos grasos y la acumulación de tejido adiposo en los tejidos [3]. Por otro lado, la producción de lípidos de

novo, lleva a la producción de TG, esta producción también se encuentra alterada en NAFLD, y contribuye a la generación de hasta 25% de los TG y posteriormente produce lipotoxicidad mediada por precursores.

La microbiota (microorganismos comensales) se encuentra a lo largo del tubo digestivo y contribuye a mantener la barrera intestinal, absorción de nutrientes y tiene un rol dentro del desarrollo de la obesidad, dislipidemia y sus complicaciones. [4] Se estima que el intestino contiene 100 trillones de células bacterianas y más de 2000 especies, los *Firmicutes* y *Bacteroidetes* abarcan el 90% de toda la biota. Las alteraciones en la microbiota (disbiosis) han sido implicadas en diversas condiciones como obesidad, hígado graso, aterosclerosis, enfermedades autoinmunes y cáncer.

Las bacterias contenidas en la microbiota tienen la función de degradar carbohidratos y promover la formación de ácidos grasos biológicamente activos de cadena corta (SCFA) media (MCFA) y larga (LCFA). Específicamente, los SCFA tienen varias funciones y están involucrados en procesos como la regulación de la energía, metabolismo y expansión del tejido adiposo. [5] De igual forma, son ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs o GPRs) que modulan la respuesta a hormonas y neurotransmisores, tales como GPR43 y 41. La activación de GPR43 contribuye a inhibir la lipólisis, ya que se ha observado que esta activación incrementa el tejido graso en modelos murinos. [6]

Los GPRs se encuentran principalmente en las células enteroendocrinas del intestino. De acuerdo al tipo de ácidos grasos, se activan distintos receptores y las acciones o desenlaces son selectivos. El GPR43 se encuentra principalmente en tejido adiposo, células inflamatorias y tracto gastrointestinal. [7] Mas aún, los MCFA activan al receptor GPR40 y disminuyen la esteatosis, mientras que los LCFA activan a los receptores GPR119 y 120 y tienen actividad anti-esteatosis, anti-diabética y anti-obesidad, disminuyendo el peso corporal. [8]

MARCO DE REFERENCIA

La microbiota intestinal es una variedad de microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal de mamíferos, investigaciones recientes han mostrado el papel de la microbiota intestinal y su relación en la obesidad y trastornos metabólicos. Los estudios que utilizan ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasas, han relacionado

una composición alterada del microbiota intestinal con el desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina y diabetes en el huésped a través de varios mecanismos, que incluyen una mayor recolección de energía y ácidos grasos alterados de la dieta, así como metabolismo y composición en el tejido adiposo e hígado. [9]

Una actividad importante de la microbiota intestinal es catabolizar las fibras dietéticas que el huésped no hidroliza por completo. Los principales productos de fermentación bacteriana del colon de la fibra dietética son los SCFA como el acetato, el propionato y el butirato. [10] Los SCFA se pueden utilizar para la síntesis de *novo* de lípidos y glucosa, que se utilizan como las principales fuentes de energía para el huésped.

La proporción de concentraciones de SCFA en la luz del colon es de aproximadamente 60% de acetato, 25% de propionato y 15% de butirato. Los SCFA lumbinales no solo se absorben como nutrientes a través del epitelio intestinal, sino que también influyen en diversas funciones del tracto gastrointestinal. [11] Por ejemplo, se sabe que los SCFA afectan la movilidad del colon y el transporte de iones [12, 13] e inhiben el tránsito en regiones más proximales a su aplicación luminal.

Además de las fuentes de energía, los SCFA se han establecido como nutrientes esenciales que también actúan como moléculas de señalización. Recientemente, el GPR41 y GPR43, han demostrado ser activados por SCFA. Específicamente, se ha observado que GPR41 se acopla a Gi/o como una subunidad alfa de proteína G heterotrimérica y actúa como un sensor de energía relacionado con la microbiota intestinal en el sistema nervioso simpático e intestinal; mientras que el GPR43 se acopla a Gi/o Gq como otra subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica. También se ha observado que GPR43 se expresa en el tejido adiposo, intestinal y el sistema inmune. [14]

En el sistema inmune, la regulación de las respuestas inflamatorias por GPR43 es un proceso bien establecido; sin embargo, en tejido adiposo aún se cuenta con información escasa de la función de este receptor. Algunos estudios han indicado que GPR43 promueve la secreción de leptina, la adipogénesis y la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo y los adipocitos, regulando así el metabolismo energético [15]. Los ratones deficientes en GPR43, alimentados con dieta alta en grasa, exhiben una tolerancia a la glucosa y una reducción en la grasa corporal. Por otro lado, otro grupo informó que el aumento en la expresión intestinal de GPR43 se asocia a una mejora en la tolerancia a la glucosa, a través de la promoción de la secreción del péptido-1 similar al glucagón.[16]

La localización de los receptores en células del tracto digestivo se ha demostrado en distintos estudios. En 2006 Karaki et al, demostró la expresión génica del receptor GPR43 en el tubo digestivo (íleon distal y colon) de ratas, y mediante inmunohistoquímica se determinó la localización de los receptores en las células enteroendócrinas. [17] Siendo en 2008, cuando el grupo de Karaki et al, logró el aislamiento del receptor GPR43/FFA2 en muestras de colon ascendente de pacientes sometidos a colectomía. [18]

PLANTEAMIENTO

Los GPRs se expresan en distintas células enteroendocrinas del intestino, y la alteración en la microbiota parece tener un papel importante en el desarrollo de NAFLD, ya que incrementa el número de SCFA y al activar al GPR43 inhibe la lipólisis y la diferenciación de adipocitos, por lo que aumenta el tejido adiposo.

Se ha aislado cuantitativamente el receptor GPR43 en modelos murinos a lo largo del tracto digestivo siendo más frecuente en colon, íleon terminal, placas de peyer, yeyuno y duodeno, en orden decreciente. En 2014, Little et al, demostró la presencia de receptores de ácidos grasos de cadena corta, GPR36, 40, 119 y 120 en muestras de mucosa de duodeno de humanos, demostrando también una correlación directa entre la expresión de GPR120 y el índice de masa corporal (IMC).

Derivado de estas asociaciones este estudio plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la diferencia en la expresión de GPRs de acuerdo a la presencia y ausencia de NAFLD y obesidad?

JUSTIFICACIÓN

Actualmente no existen estudios que demuestren la expresión de GPRs para diferentes ácidos grasos en pacientes con NAFLD. Gracias a un estudio previo realizado por este grupo de investigación, sabemos que los factores implicados en la patogénesis del NAFLD tienen relación con las características de la dieta, específicamente con la cantidad y tipo de ácidos grasos biológicamente activos que se consumen, pudiendo ser reconocidos por

dichos receptores GPRs. Por otro lado, la expresión génica de GPRs en células sanguíneas muestran diferencias de acuerdo a la presencia de NAFLD y obesidad, así como su combinación. (*data not published*)

Con este estudio se pretende describir la expresión de GPRs para los diferentes ácidos grasos en células intestinales, con la finalidad de comparar la expresión sanguínea, estudiada previamente y la expresión enteroendocrina. Las relaciones y diferencias en la expresión de GPRs en pacientes con NAFLD y/o obesidad, pueden encaminar las recomendaciones dietéticas, en cuanto al consumo de ácidos grasos, que puedan regular la expresión y regulación del desarrollo de NAFLD, siendo una estrategia terapéutica adyuvante en las terapias actualmente disponibles.

OBJETIVO

Primario

Determinar la expresión génica y proteica de receptores acoplados a proteínas G (GPR 40, GPR 43, GPR 120) en muestras de mucosa de duodeno y colon de pacientes con y sin NAFLD/Obesidad.

Secundarios

Determinar si existe relación de la expresión de los receptores y la severidad de la esteatosis hepática.

Determinar si existen diferencias en la expresión de acuerdo con la presencia/ausencia de NAFLD y obesidad.

HIPÓTESIS

Los pacientes con NAFLD y obesidad tendrán mayor expresión génica y/o proteica de receptores GPRs asociados a lipólisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Universo de estudio. Población de estudio

Pacientes con y sin NAFLD/Obesidad que acudan a estudios de endoscopia en la Unidad de Endoscopia de Médica Sur.

Tamaño de la muestra

Debido a la falta de información acerca de la expresión cuantitativa de GPRs en muestras de pacientes con NAFLD, el estudio se realiza con un tamaño de muestra a conveniencia del investigador, estableciendo 10 pacientes por grupo de comparación, teniendo un total de 40 pacientes. Se dará un tiempo de reclutamiento de 4 meses que podrá modificarse de acuerdo a la velocidad de reclutamiento de la muestra.

Muestreo

No probabilística
Conveniencia

CRITERIOS DE SELECCIÓN.

Criterios de Inclusión.

- Pacientes mayores de 18 años que acudan a estudios endoscópicos y acepten participar en el estudio
- Pacientes con plaquetas $>50,000$
- Pacientes con $\text{INR} > 1.5$
- Pacientes que no presenten alguna contraindicación para el estudio endoscópico
- Grupo 1: Pacientes con $\text{IMC} > 25 \text{ kg/m}^2$ y NAFLD
- Grupo 2: Pacientes con $\text{IMC} > 25 \text{ kg/m}^2$ sin NAFLD
- Grupo 3: Pacientes con $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ y NAFLD
- Grupo 4: Pacientes con $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ sin NAFLD

Criterios de exclusión.

- Pacientes con hepatopatías diferentes a NAFLD
- Pacientes que hayan recibido tratamiento con fármacos hepatotóxicos

Criterios de eliminación.

- Pacientes que retiren el consentimiento una vez incluido en el estudio

Definición de variables

- Pacientes con consumo de alcohol superior a 140g/semana
- Pacientes que hayan recibido transfusiones sanguíneas anteriores a 1990
- Pacientes que consuman suplementos de alimentación con ácidos grasos poliinsaturados, omega 3 y 6
- Pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2

Independientes.		Dependientes.	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Sobrepeso – obesidad	Nominal	Expresión de GPRs	Intervalo
NAFLD	Nominal		
Severidad NAFLD	Ordinal		
Sexo	Nominal		

Descripción de procedimientos

Se reclutan pacientes que acuden a estudios endoscópicos, antes de realizar el estudio se explica el protocolo al paciente y se entrega consentimiento informado.

Diagnóstico NAFLD

Previo a realizar el estudio endoscópico se realiza un estudio de elastografía de transición, para determinar la presencia y grado de esteatosis y fibrosis hepática para clasificar a los pacientes en los cuatro grupos establecidos. En pacientes en que se detecte fibrosis

avanzada, se notifica al médico que realice la endoscopia para el abordaje adecuado de la patología.

Procedimiento de endoscopia

Se realiza endoscopia superior o colonoscopia, previa sedación y apoyo suplementario de oxígeno, se toman biopsias con pinza tipo forceps de 5mm en mucosa duodenal y colonica, todos los procedimientos se realizan por endoscopistas expertos, certificados con más de 300 procedimientos realizados por año. La sedación es administrada por un anestesiólogo certificado para estos procedimientos.

Procesamiento de las muestras

Las biopsias se distribuyen en tubos eppendorf para almacenar específicamente de acuerdo a la determinación subsecuente de la expresión proteica (buffer de lisis) y/o génica (trizol) de los GPRs. Una vez tomada la biopsia se deposita inmediatamente en hielo seco para una congelación inmediata y conservación a -70°C hasta su procesamiento.

Expresión proteica - *Western Blot*

Los extractos de tejido se procesan de acuerdo a técnicas reportadas previamente (Álvarez-Arce A, 2017). Se emplean membranas de nitrocelulosa y anticuerpos específicos anti-GPR40 (E-AB-31596, Elabscience®), anti-GPR43 (sc-293202, Santa Cruz Biotechnology®) y anti-GPR120 (sc-390752, Santa Cruz Biotechnology®) y anti-GAPDH como proteína constitutiva. Se emplea una plataforma de quimioluminiscencia (Immobilon HRP-substrate reagent, Millipore, ChemiDoc® MP Imaging, BioRad). Las imágenes se procesan por análisis de densitometría (NIH-ImageJ software, NIH USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.).

Expresión génica – RT.PCR

La extracción de RNA se lleva a cabo por la técnica de Trizol de acuerdo a las instrucciones del proveedor (TRIzol, Thermo Fisher Scientific®). La concentración total de RNA se determina mediante espectrofotometría (Epoch microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, USA). 1 mg de RNA se retro-transcribe (cDNA) por medio de un kit comercial de acuerdo a las instrucciones del proveedor (QuantiTect Reverse Transcription, Qiagen, USA)

La reacción en cadena de polimerasa se lleva a cabo utilizando 500 ng de cDNA y por medio de un kit comercial de acuerdo a las instrucciones del proveedor (2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, Qiagen, USA). Se emplea un termociclador de la plataforma Qiagen (Rotor-Gene Real-Time System, Qiagen, USA). La concentración de primer se estandariza a partir de 0.3 mM. 40 ciclos de reacción se lleva a cabo seguido de curvas de “melting” para confirmar la especificidad de los “primers” o iniciadores a emplear. La secuencia de los mismos se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de “primers” o iniciadores de los genes GAPDH, GPR40, GPR43, GPR120

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
GAPDH NM_002046.5	GCGCCCAATACGACCAAATC	GCGCCCAATACGACCAAATC
GPR-40 NM_005303.2	GCATCAACACACCGGTCAAC	CACGTAGCAGAAGGCTGTGA
GPR-43 NM_005306.2	GGCAGTCACCATCTTCTGCT	GTAAGGTCCGAAGCACACCA
GPR-120 NM_181745.3	TTTACAGACCTCGGAACACCTC	ATCTGGTGGCTCTCCGAGTA

GAPDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. **GPR-40**, receptor acoplado a proteínas G-40. **GPR-43**, receptor acoplado a proteínas G-43. **GPR-120**, receptor acoplado a proteínas G-120. **NM**, secuencia de referencia. **G**, guanina. **C**, citosina. **A**, adenina. **T**, timina.

VALIDACIÓN DE DATOS

Se utiliza estadística descriptiva, medidas de tendencia central y dispersión mediana y rangos intercuartilares, para las características generales de los pacientes.

Para el análisis cuantitativo de la expresión génica se realiza análisis de varianza de una vía para determinar las diferencias de la expresión de acuerdo a cada grupo de comparación.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los datos descriptivos se presentarán por medio de tablas. Para la expresión proteica y/o génica de GPRs por grupo se emplean gráficas de barras y densitogramas.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Los datos sensibles de los pacientes se omiten de registros y etiquetado de muestras, identificando a los pacientes con letras y números no relacionados con sus datos de identificación.

NOTAS AL PIE

Declaración de consentimiento informado: Todos los datos de los pacientes fueron anonimizados y manejados bajo estricta confidencialidad.

Declaración de conflicto de intereses: Todos los autores declaran no tener conflictos de interés relevantes relacionados con este artículo.

Disponibilidad de datos: Los conjuntos de datos generados y/o analizados durante el presente estudio no están disponibles públicamente debido a las políticas institucionales de protección de datos, pero pueden ser solicitados al autor de correspondencia previa solicitud razonable.

Acceso abierto: Este artículo es de acceso abierto, seleccionado por un editor interno y sometido a revisión por pares por evaluadores externos. Se distribuye conforme a la licencia Creative Commons Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0), que permite a terceros distribuir, remezclar, adaptar y desarrollar el contenido con fines no comerciales, así como licenciar sus obras derivadas en términos diferentes, siempre que se otorgue el crédito correspondiente a la obra original y el uso no sea comercial.

Véase: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

País de origen: México.

REFERENCIAS

Las referencias bibliográficas se mantienen en su idioma original con el propósito de permitir su revisión directa y asegurar la fidelidad de las fuentes citadas.

1. **Bernal-Reyes R**, Castro-Narro G, Malé-Velázquez R, et al. The Mexican consensus on nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Mex*. 2019 Jan - Mar;84(1):69-99.
2. **Manne V**, Handa P, Kowdley KV. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 22 (2018) 23–37.
3. **Diehl AM**, Day C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 2017;377:2063-72.
4. **Arslan N**. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol* 2014 November 28; 20(44): 16452-16463.
5. **Sekirov I**, Russell SL, Antunes LC, et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):859-904.
6. **Delzenne NM**, Cani PD. Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: Relevance in Nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2011 Aug 21;31:15-31.
7. **Juárez E**, Chávez NC, Uribe M, et al. Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Journal* (2016) 15:72.
8. **Leung C**, Rivera L, Furness J, et al. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* volume 13. 2016, pages 412–425.
9. **Muegge**, B. D. et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 332, 970–974 (2011).

10. **Topping**, D. L. & Clifton, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 81, 1031–1064 (2001).
11. **Cummings JH**, Rombeau JL, Sakata T (1995) Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Cambridge University Press, Cambridge
12. **Yajima T** (1985) Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J Physiol (Lond)* 368:667–678
13. **Fukumoto S**, Tatewaki M, Yamada T, Fujimiya M, Mantyh C, Voss M, Eubanks S, Harris M, Pappas TN, Takahashi T (2003) Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1269–R1276
14. **Stoddart**, L. A., Smith, N. J., Jenkins, L., Brown, A. J. & Milligan, G. Conserved polar residues in transmembrane domains V, VI, and VII of free fatty acid receptor 2 and free fatty acid receptor 3 are required for the binding and function of short chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 283, 32913–32924 (2008).
15. **Zaibi**, M. S. et al. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Lett.* 584, 2381–2386 (2010).
16. **Tolhurst**, G. et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* 61, 364–371 (2012).
17. **Karaki S**, Mitsui R, Hayashi H, et al. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res* (2006) 324: 353–360.
18. **Karaki S**, Tazoe H, Hayashi H. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Hist* (2008) 39:135–142.