

Título del proyecto: "Relación de las Concentraciones Plasmáticas de Leptina y la Expresión Fenotípica de CYP2E1, de acuerdo al Estado Nutricional y al Grupo Étnico".

Clave de Programa SIP:1282.

Director: Dr. en C. Ismael Antonio Lares Asef

Unidad: CIIDIR-IPN Unidad Durango

Módulos que Forman el Proyecto Multidisciplinario

Módulo I- Título. Relación de las concentraciones plasmáticas de leptina y la expresión fenotípica de CYP2E1, de acuerdo al estado nutricional y al grupo étnico.

Registro asignado por la SIP: 20120492

Responsable: Dr. Ismael A. Lares Asef

Módulo II.- Título. Determinación y asociación de los niveles plasmáticos de leptina de acuerdo al estado nutricional y al grupo étnico

Registro asignado por la SIP: 20120500

Responsable: Dra. Laurence Marchat M.

Módulo III.- Título. Determinación y Asociación de los Niveles de Acetaminofen y sus Metabolitos y de su Expresión Fenotípica de CYP2E1, de Acuerdo al Estado Nutricional y al Grupo Étnico

Registro asignado por la SIP: 20113586

Responsable: Dr. Francisco Flores Murrieta

Módulo IV.-Título. Caracterización de los Polimorfismos Genéticos de CYP2E1 en grupos Étnicos de Durango, México, y su Utilidad Terapéutica.

Registro asignado por la SIP: 20120494

Responsable: Dra. Verónica Loera Castañeda

Resumen

La leptina es una hormona que regula la homeostasis de la energía, y las funciones reproductivas, neuroendocrinas, inmunológicas y metabólicas, además de ser reguladora del peso corporal. **Objetivo y metas cumplidas.** Evaluar la relación entre las concentraciones plasmáticas de leptina y la expresión fenotípica de CYP2E1 en poblaciones menonita, tepehuana, y mestiza de Durango. De 10 metas se han cumplido casi el 100 %, por dificultades técnicas para determinar un metabolito del acetaminofén. **Metodología:** Se reclutaron 100 voluntarios adultos (50 indígenas Tepehuanos y 50 individuos de origen mestizos) de Durango. Con el IMC los individuos se clasificaron de peso normal y sobrepeso/obesidad; 50 presentaron peso normal, 25 mestizos y 25 indígenas Tepehuanos; 50 individuos (25 mestizos y 25 Tepehuanos) con sobrepeso y obesidad. Se determinaron las concentraciones de leptina por el método de ELISA y de acetaminofén por HPLC (Se tuvieron dificultades técnicas para cuantificar sus metabolitos debido a sus características fisicoquímicas y concentraciones muy pequeñas). Se determinaron las variantes alélicas de polimorfismos de CYP2E1*3,*4 y *1B por PCR en tiempo real. **Resultados.** En mestizos las concentraciones de leptina fueron más elevadas en individuos con sobrepeso/obesidad (8.17 ng/mL, 0.63 a 26.9 ng/mL), en comparación con los valores en individuos con peso normal (4.29 ng/mL, 0.20 a 24.98 ng/mL); las concentraciones de leptina fueron significativamente más elevadas en indígenas con sobrepeso/obesidad (3.33 ng/mL, de 0.18 a 8.83 ng/mL) que con peso normal (0.86 ng/mL, 0.041 a 9.49 ng/mL). Hubo diferencias interétnicas en las concentraciones de leptina entre indígenas y mestizos, independientemente del estado nutricional, más elevadas en mestizos con una $p=0.03$. Existe asociación significativa entre niveles de leptina e IMC únicamente en indígenas con peso corporal normal. Los resultados

de genotipificación del CYP2E1 hicieron evidentes las diferencias interétnicas entre indígenas Tepehuanos y mestizos, en virtud de que únicamente los indígenas presentaron individuos con polimorfismos homocigotos mutantes tanto para CYP2E1*3 y *1B lo que implica que sean eliminadores lentos para acetaminofén; así mismo 35 individuos mestizos e indígenas muestran capacidad de eliminación intermedia, siendo que la mayoría de los mestizos son eliminadores rápidos por contar con genotipos Wild Type. **Aportaciones del Proyecto:** Se demuestran diferencias tanto nutricionales, de las concentraciones séricas de leptina, así como de los polimorfismos genéticos de CYP2E1*3, y *1B en poblaciones mestiza e indígenas Tepehuanos de Durango, los cuales van a determinar diferencias farmacocinéticas del acetaminofén, en virtud de que regulan la expresión fenotípica de dichos polimorfismos, determinando que algunos individuos se comporten como eliminadores rápidos, intermedios y lentos, siendo los indígenas Tepehuanos los únicos que tuvieron individuos eliminadores lentos por contar con genotipos homocigotos mutantes. La principal aportación resulta de la gran aplicación que tiene el conocimiento tanto de los polimorfismos genéticos y del estado nutricional para la optimización terapéutica de los medicamentos que se biodegradan por la vía metabólica del CYP2E1.

Introducción

La leptina es una hormona que regula la homeostasis de la energía, y las funciones reproductivas, neuroendocrinas, inmunológicas y metabólicas. La hiperleptinemia es una característica esencial en la obesidad humana. Sin embargo, la diabetes no influye en la producción de leptina tanto en sujetos delgados y obesos per se. Independientemente de la adiposidad, los niveles de leptina son más altos en las mujeres que en los hombres. A pesar de la fuerte correlación entre los niveles de grasa corporal y la leptina, existe una gran heterogeneidad en los niveles de leptina en cualquier índice dado de grasa en el cuerpo (1).

Isidore AM et al (2) demostraron que en los seres humanos adultos de peso corporal diferente, la leptina sérica disminuye gradualmente durante el envejecimiento, la reducción de leptina es mayor en las mujeres que en los hombres, pero es independiente del índice de masa corporal (IMC), así como de otros factores relacionados con la edad y cambios endocrinos. En un estudio diseñado por Daniel JA et al (3) determinaron el efecto de la alimentación o del ayuno y del menor peso corporal en ovejas sobre los perfiles de leptina en 24 horas; se evidenció que las concentraciones plasmáticas de leptina son episódicas, además de que son influenciadas por el estado nutricional y el espesor de grasa sobre las costillas, pero no mostraron ninguna variación circadiana.

Los estudios realizados por Thomas et al (4) indicaron que la masa de grasa, la masa magra, y el nivel de insulina, son los principales factores determinantes de los niveles séricos de leptina en adultos; después de ajustar estas variables, la biodisponibilidad de los estrógenos también explica una parte significativa de la variación entre los niveles de leptina en mujeres posmenopáusicas que no están en terapia de remplazo hormonal (TRH). Además Di Carlo et al (5) mostraron que la TRH después de la menopausia no modificaba los niveles de leptina. Es probable que los efectos de hipoestrogenismo posmenopáusico sobre los niveles de leptina están enmascarados por los cambios en la composición corporal posmenopáusica. En efecto, después de la menopausia, hay un aumento en el peso corporal, IMC, y de masa grasa, con una centralización de la distribución de la grasa. La administración de TRH puede detener estos cambios, e incluso restaurar un patrón antes de la menopausia, lo que lleva entonces a una disminución de los niveles de leptina.

En una investigación realizada en Amerindios Ache sanos del este de Paraguay Bribiesca RG (6) reporta las concentraciones séricas de leptina realizada en varones con edades entre 29 a 36 años y mujeres con edades de 26.8 a 36 años de edad. Las concentraciones de leptina de los amerindios Ache fueron mucho menores que en las poblaciones industrializadas, aunque el dimorfismo sexual era evidente significativamente (mujeres $5.64 \text{ ng/mL} \pm 0.91$ vs hombres 1.13 ± 0.08 con valor de $p < 0.0001$).

Lilja M et al (7) encontraron que los indios asiáticos tienen niveles más altos de leptina, leptina/IMC y leptina/cintura que los criollos y europeos. La leptina tiene una alta estabilidad intra-individual, y la variación estacional de la leptina no parece explicar las diferencias étnicas observadas.

En el estudio conducido por AL-Harithy RN (8) demostró que existen diferencias específicas respecto a las concentraciones de leptina en individuos saudíes sanos, dependientes tanto del género y de la edad. Sin embargo, el estudio indica que puede haber variables desconocidas que también pueden influir en los niveles de leptina tanto en mujeres y en hombres sauditas.

Waisberg R et al (9) establecieron la hipótesis de que una de las razones de la mayor prevalencia de la menores niveles de leptina, mientras que las diferencias étnicas en la prevalencia de trastornos metabólicos

no se puede explicar por las diferencias en los niveles de adipocinas, pero puede estar relacionada con una mayor adiposidad visceral en el grupo de la India.

Los estudios mencionados hacen énfasis en la variabilidad en las concentraciones de leptina, debida a factores biológicos y ambientales entre otros, así como a las diferencias entre poblaciones, los cuales hacen énfasis a la relevancia del factor étnico.

En virtud de la carencia de éste tipo de estudios en nuestro país, el objetivo de éste trabajo fue determinar la asociación entre el estado nutricional con las concentraciones plasmáticas de leptina, así como identificar el genotipo y expresión fenotípica de CYP2E1, e identificar las diferencias entre indígenas Tepehuanos y población mestiza de Durango, México.

Objetivos y metas cumplidas por módulo

Modulo I.- Objetivo. Evaluar la relación entre las concentraciones plasmáticas de leptina y la expresión fenotípica de CYP2E1 en las poblaciones menonita, tepehuana y mestiza del estado de Durango.

Justificación. No fue posible estudiar a la población menonita en virtud de que no aceptaron participar en el estudio, al parecer por cuestiones religiosas. Se evaluaron las condiciones de salud y el estado nutricional para realizar el estudio tanto en las población indígena y en la mestiza.

Existen dos maneras de estudiar la capacidad de biotransformar y eliminar los medicamentos, las sustancias xenobióticas y/o endógenas, a través de enzimas del CYP2E1. Una alternativa es estudiar la expresión genotípica a través de polimorfismos del gen CYP2E1, y otra es la expresión fenotípica a través de la razón metabólica, sin embargo por limitaciones técnicas y/o económicas en ocasiones no se puede utilizar una de ellas, y en su caso se utiliza la otra en virtud de que existe asociación entre ellas. En nuestro caso previendo dicha situación se utilizaron las dos, lo cual refuerza aún los resultados.

Contribución del Módulo I para la obtención de resultados del estudio: 25%

Se cumplieron las metas

Modulo II.- Objetivo. Determinar la asociación de los niveles plasmáticos de leptina con el estado nutricional de grupos étnicos, y su influencia sobre la biotransformación de fármacos.

Contribución del Módulo II para la obtención de resultados del estudio: 25 %

Se cumplieron las metas.

Modulo III.- Objetivo. Determinar la expresión fenotípica de CYP2E1 mediante la razón metabólica de acetaminofén y relacionar el efecto de los niveles de leptina con la razón metabólica de la actividad de CYP2E1.

Justificación del atraso (del montaje y validación) para determinar las concentraciones de ACF y sus metabolitos. En virtud de los problemas técnicos por la complejidad fisicoquímica de los compuestos para la determinación de ACF y sus metabolitos para validar el método analítico completo con el fármaco inalterado, se tuvo un retraso, el cual va a ser superado una vez que esté terminada la validación del método para proceder a la determinación del ACF y sus metabolitos en las muestras biológicas, las cuales ya fueron recolectadas en las poblaciones indígena y mestiza de Durango.

Contribución del Módulo III para la obtención de resultados del estudio: 20 %

Justificación del atraso (del montaje y validación) para determinar las concentraciones de ACF y sus metabolitos. En virtud de los problemas técnicos por la complejidad fisicoquímica de los compuestos para la determinación de ACF y sus metabolitos para validar el método analítico completo con el fármaco inalterado, se tuvo un retraso, el cual va a ser superado una vez que esté terminada la validación del método para proceder a la determinación del ACF y sus metabolitos en las muestras biológicas, las cuales ya fueron recolectadas en las poblaciones indígena y mestiza de Durango.

Modulo IV.- Objetivo. Identificar y describir la frecuencia de los polimorfismos genéticos de CYP2E1, y determinar sus diferencias de acuerdo a la pertenencia a los diferentes grupos étnicos de Durango, México.

Contribución del Módulo I para la obtención de resultados del estudio: 25 %

Se cumplieron las metas

Tipo de Estudio: prospectivo, descriptivo, comparativo, y de relación

Población

Se reclutaron 200 voluntarios adultos (100 indígenas de origen Tepehuano y 100 individuos de origen mestizo), originarios del estado de Durango, México. El protocolo y el consentimiento informado por escrito fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General de Durango, dicho consentimiento fue firmado por todos los participantes en el estudio. A todos los individuos incluidos en el estudio se les realizó una historia clínica completa, así como el estudio antropométrico para evaluar el estado nutricional de cada voluntario, a través de considerar el índice de Quetelet (10) como medida de asociación entre peso y talla corporal, empleando la siguiente ecuación: $IMC = \text{Peso/Talla}^2 \text{ kg/m}^2$. De tal manera que 100 individuos presentaron peso normal, de los cuales 50 eran mestizos y 50 indígenas Tepehuanos; y 100 individuos (50 mestizos y 50 Tepehuanos) cursaban con sobrepeso y obesidad ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$). Así mismo se les extrajeron muestras de sangre para determinar las concentraciones séricas de leptina, el genotipo y el fenotipo de CYP2E1 y pruebas bioquímicas para evaluar su estado de salud.

Evaluación del estado nutricional

Para establecer el estado nutricional de los voluntarios, los individuos se clasificaron según su Índice de Quetelet ($IMC = \text{Peso/Talla}^2 \text{ kg/m}^2$), siguiendo los criterios de corte establecidos por la FAO/OMS¹⁰ de acuerdo a los siguientes valores: $IMC < 18.5 \text{ kg/m}^2$ corresponde a desnutrición; de 18.5 a 24.99 kg/m^2 indica un estado nutricional normal; de 25.0 a 29.99 kg/m^2 significa sobrepeso; $\geq 30.0 \text{ kg/m}^2$ corresponde a obesidad

Cuantificación de la Leptina.

Se extrajeron 10 mL de sangre a cada individuo para depositar 5 mL en tubos sin anticoagulante y 5 ml en tubos con anticoagulante. La determinación de las concentraciones de leptina en suero se llevaron a cabo por medio del kit Human Leptin ELISA (Millipore) en un equipo espectrofotométrico Du®-64 (Beckman, USA), a $\lambda = 582 \text{ nm}$.

Cuantificación de Acetaminofen

Pruebas para la Determinación de Acetaminofén, 3-hidroxiacetaminofen y n-acetil-p-benzoquinoneimina en Plasma Humano por Medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

El método para la determinación de acetaminofén (ACF) y sus metabolitos 3-hidroxiacetaminofén (3-OH) y n-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI), ha resultado todo un reto; en un inicio se planeó realizar un solo método para determinar los tres compuestos con un mismo método, sin embargo esto no fue posible por las características fisicoquímicas tan diferentes que tiene el metabolito n-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI); en ese sentido se planeó utilizar dos métodos diferentes después de realizar diferentes pruebas de extracción y de condiciones cromatográficas, se realizaron barridos para determinar la longitud de onda ideal para cada compuesto, se probaron diferentes extracciones, con distintas pruebas de precipitación, extracciones líquidas, también se probaron diferentes Fases Móviles a diferentes pHs y diferentes proporciones del buffer y solventes.

Dentro de las pruebas que se realizaron se hizo una doble extracción, primero una precipitación con ácido perclórico al 30% para extraer a ACF y 3-OH por la similitud de sus propiedades fisicoquímicas, después una líquido-líquido para extraer a NAPQI aquí probamos una fase móvil compuesta por Fosfatos-Acetonitrilo-Metanol 95-3-2 dando mejores resultados las fases móviles compuestas solo por fosfatos-metanol, pero el recobro para NAPQI seguía siendo bajo.

Después de todas las pruebas realizadas se llegó a la conclusión de que como los metabolitos tienen propiedades fisicoquímicas diferentes se tendrían que cuantificar de manera separada, juntando los dos compuestos más similares que son ACF y 3-OH y realizar la cuantificación de manera individual del NAPQI

Se ajustaron las condiciones idóneas para determinar el acetaminofén y el metabolito 3-hidroxi, llegando a las siguientes condiciones finales.

Columna Simmetry C18

Longitud 150 mm

Diámetro Interno 3.9

Tamaño de partícula 5 µm

Temperatura columna 35°C

Temperatura Automuestreador 10°C

Volumen de inyección 40 µL

Tiempo de Corrida 9 min

Fase Móvil Buffer de fosfatos 10Mm pH 3.5 – Metanol 92:8

Solvente utilizado para la precipitación de proteínas: Ácido perclórico-Acetonitrilo 30%

Ya se ha iniciado la validación del método en donde las pruebas de linealidad del método y del sistema pasan adecuadamente de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998 así como la variabilidad intradía, se han corrido dos duplicados faltando solo uno para evaluar la variabilidad interdía, también están pendientes a realizar las pruebas de estabilidad y las de robustez del método.

Para la determinación del metabolito NAPQI están por establecerse todas las condiciones finales para iniciar con la validación de este compuesto, sin embargo ya se ha definido que se utilizará una extracción líquido líquido, de tal manera que el solvente empleado será acetato de etilo. El intervalo de la curva de calibración que tenemos contemplados va de 20 a 200 ng/mL aunque se está evaluando la posibilidad de subir el límite de cuantificación LC. La columna utilizada es una Zorbax.

Justificación del atraso (del montaje y validación) para determinar las concentraciones de ACF y sus metabolitos. En virtud de los problemas técnicos por la complejidad fisicoquímica de los compuestos para la determinación de ACF y sus metabolitos para validar el método analítico completo con el fármaco inalterado, se tuvo un retraso, el cual va a ser superado una vez que esté terminada la validación del método para proceder a la determinación del ACF y sus metabolitos en las muestras biológicas, las cuales ya fueron recolectadas en las poblaciones indígena y mestiza de Durango.

Extracción de ADN

Se obtuvieron muestras de sangre total en tubos tipo vacutainer con EDTA como anticoagulante. El ADN genómico se aisló mediante el kit Wizard® del laboratorio Promega, mediante cuatro pasos. El primer paso es la purificación mediante lisis de las células y los núcleos, para el aislamiento de ADN de las células blancas de la sangre, este paso implica la lisis de los glóbulos rojos en la solución de lisis celular, seguido por la lisis de las células blancas de la sangre y sus núcleos en la solución de lisis núcleos. Un paso de digestión RNAsa se pueden incluir en este momento, sino que es opcional para algunas aplicaciones. Las proteínas celulares se retiran por sales donde se busca precipitar las proteínas. Finalmente se realizaron lavados.

Electroforesis para verificar integridad de ADN

La integridad y pureza del ADN genómico se evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Cuantificación de las muestras por espectrofotometría

La concentración de las muestras se determinaron a través de la lectura a 260 nm y la calidad de las muestras se realizará mediante la medición a 260 y 280 nm y se consideraron óptimas cuando la razón de los valores 260/280 fué entre 1.7 y 2.

PCR en tiempo real

Para la determinación de las variantes alélicas *CYP2E1*1B*, *3, *4, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real, en la cual se amplificaron fragmentos de ADN genómico del gen *CYP2E1*, usando sondas TaqMan específicas para el fragmento.

Sondas TaqMan

Las sondas TaqMan que se utilizaron fueron las siguientes:

CYP2EC1*4, rs6413419: Secuencia:
CCTATCGGCTGCGGCCCTGCAAC[G/A]TCATAGCCGACATCCTCTTCCGCAA FAM (G) VIC (A)

CYP2E1*1B: rs2070676: Secuencia:
CCTTCACTAAGCAACTCCTTCAACT[G/C]GAAATATACTATCCTATATAGCATA
FAM (G) VIC (C)

CYP2E1*3: rs55897648: Secuencia:
TCTTTGTTTCTCCTAGGGCACAGTC[G/A]TAGTGCCAACTCTGGACTCTGTTTT
FAM (G) VIC (A)

Análisis estadístico

Se analizaron tanto la distribución y la dispersión de los datos, así como las medidas de tendencia central y de variabilidad, con la finalidad de determinar el uso de pruebas paramétricas y/o no-paramétricas. En virtud de la amplia dispersión de los datos en alguna de las variables consideradas, se utilizaron los valores para la mediana y los rangos. Las pruebas utilizadas fueron de ANOVA one-way o de Kruskal-Wallis, así como las pruebas t de Student, o U de Mann-Whitney, finalmente el coeficiente de correlación de Pearson, utilizando el programa Statistica (11).

Resultados

Los voluntarios de Durango, México, que participaron en el estudio presentaron edades comprendidas de los 18 a los 57 años; con base a su IMC, 50 % individuos tenían un peso corporal normal (25 % mestizos y 25 % indígenas Tepehuanos), y 50 % de los individuos presentaron sobrepeso/obesidad con un IMC > 25 kg/m² (25 % mestizos y 25 % indígenas Tepehuanos). En la tabla 1 se observan los siguientes resultados: la presión arterial media (mm/Hg) aunque presenta diferencias discretamente más elevadas en los individuos de origen mestizo con peso normal (88.2±7.6 mm/Hg) y con sobrepeso/obesidad (87.6 ± 9.4 mm/Hg), con respecto a los valores encontrados en indígenas Tepehuanos con peso normal (82.6±9.5) y con sobrepeso/obesidad (82.9 ± 8.6), no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Las cifras de colesterol fueron significativamente más bajas en los mestizos con peso normal (121.6 ± 10.9 mg/dL) que en los sujetos mestizos e indígenas Tepehuanos con sobrepeso/obesidad (146.5 ± 32 mg/dL) y (157.4 ± 31 mg/dL) respectivamente, y que los indígenas Tepehuanos con normopeso, ya que cursaban con valores de (147 ± 21.1 mg/dL) cuyo valor de p<0.0001, el cual determinó diferencias altamente significativas.

Así mismo las cifras de HDL también fueron significativamente más bajas tanto en los mestizos con peso normal (31.50 ± 11.8 mg/dL) como en los mestizos con sobrepeso/obesidad (29.4 ± 13.6 mg/dL), respecto a los valores encontrados en los indígenas Tepehuanos con peso normal (40.63 ± 12.1 mg/dL) y con sobrepeso/obesidad (31.8 ± 5.9 mg/dL), con un valor estadísticamente significativo de $p < 0.05$. Las cifras de LDL fueron discretamente más elevadas en los indígenas con sobrepeso/obesidad (81.5 ± 20.9) que en los mestizos con la misma condición nutricional (79.63 ± 27.4 mg/dL), $p < 0.05$; contrariamente los mestizos con peso normal presentaron cifras más elevadas (93.1 ± 23.3 mg/dL) que los indígenas Tepehuanos con peso normal (79.8 ± 18.3 mg/dL)

Las cifras de VLDL fueron significativamente diferentes ($p = 0.001$), más elevadas en los indígenas con sobrepeso/obesidad 34.1 ± 18.7 mg / dL que en los mestizos con la misma condición nutricional 18.8 ± 25.3 mg/dL y que los tepehuanos y mestizos con peso normal con valores de 19.9 ± 8.2 mg/dL y 27.2 ± 14.7 mg/dL respectivamente. Con respecto a las concentraciones de triglicéridos las cifras más elevadas se presentaron en los indígenas con sobrepeso/obesidad 165.3 ± 103.3 mg/dL y en los mestizos con peso normal 153 ± 65.4 mg/dL que los valores encontrados en los indígenas con peso normal 99.0 ± 41.0 mg/dL y en los mestizos con sobrepeso/obesidad 85.4 ± 111.4 mg/dL con un valor de $p = 0.001$ altamente significativo.

Finalmente las concentraciones de leptina fueron más elevadas en los sujetos mestizos con sobrepeso/obesidad sujetos mestizos 8.17 ($9.6-26.9$ ng/mL) que los mestizos con peso normal 4.29 ($0.2-24.9$ ng/mL) y los indígenas Tepehuanos con peso normal 0.86 ($0.04-8.81$ ng/mL) con un valor de $p < 0.05$ que señala diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 1.- Datos demográficos y biológicos de las poblaciones mestizo y de indígenas Tepehuanos del estado de Durango México.

Variable	Peso normal		p^a	Obeso/Sobrepeso		
	Tepehuano	Mestizos		Tepehuano	Mestizos	
TGO	38.8 ± 14.2	26.4 ± 8.2	$< 0.05^b$			
TGP	32 (70-24)	28 (58-14)	ns ^b			
Presion arterial media (mm/Hg)	82.6 ± 9.5	88.2 ± 7.6		82.9 ± 8.6	87.6 ± 9.4	ns
Colesterol total (mg/dL)	147 ± 21.1	121.6 ± 10.9		157.4 ± 31	146.5 ± 32	0.001
HDL (mg/dL)	40.63 ± 12.1	31.50 ± 11.8		31.8 ± 5.9	29.4 ± 13.6	< 0.05
LDL (mg/dL)	79.8 ± 18.3	93.1 ± 23.3		81.5 ± 20.9	79.63 ± 27.1	< 0.05
VLDL (mg/dL)	19.9 ± 8.2	27.2 ± 14.7		34.1 ± 18.7	18.8 ± 25.3	0.001
Trigliceridos (mg/dl)	99.0 ± 41.0	153 ± 65.4		165.3 ± 103.3	85.4 ± 111.4	0.001
Leptina (ng/ml)	0.86 (0.04-8.8)	4.29 (0.2-24.9)	< 0.05	3.33 (0.18-8.8)	8.17(9.6-26.9)	< 0.05

^a Análisis de Varianza de Kruskal Wallis ^b Prueba t de Student

En la tabla 2 se presentan las concentraciones de leptina sérica en los diferentes grupos estudiados, con valores más elevados tanto en los mestizos y en los indígenas Tepehuanos con sobrepeso/obesidad con respecto a los valores encontrados en los mestizos e indígenas con peso normal.

Tabla 2: Concentraciones séricas de leptina (ng/mL) en los diferentes grupos étnicos de Durango, Mexico.

	Mestizos		Tepehuanos	
	n	Leptina (ng/mL)	n	Leptina (ng/mL)
Todos	100	3.37 (0.045-26.9)	100	1.38 (0.041-26.9)
Peso normal	50	4.29 (0.20-24.98)	50	0.86 (0.041-24.88)
Sobrepeso/obesidad	50	8.17 (0.63-26.40)	50	3.33 (0.18-8.83)

Como se muestra en la figura 1, los sujetos mestizos con sobrepeso/obesidad presentan un mayor peso corporal (95.43 ± 12.6 kg) que los sujetos mestizos con peso normal (67.76 ± 7.9 kg); esta diferencia es estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.001$. Igualmente, los indígenas Tepehuanos con sobrepeso/obesidad presentan valores de peso significativamente más elevados que los indígenas Tepehuanos con peso normal (77.31 ± 6.0 kg vs 60.6 ± 5.3 kg, respectivamente; t de Student= 9.9, 48 gl y $p < 0.0001$)

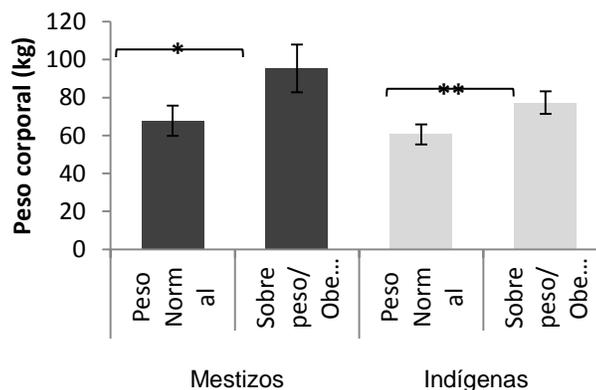


Figura 1.- Diferencias en el análisis comparativo del peso entre mestizos * t de Student= 8.0; 48 gl y $p < 0.001$, y entre indígenas ** t de Student= 9.9, 48 gl y $p < 0.0001$.

Al comparar el IMC de los dos grupos de mestizos (figura 2), se observa que los sujetos de peso normal presentan un valor estadísticamente más bajo que los que cursaban con sobrepeso/obesidad (21.78 ± 1.45 kg/m^2 vs 29.89 ± 3.14 kg/m^2 , respectivamente; $p < 0.0001$). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el IMC de los indígenas Tepehuanos con normopeso (22.7 ± 1.68 kg/m^2) y los indígenas con sobrepeso/obesidad (28.0 ± 1.72 kg/m^2) con t Student = 11.4; gl = 48 y una $p < 0.001$.

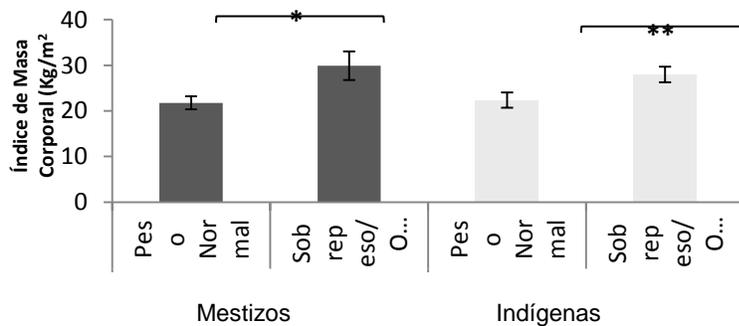


Figura 2.- Diferencias en el IMC entre mestizos e indígenas Tepehuanos. ANOVA two way entre etnias $F= 217.3$, con 1 gl y una $p=0.0001$ y dentro de subgrupos $F= 8.7$, $p=0.04$. * t de Student = 9.56; 48 gl, y $p<0.0001$. ** t de Student= 11.4; 48 gl y $p<0.001$. La comparación entre las poblaciones 1 vs 3 con t de Student= 1.40; 48 gl con una $p = 0.168$ ns. Grupos 2 vs 4 con t de Student = 2.72; 48 gl, y $p< 0.005$.

En la figura 3 se hacen evidentes las diferencias en las concentraciones de leptina de acuerdo al grupo étnico y al estado nutricional, con valores estadísticamente significativos entre los grupos, $p = 0.0001$. En contraste, las concentraciones séricas de leptina fueron significativamente más elevadas en los indígenas con sobrepeso 3.33 ng/mL, 18 a 8.83 ng/mL en comparación con lo que se observó en los indígenas con normopeso 0.86 ng/mL, 0.041 a 9.49 ng/mL) con un valor U de Mann-Whitney de 134.3 y una $p = 0.03$.

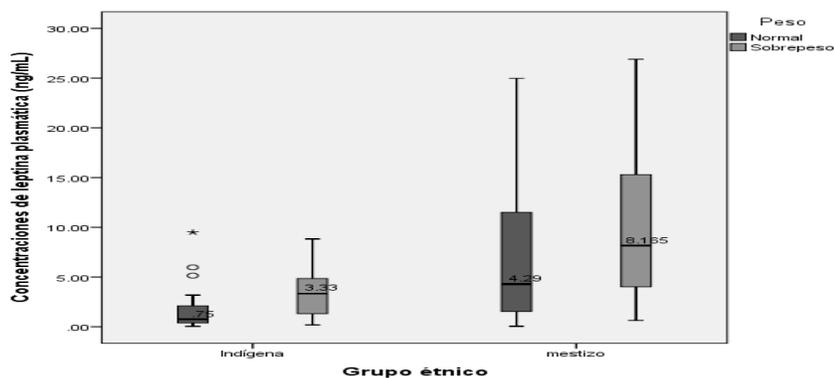


Figura 3.- Análisis de varianza de Kruskal Wallis : $H(1,N79)= 16.0$; $p=0.0000$. Indígenas con sobrepeso vs Indígenas con normopeso, Mann-Whitney U test: $U=134.5$, $Z=2.16$, $p=0.03$ s. mestizos con sobrepeso vs normopeso, Mann-Whitney U test: $U=116$, $Z= 1.64$, $p=0.09$ ns. s= diferencias significativas; ns= diferencias no significativas..

Las concentraciones séricas de leptina fueron más elevadas en los individuos mestizos con sobrepeso/obesidad. De manera general, los valores de leptina están aumentados en individuos con sobrepeso/obesidad ya sean indígenas Tepehuanos o mestizos, los cuales se encuentran entre 3 a 18 ng/mL. Tanto los indígenas Tepehuanos con normopeso y con sobrepeso/obesidad, presentaron niveles de leptina inferiores a los determinados en los voluntarios mestizos con peso normal y con sobrepeso/obesidad ($p < 0.0000$), lo que confirma la relevancia del factor étnico

Al determinar las diferencias entre las concentraciones séricas de leptina de acuerdo con el estado nutricional entre los indígenas Tepehuanos con peso normal y con sobrepeso/obesidad (ver tabla 3), se observa que hay un mayor número de indígenas tepehuanos con sobrepeso/obesidad que presentan valores más elevados de leptina (11 de 16 = 68.75 %) que de individuos con peso normal (5 de 16 = 31.25 %) con una diferencia significativa con un valor de $p = 0.03$ de acuerdo a la prueba χ^2 ; asimismo, hay un mayor número de indígenas Tepehuanos con peso normal que presentan valores bajos de leptina (18 de 28 = 64.28 %) que de individuos con peso normal (10 de 28 = 31.71 %), y con una $p=0.034$ de acuerdo a la prueba $\chi^2= 4.45$; con 1 gl.

Tabla 3.- Diferencias de las concentraciones séricas de leptina de acuerdo con el estado nutricional, en indígenas Tepehuanos con normopeso, y con sobrepeso/ obesidad.

Estado nutricional	Niveles de leptina (ng/mL)		
	< 3	3 – 10	Total
Normopeso	18	5	23
Sobrepeso y Obesidad	10	11	21
Total	28	16	44

$$\chi^2 = 4.45 ; \text{gl}=1 , P = 0.034$$

La única asociación estadísticamente significativa entre las concentraciones séricas de leptina con el peso corporal y el IMC, realizada tanto en los individuos mestizos así como en indígenas Tepehuanos con peso normal y con sobrepeso/obesidad, fue evidente en los indígenas Tepehuanos con peso normal, la cual resultó significativa con un valor de $r = 0.420$; $r^2 = 0.176$ con $n = 22$ y un valor de $p = 0.05$.

Se realizó la genotipificación de los polimorfismos de CYP2E1 por Tiempo real encontrando los siguientes resultados:

Polimorfismo CYP2E1*1B. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa, con predominio del alelo silvestre (C) en ambas poblaciones, pero con un bajo porcentaje del alelo mutado (G) en los mestizos, en cambio en la población tepehuana se encuentra con un alto porcentaje, casi homologándose con el porcentaje de presencia del alelo silvestre.

	C-16026001_20 CYP2 *1B					
	CC	CG	GG	C	G	
MESTIZOS	70%	30%	0	85%	15%	$\chi^2=20.5$ $p<0.001$
TEPEHUANOS	43.75%	18.75%	37.5%	53.1%	46.9%	

Polimorfismo CYP2E1*3. Existe una diferencia estadísticamente significativa en el % del alelo mutado (A) el cual se encuentra en un porcentaje mayor en población tepehuana, en comparación con la población mestiza. La distribución del alelo mutado es muy semejante al alelo silvestre (G) en la población tepehuana, sin embargo en la población mestiza no se encuentra esta similitud, ya que en el 98% está presente el alelo silvestre y solamente el 2% presenta el alelo mutado en estado heterocigoto.

	C_30634216_10 CYP2E1 *3					
	GG	GA	AA	G	A	
MESTIZOS	96%	4%	0	98%	2%	$\chi^2 = 15.4$ $p<0.001$
TEPEHUANOS	43.75%	18.75%	37.5%	53.1%	46.9%	

Polimorfismo CYP2E1*4. No existe diferencia estadísticamente significativa en el polimorfismo *4, encontrándose una distribución semejante en ambas poblaciones, sin embargo la distribución genotípica y alélica se encuentra con un desequilibrio de Hardy Weinberg. Predomina el genotipo homocigoto silvestre, no existen homocigotos mutados en la muestra estudiada y la cantidad de heterocigotos es minoritaria, sin embargo el aumento del tamaño de muestra puede ser considerado aun cuando la evidencia en este pequeño grupo muestral refleja la baja frecuencia del alelo mutado en ambas poblaciones.

	C-20443971-10 *4					
	GG	GA	AA	G	A	$\chi^2 = 0.0023$ $p=0.9$
MESTIZOS	82%	18%	0	91%	9%	
TEPEHUANOS	81.2%	18.8%	0	90.6%	9.3%	

Producto final de los módulos

Módulo I.- 1.1.- Sometimiento del protocolo para obtener autorización del estudio por los Comités de ética e investigación del Hospital General de Durango. 1.2.- Obtención de los consentimientos informados de los voluntarios de ambas poblaciones. 1.3.- Historia clínica completa y signos vitales de los individuos de ambas poblaciones. 1.4.- Evaluación del estado de salud a partir de pruebas bioquímicas de todos los voluntarios. 1.5.- Medidas antropométricas de cada individuo para determinar el estado nutricional. 1.6.- Creación de la base de datos. 1.7.- Extracción de las muestras sanguíneas para determinación de concentraciones de leptina, polimorfismos genéticos de CYP2E1. 1.8.- Administración del acetaminofén por vía oral y extracción de sangre 3 horas después para la determinación de la razón metabólica de acetaminofén. 1.9.- Procesamiento y análisis estadístico de los datos de las variables consideradas para contrastación y asociación de las hipótesis, de acuerdo al estado nutricional y a las concentraciones plasmáticas de leptina.

Módulo II.- Se determinaron las concentraciones plasmáticas de leptina en individuos con peso normal y con sobrepeso/obesidad tanto de las poblaciones de indígenas Tepehuanos y mestizos de Durango, y las diferencias interétnicas, las cuales fueron estadísticamente significativas; la única asociación significativa entre el IMC y las concentraciones de leptina se encontró en indígenas Tepehuanos con peso normal.

Módulo III.- En virtud de los problemas técnicos por la complejidad fisicoquímica de los compuestos para la determinación de ACF y sus metabolitos para validar el método analítico completo con el fármaco inalterado, se tuvo un retraso, el cual va a ser superado una vez que esté terminada la validación del método para proceder a la determinación del ACF y sus metabolitos en las muestras biológicas, las cuales ya fueron recolectadas en las poblaciones indígena y mestiza de Durango.

Módulo IV.- Se determinaron las frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos de CYP2E1* 1B, de CYP2E1*3 y de CYP2E1*4 en cada grupo étnico, y se demostraron diferencias interétnicas entre individuos mestizos e indígenas Tepehuanos de Durango, México, las cuales fueron altamente significativas. Se hizo evidente que los indígenas tepehuanos mostraron genotipos homocigotos mutados para los polimorfismos *1B y *3, lo cual tiene implicaciones en la velocidad de eliminación del acetaminofén, en virtud de que dichos individuos se comportarán como eliminadores lentos de dicho fármaco.

Conclusiones e impacto en investigación

1.- El estado nutricional fue mejor en la población mestiza que en la población indígena Tepehuana, es importante mencionar que los valores tanto de peso y talla corporal como el IMC fueron mayores en los individuos con sobrepeso/obesidad tanto en los mestizos como en los indígenas Tepehuanos.

2.- Como consecuencia de lo anterior, los indígenas Tepehuanos presentaron concentraciones de leptina sérica inferiores a las encontradas en los mestizos, independientemente del estado nutricional.

3.- Son fundamentales las implicaciones que tienen los trastornos nutricionales como son el sobrepeso y la obesidad encontrados en ambas poblaciones, particularmente por los efectos que tienen los trastornos nutricionales y la disminución de los niveles de leptina plasmática en los indígenas Tepehuanos, y consecuentemente sus efectos sobre la farmacocinética de medicamentos, particularmente al reducir la actividad enzimática de las enzimas del CYP450, repercutiendo en la velocidad de eliminación de los medicamentos que se biotransforman a través de la enzima hepática CYP2E1, con incremento del tiempo de vida media de eliminación, y la respuesta al tratamiento al incrementar los riesgos de toxicidad por reducirse el metabolismo de fármacos que requieren de la enzima CYP2E1.

4.- Los polimorfismos estudiados se encuentran en desequilibrio Hardy-Weinberg.

5.- Los polimorfismos *1B y *3, se encuentran con diferencias estadísticamente significativas, existiendo un aumento en la presencia de sujetos con genotipo homocigoto mutado en la población tepehuana y la baja prevalencia del alelo mutado en población mestiza.

6.- El polimorfismo *4 se encuentra en una distribución similar en ambas poblaciones, sin embargo las poblaciones se encuentran en desequilibrio Hardy-Weinberg, pues se observa un predominio del homocigoto silvestre y la inexistencia del homocigoto mutado en ambas poblaciones. El alelo mutado se encuentra en un bajo porcentaje y en condición heterocigota.

7.- Seis sujetos tepehuanos (37.5%), son homocigotos mutados para dos de los polimorfismos (*1B y *3) y son los que presentan mayores niveles séricos de TGO, lo que sugiere que además de presentar alteración hepática asintomática, la probabilidad de ser metabolizadores lentos para acetaminofen es mayor en comparación con los que no presentan este genotipo.

8.- Estos resultados fundamentan la necesidad de realizar estudios de terapia individualizada tanto para individuos como para tratamientos poblacionales, ya que las claras diferencias en las frecuencias de los polimorfismos, revelan la diferencia inter-racial y la posible repercusión a la salud, ya que en los individuos con genotipo homocigoto mutado y que además estos son dobles homocigotos mutados, presentan datos sub-clínicos de daño hepático.

9.- Los resultados del estudio aportan conocimientos útiles para la optimización terapéutica de medicamentos que requieren para su biotransformación de las enzimas del CYP450 como es el caso de CYP2E1, ya que dependiendo de la herencia genética existe susceptibilidad a eventos adversos o por el contrario al fracaso terapéutico.

Referencias bibliográficas

- 1.- Sinha MK, Caro JF. Clinical aspect of leptin. *Vitam Horm* 1998;54:1-30.
- 2.- Isidori AM, Strollo F, Moré M, Caprio M, Aversa A, Moretti C, Frajese G, Riondino G, Fabbri A. Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85 (5):1954-62.
- 3.- Daniel JA, Whitlock BK, Baker JA, Steele B, Morrison CD, Keiser DH, Sartin JL. Effect of body fat mass and nutritional status on 24-hour leptin profiles in ewes. *J Anim Sci* 2002; 80(4):1083-89.
- 4.- Thomas T, Burguera B, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, Khosla S. Relationships of serum leptin levels with body composition and sex steroid and insulin levels in men and woman. *Metabolism* 2000; 49(10):1278-84.
- 5.- Di Carlo C, Tommaselli GA, Nappi C. Effects of sex steroid hormones and menopause on serum leptin concentrations. *Gynecol Endocrinol* 2002;16(6):479-91.
- 6.- Bribiesca RG. Serum leptin levels and anthropometric correlates in Ache Amerindians of eastern Paraguay. *Am J Phys Anthropol* 2001;115(4):297-303.
- 7.- Lilja M, Rolandsson O, Shaw JE, Pauvaday V, Cameron AJ, Tuomilehto J, Alberti KG, Zimmet PZ, and Soderberg S. Higher leptin levels in Asian Indians, Creoles and Europeans: a potential explanation for increased metabolic risk. *Int J Obes* 2010;34(5):878-85.
- 8.- Al-Harthy RN. Relationship of leptin concentration to gender, body mass index and age in Saudi adults. *Saudi Med* 2004;25(8): 1086-90.

- 9.- Waisberg R, Paiker JE, and Crowther NJ. Adipokine serum concentrations, anthropometric measurements and socio-economic status in two ethnic groups with different prevalence levels for cardiovascular diseases and type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2011; 43(9):660-66.
- 10.- Garrow JS and Webster J. Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *International Journal of Obesity* 1985; 9:147–153.
- 11.- Statistica Version 10, software package.