

FACULTAD DE MEDICINA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE



**ASOCIACIÓN ENTRE BILIRRUBINA SÉRICA CON ÍNDICES DE
SENSIBILIDAD INSULÍNICA EN MUJERES NORMOGLICÉMICAS**

Tesis presentada para optar al grado de Magister en Nutrición, otorgado por la
Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Por:

PAULA FRANCISCA VERGARA VARGAS

Director de Tesis:

JOSÉ LUIS SANTOS

JUAN FRANCISCO MIQUEL

2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer al director del programa de Magister en Nutrición y quien es también profesor guía de esta tesis, el Dr. José Luis Santos, quien se preocupó de desarrollar todo el ambiente académico necesario para que pudiéramos completar el programa de Magister y que de forma personal me acompañó y guió en el desarrollo de esta investigación.

Agradezco también al Dr. Juan Francisco Miquel, el otro profesor a cargo de la tesis, que confió en mí para compartir sus datos de años de investigación previa y pudo encontrar tiempo en su apretada agenda asistencial para ayudarme en correcciones y comentarios para el proyecto.

A Lorena Azócar, encargada del laboratorio de gastroenterología, por enseñarme todo el trabajo técnico que hay detrás del análisis genético, recordarme mucho de la parte molecular y tenerme paciencia con mis primeras pipetas.

No puedo dejar de incluir a los profesores del programa de Magister en Nutrición que siempre buscaron la mejor forma de entregarnos conocimiento y motivación por aprender, especialmente al Dr. José Galgani, siempre dispuesto a responder dudas fuera de horario y con una tremenda bibliografía disponible para seguir aprendiendo.

Por supuesto agradezco también a mi familia, todos muy entusiasmados en que los ayude a alimentarse más sano, aunque después no lo hagan; a mi esposo Jorge, quien aguantó estoicamente mis momentos de estrés y preocupación, sin su apoyo este último año no hubiese sido posible; y mis tres hijos, que tuvieron paciencia infinita para esperarme para jugar cuando yo estaba estudiando.

Por último, al increíble grupo de compañeros de magister, nos tocaron dos años bien complejos desde el punto de vista social pero fuimos apoyo y amistad en momentos difíciles.

RESUMEN

INTRODUCCION: Estudios epidemiológicos han mostrado que la hiperbilirrubinemia leve y crónica (como la encontrada en el síndrome de Gilbert) podría estar asociada con menor resistencia a la insulina y menor riesgo de diabetes tipo 2. El mecanismo por el cual la bilirrubina produce estos beneficios no parece ser exclusivamente por su capacidad antioxidante, sino que podría estar mediada también vía estimulación del receptor nuclear PPAR α .

OBJETIVOS: Evaluar la asociación entre bilirrubina sérica y sensibilidad insulínica calculada a partir de índices derivados del test oral de tolerancia a la glucosa (TTOG) y del test endovenoso de glucosa (TTGIV). Evaluar la asociación entre genotipo UGT1A1 y sensibilidad a la insulina.

METODOS: Se estudiaron dos grupos de voluntarias normoglicémicas. El primero, 494 mujeres que fueron sometidas a un TTGO estándar. El segundo grupo, de 69 mujeres que fueron sometidas a un TTGO y a un IVGTT de una hora. En ambos grupos se midió la bilirrubina circulante total y en el grupo 2 la directa. Se calcularon índices HOMA-S, Matsuda y CSI. Los genotipos UGT1A1 se determinaron mediante ensayos Taqman. Se realizaron correlaciones de Spearman y regresión lineal múltiple.

RESULTADOS: Los niveles séricos de bilirrubina total se correlacionaron directamente con el índice HOMA-S ($r=0.27$; $p<0.001$). índice Matsuda ($r=0.23$; $p\leq .001$) y CSI ($r=0.37$; $p<0.008$). La bilirrubina sérica indirecta se asoció de forma estrecha con CSI ($r=0.39$; $p<0.005$). El ajuste por covariables mantuvo las asociaciones. Los genotipos UGT1A1 se asociaron fuertemente con bilirrubina sérica, pero no mostraron asociación significativa con índices de sensibilidad a la insulina.

CONCLUSIÓN: Los niveles circulantes de bilirrubina se asocian directamente con una mayor sensibilidad a la insulina en mujeres normoglicémicas. A pesar de la fuerte asociación encontrada entre los genotipos UGT1A1 y bilirrubina sérica, no se evidenció una asociación entre las variantes de este gen con índices de insulínica.

SUMMARY

INTRODUCTION: Epidemiological studies have shown that mild and chronic hyperbilirubinemia (as found in Gilbert syndrome) could be associated with lower insulin resistance and lower risk of type 2 diabetes. The mechanism by which bilirubin produces these benefits can't be entirely because of its antioxidant capacity, but it could involve stimulation of the nuclear receptor PPAR α .

OBJECTIVES: To evaluate the association between serum bilirubin and insulin sensitivity, calculated from indices derived from the oral glucose tolerance test (OGTT) and the intravenous glucose test (IVGTT). Also, to evaluate the association between UGT1A1 genotype and insulin sensitivity.

METHODS: Two groups of normoglycemic volunteers were studied. The first group consisted of 494 women who underwent a standard OGTT. The second group was n = 69 women who underwent a standard OGTT and an IVGTT of one hour. In both groups, total circulating bilirubin was measured, direct bilirubin was measured only in group 2. The HOMA-S, Matsuda and CSI indices were calculated. UGT1A1 genotypes were determined by Taqman assays. Spearman correlations and multiple linear regression were performed.

RESULTS: The serum levels of total bilirubin were directly correlated with the HOMA-S index ($r = 0.27$; $p < 0.001$), Matsuda index ($r = 0.23$; $p \leq .001$) and CSI ($r = 0.37$; $p < 0.008$). Indirect serum bilirubin was particularly associated with CSI ($r = 0.39$, $P < 0.005$). Adjustment for covariates kept the significant associations. The UGT1A1 genotypes were strongly associated with serum bilirubin, but did not show a significant association with insulin sensitivity indices.

CONCLUSION: Circulating bilirubin levels are directly associated with increased insulin sensitivity in normoglycemic women. Despite the strong association found between the UGT1A1 genotypes and serum bilirubin, no significant association was found between the variants of this gene with indices of insulin sensitivity.

GRAPHICAL ABSTRACT

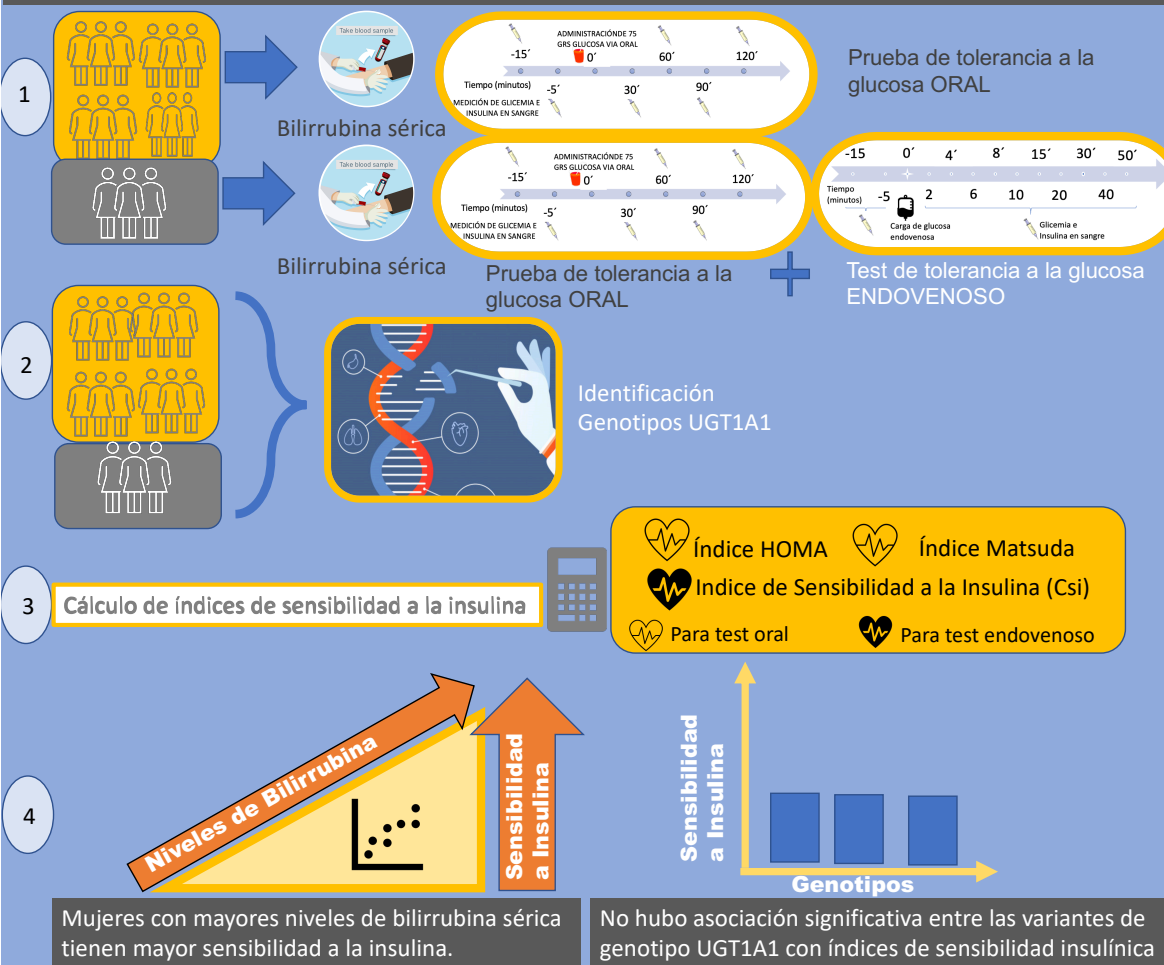
Bilirrubina y Sensibilidad a la Insulina

Dra. Paula Vergara



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

Estudio en 2 grupos de 550 mujeres jóvenes y sanas



INTRODUCCION

La bilirrubina es una molécula derivada de la degradación del grupo hemo, que mayoritariamente proviene de la hemoglobina de glóbulos rojos senescentes. En el sistema retículo endotelial, el grupo hemo es metabolizado por la enzima hemo oxigenasa generando biliverdina, monóxido de carbono y hierro. Posteriormente, la biliverdina es reducida a bilirrubina por medio de la biliverdin reductasa. La bilirrubina así producida es altamente hidrofóbica y circula en el plasma unida a la albúmina hacia el hígado, donde es conjugada con ácido glucurónico por la acción de la enzima UDP glucuronil transferasa 1A1 (UGT1A1), permitiendo su eliminación vía biliar (Hamoud AR, 2018).

Los niveles de bilirrubina sérica son muy variables tanto intra como entre individuos, influyendo diferentes factores como el estrés, las horas de ayuno, el uso de algunos medicamentos y el sexo, siendo fisiológicamente más elevados los niveles en hombres que en mujeres (Bailey, 1977). Los valores de laboratorio normales para la bilirrubina sérica varían entre 0,2 y 1 mg/dl, la gran mayoría de ella corresponde a bilirrubina no conjugada, la cual no se puede medir de forma directa. La elevación de la bilirrubina circulante se manifiesta clínicamente como ictericia. Tradicionalmente se ha considerado a la bilirrubina como un metabolito tóxico, ya que frente a altas concentraciones séricas de ella ha quedado demostrado una toxicidad sobre el sistema nervioso central, como en casos de encefalopatía hepática, ictericia neonatal y kernicterus. Sin embargo, es posible encontrar un grupo de individuos con niveles leves o moderadamente altos de bilirrubina circulante por una alteración genética hipomórfica en la enzima UGT1A1, lo que conduce a Síndrome de Gilbert, esta condición de tipo benigna suele presentarse de manera asintomática o con episodios de ictericia transitoria (Vitek, 2012). En las últimas décadas, se ha demostrado en estudios poblacionales que la bilirrubina sérica levemente elevada de los sujetos con síndrome de Gilbert podría tener efectos beneficiosos, siendo esto explicado por las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la bilirrubina. Recientemente, se ha sugerido que la bilirrubina podría ser un ligando endógeno del factor de transcripción nuclear PPAR α , promoviendo una mayor oxidación de ácidos grasos y acciones sensibilizadoras a la insulina, al inhibir la expresión de APOC3 y promover la expresión de la hepatoquina FGF21.(Hinds, 2018). Esto permite plantear que la modulación de la sensibilidad/resistencia a la insulina es una de las vías que explicarían los beneficios de la exposición crónica a niveles de bilirrubina levemente elevados.

La resistencia a la insulina se caracteriza por una disminución en la acción de la insulina en los tejidos sensibles a esta hormona, tales como el músculo, tejido adiposo e hígado. En respuesta a esta deficiente acción de la insulina en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, se ha descrito una típica respuesta de hiperinsulinemia basal por la cual el páncreas endocrino incrementa la secreción de insulina para mantener los niveles normales de glicemia. Si esta condición se mantiene en el tiempo, los mecanismos que mantienen la homeostasis glicémica pueden verse alterados, y se suman diferentes alteraciones fisiológicas en órganos blanco podría desembocar en el desarrollo de diabetes tipo 2 (De Fronzo, 1997) Aparte de la diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina está presente y desempeña un importante rol en la fisiopatología de numerosas enfermedades metabólicas tales como hipertensión, dislipidemia y obesidad (ADA, 2014).

Se han descrito diferentes metodologías de medición para la sensibilidad/resistencia a la insulina basadas, ya sea en muestras en ayuno o en respuesta a un desafío oral o endovenoso de glucosa. El método de referencia sigue siendo el clamp euglicémico-hiperinsulinémico (CEH) (De Fronzo, 1979). En este método, se infunde insulina en niveles supra fisiológicos, calculando el valor-M de sensibilidad a la insulina, en función de la glucosa que es necesario administrar para alcanzar la euglicemia. El valor-M obtenido en el CEH generalmente se presenta como un índice de sensibilidad a la insulina sistémico, aunque las altas concentraciones de insulina en CEH implican una inhibición casi completa de la producción de glucosa endógena hepática. Por esta razón, se asume que el valor-M principalmente representa un índice de sensibilidad muscular, dado que este órgano es el más relevante (por su masa) en la determinación del valor-M. El CEH es un método caro, engorroso y difícil de aplicar en clínica. Por esta razón, se han desarrollado otros métodos que buscan simplificar el proceso basados en cargas endovenosas de glucosa, a partir de los que se derivan índices de secreción y sensibilidad a la insulina (Bergman, 1979). Otros métodos de determinación de la sensibilidad a la insulina están basados en el test de tolerancia oral a la glucosa (TTGO), los que necesariamente deben asumir el efecto del tracto gastrointestinal. El índice más utilizado basado en TTGO es el índice de Matsuda ISI-COMP (Matsuda, 1999) que indica la sensibilidad sistémica, teniendo muy buena correlación con el CEH. Adicionalmente se han descrito otros índices que buscan diferenciar la sensibilidad/resistencia de manera específica para el hígado o el músculo (Abdul-Ghani, 2007). Por último, y con el fin de simplificar más aun la estimación de la sensibilidad a la insulina, se han derivado índices tales como el *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR) basado en mediciones de glicemia e insulinemia en muestras en ayuno (Matthews, 1985), Así también se han publicado subrogados de resistencia a la insulina basados en valores en ayuno de trigliceridemia y glicemia (TyG Index), o basados en mediciones plasmáticas de leptina y adiponectina, dos importantes hormonas implicadas en la homeostasis energética.

Dadas las acciones recientemente descritas para la bilirrubina como molécula señalizadora y reguladora del metabolismo, es posible plantear que niveles levemente altos de bilirrubina circulante dentro rangos fisiológicos (similares a los encontrados en sujetos con síndrome de Gilbert) puedan estar asociados positivamente con una mayor sensibilidad a la insulina, especialmente en sujetos normoglicémicos. Sin embargo, la gran mayoría de los estudios que han abordado esta asociación se basan en índices surrogados de sensibilidad/resistencia a la insulina como el HOMA-IR, existiendo muy pocos estudios que evalúen la sensibilidad a la insulina tras desafíos orales o endovenosos de glucosa. Por ello, el objetivo del presente trabajo es evaluar la asociación entre bilirrubina plasmática y sensibilidad insulínica, calculada a partir de test de tolerancia oral a la glucosa y de un test endovenoso. Adicionalmente, se evaluará la asociación entre genotipos UGT1A1 propios del síndrome de Gilbert con la sensibilidad a la insulina.

METODOLOGÍA

Diseño de estudio y Participantes

Estudio observacional de tipo transversal realizado en 2 cohortes de mujeres jóvenes chilenas. Primer grupo corresponde a 493 mujeres voluntarias, reclutadas dentro de los Centros de Medicina Familiar ANCORA (Puente Alto) de la Facultad de Medicina UC; con edades entre 18 y 25 años, siendo criterios de exclusión encontrarse embarazada o tener el diagnóstico de diabetes. El segundo grupo (GEDYMET) corresponde a 69 mujeres, entre 18 y 48 años de edad, nulíparas, sin antecedentes familiares de diabetes. Como criterio de exclusión era tener obesidad, hipertensión, alteración en perfil lipídico, pruebas hepáticas o parámetros hematológicos. Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica

Evaluación Clínica y de laboratorio

Las voluntarias del grupo 1 tuvieron una evaluación inicial en la cual se realizó antropometría, examen físico general con exámenes de laboratorio, que incluyeron triglicéridos, colesterol y bilirrubina total, además fueron sometidas a un test de tolerancia oral a la glucosa estándar (TTOG): luego de un ayuno de 8-12 horas se tomaron muestras de glicemia e insulina 15 y 5 minutos antes de ingerir 75 gramos de glucosa (el promedio de estos valores se utilizó como valor basal), para luego realizar mediciones seriadas de glicemia e insulina a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

Los individuos del grupo 2 (GEDYMET) asistieron en tres ocasiones a evaluación clínica. En una primera instancia se realizaron mediciones antropométricas con peso y talla, para cálculo de IMC; además de exámenes de laboratorio de screening, dentro de los cuales se incluyeron triglicéridos, colesterol, bilirrubina total y directa, la bilirrubina indirecta se obtuvo por cálculo como la diferencia entre bilirrubina total y directa. En la segunda visita se realizó un TTOG estándar, como el descrito previamente y se agregó una medición de glicemia e insulina 15 minutos post carga. Una semana después, un subgrupo de 57 voluntarias se realizó un test de tolerancia a la glucosa endovenoso (IVGTT), basado en el modelo mínimo abreviado (Tura et al), se les administró una dosis intravenosa de glucosa de 0,3 g por kilo de peso en una dilución al 50%, con un máximo de 30 grs y a pasar en un período no mayor a 3 minutos. Se tomaron muestras para glucosa e insulina plasmáticas en los tiempos -15, -5 y 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 minutos para calcular el *Acute Insulin Release* (AIR) y luego se tomaron muestras cada 10 minutos hasta completar 50 minutos, para obtener el índice de sensibilidad a la insulina calculado (CSI). Los análisis bioquímicos de las muestras de ambos grupos fueron analizadas en el Laboratorio Central de la Red de Salud UC.

Cálculo de sensibilidad a la insulina

Con la glicemia e insulinemia en ayuno, se calculó el índice HOMA (HOMA_IR) y con valores de glicemia y triglicéridos de los sujetos en ayuno se calculó el TyGIndex. El HOMA_IR fue convertido en HOMA-S ($1/\text{HOMA_IR}$) para efectos de interpretación del resultado. Con los valores obtenidos del TTOG se calcularon el Índice de Matsuda, el *Hepatic Insulin Resistance Index* (HIRI), y el *Muscle Insulin Sensitivity Index* o MISI (Abdul-Ghani, 2007); para este último se utilizó la aplicación online desarrollada (O'Donovan, 2019); de la

misma forma, a través de una plataforma online se calculó el OGIS-2h (Oral Glucose Insulin Sensitivity) (Mari, 2001) En el caso del IVGTT, los datos obtenidos se usaron para calcular el Índice de sensibilidad a la insulina (Csi) (Tura, 2010)

Determinación de genotipos UGT1A1

La presencia del alelo UGT1A1*28 (TA7) se determinó indirectamente analizando la variante rs6742078 (G>T) ubicada en el intrón 1 del gen UGT1A1, que se encuentra en fuerte desequilibrio de unión ($r^2 = 0,99$) con las variantes TA6/TA7 (Mendez, 2013). Se empleó ensayo Taqman de discriminación alélica en un equipo de PCR en tiempo real.

Análisis Estadístico

Las variables continuas se presentaron como promedios más desviación estándar y las categóricas como porcentaje. Se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas de la variante rs6742078 de UGT1A1 evaluando la concordancia con equilibrio de Hardy-Weinberg. Para identificar la asociación entre variables numéricas se utilizó coeficiente de correlación de Spearman y para asociación de genotipos se usó ANOVA y kruskall wallis. Se analizaron los datos con regresión lineal múltiple para realizar ajustes por edad e índice de masa corporal. Considerando un coeficiente de correlación de $r=0,3$ entre bilirrubina total vs índices de sensibilidad a la insulina (HOMA-S o Matsuda), una muestra de $n=450$ otorga poder $> 90\%$ con una confianza de 95% para detectar asociación estadística. El tratamiento estadístico fue realizado con el programa STATA 14, considerando un nivel de significación de $p<0.05$.

RESULTADOS

Características clínicas de la muestra. La tabla 1 resume las características generales de ambas cohortes, los dos grupos corresponden a mujeres jóvenes, sin diabetes. Las pacientes del grupo 1 tienen un promedio de edad menor y tienen mayor IMC comparado con las del grupo 2. Los valores basales de triglicéridos, glicemia y bilirrubina total resultaron sin diferencia significativa entre ambos grupos. Un 5% de las pacientes presentó bilirrubinemia sobre 1 mg/dl , valor usado en estudios de prevalencia para fenotipo Gilbert (Mendez y col, 2013), siendo menor esta prevalencia en el grupo GEDYMET.

Asociación entre Bilirrubina total y variables bioquímicas relacionadas con el síndrome metabólico. Se observó una correlación negativa entre los niveles de bilirrubina total con insulina, glicemia, triglicéridos y colesterol total. No se vio asociación con niveles de colesterol HDL. La asociación se mantuvo al ajustar por edad y peso (tabla 2)

Asociación Bilirrubina Total y Sensibilidad a la insulina. Los niveles séricos de bilirrubina total se correlacionaron directamente con el índice HOMA-S ($r=0.27$; $p<0.001$) e inversamente con el TygIndex ($r=-0,24$, $p<0,001$). En los índices calculados a partir del TTOG, la bilirrubina sérica tuvo correlación directa con Índice Matsuda ($r=0.23$; $p<0.001$) y con el OGIS ($r=0,19$, $p<0,001$), la correlación fue inversa con el índice de resistencia HIRI ($r=-0,25$, $p<0,001$) y no se observó correlación con MISI ($r=0,06$, $p=0,17$). Para el Csi calculado a partir del IVGTT, la correlación con bilirrubinemia total fue más estrecha ($r=0.37$; $p<0.008$) (Figura

1). Al analizar cada grupo de estudio por separado según cohorte, se observa que esta asociación se mantiene en el grupo ÁNCORA (Tabla 3). En el caso del grupo GEDYMET la asociación es significativa para el HOMA-S, Matsuda, OGIS y CSI.

Asociación Bilirrubina Indirecta y sensibilidad a la insulina, la bilirrubina sérica indirecta (total-directa) se asoció con HOMA-S, Matsuda, OGIS y con CSI (Tabla 4). La bilirrubina directa no mostró asociación con ninguno de los índices analizados y el ratio Bilirrubina Directa/Bilirrubina Total mostró asociación sólo con HOMA-S. El ajuste por covariables mantuvo las asociaciones estadísticamente significativas entre bilirrubinemia y sensibilidad a la insulina (Tabla. 5)

Asociación de Genotipo con bilirrubina sérica. La frecuencia de la variante infrecuente T del SNP rs6742078 del gen UGT1A1 fue de 33% y genotipo homo- cigoto TT 11,2% (genotipo Gilbert), lo que es concordante con hallazgos previos. Los genotipos mostraron concordancia con la ley de Hardy-Weinberg ($p=0.98$). Como era de esperar, la presencia de un alelo infrecuente para el genotipo Gilbert en UGT1A1 se asoció con mayores valores de bilirrubina sérica (Figura 3).

Asociación entre genotipo UGT1A1 con índices de sensibilidad a la insulina. No se encontró asociación significativa entre la presencia/genotipos de la variante genética rs6742078 con los diversos índices de sensibilidad a la insulina calculados, tras ajustar por edad e IMC en modelos de regresión múltiple utilizando diversos modelos genéticos (dominante, recesivo, genotípico, aditivo).

DISCUSIÓN

En este estudio buscamos establecer una asociación entre la bilirrubina sérica y diversos índices de resistencia/sensibilidad a la insulina, evaluando 2 grupos de mujeres jóvenes normoglicémicas. En el primer grupo (ANCORA), que contaba con un mayor número de participantes, se pudo correlacionar la bilirrubina total con todos los índices de sensibilidad a la insulina calculados, tanto a partir de muestras en ayuno como también de los obtenidos a partir del test de tolerancia oral a la glucosa. Los resultados fueron similares en el caso del segundo grupo (GEDYMET), que contaba con menos participantes, pero que tenía además un test de tolerancia endovenoso. En ambos casos se evaluó también la asociación entre la presencia del Genotipo UGT1A1 (Genotipo Gilbert) con los niveles de bilirrubina sérica y los índices de sensibilidad a la insulina.

El síndrome de Gilbert es una condición benigna, hereditaria, que se caracteriza por una disminución en la actividad de la UDP-GT en alrededor de un 30%, lo que los lleva a tener bilirrubina sérica en niveles sobre el promedio. El uso de este grupo de individuos en estudios tiene como fin evaluar las consecuencias de la exposición crónica a niveles ligeramente elevados de bilirrubina. Es así como diversos estudios poblacionales han mostrado un efecto benéfico de la hiperbilirrubinemia leve crónicamente elevada de pacientes con Gilbert, en relación con una menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares (Vitek, 2002), menor activación plaquetaria, trombogénesis e inflamación (Kundur, 2017) y mejor función endotelial (Maruhashi, 2012). También se ha descrito que

los sujetos con síndrome de Gilbert tienen menos incidencia de diabetes, y menos complicaciones vasculares relacionadas a ella (Inoguchi, 2007). Adicionalmente, los pacientes con Gilbert también han demostrado menor incidencia de cáncer y una menor mortalidad que la población general (Schwertner 2008; Tukey, 2000). En este sentido, diversos estudios han sugerido existe una asociación positiva entre niveles de bilirrubina sérica total y diversos índices de sensibilidad insulínica (Guzek, 2012; Djousse, 2001), lo que concuerda con los resultados principales de este estudio. El estudio de Abassi y col (Diabetes,2015), a través de un modelo de randomización mendeliana estableció que los pacientes con Gilbert tenían mayores niveles de bilirrubina sérica y simultáneamente tenían menor riesgo de desarrollar Diabetes tipo 2.

En el presente trabajo pudimos establecer la asociación nítida y reproducible entre hiperbilirrubinemia sérica y mayor sensibilidad a la insulina, pero no pudimos encontrar asociaciones significativas entre genotipos UGT1A1 (caracterizados por hiperbilirrubinemia leve crónica) e índices de sensibilidad a la insulina. Dentro de los factores que pueden explicar esta observación, podemos mencionar que el grupo está formado solo por mujeres, las que habitualmente tienen menos niveles de bilirrubina sérica que los hombres. Además, los sujetos de este estudio son jóvenes, que típicamente tienen menores niveles de bilirrubina que grupos de mayor edad, por lo que este grupo ha tenido una menor exposición a niveles altos de bilirrubina. Este resultado es acorde a la literatura existente, que ha podido establecer con mayor claridad un beneficio de la bilirrubina en hombres comparado con mujeres y también en grupos etáreos mayores. Sería interesante complementar el análisis con una muestra similar tanto en hombres como con un grupo de mujeres de mayor edad.

El mecanismo de acción por el cual la bilirrubina logra un efecto protector de enfermedades cardiovasculares se mantiene aún en cuestión, y tradicionalmente se les ha atribuido a sus propiedades como antioxidante son categóricas y bien demostradas. En este sentido, el efecto antioxidante de esta molécula deriva de sus propiedades químicas como agente reductor, basado en su capacidad lipofílica, siendo muy efectiva en reducir la oxidación de lípidos y complementa el rol de otros antioxidantes como glutatión y vitamina E (Fujiwara, 2018). Adicionalmente, sucesivas investigaciones han dado cuenta de que se trata de una molécula con un importante rol antiinflamatorio. Estudios recientes además han mostrado que la bilirrubina tendría un rol como molécula señalizadora, capaz de unirse al receptor nuclear PPAR α , y aumentar la actividad transcripcional de genes relacionados con la oxidación lipídica como FGF-21, lo que se traduciría en menor acumulación de lípidos y una mejoría en la sensibilidad insulínica, con los consiguientes beneficios relacionados con obesidad y diabetes (Stec, 2016). Estas hipótesis son compatibles con los hallazgos de este estudio, donde la bilirrubina sérica se asoció con menores niveles de glicemia, triglicéridos y colesterol, apoyando la teoría de algunos autores respecto al efecto protector de la bilirrubinemia levemente elevada (Schwertner,2008). La falta de asociación entre genotipos UGT1A1 con índices de sensibilidad a la insulina en nuestro estudio podría deberse a la relación entre degradación del grupo hemo, síntesis de bilirrubina y producción de monóxido de carbono (CO) generado por la hemo-oxigenasa. En este sentido, CO se ha mostrado como un nuevo efector metabólico cuya producción se encuentra directamente relacionada con la producción de bilirrubina que ocurre durante la degradación del grupo

hemo. Por otro lado, es interesante señalar la existencia de un modelo murino recientemente desarrollado que simula síndrome de Gilbert genético, mostrando una menor frecuencia de hígado graso y alteraciones del metabolismo de la glucosa comparado con el ratón normal (Hinds, 2017).

El presente estudio tiene ciertas limitaciones: es un estudio realizado solo en mujeres, por lo cual sus resultados no son aplicables a la población general. Por otro lado, los niveles de bilirrubina sérica medidos en una sola ocasión no son completamente fiables y muestran gran variabilidad intra e inter-individuo, pudiéndose afectar por diversos factores como tiempo de ayuno, efecto de hormonas o medicamentos. Este efecto podría cobrar especial importancia en el subgrupo GEDYMET, cuya muestra de bilirrubina fue tomada en un día distinto al día de realización de las pruebas de tolerancia. Por último, el diseño del estudio de tipo transversal no permite concluir causalidad. Respecto a las fortalezas, es un estudio con un número alto de participantes, la sensibilidad a la insulina fue calculada con diversos métodos que no solo se calculan a través de muestras en ayunas, sino también a través de tests de tolerancia oral y endovenoso a la glucosa, el

En conclusión, a través del presente estudio se pudo establecer que en un grupo de mujeres jóvenes normoglicémicas, los niveles de bilirrubina sérica se asociaron directamente con una mayor sensibilidad a la insulina, independiente del estado nutricional de las pacientes. Este efecto parece mostrar una mayor asociación al evaluar la bilirrubina indirecta circulante con los índices de sensibilidad a la insulina y ser especialmente estrecho al usar índices basados en el test endovenoso de glucosa. A pesar de la fuerte asociación encontrada entre los genotipos UGT1A1 y bilirrubina sérica, no se evidenció una asociación significativa entre las variantes de este gen con índices de sensibilidad a la insulina.

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey A, Robinson D, Dawson AM. Does gilbert's disea- se exist? The Lancet 1977; 309: 931-3.
2. DeFronzo RA. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. Neth J Med. 1997;50(5):191-197. doi:[https://doi.org/10.1016/S0300-2977\(97\)00012-0](https://doi.org/10.1016/S0300-2977(97)00012-0)
3. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am J Physiol Metab. 1979;237(3):E214. doi:10.1152/ajpendo.1979.237.3.E214
4. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2014;37(Supplement 1):S81--S90. doi:10.2337/dc14-S081
5. Djoussé L, Levy D, Cupples LA, Evans JC, D'Agostino RB, Ellison RC. Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. Am J Cardiol. 2001;87(10):1196-1200. doi:10.1016/S0002-9149(01)01494-1
6. Fujiwara R, Haag M, Schaeffeler E, Nies AT, Zanger UM, Schwab M. Systemic regulation of bilirubin homeostasis: Potential benefits of hyperbilirubinemia. Hepatology. 2018;67(4):1609-1619. doi:10.1002/hep.29599
7. Fu YY, Kang KJ, Ahn JM, et al. Hyperbilirubinemia Reduces the Streptozotocin- Induced Pancreatic Damage through Attenuating the Oxidative Stress in the Gunn Rat. Tohoku J Exp Med. 2010;222(4):265-273. doi:10.1620/tjem.222.265
8. Guzek M, Jakubowski Z, Bandosz P, et al. Inverse association of serum bilirubin with metabolic syndrome and insulin resistance in Polish population. Przegl Epidemiol. 2012;66(3):495—501.
<http://europepmc.org/abstract/MED/23230722>.
9. Hamoud A-R, Weaver L, Stec DE, Hinds Jr. TD. Bilirubin in the Liver-Gut Signaling Axis. TRENDS Endocrinol Metab. 2018;29(3):140-150. doi:10.1016/j.tem.2018.01.002
10. Inoguchi T, Sasaki S, Kobayashi K, Takayanagi R, Yamada T. Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes. JAMA-JOURNAL Am Med Assoc. 2007;298(12):1398-1400. doi:10.1001/jama.298.12.1398-b
11. Kundur AR, Santhakumar AB, Bulmer AC, Singh I. Mildly elevated unconjugated bilirubin is associated with reduced platelet activation-related thrombogenesis and inflammation in Gilbert's syndrome. Platelets. 2017;28(8):779-785. doi:10.1080/09537104.2017.1280146
12. Kwon YJ, Lee YJ, Park BJ, Hong K-W, Jung D-H. Total serum bilirubin and 8-year incident type 2 diabetes mellitus: The Korean Genome and Epidemiology Study. DIABETES Metab. 2018;44(4):346-353. doi:10.1016/j.diabet.2017.07.004
13. Mari A., G. Pacini, E. Murphy, B. Ludvik and J.J. Nolan. A Model-Based Method for Assessing Insulin Sensitivity from the Oral Glucose Tolerance Test. Diabetes Care 24:539-548, 2001.
14. Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, et al. Hyperbilirubinemia, Augmentation of Endothelial Function, and Decrease in Oxidative Stress in Gilbert Syndrome. Circulation. 2012;126(5):598-603. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.105775

15. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999;22(9):1462-1470. doi:10.2337/diacare.22.9.1462
16. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-419. doi:10.1007/BF00280883
17. Méndez, L., Lagoa, M., Quiroga, T., Margozzini, P., Azócar, L., Molina, H. R., Vera, A., Villarroel, L., Arrese, M., Hampe, J., Buch, S., & Miquel, J. F. (2013). Prevalencia de síndrome de Gilbert y sus determinantes genéticas en población chilena [Prevalence of Gilbert syndrome and its genetic determinants in Chile]. *Revista medica de Chile*, 141(10), 1266–1274. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013001000005>
18. Muniyappa R, Tella SH, Sortur S, et al. Predictive Accuracy of Surrogate Indices for Hepatic and Skeletal Muscle Insulin Sensitivity. *J Endocr Soc*. 2018;3(1):108-118. doi:10.1210/js.2018-00206
19. Schwertner HA, Vitek L. Gilbert syndrome, UGT1A1{*}28 allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis*. 2008;198(1):1-11. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.01.001
20. Stec DE, John K, Trabbic CJ, et al. Bilirubin Binding to PPAR alpha Inhibits Lipid Accumulation. *PLoS One*. 2016;11(4). doi:10.1371/journal.pone.0153427
21. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:581-616. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581
22. Tura A, Sbrignadello S, Succurro E, Groop L, Sesti G, Pacini G. An empirical index of insulin sensitivity from short IVGTT: validation against the minimal model and glucose clamp indices in patients with different clinical characteristics. *Diabetologia*. 2010;53(1):144-152. doi:10.1007/s00125-009-1547-9
23. Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, et al. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis*. 2002;160(2):449-456. doi:10.1016/S0021-9150(01)00601-3
24. Vitek L. The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. *Front Pharmacol*. 2012;3:55. doi:10.3389/fphar.2012.00055

FIGURAS Y TABLAS.

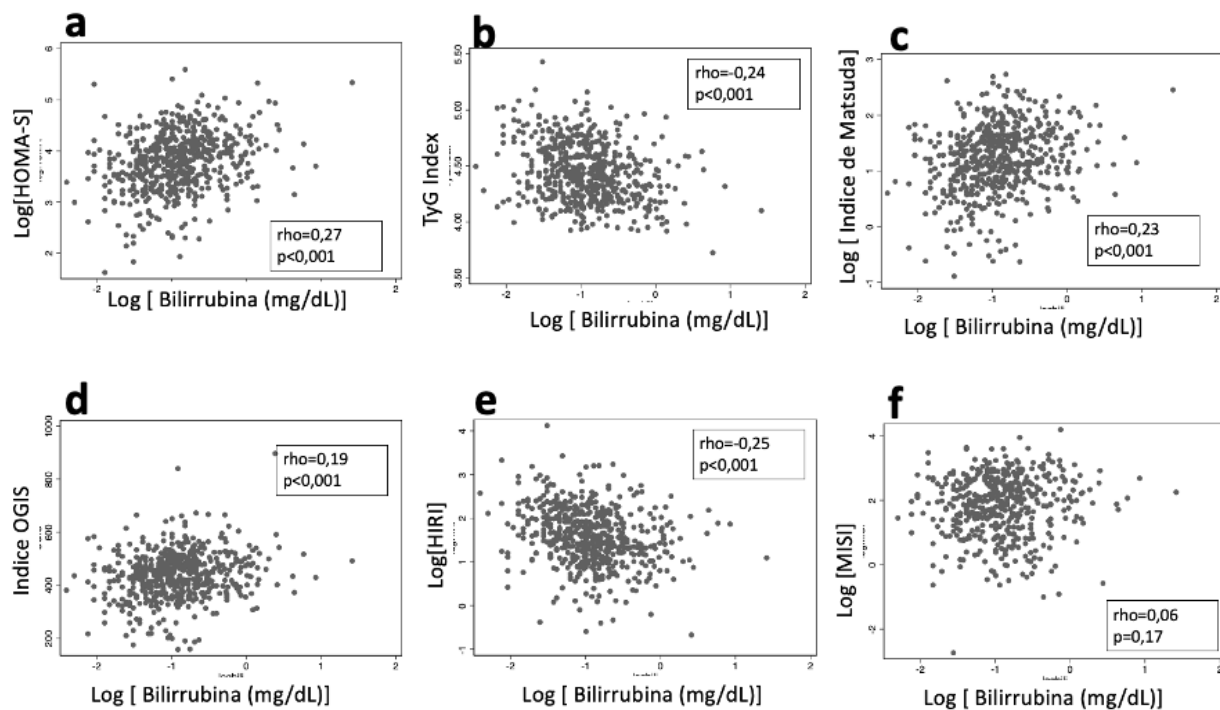


Figura 1 Relación entre Bilirrubina total (mg/dl) e Índices de sensibilidad insulínica calculados en ayuno (a y b) y a partir de TTOG (c, d, e y f)

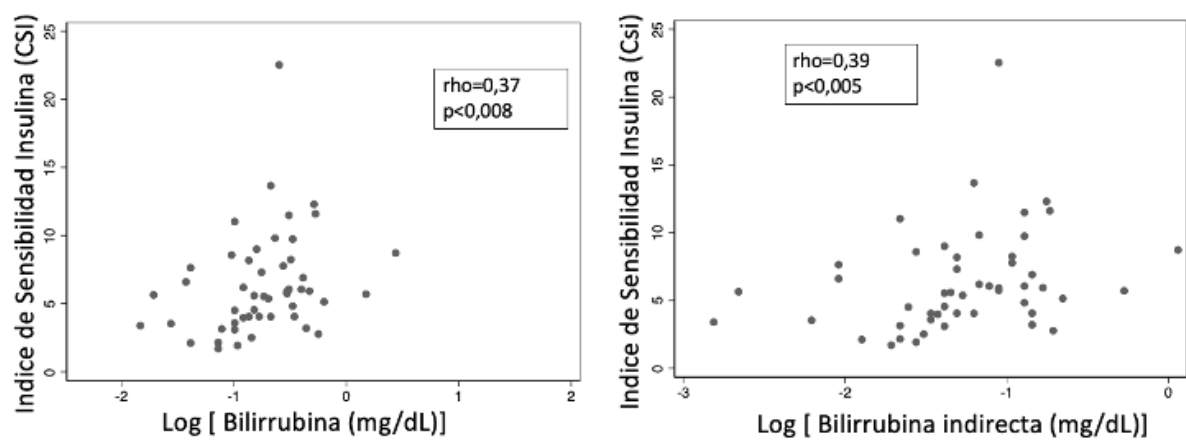


Figura 2 Relación entre Índice de sensibilidad calculado a partir de test de tolerancia endovenoso (CSI) y Bilirrubina sérica total e indirecta

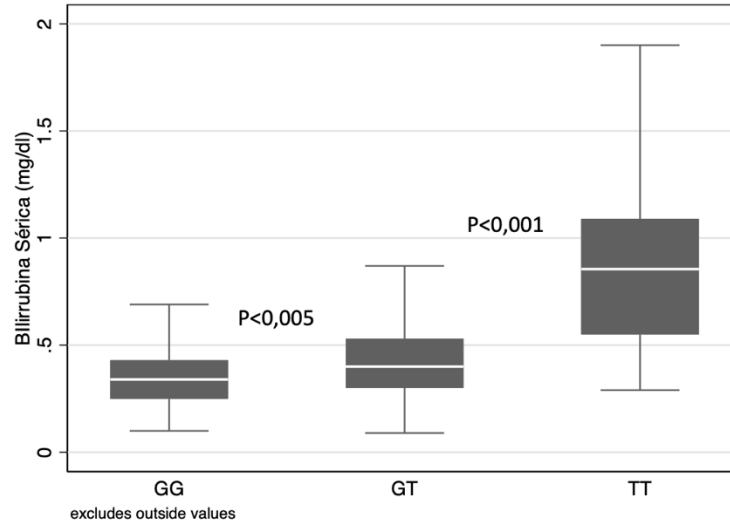


Figura 3 Asociación entre genotipos de la variante genética UGT1A1 rs6742078 con bilirrubina sérica

Tabla 1- Características de la muestra por grupo de estudio

	Grupo Ancora	Grupo Gedymet
n	494	69
Edad(años)	20 ± 1,9	27,4 ± 6,9
Peso (kg)	65 ± 14	60,1 ± 9
IMC	26,2 ± 5,3	23,8 ± 3,5
Triglicéridos plasmáticos (mg/dL)	102,8 ± 58,6	106,8 ± 60,8
Bilirrubina sérica total(mg/dL)	0,45 ± 0,4	0,49 ± 0,24
Bilirrubina directa (mg/dL)	-	0,19 ± 0,08
Glicemia ayuno (mg/dL)	81,4 ± 6	80,3 ± 5,4
Lactato (mmol/L)	-	1,35 ± 0,52
HOMA-S	48,9 ± 27,5	77,8 ± 43,9
OGIS	434 ± 89,1	484,3 ± 73,3
Índice Triglicérido Glucosa (TygIndex)	4,44 ± 0,26	4,44 ± 0,24
LAR	-	1,91 ± 1,26
Indice de Matsuda	3,9 ± 2,45	5,7 ± 2,96
HIRI	6,3 ± 4,9	3,81 ± 2,36
MISI	10,04 ± 7,6	1,8 ± 1,1
CSI	-	6,45 ± 4
Gilbert Fenotípico	5,30%	3,40%
Gilbert Genotípico	11,70%	7,02%

* IMC= Índice de Masa Corporal; HOMA-S= homeostatic model assessment OGIS=Oral Glucose Insulin Sensitivity LAR= Ratio Leptina adiponectina HIRI= hepatic insulin resistance index MISI= muscle insulin sensitivity index CSI= Índice de sensibilidad a la insulina calculado

Tabla 2. Asociación entre bilirrubina sérica y variables bioquímicas relacionadas con síndrome metabólico

	rho	p	r ²
Edad	0,11	0,01	0,01
Peso	-0,21	<0,001	0,04
IMC	-0,24	<0,001	0,06
Glicemia (mg/dl)	-0,12	0,004	0,01
Insulina (uIU/ml)	-0,27	<0,001	0,07
Triglicéridos (mg/dl)	-0,22	<0,001	0,05
Colesterol (mg/dl)	-0,15	<0,001	0,02
Colesterol HDL (mg/	0,03	0,42	0,001

Tabla 3 Correlación por grupos con distintos índices de sensibilidad insulínica

	Ancora (n=494)		Gedymet (n=69)	
	rho	p	rho	p
HOMA-S	0,25	<0,001	0,28	0,03
TyG Index	-0,25	<0,001	-0,14	0,24
Matsuda	0,20	<0,001	0,29	0,03
HIRI	-0,25	<0,001	-0,13	0,32
MISI	0,12	0,01	0,11	0,41
OGIS	0,16	<0,001	0,26	0,04
CSI	-	-	0,37	0,01
Lactato (mmol/L)	-	-	-0,26	0,05
LAR	-	-	-0,14	0,29
* IMC= Índice de Masa Corporal; HOMA-S= homeostatic model assessment OGIS=Oral Glucose Insulin Sensitivity LAR= Ratio Leptina adiponectina HIRI= hepatic insulin resistance index MISI= muscle insulin sensitivity index CSI= Índice de sensibilidad a la insulina calculado				

Tabla 4 Correlación de Spearman en grupo Gedymet entre subtipos de Bilirrubina y sensibilidad a la insulina

	Bili Total (mg/dL)		Bili Indirecta (mg/dL)		Bili Directa (mg/dL)		Ratio Directa/Total	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
HOMA-S	0,28	0,03	0,31	0,01	0,25	0,06	-0,31	0,02
TyG Index	-0,14	0,24	-0,12	0,31	-0,04	0,74	-0,07	0,51
Índice Matsuda	0,29	0,03	0,29	0,02	0,24	0,06	-0,21	0,11
HIRI	-0,13	0,32	-0,11	0,4	-0,12	0,38	0,03	0,85
MISI	0,11	0,41	0,11	0,4	0,08	0,54	-0,06	0,65
CSI	0,37	0,008	0,39	0,01	0,32	0,02	-0,24	0,09
OGIS	0,26	0,04	0,27	0,04	0,21	0,11	-0,21	0,1
LAR	-0,14	0,30	-0,12	0,37	-0,15	0,27	0,06	0,64
Lactato (mmol/L)	-0,26	0,048	-0,29	0,03	-0,16	0,21	0,31	0,02

* IMC= Índice de Masa Corporal; HOMA-S= homeostatic model assessment OGIS=Oral Glucose Insulin Sensitivity LAR= Ratio Leptina adiponectina HIRI= hepatic insulin resistance index MISI= muscle insulin sensitivity index CSI= Índice de sensibilidad a la insulina calculado

Tabla 5 Análisis de regresión lineal entre índices HOMA y Matsuda con bilirrubina					
Variable Dependiente	Variable Ind.	Beta	IC 95%	p value	R ajustado
HOMA-S	Bilirrubina	16,2	9,49-22,91	<0,001	0,08
	IMC	-1,89	-2,31--1,47	<0,001	0,22
	Edad	1,92	1,25-2,57	<0,001	0,27
	Glicemia basal	-1,32	-1,62--1,01	<0,001	0,35
MATSUDA	Bilirrubina	0,57	0,05-1,07	0,03	0,04
	IMC	-0,16	-0,19--0,13	<0,001	0,22
	Edad	0,13	0,08-0,18	<0,001	0,26
	Glicemia basal	-0,08	9,49-14,01	<0,001	0,32
Ajustado por edad, IMC y glicemia basal					

