

Concentraciones plasmáticas de leptina en los pacientes con cirrosis biliar primaria y su relación con el grado de fibrosis

C. García-Suárez^a, J. Crespo^a, P. Luis Fernández-Gil^a, J.A. Amado^b, M.T. García-Unzueta^b y F. Pons Romero^a

^aServicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Valdecilla. Universidad de Cantabria. Santander.

^bServicio de Endocrinología. Hospital Universitario Valdecilla. Universidad de Cantabria. Santander. España.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los objetivos del estudio fueron, por un lado, analizar las concentraciones plasmáticas de leptina en pacientes con cirrosis biliar primaria y, por otro, investigar la relación entre los valores de leptina y el estadio de fibrosis hepática en una cohorte de pacientes con cirrosis biliar primaria.

PACIENTES Y MÉTODO: Las concentraciones séricas de leptina se han valorado mediante un radioinmunoanálisis en 30 pacientes con cirrosis biliar primaria (edad media de 37,2 ± 11,0 años; rango: 19-75) y en 29 controles emparejados por edad y peso. La sangre venosa obtenida tras 12 h de ayuno se centrifugó en tubos EDTA. Tanto el peso como la talla y el índice de masa corporal se midieron con técnicas estandarizadas. El ARN del virus de la hepatitis C se determinó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa y cuantitativa. En todos los pacientes se disponía de una biopsia hepática en la que se graduaron el grado de fibrosis y la extensión del infiltrado inflamatorio.

RESULTADOS: Las concentraciones plasmáticas de leptina en los pacientes con cirrosis biliar primaria fueron inferiores a las obtenidas en los sujetos controles ($p < 0,0001$), sin que hubiera diferencias significativas en cuanto a la edad, peso, talla, índice de masa corporal o índice de masa grasa entre ambos grupos.

Observamos un claro incremento de los títulos séricos de leptina en función del estadio histológico de la cirrosis biliar primaria (estadio I: 2,1 ng/ml; estadio II: 4,3 ng/ml; estadio III: 5,3 ng/ml, y estadio IV: 12,1 ng/ml; $p < 0,01$).

CONCLUSIONES: En este estudio demostramos la correlación existente entre la leptina y el estadio de fibrosis hepática en

una cohorte de pacientes con cirrosis biliar primaria, otro dato que apunta a la implicación de la leptina en el proceso de fibrosis hepática.

PLASMA LEPTIN LEVELS IN PATIENTS WITH PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS AND THEIR RELATIONSHIP WITH DEGREE OF FIBROSIS

OBJECTIVES: *a)* To analyze plasma leptin levels in patients with primary biliary cirrhosis (PBC) and *b)* to investigate the relationship between leptin levels and liver fibrosis stage in a cohort of patients with PBC.

PATIENTS AND METHODS: Serum leptin levels were evaluated through radioimmunoassay in 30 patients with PBC (mean age: 37.2 ± 11.0 years; range: 19-75) and in 29 controls matched for age and weight. Venous blood obtained after a 12-hour fast was centrifuged in EDTA tubes. Weight, height and body mass index (BMI) were measured using standard methods. Hepatitis C virus RNA was determined using qualitative and quantitative polymerase chain reaction. In all patients liver biopsies were performed and the degree of fibrosis and extent of inflammatory infiltrate were evaluated.

RESULTS: Plasma leptin levels in patients with PBC were lower than those obtained in control subjects ($p < 0.0001$). No significant differences were found between the two groups in age, weight, height, BMI or body fat index.

There was a clear increase in serum leptin levels according to histological stage of PBC (stage I: 2.1 ng/ml; stage II: 4.3 ng/ml; stage III: 5.3 ng/ml; stage IV: 12.1 ng/ml; $p < 0.01$).

CONCLUSIONS: The present study demonstrates the correlation between leptin and stage of liver fibrosis in a cohort of patients with PBC, providing further evidence of the involvement of leptin in the process of liver fibrosis.

Este trabajo ha sido posible gracias a las becas concedidas por el programa I + D (SAF 96/ 0827) y por la Fundación Marqués de Valdecilla, y por la ayuda concedida a la Red de Esteatohepatitis RTIC G03/015.

Correspondencia: Dr. J. Crespo.
Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Valdecilla.
Avda. Valdecilla, s/n. 39008 Santander. Cantabria. España.
Correo electrónico: javiercrespo@telcel.es

Recibido el 2-9-2003; aceptado para su publicación el 5-11-2003.

INTRODUCCIÓN

La leptina es un péptido hormonal de 16 kilodaltons descubierto en 1994. La producen los adipocitos, cumple un papel importante en la regulación de la ingesta y la composición corporal, y se ha propuesto como factor fisiopatológico en la obesidad¹⁻³. En el ser humano actúa como

hormona de la saciedad mediante un mecanismo de *feed-back* negativo en el sistema nervioso central⁴. La concentración sérica varía ampliamente de un individuo a otro y en conjunto es superior en las mujeres; se correlaciona de forma intensa con el índice de masa corporal y con el índice de masa grasa, decreciendo con la pérdida de peso inducida por la dieta^{5,6}. Se han encontrado receptores para la leptina tanto en el hipotálamo como en diversos tejidos periféricos tales como el pulmón, riñón, páncreas, hígado, suprarrenales, ovarios, células hematopoyéticas y músculo esquelético, lo que podría indicar su implicación en diversos mecanismos biológicos más allá de ser un factor de saciedad^{7,8}.

Recientemente, se ha descrito un aumento de las concentraciones circulantes de leptina en la cirrosis alcohólica, que podría deberse a la combinación del incremento de su producción y el descenso de la excreción renal⁹. En hepatitis crónicas de origen viral se han observado títulos de leptina inferiores a los de los sujetos controles; las concentraciones se elevan a medida que se deteriora la función hepática, lo que apuntaría a un proceso de adaptación a la anorexia, que contribuiría a la deficiente homeostasis de la masa corporal en estos pacientes. De hecho, en un estudio de nuestro grupo pudimos observar un incremento progresivo de las concentraciones de leptina en pacientes con hepatitis C en función del estadio de fibrosis¹⁰. Asimismo, se ha relacionado la leptina con ciertos tipos de esteatosis hepática, lo que indicaría una posible implicación en su progresión a esteatohepatitis^{11,12}. Por otro lado, se ha demostrado la expresión de leptina en las células estrelladas activadas, lo que hace pensar en su participación en el proceso de fibrosis hepática, aspecto apoyado por los hallazgos de Saxena et al que evidencia el papel profibrogénico de la leptina en dichas células hepáticas^{13,14}.

Con la intención de corroborar estos hallazgos en otro tipo de hepatopatía, nos planteamos el presente estudio con los siguientes objetivos: *a*) analizar las concentraciones plasmáticas de leptina en pacientes con cirrosis biliar primaria (CBP), y *b*) investigar la relación entre los títulos de leptina y el estadio de fibrosis hepática en una cohorte de pacientes con CBP.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes

En este estudio hemos incluido a un total de 59 sujetos divididos en 2 grupos:

1. *Grupo de estudio.* Se incluyó a 30 pacientes, todas ellas mujeres, con una edad media de $37,2 \pm 11,0$ años (rango entre 19 y 75 años), diagnosticadas de CBP, con la siguiente distribución según su histología: 8 pacientes en estadio I, 7 en estadio II, 8 en estadio III y 7 en estadio IV. Para la inclusión en el estudio todas ellas debían contar con confirmación diagnóstica histológica y función renal completamente normal, y no presentar signos de complicaciones hepáticas, fallo cardíaco, enfermedad renal orgánica, diabetes, enfermedad tiroidea, cáncer, obesidad mórbida o cualquier otra enfermedad importante. La dieta de las pacientes carecía de restricciones. Ninguna de ellas recibía tratamiento en el momento de la biopsia.

2. *Grupo control.* Se estudió a 29 pacientes del sexo femenino con una edad media de $44,4 \pm 9,2$ años, seleccionadas por tener una talla y peso similares a las pacientes del grupo de estudio.

Método

El índice de masa corporal se calculó como el cociente entre el peso corporal y el cuadrado de la altura (kg/m^2), y el índice de masa grasa se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $(\text{índice de masa corporal} - 13)/1,33$.

Se obtuvo el consentimiento informado de todas las participantes antes de iniciar el estudio. Éste se ha realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki II.

Se midieron las concentraciones de aspartatoaminotransferasa, alanina-aminotransferasa, bilirrubina total y fosfatasa alcalina con un autoanalizador convencional (Biochemical Analysis and Serological Assays).

Se disponía de una biopsia hepática de todas las pacientes. Las muestras se procesaron según la técnica habitual. Cada muestra de tejido se fijó con formalina al 10% y se introdujo en parafina. Se realizaron cortes seriados de 4μ de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. La CBP se definió de acuerdo con los criterios internacionales aceptados en 4 estadios y los hallazgos histopatológicos hepáticos fueron graduados por un anatomopatólogo experimentado.

Las concentraciones plasmáticas de leptina se cuantificaron mediante un test comercial de radioinmunoanálisis utilizando un anticuerpo específico contra la leptina humana (Linco Research, Inc., St. Louis, MO, EE.UU.). La determinación de la leptina se efectuó en los primeros 7 días del ciclo menstrual. El límite de detección era de $0,5 \text{ pg/ml}$. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron del 5 y el 8%, respectivamente. La determinación de leptina se realizó el mismo día en que se hizo la biopsia hepática, así como la gradación histológica. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba de la *t* de Student, test de Fisher o análisis de la variancia según correspondiese. Se consideró estadísticamente significativo un valor de *p* inferior a 0,05.

RESULTADOS

Las concentraciones plasmáticas de leptina en las pacientes con CBP fueron significativamente inferiores en su conjunto a las obtenidas en los sujetos seleccionados en función de la edad, el peso, la talla y el sexo ($6,7 \pm 1,5$ frente a $15,9 \pm 0,87 \text{ ng/ml}$; $p < 0,0001$), sin que hubiera diferencias significativas en cuanto a la edad, el peso, la talla, el índice de masa corporal o el índice de masa grasa entre los sujetos con CBP y los controles.

Por otro lado, la relación entre los títulos de leptina y el índice de masa corporal se mantenía tanto en los sujetos controles como en los pacientes con CBP ($r = 0,75$ y $r = 0,73$, respectivamente).

No hemos encontrado correlación alguna entre la concentración de leptina y las cifras de aspartatoaminotransferasa, alaninaaminotransferasa, gammaglutamiltranspeptidasa, fosfatasa alcalina y bilirrubina total.

Por último, analizamos las concentraciones de leptina de acuerdo con el estadio histológico en las pacientes con CBP y observamos un claro incremento de aquéllas a medida que avanzaba el estadio histológico (estadio I: $2,1 \pm 0,4$; estadio II: $4,3 \pm 2,2$; estadio III: $5,3 \pm 2,7$, y estadio IV: $12,1 \pm 5,2$; $p < 0,01$).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que existe una disminución de las concentraciones séricas de leptina en pacientes con CBP y que se observa un incremento de aquéllas en función del avance del estadio de fibrosis hepática.

Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos en un reciente trabajo de nuestro grupo¹⁰, donde se pone de manifiesto el aumento de los títulos séricos de leptina en fun-

ción del estadio de fibrosis en pacientes con hepatopatía crónica secundaria al virus C, resultados muy similares a los comunicados por Testa et al¹², lo que indica que en pacientes con hepatopatía crónica, independientemente de su etiología, exceptuando la alcohólica, existe una reducción de las concentraciones de leptina que tienden a incrementarse de forma directamente proporcional al agravamiento de la hepatopatía de base. La reducción de los valores de leptina en pacientes con hepatopatía crónica respecto a los controles es un proceso similar a lo que sucede en sujetos normales durante un balance energético negativo, causado por la combinación de una reducción de la ingesta energética o un incremento de las necesidades, lo que quizá permita una disminución de la secreción de leptina desde el tejido adiposo a fin de restaurar el balance energético¹⁻³. La importancia de la leptina en el mantenimiento de dicho balance y en el contenido de grasa corporal se ha demostrado ampliamente en diversos estudios experimentales. La razón del incremento gradual de las concentraciones plasmáticas de leptina en relación con el estadio de fibrosis aún no se ha determinado. Una de las causas podría ser la reducción del aclaramiento hepático a medida que decrece la capacidad funcional del hígado, si bien es poco probable en nuestro estudio, teniendo en cuenta que ninguna de las pacientes incluidas en él presentaba disfunción hepática significativa. Otra explicación posible sería la disminución de su eliminación, también poco probable, ya que todas las pacientes tenían una función renal completamente normal.

Así pues, deben considerarse otros factores. Entre ellos cabe destacar los siguientes: *a)* la producción hepática de leptina; *b)* su participación en la regulación de la respuesta proinflamatoria; *c)* el incremento de la producción intrahepática del factor transformador del crecimiento beta (TGF- β), y *d)* el efecto directo de la leptina sobre las células estrelladas. Ikejima et al¹³ han demostrado *in vivo* la producción de leptina por las células hepáticas estrelladas activadas y señalan su papel en el proceso de fibrosis hepática, aspectos apoyados por los hallazgos de Saxena et al¹⁴, que evidencian un papel directo de la leptina en la fibrosis hepática mediante el aumento de la expresión del gen del colágeno¹⁵.

En principio, es poco probable que las concentraciones de leptina detectadas dependan de la síntesis hepática de leptina que parte de las células estrelladas. De hecho, es probable que gran parte de la leptina detectada tenga su origen en la grasa periférica. Por otro lado, según datos experimentales publicados por nuestro grupo en forma de resumen¹⁶, las diferencias se deben en gran medida a la sobreexpresión o no del receptor de leptina en el tejido hepático.

En segundo lugar, se ha implicado a la leptina en la regulación de la respuesta inducida por la endotoxina y el factor de necrosis tumoral alfa¹⁷⁻¹⁹. Sin embargo, sus valores no se correlacionan con los de la leptina en trabajos previos, lo que podría explicarse por la influencia del índice de masa corporal sobre las concentraciones de leptina, hecho que no se daría en el caso del factor de necrosis tumoral¹⁰. Por otro lado, las células hematopoyéticas, mo-

nocitos, macrófagos y linfocitos, contienen un receptor funcional de leptina a través del cual ésta modula la proliferación y maduración de los inmunocitos y esto quizá contribuya al inicio de la propagación de la fibrosis²⁰.

En tercer lugar, la leptina aumenta también la expresión de TGF- β 1, una potente citocina profibrogénica²¹. Se ha conjeturado que la leptina podría tener un efecto indirecto en la fibrosis hepática mediado principalmente por el TGF- β 1, aunque se precisan más estudios que ayuden a clarificar la relación entre leptina y TGF- β 1. Por último, otros estudios señalan un efecto directo de la leptina sobre las células estrelladas al encontrar que éstas expresaban el receptor de la leptina y respondían a ella con un incremento de la expresión del procolágeno tipo I y fosforilación de Stat-3²².

En conclusión, en este estudio se demuestra la correlación entre la leptina y el estadio de fibrosis hepática en pacientes con CBP, datos que apoyan aún más la implicación de la leptina en la fibrosis hepática. Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto por el cual la leptina puede incrementar la fibrosis hepática y se necesitan más estudios que ayuden a entender el mecanismo de la fibrogenesis inducida por la leptina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rosnebaum M, Leible RL. The role of leptin in human physiology. *N Engl J Med* 1999;341:913-5.
2. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763-70.
3. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999;130:671-80.
4. Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC. Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr* 1999;69:584-96.
5. Van Gaal LF, Wauters MA, Mertens IL, Considine RV, de Leuw IH. Clinical endocrinology of human leptin. *Int J Obes Relat Disord* 1999;23(Suppl 1):29-36.
6. Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, et al. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4140-7.
7. Kokot F, Adamczak M, Wiecekilek A, Spiechowicz U, Mesjasz J. Plasma immunoreactive leptin and neuropeptide Y levels in kidney transplant patients. *Am J Nephrol* 1999;19:28-33.
8. Kagan A, Haran N, Leschinsky L, Shuali N, Rapoport J. Leptin in CAPD patients: serum concentrations and peritoneal loss. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:400-5.
9. Henriksen JH, Holst JJ, Moller S, Brinch K, Bendtsen F. Increased circulating leptin in alcoholic cirrhosis: relation to release and disposal. *Hepatology* 1999;29:1818-24.
10. Crespo J, Rivero M, Fábrega E, Cayón A, Amado JA, García Unzueta MT, et al. Plasma leptin and TNF-alpha levels in chronic hepatitis C patients and their relationship to the fibrosis. *Dig Dis Sci* 2002;47:1604-10.
11. Giannini E, Botta F, Cataldi A, Tenconi GL, Ceppa P, Barreca T, et al. Leptin levels in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2422-5.
12. Testa R, Franceschini R, Giannini E, Cataldi A, Fasoli A, Tene-relli P, et al. Serum leptin levels in patients with viral chronic hepatitis or liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000;33:33-7.
13. Ikejima K, Honda H, Takei Y. Hepatic stellate cells produce leptin during the progression of liver fibrosis. *Hepatology* 1999;30(Suppl 1):492.
14. Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002;35:762-71.

15. Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:178-82.
16. Cayón A, Crespo J, Guerra A, Orive A, Cuadrado A, Pons-Romero F. Cytokine expression profile in the nonalcoholic steatohepatitis patients. The 38th Annual Meeting of European Association for the Study of the Liver (EASL); 2003, July 3-6; Geneve. Geneve: EASL, 2003.
17. Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, et al. Transdifferentiation of rat hepatic cells leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001;34: 288-97.
18. Takahashi N, Waelput W, Guisez Y. Leptin is an endogenous protective protein against the toxicity exerted by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1999;189:207-12.
19. Francis J, Mohankumar PS, Mohankumar SM, Quadri SK. Systemic administration of lipopolysaccharide increases plasma leptin levels: blockade by soluble interleukin-1 receptor. *Endocrine* 1999;10:291-5.
20. Santos-Álvarez J, Goberna R, Sánchez Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999;194:6-11.
21. Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, et al. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1999;56:860-72.
22. Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, et al. Leptin receptor-mediated signalling regulates fibrogenesis and remodelling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399-410.