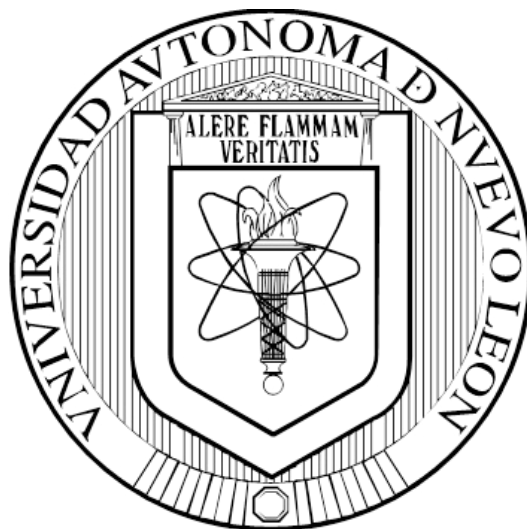


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS rs2289669 EN
EL GEN MATE1 Y rs622342 EN EL GEN OCT1
CON LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE LA
METFORMINA EN PACIENTES DIABÉTICOS
DEL NORESTE DE MÉXICO**

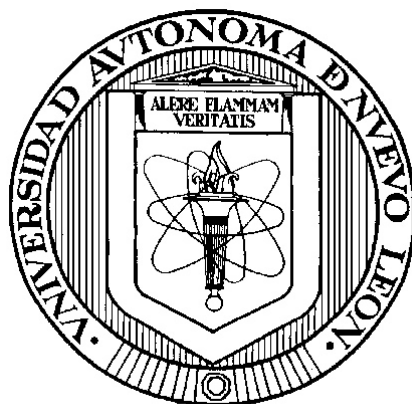
POR

JORGE LUIS GUÍA GARCÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

SEPTIEMBRE, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS
rs2289669 EN EL GEN MATE1 Y rs622342 EN EL GEN OCT1 CON LA
EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE LA METFORMINA EN PACIENTES
DIABÉTICOS DEL NORESTE DE MÉXICO**

POR

JORGE LUIS GUÍA GARCÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

SEPTIEMBRE, 2018

**ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS
rs2289669 EN EL GEN MATE1 Y rs622342 EN EL GEN OCT1
CON LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE LA
METFORMINA EN PACIENTES DIABÉTICOS
DEL NORESTE DE MÉXICO**

Aprobación de la tesis:

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Presidente

Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo
Secretario (a)

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Vocal

Dra. María Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS
rs2289669 EN EL GEN MATE1 Y rs622342 EN EL GEN OCT1
CON LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE LA
METFORMINA EN PACIENTES DIABÉTICOS
DEL NORESTE DE MÉXICO**

Revisión de la tesis:

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Directora

Dr. Isaías Balderas Rentería
Co-Director

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Comité Tutorial

Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo
Comité Tutorial

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez
Comité Tutorial

RESUMEN

Jorge Luis Guía García

Fecha de Graduación: Septiembre 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del proyecto:

Estudio de la asociación entre los polimorfismos rs2289669 en el gen MATE1 y rs622342 en el gen OCT1 con la efectividad terapéutica de la metformina en pacientes diabéticos del noreste de México.

Número de páginas: 91

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y Método de Estudio: El presente estudio tiene como objetivo principal evaluar la posible asociación entre los polimorfismos rs2289669 del gen MATE1 y rs622342 del gen OCT1 con la efectividad terapéutica de la metformina en pacientes diabéticos mayores de 18 años. Para llevar a cabo el estudio se realizó una evaluación antropométrica (talla, peso, circunferencia de cintura) y la determinación de HbA1c en sangre, al inicio del estudio y 3 meses después de estar sometidos a un tratamiento con metformina, además con la muestra de sangre extraída se obtuvo el DNA genómico para la identificación de los genotipos de los 2 polimorfismos de interés, utilizando la técnica de PCR-RFLP para el polimorfismo rs2289669 y PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan para el polimorfismo rs622342.

Contribuciones y conclusiones: Se reportaron por primera vez las frecuencias genotípicas y alélicas de ambos polimorfismos en una población del noreste de México. Se encontró que los pacientes que presentan el alelo A en el polimorfismo rs2289669 en el gen MATE1 está relacionado con una mayor reducción en los valores de HbA1c comparado con los pacientes que presentan el alelo G. El genotipo AA en el polimorfismo rs622342 en OCT1

reportó una mayor reducción en el intervalo de reducción de HbA1c de 0.26-0.5. Se sugieren más estudios para la reproducción de los resultados y analizar si existe esta misma asociación en pacientes de otras regiones de México.

Firma del asesor:

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios por las oportunidades que me brinda día con día para ir cumpliendo cada una de las metas que me he propuesto y sé que de su mano todo lo que se sueña se puede lograr.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la manutención por estos dos años.

A mi familia, mis padres Víctor Manuel Guía García y Rosalinda García Salas por todo el apoyo y motivación que me han dado en todos los proyectos que me he propuesto realizar, por más locos o descabellados que puedan llegar a ser, gracias por enseñarme que no hay amor como el de la familia, un amor que siempre será incondicional, por tantas enseñanzas, bendiciones, regaños, etcétera y por haberme inculcado a no conformarme y siempre buscar ese algo más. A mis hermanos Víctor y Jesús por el apoyo, muy a su manera, pero sé que cuando necesite de ustedes ahí van a estar para apoyarme al igual que yo para ustedes, porque la familia será familia siempre. A mis tíos, primos, que en cada reunión me brindaban motivación y apoyo para seguir adelante.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme las instalaciones para poder llevar a cabo el presente proyecto, al personal de almacenes, al igual para el laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica a cargo del Dr. Eder Arredondo y los demás compañeros por los materiales y equipos que me facilitaron para poder llevar a cabo una parte experimental y por sus asesorías.

A las clínicas que aceptaron apoyarnos con este proyecto, dándonos la oportunidad de trabajar con ellos para el reclutamiento de la población y a su personal que fueron de gran ayuda para la obtención de los datos.

A mi directora de tesis, la Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez, gracias por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por las enseñanzas y por su ayuda durante la realización del mismo.

A mi co-director, el Dr. Isaías Balderas Rentería, gracias por todo el apoyo que me brindó durante estos dos años, por la paciencia y asesorías que me fueron de gran ayuda, me llevo un gran aprendizaje de su parte, tanto personal como profesional.

A mi comité tutorial, Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo, Dr. Eder U. Arredondo Espinoza, Dra. Yolanda A. Gracia Vásquez por su valiosa asesoría durante cada reunión de comité y por las revisiones al presente trabajo.

A mis amigos, Josué Estrada, Alan Aguillón, Zaul Villanueva, Alan Cedillo, Alberto Moncada, Iván Chávez, etcétera que han estado en las buenas y malas conmigo, gracias por su compañía y amistad a lo largo de todos estos años.

A todos los profesores del área de farmacia que tuve la dicha de conocer, Dra. Lucía, Dr. Omar, Dra. Elizabeth, Dr. Francisco, Dra. Paty, Dra. Rosario, Dra. Mónica, gracias por la contribución que tuvieron para mi formación estos dos años.

DEDICATORIA

A mi madre Rosalinda García Salas, porque sin ella esto no hubiera sido posible, todo esto es por ti y para ti.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Diabetes	1
1.2. Tipos de diabetes y diagnóstico	3
1.3. Tipos de tratamientos	6
1.4. Las biguanidas como tratamiento	7
1.4.1. Mecanismo de acción	8
1.5. Farmacogenética y farmacogenómica	9
1.6. Genética en la diabetes	12
1.7. Farmacogenómica de la metformina	14
1.7.1. OCT1/SLC22A1	15
1.7.2. OCT2/SLC22A2	16
1.7.3. OCT3/SLC22A3	17
1.7.4. MATE1/SLC47A1 y MATE2-K/SLC47A2	17
1.8. Antecedentes	18
1.9. Justificación	23
1.10. Hipótesis	25
1.11. Objetivo general	25
1.11.1. Objetivos específicos	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. Materiales y reactivos	27
2.2. Equipos y ubicación	28

Capítulo	Página
2.3. Metodología	29
2.4. Reclutamiento de candidatos	29
2.4.1. Criterios de inclusión y exclusión	30
2.4.2. Cálculo del tamaño de la muestra	31
2.5. Evaluación antropométrica y pruebas clínicas	32
2.5.1. Fundamento HbA1c	33
2.6. Extracción de DNA	34
2.7. Genotipificación	36
2.7.1. Genotipificación por PCR-RFLP para el SNP rs2289669 del gen MATE1.....	36
2.7.1.1. Diseño de los primers (iniciadores)	37
2.7.1.2. Condiciones de amplificación	37
2.7.1.3. Digestión de fragmentos	39
2.7.2. Genotipificación por PCR en tiempo real para el SNP rs622342 del gen OCT1	39
2.8. Análisis estadístico	42
2.9. Disposición de los residuos generados	43
3. RESULTADOS	44
3.1. Características generales de la población	44
3.2. Características de la población dividida por género	45
3.3. Extracción de DNA y cuantificación del DNA extraído	48
3.4. Genotipificación del SNP rs2289669 en el gen MATE1 por PCR-RFLP	49
3.5. Genotipificación del SNP rs622342 en el gen OCT1 por PCR en tiempo real	51
3.6. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1	55
3.7. Asociación de los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con las variables antropométricas y bioquímicas en la población total	56

Capítulo	Página
3.8. Asociación de los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con las variables antropométricas y bioquímicas en la población clasificada según su IMC	58
3.9. Asociación de los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con la reducción de HbA1c en los pacientes que siguieron el tratamiento	62
3.10. Asociación de los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con la reducción de HbA1c por los modelos de herencia y cálculo de OR	65
4. DISCUSIÓN	68
5. CONCLUSIONES	73
5.1. Perspectivas	74
REFERENCIAS	75
APÉNDICES	82
APÉNDICE A.- INVITACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN	83
APÉNDICE B.- CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	85
APÉNDICE C.- EXPEDIENTE	87

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Criterios de diagnóstico para diabetes	3
2. Criterios de diagnóstico para prediabetes	5
3. Criterios de inclusión	30
4. Criterios de exclusión	30
5. Reactivos utilizados para la amplificación	38
6. Programa de PCR para el equipo	38
7. Condiciones de la digestión	39
8. Fragmentos resultantes del corte enzimático	39
9. Condiciones de reacción para PCR en tiempo real	42
10. Programa de amplificación	42
11. Características generales de la población total	45
12. Características generales de la población dividida por género	46
13. Datos clínicos y antropométricos y su relación con la clasificación del IMC	47
14. Cuantificación DNA genómico	49
15. Frecuencias genotípicas, alélicas y valores de p para el equilibrio de Hardy-Weinberg	55
16. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con las variables de estudio	57

Tabla	Página
17. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con las variables de estudio	57
18. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con las variables de estudio en pacientes con IMC normal	59
19. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con las variables de estudio en pacientes con IMC normal	59
20. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con las variables de estudio en pacientes clasificados con sobrepeso por su IMC	60
21. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con las variables de estudio en pacientes clasificados con sobrepeso por su IMC	60
22. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con las variables de estudio en pacientes clasificados como obesos por su IMC	61
23. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con las variables de estudio en pacientes clasificados como obesos por su IMC	61
24. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con la reducción de la HbA1c	63
25. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con la reducción de la HbA1c	63
26. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con los intervalos de reducción de HbA1c	64
27. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con los intervalos de reducción de HbA1c	65
28. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con la reducción por medio de los modelos de herencia	66
29. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con la reducción por medio de los modelos de herencia	66

Tabla**Página**

30. Calculo de la razón de momios (OR) para rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1	67
--------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de la metformina	7
2. Localización de los transportadores de cationes orgánicos involucrados en la farmacocinética de la metformina	15
3. Distribución de la población dividida por género (n=96)	45
4. Clasificación de la población de estudio conforme al IMC (n=96)	46
5. DNA genómico en gel de agarosa al 1% teñido con RedGel®	48
6. Amplificación de fragmentos de PCR (293 pb) en gel de agarosa al 1% teñido con RedGel® y marcador de PM de 100 pb por banda	50
7. Digestión del producto de PCR con la enzima TaqI en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed®, utilizando un marcador de PM de 100 pb	50
8. Diagrama de discriminación alélica	51
9. Diagrama de amplificación	52
10. Fragmentos de amplificación en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed®, utilizando un marcador de PM de 100 pb	52
11. Diagrama de amplificación del genotipo AA	53
12. Diagrama de amplificación del genotipo CC	53

Figura	Página
13. Diagrama de amplificación del genotipo CA	54
14. Diagrama multicomponente del blanco negativo	54

LISTA DE SIMBOLOS

$\%$	Porcentaje
\geq	Mayor o igual que
$<$	Menor que
$>$	Mayor que

NOMENCLATURA

ADA	Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association)
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
cm	Centímetros
DE	Desviación estándar
dL	Decilitros
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxinucleótido (Deoxynucleotide)
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FAM	Amidita de fluoresceína (Fluorescein amidite)

gl	Grados de libertad
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HCl	Ácido clorhídrico
IMC	Índice de masa corporal
Kg	Kilogramo
m	Metros
MATE	Proteína de extrusión de compuestos tóxicos y fármacos (Multidrug and toxic compound extrusion protein)
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
n	Número de muestra
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
OCT	Transportadores de cationes orgánicos (Organic Cation Transporters)
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PCR-RFLP	Reacción en cadena de la polimerasa – polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso Molecular
PMAT	Transportador de monoamina de membrana plasmática (Plasma Membrane Monoamine Transporter)
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero (Ribonucleic Acid)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphism)
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes

La Diabetes mellitus (DM) se define como una enfermedad endócrino-metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica, con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, que puede estar producida por una deficiencia en la secreción de insulina, una resistencia a la acción de la misma, o una mezcla de ambas (Balderas, 2015). En personas sanas, cuando la cantidad de glucosa en la sangre aumenta, por ejemplo, después de una comida, el páncreas libera insulina para su regulación. La insulina estimula a las células musculares y adiposas a captar la glucosa de la sangre y estimula al hígado para que la metabolice, lo que ocasiona que se normalicen los niveles de glucosa en sangre cuyo rango de valores está considerado entre 80 y 100 mg/dL. En personas diabéticas los niveles de glucosa sanguínea se mantienen por encima del rango normal (Dean y McEntyre, 2004). En su etapa inicial es asintomática; sin embargo, cuando la enfermedad sigue su curso y no se somete a algún tratamiento, la persona puede presentar complicaciones graves para su salud como puede ser: ceguera, amputación de extremidades inferiores, falla renal e incluso una muerte prematura (Hernández-Ávila y Reynoso-Noverón, 2013).

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que hay alrededor de 422 millones de personas en el mundo viviendo con diabetes y su prevalencia ha aumentado en las últimas décadas, siendo blanco de numerosas investigaciones para tratar de encontrar mejores tratamientos para su control, se estima que existen 175 millones de personas con diabetes alrededor del mundo las cuales no han sido diagnosticadas (Cerna y Maresova, 2016). Según reportes de la Federación Internacional de Diabetes, los países que presentan una mayor incidencia de pacientes con esta enfermedad son: China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México.

En México, la prevalencia de diabetes ha aumentado considerablemente, siendo la primera causa de muerte entre las mujeres y la segunda entre los hombres. La Federación Mexicana de Diabetes muestra que los estados con prevalencias más altas de ésta enfermedad son: Ciudad de México, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí; además representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año en su atención y las posibles complicaciones que se puedan presentar con el transcurso de la enfermedad.

En el año 2016 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición exploró el estado de diversas enfermedades crónicas en México, entre ellas, la diabetes en población mayor de 20 años. Y se encontró que la prevalencia pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016 lo que representa 6.4 millones de mexicanos, las mujeres reportan mayores valores de diabetes que los hombres, 10.3% comparado con 8.4%, respectivamente. La mayor prevalencia de diabetes se observa entre los hombres de 60 a 69 años (27.7%), y las mujeres en el mismo rango de edad (32.7%) y de 70 a 79 años (29.8%).

1.2. Tipos de Diabetes y Diagnóstico

Existen diferentes tipos de DM como por ejemplo la diabetes gestacional y la diabetes causada por diversos orígenes (pancreatitis, pancreatocotomía, etcétera), sin embargo; las dos principales son la tipo 1 (dependiente de insulina) y tipo 2 (no dependiente de insulina). La diabetes tipo 2 (DM2) es la forma más común de la enfermedad con un 85 a 90 % de los casos (Reyes *et al.*, 2016).

Para el diagnóstico de la enfermedad se recomiendan una serie de estudios para evaluar el estado glucémico de la persona y poder tener información de su estado de salud, la ADA (American Diabetes Association) establece 4 criterios para el correcto diagnóstico de la enfermedad. A continuación, se presentan en la Tabla 1 los criterios y límites que se establecen.

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para diabetes (ADA, 2018).

Prueba de glucosa en sangre ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L). La prueba debe ser realizada con al menos 8 horas de ayuno
Prueba de tolerancia a la glucosa ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L). La prueba se debe realizar usando una carga de glucosa equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.
HbA1C ≥ 6.5 (48 mmol/mol). El ensayo debe ser realizado en un laboratorio usando un método certificado y estandarizado.
Prueba aleatoria de glucosa en sangre ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia.

Las pruebas deben ser realizadas cuando las personas presenten los síntomas clásicos descritos por la OMS: aumento de la frecuencia urinaria (poliuria), sed (polidipsia), hambre (polifagia) y una reducción de peso; también pueden presentar entumecimiento de las extremidades, dolor en los pies y visión borrosa. Existen casos que no presentan manifestaciones clínicas, en estos casos se debe realizar un tamizaje por parte del médico, el cual tomará en cuenta ciertas consideraciones de riesgo para descartar la presencia de diabetes, personas con las siguientes características podrían presentar diabetes o prediabetes asintomática (ADA, 2018):

- Peso. Personas con sobrepeso u obesas que tengan un IMC ≥ 25 kg/m² tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que personas con peso normal.
- Personas con valores de HbA1c $\geq 5.7\%$ deben ser evaluados anualmente.
- Antecedentes familiares de diabetes.
- Grupo étnico. Los afroamericanos, latinos, nativos americanos e isleños del pacífico presentan mayor predisposición a desarrollar la enfermedad.
- Edad. Se recomienda realizarse estudios de glucosa en sangre a partir de los 45 años.
- Mujeres que hayan sido diagnosticadas con diabetes gestacional deben realizarse chequeos por lo menos cada 3 años.
- Personas con problemas cardiovasculares.
- *Acanthosis nigricans*. Es un padecimiento de la piel que se presenta cuando existe una resistencia a la insulina en donde la piel se engruesa y oscurece en algunas partes del cuerpo, principalmente en el cuello y axilas.
- Niveles de colesterol HDL < 35 mg/dL y/o niveles de triglicéridos > 250 mg/dL.

- Inactividad física. Llevar una vida sedentaria y una dieta no balanceada se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes e hipertensión.

Personas que presenten algunas características no necesariamente presentarán la enfermedad, existen individuos cuyos niveles de glucosa no cumplen con los valores establecidos, pero son más altos de lo normal, a los pacientes con esta condición se les denomina prediabéticos, los cuales están en un alto riesgo de desarrollar diabetes. La prediabetes está asociada con la obesidad (en especial con obesidad abdominal o visceral), dislipidemia con altos niveles de triglicéridos y con hipertensión (ADA, 2018). Los criterios para el diagnóstico de prediabetes se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios de diagnóstico para prediabetes (ADA, 2018).

Prueba de glucosa en sangre: entre 100 mg/dL (5.6 mmol/L) y 125 mg/dL (6.9 mmol/L).
Prueba de tolerancia a la glucosa: entre 140 mg/dL (7.8 mmol/L) y 199 mg/dL (11.0 mmol/L).
HbA1c: entre 5.7 y 6.4 % (39-47 mmol/mol).

1.3. Tipos de Tratamientos

La diabetes tipo 1 (DM1) (anteriormente denominada diabetes insulino dependiente o juvenil) se caracteriza por la ausencia de la síntesis de insulina por las células beta las cuales son atacadas por el sistema inmune, su principal tratamiento es la dosificación de insulina exógena para el control de la hiperglucemia provocada por la destrucción de éstas células.

La DM2 es el tipo más común de la enfermedad y en algunos pacientes se ha observado que con una dieta adecuada y un régimen de actividad física, los niveles de glucosa sanguínea disminuyen considerablemente, por lo que es la primera terapia no farmacológica recomendada. Por otro lado, existe una amplia gama de tratamientos farmacológicos para esta enfermedad, debido a una elevada variabilidad de efectividad terapéutica entre pacientes, explicado por una compleja interacción de factores biológicos y no biológicos (Luo *et al.*, 2018). Los medicamentos más comunes son los siguientes (Balderas, 2015):

- Secretagogos de insulina (Sulfonilureas)
- Meglitinidas (Repaglinida y Nateglinida)
- Sensibilizadores de insulina (Biguanidas como la Metformina)
- Tiazolidinedionas o glitazonas (Rosiglitazona y Pioglitazona)
- Inhibidores de la α -glucosidasa (Acarbosa y Miglitol)
- Inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa-4 [DPP-4] (Sitagliptina, Vidagliptina, Saxagliptina, etcétera)
- Análogos del péptido similar al glucagón GLP-1 (Exenatida y Liraglutida)

- Análogos de amilina (Pramlinitida)
- Secuestradores de ácidos biliares (Colesevelam)
- Inhibidores del transportador de sodio-glucosa de tipo 2 (Canagliflozina y Dapagliflozina)

1.4. Las Biguanidas como Tratamiento

Las biguanidas se identificaron en los extractos de la planta *Galega officinalis*, los cuales se utilizaban en la Edad Media para la diabetes, la metformina surge en el año 1922 por los trabajos de Emil Werner y James Bell, ellos descubrieron su poder antihiperglucemiante en conejos (Ortega, 2003).

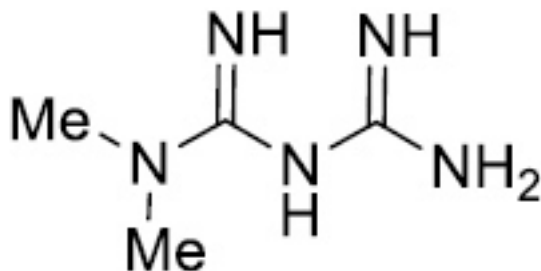


Figura 1. Estructura química de la metformina.

La metformina es una biguanida disustituida (N-1,1-dimetilbiguanida) como se observa en la figura 1 presenta dos grupos metilos unidos a un nitrógeno; que entre sus principales funciones clínicas están la disminución de la gluconeogénesis en el hígado y el incremento en la sensibilidad de los tejidos muscular y graso a la acción de la insulina (Balderas, 2015; Kleinberger y Pollin, 2015). La metformina no se liga a las proteínas plasmáticas, no es metabolizada por el hígado, tiene una vida media corta y es eliminada por vía renal (Velázquez *et al.*, 2002).

Éste medicamento es el más prescrito para el tratamiento de la DM2; el tratamiento farmacológico, en conjunto con una modificación en el estilo de vida del paciente (dieta, control de peso y actividad física) ha obtenido buenos resultados, o en combinación con algún otro antidiabético. La metformina es efectiva y segura, además de ser un medicamento de bajo costo, tiene algunos otros beneficios, como reducir el riesgo de eventos cardiovasculares (ADA, 2018), la reducción de peso, entre otros. Es utilizada por al menos 120 millones de personas alrededor del mundo. La metformina se considera un agente antihiper glucémico porque disminuye las concentraciones de glucosa en la sangre sin causar una hipoglucemia en los pacientes (Arocha *et al.*, 2017).

La metformina siempre debe administrarse junto con los alimentos o inmediatamente después de ellos. La dosis inicial es de 500 mg a 850 mg cada 12 horas y los ajustes a la dosis deben ser de 500 mg dependiendo de la respuesta del paciente. La dosis máxima por día es de 2500 mg, dosis mayores a esta pueden desencadenar lactoacidosis. En niños y jóvenes de 10 a 16 años, la dosis máxima al día es de 2000 mg (Rosas *et al.*, 2009).

1.4.1. Mecanismo de Acción

La metformina reduce la glucosa sanguínea por la inhibición de la producción de glucosa en el hígado e incrementa la sensibilidad a la insulina, lo que ocasiona que la glucosa circulante sea mayormente captada y utilizada, además incrementa el número de transportadores en el músculo esquelético, disminuye la absorción de glucosa en el intestino e inhibe la síntesis de lípidos (Rena *et al.*, 2013; Dawed *et al.*, 2016).

El mecanismo molecular por el cual la metformina causa estos efectos aún no es elucidado completamente; sin embargo, se sabe que inhibe el complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria, lo que resulta en una disminución de ATP (Adenosín trifosfato) y un incremento en los niveles de AMP (Adenosín monofosfato). Este desbalance entre la relación ATP/AMP activa a AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y mediante esta proteína se da la supresión de la gluconeogénesis (Arrocha *et al.*, 2017).

La AMPK está involucrada en el balance energético no solo de las células específicas, sino de todo el organismo en respuesta a situaciones de estrés metabólico o disponibilidad de nutrientes. Se le ha involucrado en los mecanismos responsables del desarrollo de obesidad y otros padecimientos. La AMPK se activa por un aumento en la relación AMP/ATP lo que indica que la energía celular está comprometida (esto ocurre durante periodos de alta demanda de energía y bajo diferentes tipos de estrés celular, lo que ocasiona una depleción de ATP). Al ser activada por medio de fosforilación se inician rutas metabólicas que permitirán reponer el ATP consumido (Miranda *et al.*, 2007).

1.5. Farmacogenética y Farmacogenómica

El primer borrador de la secuencia del genoma humano fue descifrado en el año 2001 y para el 2003 se presentó la versión final. Dentro de los resultados de este proyecto se encontró que el genoma humano codifica para alrededor de 25,000 a 30,000 genes que corresponde a cerca de 1.5% de los 3 mil millones de nucleótidos que representan el genoma completo del *Homo sapiens* (Checa Caratachea, 2007).

Otro hallazgo importante de este proyecto fue la presencia de variaciones genéticas entre los individuos, a las que se les adjudican las características particulares y únicas que

confieren dicha individualidad a las personas. Más allá de rasgos triviales asociados a la apariencia física, estas variaciones genéticas denominadas polimorfismos han permitido entender más a fondo las respuestas poblacionales a factores externos como la predisposición a enfermedades o la variabilidad en la respuesta a fármacos (Bravo *et al.*, 2011).

Estos polimorfismos pueden presentarse como inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetidas y los más comunes son los polimorfismos de nucleótido único (SNP por sus siglas en inglés) (Checa Caratachea, 2007). Para que un polimorfismo sea clasificado como tal, éste debe ocurrir con una frecuencia mayor de 1% en la población. Estas variaciones pueden o no causar alguna alteración en la función de la proteína y su fenotipo, por ejemplo; si algún polimorfismo se ubica dentro de la región codificante de un gen, éste cambio puede causar alguna sustitución de un aminoácido por otro, lo que provocaría un cambio en la proteína codificante; un polimorfismo ubicado en el promotor puede alterar el nivel de transcripción de ese gen; un polimorfismo localizado en los límites entre un intrón y un exón de un gen puede provocar que se sintetice una proteína incompleta o inactiva por el resultado de un empalme (splicing) incorrecto del RNAm (Pérez, 2005).

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica que presenta varios genotipos posibles y se considera como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Un ejemplo simple para el estudio de un polimorfismo es el siguiente: la existencia de dos alelos (G y A) que se piensa que uno de ellos se encuentra relacionado al desarrollo o predisposición a una enfermedad (A), identificados los alelos se procede a recolectar información de la

incidencia de éstos alelos en alguna población para obtener los diferentes genotipos posibles (GG, GA y AA).

Los 4 modelos principales para el análisis de un polimorfismo son los siguientes (Iniesta *et al.*, 2005):

- **Modelo dominante:** Este modelo establece que una única copia de A es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en magnitud, lo que quiere decir es que tanto los heterocigotos GA y homocigotos AA presentarán el mismo riesgo.
- **Modelo recesivo:** Establece que son necesarias 2 copias de A para modificar el riesgo, por lo que, heterocigotos GA y homocigotos del alelo más frecuente GG tienen el mismo riesgo.
- **Modelo aditivo.** Establece que cada copia de A va a modificar el riesgo en una cantidad aditiva, es decir, los homocigotos AA van a presentar el doble de riesgo que los heterocigotos GA.
- **Modelo co-dominante:** En este modelo, cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos (He) y homocigotos variantes (Va) por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente.

A raíz de la publicación del genoma humano, surgieron las llamadas ciencias genómicas que, como una variante de la genética, permiten hacer un análisis en el genoma completo de las personas, para responder a las diversas variaciones poblacionales a factores medioambientales (Banda *et al.*, 2010). Así, surge la medicina genómica cuyo propósito es evaluar la predisposición a enfermedades por una determinada población en función del patrón genético de la misma (Daudén, 2007), o la farmacogenómica que, a su

vez, evalúa las variaciones en la respuesta terapéutica de un medicamento en una población y su asociación con las variantes en el genoma que dicha población pudiera tener (Bravo *et al.*, 2011). La farmacogenómica puede abarcar estudios asociados a una variación en la respuesta farmacocinética si las variaciones genéticas corresponden a genes asociados al proceso de absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco o bien a la respuesta farmacodinámica, cuando se involucra a los receptores o blancos terapéuticos del fármaco y que tienen que ver con una mayor o menor eficiencia en la respuesta biológica por parte del paciente (Bravo *et al.*, 2011).

La diferencia entre la farmacogenómica y la farmacogenética es que la primera analiza al mismo tiempo varios genes o el genoma completo, mientras que la segunda que fue una herramienta del pasado y, debido a las limitaciones técnicas, permitía un limitado análisis gen por gen de forma individual.

La farmacogenética y más recientemente la farmacogenómica permitirán en un futuro cercano ofrecer una alternativa de tratamientos más personalizados (Singh *et al.*, 2016), con lo que se pretende encontrar el medicamento más adecuado dependiendo del genoma del paciente. A nivel mundial hay un avance en este tipo de terapias, aunque México se encuentra aún en desarrollo (Cuautle-Rodríguez *et al.*, 2013).

1.6. Genética en la Diabetes

La influencia de la genética en el desarrollo de la diabetes ha sido ampliamente estudiada a nivel mundial, y se conocen ciertos genes que están relacionados con un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad.

Los 7 genes que se han considerado afectan la secreción de la insulina en las células β son los siguientes (Balderas, 2015):

- TCF7L2. El cual es un factor de transcripción, que activa la vía de señalización Wnt y por consiguiente anula la síntesis de proglucagón.
- HHEX. Se estudia para comprobar si actúa como regulador en la diferenciación y fisiología del páncreas.
- CDKNA. Codifica al inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p16INK4 el cual se ha encontrado inactivado en el 95 % de los casos de cáncer pancreático.
- IGF2BP2. Es la proteína 2 de unión a RNAm del factor 2 de crecimiento semejante a la insulina y se han caracterizado variantes transcripcionales las cuales codifican diferentes isoformas.
- SLC30A8. Codifica para un transportador de zinc que se relaciona con la secreción de insulina en los seres humanos y se encuentra que ciertos alelos de este gen pueden incrementar el riesgo de desarrollar la enfermedad.
- JAZF1. Las variantes en este gen se han relacionado con un incremento en el riesgo de desarrollar DM2 y de padecer cáncer de próstata.

Además de los genes involucrados en el desarrollo de diabetes o predisposición a esta enfermedad, se han realizado estudios para relacionar el efecto de los medicamentos, así como los genes relacionados con ellos, para implementar la medicina personalizada, dando pie al desarrollo de la farmacogenómica.

1.7. Farmacogenómica de la Metformina

La metformina es el medicamento más utilizado para el tratamiento de la DM2 alrededor del mundo por lo que resulta esencial, evaluar la influencia del fondo genético sobre la efectividad terapéutica y la respuesta a dicho fármaco en las poblaciones. Actualmente se conocen ciertos genes que están involucrados en la eficacia de la metformina, algunos son altamente polimórficos y se tienen reportes de que cambios en ellos ocasionan un cambio en la efectividad de la metformina en los pacientes (Manolopoulos *et al.*, 2011).

Para entender la farmacogenómica de la metformina es necesario analizar su farmacocinética. La metformina es una molécula hidrofílica que es transportada por medio de transportadores de cationes orgánicos en el intestino, hígado y riñones, la distribución pasiva es limitada debido a su baja liposolubilidad (Figura 2). En el intestino el transportador PMAT (codificado por el gen SLC29A4) es el primer involucrado en la absorción de la metformina, estos transportadores se ubican en el lado luminal de los enterocitos. OCT3 (transportador de cationes orgánicos, codificado por SLC22A3) también se ubica en el lado luminal de los enterocitos y puede que contribuya con PMAT en el intestino. OCT1 se expresa en la membrana basolateral de enterocitos y es el responsable del transporte de metformina al líquido intersticial. Además, OCT1 y OCT3 se expresan en la membrana basolateral de los hepatocitos.

MATE1 (codificado por SLC47A1) contribuye a la eliminación de la metformina y está presente en hígado y riñones, en conjunto con OCT2 que se ubica en riñón y es el

encargado de introducir la metformina al riñón para después ser eliminada en orina por medio de MATE1 y MATE2 (codificado por SLC47A2) (Pawlyk *et al.*, 2014).

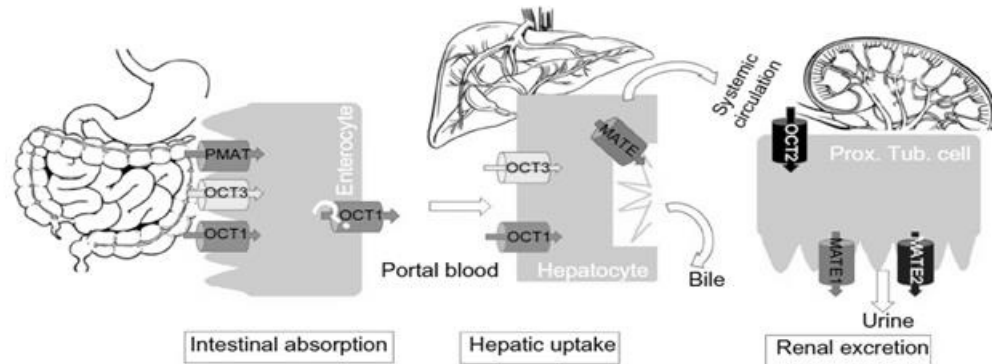


Figura 2. Localización de los transportadores de cationes orgánicos involucrados en la farmacocinética de la metformina. Tomado de Dawed *et al.*, 2016.

1.7.1. OCT1/SLC22A1

El gen SLC22A1 localizado en la región 6q25.3 es altamente polimórfico y codifica para OCT 1 (Todd y Florez, 2014), el cual es un transportador de cationes orgánicos, que es expresado en el hígado e intestino y tiene un rol importante en la absorción, distribución y excreción de algunos xenobióticos (Meyer *et al.*, 2017), entre los cuales se encuentran algunos medicamentos como la metformina y la cimetidina. Estas moléculas median el transporte electrógeno de algunos pequeños cationes orgánicos que tienen estructuras moleculares diferentes y son independientes del gradiente de sodio (Sakata *et al.*, 2004).

Se han encontrado 25 polimorfismos en este gen, tres de los cuales presentaron reducción en su actividad transportadora (Arg61Cys, Cys88Arg y Gly401Ser) (Kerb *et al.*, 2002). Además, se han encontrado otros 13 polimorfismos ubicados en diferentes

partes del gen, por ejemplo, en el exón 1 del gen se han encontrado los siguientes polimorfismos: rs2297373, rs1867351, mientras que en el exón 2 se encontró rs683369, para el exón 6 y 7 se encontraron rs2282143 y rs628031, respectivamente. En los intrones es donde se han encontrado la mayoría de los polimorfismos, rs4646272 en el intrón 1, rs4646273 y rs3737088 en el intrón 2, rs4646276 en el intrón 4, rs2282142 en el intrón 5 y rs4646281, rs2297374 y rs622591 en los intrones 7, 9 y 10, respectivamente (Itoda *et al.*, 2004), otro polimorfismo que se ubica en la región intrónica es el rs622342, el cual se encuentra en el intrón 9 (Jacobs *et al.*, 2014) y se ha comprobado que influye en la respuesta terapéutica a la metformina, siendo el de mayor interés terapéutico (Tkáč *et al.*, 2013).

1.7.2. OCT2/SLC22A2

OCT2 se reporta que es el encargado de cerca del 80% del aclaramiento renal de metformina y a comparación de OCT1 tiene menos variaciones en su secuencia (Wilson *et al.*, 2017). Se expresa en el túbulo proximal de los riñones, y media la secreción renal de pequeños cationes orgánicos, en estudios se ha observado que este transportador es el responsable de la entrada de metformina a las células del túbulo renal y se ha observado que variaciones en la secuencia nucleotídica afectan significativamente la función de este transportador (Chen *et al.*, 2009).

1.7.3. OCT3/SLC22A3

Se han estudiado muy poco las variantes en este gen y de su influencia en la efectividad de la metformina, se ha observado en ensayos *in-vitro* que altera la absorción de sustratos incluyendo la metformina en (Todd y Florez, 2014).

Está ampliamente distribuido en el cuerpo, mayormente en el hígado, cerebro y músculo esquelético, aunque no existen muchos estudios que relacionen este transportador con la variabilidad entre individuos con la respuesta a la metformina. Se ha encontrado que los SNP rs8187717 y rs68187715 presentan una influencia significativa en el transporte de metformina en estudios *in vitro* (Hosseyini-Talei *et al.*, 2017).

1.7.4. MATE1/SLC47A1 y MATE2-K/SLC47A2

Estos transportadores renales de salida presentan una baja frecuencia de variaciones en sus regiones codificantes, se ha visto que *in vitro* se reduce su función transportadora, el gen SLC47A1 localizado en la región 17p11.2 codifica para el transportador MATE1 que se localiza en el lado luminal de los túbulos proximales renales y canalículos biliares y está involucrado en el transporte de metformina fuera de la célula hacia la bilis y orina (Becker *et al.*, 2009).

En los genes MATE1 y MATE2-K se han encontrado 11 y 2 SNPs, respectivamente, de los cuales algunos afectan su función, el polimorfismo G64D (rs77630697) y V480M (rs76645859) ubicados en los exones 2 y 16 causan una pérdida completa de la función (Yonezawa e Inui, 2011). Con respecto al polimorfismo rs2289669

ubicado en el intrón 10 de MATE1 no se tienen datos de si aumenta o disminuye la actividad transportadora; sin embargo, en estudios recientes se ha reportado que presenta efectos benéficos en la efectividad terapéutica de ciertos fármacos, entre ellos la metformina (Tkáč et al., 2013).

1.8. Antecedentes

Es importante resaltar la importancia del adecuado tratamiento para la diabetes, la cual es una enfermedad con alta prevalencia alrededor del mundo y es responsable de millones de muertes cada año, en México es la segunda causa de muerte. Por eso es recomendable mantener un buen control de la glucemia, así como llevar una dieta balanceada y practicar ejercicio regularmente. Año con año se buscan nuevas alternativas para combatir esta enfermedad y es por eso que los investigadores dan su apoyo a tratar de encontrar nuevos tratamientos o mejorar los ya existentes.

Actualmente en México no se cuenta con estudios disponibles que relacionen los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con el efecto terapéutico de la metformina, esto debido a la dificultad de llevar a cabo un estudio de este tipo por las limitaciones que se tienen, entre las que destacan la dificultad para obtener la muestra de la población, y, además, el apego al tratamiento por parte de los pacientes.

En cambio, en otras poblaciones ya se han realizado trabajos de los SNP antes mencionados. Para MATE1 se han reportado las frecuencias alélicas en afroamericanos, chino americanos, japoneses y mexicoamericanos (Nies *et al.*, 2016).

El primer reporte para los polimorfismos rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE fue realizado por Becker y cols en 2010, donde evaluaron ambos SNPs (rs2289669 en MATE1 y rs622342 en OCT1). Este estudio fue el pionero para que los SNPs fueran considerados de importancia en el efecto terapéutico de la metformina y el estudio de ellos en otras poblaciones para poder evaluar el comportamiento en otras poblaciones diferentes.

Los estudios realizados para evaluar las variaciones en la respuesta terapéutica de la metformina se han llevado a cabo sobre genes que codifican transportadores asociados al metabolismo de xenobióticos y que se conocen como OCT1, OCT2, OCT3 y MATE1. El presente trabajo se centrará en OCT1 y MATE1. Uno de los primeros reportes sobre el estudio de polimorfismos en el gen OCT1 fue realizado por Sakata y cols. en 2004 en el que analizaron las propiedades funcionales de las variantes de OCT1 en población japonesa, mientras que para MATE1, Becker y cols. reportaron en el 2009, la asociación del SNP rs2289669 en dicho gen, con el efecto hipoglucemiante de la metformina en pacientes caucásicos que presentaron DM2. Evaluando una población de 116 personas (69 mujeres y 47 hombres) determinando los niveles de HbA1c, así como factores que pudiesen alterarlos tales como: edad, sexo, y los niveles basales de HbA1c antes de comenzar el estudio. La dosis promedio de metformina administrada a los pacientes fue de 741 mg diarios en dosis única por 120 días. Ellos encontraron una asociación significativa entre el alelo AA del SNP rs2289669 y el aumento en el efecto hipoglucemiante de la metformina.

Becker y col. en el mismo año (2009) estudiaron la asociación del SNP rs622342 en OCT1 con la efectividad de la metformina en 102 personas (62 mujeres y 42 hombres)

estudiando los mismos parámetros que se evaluaron en el estudio anterior con MATE1. En este caso la dosis promedio de metformina fue de 677 mg diarios. Los investigadores concluyeron que los pacientes con genotipo CC tienen una menor respuesta comparado con los pacientes con genotipo AA.

En un estudio realizado en personas caucásicas por Becker y cols. en 2010, se evaluó el efecto del polimorfismo rs622342 A>C en OCT1 y rs2289669 G>A en MATE1, que para este último se ha asociado el alelo AA con una reducción mayor de los niveles de glucosa por efecto de la metformina (Becker, 2009). Los datos para este estudio fueron tomados del estudio Rotterdam, en el que participaron 98 pacientes, los cuales cumplían con todos los parámetros necesarios para ser incluidos entre los que destacan personas caucásicas mayores de 55 años. Las características consideradas como factores importantes que podrían afectar los cambios en los niveles de HbA1c fueron: edad, sexo, valor de la última HbA1c antes de comenzar el estudio y la dosis promedio diaria de metformina prescrita fue de 541 mg. Ellos encontraron que el efecto del alelo A en el polimorfismo rs622342 de OCT1 fue el que tuvo la mayor disminución en los niveles de HbA1c.

Tkáč y cols. en 2013 estudiaron los SNPs de los genes OCT1 (rs622342) y MATE1 (rs2289669) con la respuesta a la metformina en pacientes con DM2. La población fue de 148 personas caucásicas; la edad promedio fue de 57.5 ± 0.9 años, el índice de masa corporal (IMC) medio fue de 31.5 ± 0.4 kg/m². Pacientes con tumores malignos, desórdenes endocrinos, cirrosis hepática y enfermedades inflamatorias sistémicas, fueron excluidos. Fueron incluidos aquellos pacientes sin tratamiento previo (pacientes naïve) con un rango de HbA1c de 7-12%. La HbA1c fue medida una semana antes de comenzar

con el tratamiento y la segunda medición se realizó a los 6 meses del tratamiento. La HbA1c fue medida usando un método turbidimétrico y la genotipificación fue realizada mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real con una sonda marcada para OCT1 y un amplicón pequeño para MATE1. Ellos encontraron que para el genotipo AA en MATE 1 se dio una reducción significativa en los niveles de HbA1c en comparación con los pacientes con alelo G. En el caso de OCT1 no se encontraron asociaciones a la respuesta terapéutica del fármaco.

En 2014 Umamaheswaran y cols. realizaron un estudio para ver la influencia del polimorfismo rs622342 en OCT1 a la respuesta terapéutica de la metformina en pacientes con DM2 del sur de la India. Se evaluaron 122 pacientes recién diagnosticados con DM2 (75 mujeres y 47 hombres), se les midió la presión sanguínea, la HbA1c y el IMC en la primera visita y a las 12 semanas de estudio. El nivel de glucosa en sangre (en ayuno y postprandial) fue medido en cada visita. Todos los pacientes comenzaron con una dosis de 500 mg y una modificación en su dieta diaria, el estudio tuvo una duración de 3 meses. La genotipificación del SNP en OCT1 fue realizada por PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan en ensayos por triplicado. Umamaheswaran y cols. encontraron una asociación significativa entre el polimorfismo rs622342 en OCT1 y la respuesta a la metformina, los pacientes con genotipo AA presentaron mejores resultados al tratamiento con metformina comparado con los pacientes con genotipo CC del estudio.

He y cols. en 2015 estudiaron el polimorfismo rs2289669 en MATE1 en pacientes diabéticos de China y su relación con la respuesta a la metformina. Fueron reclutados 202 pacientes recién diagnosticados con DM2 (125 hombres y 95 mujeres con un rango de edad de 55.97 ± 7.78 años). Pacientes con DM1, enfermedades cardiovasculares,

disfunción renal o hepática fueron excluidos del estudio. El estudio tuvo una duración de un año. Los pacientes fueron divididos en tres grupos dependiendo de su genotipo, grupo GG (54), otro GA (103) y el último AA (63). La genotipificación fue realizada por PCR-RFLP (PCR asociado a análisis de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción, por sus siglas en inglés) y se usaron los siguientes primers:

F5'-TCAGTTTCCACAGTAGCGTCG-3' y R5'-GACACTGGAAGCCACACTGAA-3'.

Los productos de la PCR fueron digeridos con la endonucleasa de restricción Taq I. Al final del estudio He y cols. concluyeron que para el grupo AA hubo un decremento en los niveles de HbA1c significativos comparado con los grupos GG y GA.

Otro polimorfismo estudiado en el gen OCT1 ha sido el rs594709. En 2016 Xiao y cols. realizaron un estudio para evaluar el impacto de este polimorfismo en OCT1 y el ya mencionado rs2289669 en MATE1 en la respuesta a metformina en pacientes chinos con DM2 y pacientes sanos. Participaron 267 pacientes con DM2 (143 hombres y 124 mujeres) y 182 pacientes sanos (86 hombres y 96 mujeres). Pacientes con DM1, diabetes gestacional, hipertensión y daño hepático severo no fueron incluidos en el estudio. De los 267 pacientes, 53 fueron pacientes naïve. Ninguno de los pacientes había sido tratado con algún secretagogo de insulina ni habían recibido tratamiento de metformina por 3 meses consecutivos. Se recolectó información antes y al final de los 6 meses del estudio, de los siguientes parámetros: IMC, nivel de glucosa en ayunas, nivel de glucosa postprandial, nivel de insulina en ayunas, nivel de insulina postprandial, HbA1c, colesterol total, triglicéridos, LDL y HDL. La genotipificación fue hecha usando secuenciación directa, y se utilizaron los siguientes primers para amplificar el polimorfismo rs594709 en OCT1:

5'-GGCGCTTCCCACACTCAT-3'(sense) y 5'GAGGAAAGCTCCACATGTAACC-3'

(antisense), mientras que para la secuenciación de la región del polimorfismo en MATE1 la secuencia de los primers empleados es: 5'CCTGACCTCTGTCCCTATT3'(sense) y 5'GACTTCCGTGCCTGCT3'(antisense). Encontraron que existe una interacción entre los polimorfismos rs597409 y rs2289669 en OCT1 y MATE1, respectivamente, y la efectividad terapéutica de metformina en pacientes chinos.

Mousavi y cols. en 2017 evaluaron las frecuencias genotípicas del SNP rs2289669 en MATE1 en población iraní y su relación con la efectividad de la metformina, en el estudio participaron 71 personas diagnosticadas de diabetes conforme a los criterios de la Asociación Americana de Diabetes, pacientes con daño renal crónico, desórdenes endocrinos, cirrosis y enfermedades inflamatorias sistémicas fueron excluidos del estudio. Los pacientes incluidos tenían un rango de HbA1c de 6.5-11%, la HbA1c fue tomada una semana antes de iniciar con el tratamiento y 6 meses después, la genotipificación fue realizada conforme al método descrito por Ye y cols (Ye *et al.*, 2001). Concluyeron que existía una asociación significativa entre el genotipo GA y la reducción de HbA1c a causa del tratamiento con metformina, y que en el modelo dominante para el alelo A (AA+AG vs GG) los pacientes con alelo A tienen la reducción más alta de HbA1c.

1.9. Justificación

Según las estadísticas de la OMS el número de casos de diabetes se ha cuadruplicado en todo el mundo desde 1990, actualmente existen 422 millones de adultos con diabetes, lo que corresponde a que 1 de cada 11 personas en el mundo tiene la enfermedad. La genética, la edad y la historia familiar incrementan el riesgo de desarrollar diabetes. En México se tiene un alto grado de incidencia entre personas adultas, y

recientemente en jóvenes, por lo que los sistemas de salud buscan encontrar terapias más eficaces para su tratamiento o bien tratar de mejorar los tratamientos ya existentes.

La metformina es el fármaco de primera elección tanto en pacientes obesos como normopeso, existe evidencia que es eficaz tanto en monoterapia como en asociación con otros fármacos orales e insulina (Mata, 2008). A pesar de sus amplias ventajas en comparación con las otras alternativas farmacológicas que existen, la metformina presenta una gran variabilidad inter-individuos, esto se puede deber a la relación que existe entre el fondo genético y la farmacocinética de la metformina (Crespo, 2009).

En este sentido, se han identificado transportadores que están involucrados en la farmacocinética de la metformina, como son: OCT1, OCT2, OCT3, MATE1, entre otros; siendo los más relevantes OCT1 y MATE1, los cuales son encargados del ingreso de la metformina a los hepatocitos (OCT1) y de la excreción de la misma (MATE1). Se han identificado ciertos polimorfismos que se relacionan con un efecto significativo en la farmacocinética de la metformina, entre los que destacan: rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1, que se ha observado que se asocian con una respuesta en la efectividad de la metformina por medio de la comparación del genotipo con la reducción de HbA1c resultado del consumo de metformina (Viollet *et al.*, 2012).

Por lo que una opción innovadora que podría ayudar a optimizar el adecuado y eficaz uso de los diferentes esquemas de tratamiento, sería identificar las poblaciones de pacientes desde el punto de vista genético que responden mejor a uno u otro grupo de medicamentos, objetivo que corresponde a la farmacogenómica, la cual trata de explicar la relación fármaco-gen.

Por tal motivo, en el presente proyecto se propone identificar la influencia que ejercen los polimorfismos rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 que están involucrados en el metabolismo de la metformina sobre la eficacia terapéutica de este fármaco.

Si se encuentra una asociación significativa entre el origen genético de la población estudiada y la respuesta al fármaco, se puede eventualmente sugerir en función de su genoma individual tanto las dosis adecuadas del fármaco o bien los esquemas terapéuticos que mejor se apeguen a un grupo de pacientes con un patrón genético particular.

1.10. Hipótesis

Los genotipos AA del polimorfismo rs622342 en el gen OCT1 y rs2289669 en el gen MATE1 en pacientes del noreste de México con diabetes mellitus tipo 2, responderán mejor al tratamiento con metformina, reduciendo en mayor medida los niveles de HbA1c.

1.11. Objetivo General

Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs622342 en el gen OCT1 y rs2289669 en el gen MATE1 y evaluar su posible asociación con la efectividad terapéutica de la metformina en pacientes con DM2 del noreste de México.

1.11.1. Objetivos específicos

- Reclutar posibles candidatos que cumplan con los criterios de inclusión.
- Evaluar parámetros antropométricos y socio-demográficos para contar con una base de datos.
- Determinar los valores de hemoglobina glucosilada, al inicio del estudio y 3 meses después del tratamiento con metformina.
- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs622342 del gen OCT1 y rs2289669 del gen MATE1 en la muestra.
- Evaluar estadísticamente la asociación de las frecuencias alélicas en los polimorfismos rs622342 del gen OCT1 y rs2289669 del gen MATE1 con la respuesta terapéutica a la metformina.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales y Reactivos

Para la realización del proyecto se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5 mL, 0.5 mL y microtubos para PCR, puntillas y micropipetas de diferentes capacidades (10, 100, 1000 μ L), tubos BD Vacutainer® con EDTA.

Para la determinación de HbA1c: Se utilizó el Kit Glycohemoglobin Reagent Set de TECO DIAGNOSTICS con número de lote 68069 y fecha de caducidad 07/2018.

Para la extracción de DNA se utilizaron los siguientes reactivos: TSNT, cloroformo, fenol grado molecular, etanol absoluto, etanol al 70%, TAE 1X y agua MiliQ estéril.

Para la técnica de PCR-RFLP los reactivos utilizados fueron los siguientes: Green Taq DNA Polymerase, 10x Taq Buffer, Stabilized dNTPs de GenScript®, 50mM $MgCl_2$ de Bioline, primer FWD 5-TCAGTTTCCACAGTAGCGTCG-3, primer REV 5-AGCACCTGTAATCAGCAGGGA-3, sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la UNAM, buffer de carga, GelRed® de Biotium, agarosa grado moléculas de Sigma-Aldrich y DNA purificado. Para la digestión los reactivos fueron: Enzima TaqI, MULTI-

CORE™ 10x Buffer, Bovine Serum Albumin, Acetylated (BSA), todos ellos de Promega, TBE 1X y agua estéril miliQ.

Para la técnica de PCR en tiempo real los reactivos utilizados fueron los siguientes: Sondas TaqMan® SNP Genotyping Assay específicas para rs622342, TaqMan Genotyping Master Mix, agua miliQ estéril y DNA purificado.

2.2. Equipos y Ubicación

Para la realización del presente proyecto se utilizaron los siguientes equipos:

- Equipo de antropometría: Báscula, estadímetro, cintas metálicas para las determinaciones antropométricas, ubicadas en la Farmacia Universitaria “QFB Emilia E. Vásquez Farías” de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.
- Equipo para extracción de DNA genómico: Balanza Analítica AND Company Modelo HR-250A con número de serie 6A7600905, Microcentrífuga marca LABNET modelo Spectrafuge 16M con número de serie 05060736, ubicados en el Laboratorio de Farmacobiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.
- Equipo para PCR-RFLP: Termociclador marca TECHNE modelo TC73R con número de serie 125041-1R, cámara de electroforesis marca FisherBiotech sin número de serie, Fuente de poder marca Thermo Electron modelo 105ECA-115 con número de serie 06J4306857A, ubicados en el Laboratorio 4 de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.
- Equipo para PCR en tiempo real: Equipo StepOne™ Real-Time PCR system de Applied Biosystems con número de serie 271001891, ubicado en el Laboratorio

de Ingeniería Genética y Genómica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

2.3. Metodología

Para el desarrollo del proyecto y el cumplimiento de objetivos se estableció la siguiente estrategia:

1. Reclutamiento de candidatos.
2. Selección de candidatos.
3. Evaluación antropométrica y pruebas clínicas.
4. Extracción de DNA genómico.
5. Genotipificación.
6. Evaluación estadística.

2.4. Reclutamiento de Candidatos

Se reclutaron pacientes de nacionalidad mexicana, residentes del estado de Nuevo León que aceptaron participar en el estudio y que cumplieron con los criterios de inclusión.

Los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (Tabla 3) se les aplicó una encuesta para conocer información heredofamiliar, enfermedades, medicamentos que estuvieran tomando, adicciones, etcétera, esto con el fin de tener una base de datos de ellos.

Además, se les pidió firmar un consentimiento informado donde se les explicó el objetivo del estudio y posibles complicaciones que se podían presentar durante la

extracción de sangre, se les informó que sus datos serían manejados de manera confidencial y que iban a ser manejados por un número de folio asignado por el investigador a cargo.

2.4.1. Criterios de Inclusión y Exclusión

Los criterios de inclusión y exclusión se presentan en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Criterios de inclusión.

Hombres y mujeres mayores de 18 años.
Que estén de acuerdo con el consentimiento informado.
Pacientes con diagnóstico reciente de DM2.
Cumplir con el tratamiento con metformina por 3 meses como mínimo.

Tabla 4. Criterios de exclusión.

Que se encuentren bajo algún tratamiento para control de la hiperglucemia.
Problemas renales y/o hepáticos.
Que no estén de acuerdo con el consentimiento informado.
Mujeres embarazadas.
Personas con DM1.
Que no cumplan con el tratamiento de metformina por 3 meses.

2.4.2. Cálculo del Tamaño de la Muestra

Para el cálculo del tamaño de la muestra se determinó por medio de la fórmula para estudios de tipo cualitativo la cual se reporta mediante la proporción del fenómeno en estudio en alguna población de referencia; en específico se utilizó la fórmula para población finita (Fórmula 1) (Aguilar, 2005).

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$n = \frac{N Z^2 pq}{d^2 Z^2 (N - 1) + Z^2 pq}$$

Fórmula 1. Fórmula para población finita.

Dónde:

n= tamaño de la muestra.

N= tamaño de la población.

Z= valor de Z crítico, calculado en las tablas del área de la curva normal (nivel de confianza).

p= proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia.

q= proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno en estudio (1-p).

d= nivel de precisión absoluta. Se refiere a la amplitud del intervalo de confianza deseado.

Para el estudio se utilizó un intervalo de confianza del 95%, donde el valor de Z fue de 1.96, y para $d=0.05$, la población de referencia se tomó del estudio de Becker y cols. del 2009 ($N=98$), al igual que la frecuencia menor de los alelos ($p=0.44$). Obteniendo el cálculo de 78 individuos en total como población requerida.

El muestreo fue realizado en la ciudad de Monterrey y su zona metropolitana por medio de campañas de salud a manera de carteles alrededor de la ciudad invitando a participar en el estudio. Además, se realizó la búsqueda en clínicas y centros de salud que estuvieran interesados en colaborar con el proyecto, esto con el fin de cumplir con la obtención del número de individuos establecido estadísticamente.

2.5. Evaluación Antropométrica y Pruebas Clínicas

Para la evaluación antropométrica, los pacientes fueron citados con ropa ligera para que el peso de las prendas no influyera en los resultados. Se tomaron las siguientes medidas a cada paciente: talla (m), peso (kg), circunferencia de cintura (cm).

Se determinó el índice de masa corporal (IMC) (kg/m^2) por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Estatura (m}^2\text{)}}$$

Fórmula 2. Cálculo de Índice de Masa Corporal.

Para la extracción de sangre periférica los participantes debieron tener un ayuno de al menos 8 horas, la toma de la muestra se realizó mediante punción venosa para extraer aproximadamente 8 mL de sangre en dos tubos con anticoagulante (EDTA BD

Vacutainer®) para la posterior determinación de la HbA1c y la extracción de DNA genómico.

Un tubo con muestra se centrifugó y se extrajo el botón leucocitario, se llevó a congelación a -20°C hasta su uso para la extracción de DNA.

El tubo restante se utilizó para la determinación de HbA1c por medio de Kit comercial y por medio de un analizador de hemoglobina automatizado.

2.5.1. Fundamento HbA1c

La HbA1c es el resultado de la condensación irreversible de la glucosa en el residuo N-terminal de la cadena B de la hemoglobina A. Su determinación se realiza mediante un proceso no enzimático que refleja el grado de exposición de la hemoglobina a la glucosa, durante un prolongado período de tiempo. Este procedimiento utiliza una resina de intercambio iónico para la separación rápida de la hemoglobina glucosilada A1c del resto de hemoglobinas. Después de preparar el hemolizado de la sangre total, la muestra se mezcla durante 5 minutos y las hemoglobinas son retenidas por la resina de intercambio iónico, es en este lapso donde la HbA0 se une a la resina. La HbA0 contiene todas las hemoglobinas excepto la A1c, que permanece en solución. Posteriormente se utiliza un filtro que separa el sobrenadante que contiene la A1c de la resina y se estima el porcentaje de HbA1c por medio de un espectrofotómetro a una absorbancia de 415 nm (Tietz, 1999).

La determinación por medio de equipo se realizó de manera directa sin realizar alguna manipulación a la muestra fue introducido en el analizador VARIANT™ de Bio-Rad.

2.6. Extracción de DNA

Se extrajo el DNA genómico a partir de sangre completa obtenida de los pacientes. La extracción de DNA genómico se realizó por la técnica de TSNT y se llevó a cabo de la siguiente manera (Pérez, 2005):

1. En un tubo Eppendorf de 2.0 mL se colocaron 500 µl de sangre periférica con EDTA.
2. Se adicionaron 300 µl de buffer de lisis TSNT (2% Tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) y se mezclaron por inversión para lograr lisis total.
3. Se añadieron 300 µl de fenol y se mezclaron por inversión por 30 segundos.
4. Se agregaron 100 µl de cloroformo y se mezclaron nuevamente en vórtex hasta homogenizar (aproximadamente 5 min).
5. Se centrifugó por 10 min a 12000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. El DNA se precipitó adicionando 1 mL de etanol absoluto y se agitó suavemente por inversión.
6. El DNA se recuperó por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70%, se centrifugó nuevamente por 5 min a 12000 rpm.

7. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50-100 μl de H_2O miliQ.

Por último, se comprobó la integridad del DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® y la cuantificación por medio de espectrofotometría en el equipo NanoDrop™ por introducción directa de 1 μl de muestra al equipo.

Para la realización del gel de agarosa al 1% se siguió la siguiente metodología:

1. Se pesaron 0.3 gr de agarosa en un matraz Erlenmayer de 125 mL.
2. Se midieron 30 mL de buffer TAE 1X en una probeta graduada de 100 mL.
3. Se añadieron los 30 mL de solución buffer TAE 1X al matraz Erlenmayer de 125 mL.
4. Se mezclaron hasta disolver completamente la agarosa, utilizando calor para acelerar el proceso.
5. Al final, se vació el contenido del matraz a la placa de equipo de electroforesis y se colocó el peine de electroforesis, dejando reposar el gel por 10 min o hasta completar la solidificación del gel.
6. Una vez solidificado el gel se añadieron 1 μl de buffer de carga, 1 μl de GelRed® y 8 μl de DNA en cada pocillo del gel.
7. Se programó la cámara de electroforesis a 70 volts por 5 min y posteriormente se cambió el voltaje a 120 volts por 30 min.

8. Al paso de los 30 min se extrajo el gel y se colocó en el transiluminador para observarlo bajo la luz UV, se comprobó si la extracción de DNA había sido realizada con éxito analizando la banda resultante en el gel que este definida y no presente corrimientos, lo que indica una buena integridad del DNA.

2.7. Genotipificación

Los polimorfismos en ambos genes fueron determinados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés); sin embargo, para MATE1 la identificación fue por una variante de esta técnica llamada PCR acoplada a la digestión de fragmentos de restricción polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés); y para OCT1 la genotipificación fue por PCR en tiempo real.

La PCR es una técnica con un amplio uso en biología molecular que utiliza una enzima llamada TaqDNA polimerasa, un exceso de dNTPs y oligonucleótidos que éstos serán los encargados de hibridar con la secuencia blanco específica y por medio de ciclos que tienen etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión se obtienen millones de copias del fragmento génico de interés, los fragmentos pueden ir desde 130 – 1000 pb de longitud (Pérez, 2005).

2.7.1. Genotipificación por PCR-RFLP para el SNP rs2289669 del gen MATE1

La técnica de PCR-RFLP se basa en la utilización de enzimas de restricción las cuales van a reconocer sitios de corte específicos en el DNA. En esta técnica, si el producto amplificado presenta un polimorfismo, éste puede agregar o eliminar un sitio de corte para

una enzima determinada, esto ocasionará que se generen fragmentos de distintos pesos moleculares. Para observar éstos fragmentos se determina por medio de un gel de agarosa, donde se podrá ver la presencia o ausencia de dicho polimorfismo mediante la aparición de bandas de diferente talla molecular.

2.7.1.1. Diseño de los Primers (iniciadores)

La secuencia del primer Forward (FWD) se tomó de la investigación de He y cols del 2015 y el primer Reverse (REV) se diseñó en el programa **Primer3Plus**; siendo los siguientes primers:

Primer FWD 5- TCAGTTTCCACAGTAGCGTCG -3

Primer REV 5- AGCACCTGTAATCAGCAGGGA -3

El fragmento obtenido fue de 293 pb, al primer FWD se le realizó una modificación con el fin de que el fragmento fuera reconocido con la enzima de restricción TaqI al realizar la técnica de PCR-RFLP.

2.7.1.2. Condiciones de Amplificación.

Para la realización de la amplificación de los fragmentos se tomó un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad al cuál se le añadieron los reactivos de la tabla 5, uno a uno, mezclando continuamente con la puntilla. Posteriormente, se programó el equipo con el programa de la tabla 6.

Para identificar la correcta amplificación del fragmento esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®. utilizando TAE 1X como solución buffer y se siguió el mismo proceso descrito en el apartado 2.6.

Tabla 5. Reactivos utilizados para la amplificación.

Reactivo	Volumen
Agua miliQ estéril	15 μ l
DNA purificado	5 μ l
Buffer 10X	3 μ l
MgCl ₂	3 μ l
dNTPs	1 μ l
Primer FWD 1:50	1 μ l
Primer REV 1:50	1 μ l
Enzima TaqDNA polymerase	1 μ l
Volumen total	30 μ l

Tabla 6. Programa de PCR para el equipo.

Etapa	Condiciones
Desnaturalización inicial	95°C por 10 minutos
30 Ciclos	95°C por 30 segundos
	58°C por 30 segundos
	72°C por 30 segundos
Extensión final	72°C por 10 minutos

2.7.1.3. Digestión de Fragmentos.

A un tubo Eppendorf de 1.5 mL se le añadieron los reactivos presentados en la tabla 7 y se incubó en la estufa por 3 horas a una temperatura de 65°C, al término de la incubación se identificaron los fragmentos en un gel de agarosa al 2%, siguiendo la misma metodología presentada en el apartado 2.6, cambiando solamente la concentración de agarosa (se añadieron 0.6 gr de agarosa); los fragmentos esperados se presentan en la tabla 8.

Tabla 7. Condiciones de la digestión.

Reactivo	Volumen
Agua miliQ estéril	1.25 µl
Buffer 10X Multi-Core	2.5 µl
BSA (Bovine Serum Albumin)	0.25 µl
Producto de PCR	20 µl
Enzima TaqI	1 µl
Volumen Total	25 µl

Tabla 8. Fragmentos resultantes del corte enzimático.

GG	GA	AA
293 pb	293 pb, 272 pb y 21 pb	272 pb y 21 pb

La detección de los fragmentos resultantes fue realizada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed®, utilizando TBE 1X como solución buffer.

2.7.2. Genotipificación por PCR en Tiempo Real para el SNP rs622342 del gen OCT1

El término de “PCR en tiempo real” se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción; el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR convencional. Actualmente, la PCR en tiempo real se ha convertido en el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos ya que aún y cuando se tenga una cantidad muy pequeña de muestra, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (Tamay *et al.*, 2013).

Para la genotipificación se utilizaron sondas TaqMan® de ThermoFisher las cuales son específicas para el SNP de interés las cuales están marcadas con dos fluorocromos diferentes, en su extremo 5' están marcadas con el fluorocromo y en el extremo 3' hay un quencher (inhibidor de fluorescencia) que realiza su función siempre y cuando la sonda permanezca intacta.

Los fluorocromos presentes en la sonda son VIC (alelo 1) y FAM (alelo 2) los cuales tienen diferentes valores de absorción y de emisión; para VIC su máximo de absorción es de 538 nm y su máximo de emisión es de 554 nm y para FAM su máximo valor de absorción es de 495 nm y de emisión es de 520 nm, mientras que el quencher es MGB-NFQ (Minor Groove Binding Non-Fluorescent Quencher).

Durante esta técnica los primers reconocen la secuencia específica dentro del DNA genómico (este debe tener una buena pureza e integridad, para evitar contaminación o

errores en la determinación por lo que se debe analizar la muestra en el equipo NanoDrop™), si el DNA presenta la secuencia polimórfica específica se dará la hibridación de la sonda TaqMan con la secuencia por homologación de bases. Posterior a la unión de la sonda con la secuencia clave, la AmpliTaqGold (enzima con actividad DNA polimerasa y exonucleasa 5'-3') comienza con la polimerización de la cadena lo que ocasiona que el fluorocromo específico de la sonda se libere, emitiendo una fluorescencia que es registrada por el equipo (Tamay *et al.*, 2013).

La sonda TaqMan® utilizada con ID C__928527_20 tiene la siguiente secuencia: TTTCTTCAAATTTGATGAAAACCTTC[A/C]AATACATAGATCTAACAATCTCAAT, donde la sonda específica para el alelo A tiene el fluorocromo VIC y la sonda específica para el alelo C tiene el fluorocromo FAM, y el fragmento que se amplificó por los primers del ensayo fue de ~190 pb conforme a información proporcionada por el distribuidor de los reactivos.

Para la realización de la técnica se realizó un ajuste en la concentración del DNA de todas las muestras, la técnica requiere una concentración de ~1.5 ng/μl para la dilución de las muestras se utilizó agua miliQ estéril, las sondas TaqMan® presentaban una concentración de 40X por lo que su concentración fue ajustada a 20X con una solución de TE 1X estéril, para el Master Mix no se necesitó ningún ajuste en la concentración. Una vez ajustadas todos los reactivos a las condiciones presentadas en la tabla 9 se procedió a añadir a un tubo Eppendorf de 0.5 mL los reactivos, se programó el equipo con los datos de la tabla 10 y se colocaron las muestras en el equipo. Al final del proceso se registraron los datos y las muestras fueron desechadas conforme a los lineamientos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Tabla 9. Condiciones de reacción para PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen
Sonda TaqMan® 20X	1.25 µl
TaqMan® Genotyping Master Mix 2X	12.5 µl
DNA (~1.5 ng/µl)	11.25 µl

Tabla 10. Programa de amplificación.

Etapa	Condiciones
Pre-PCR Holding Stage	60°C por 30 segundos*
Holding Stage (Etapa de reposo)	95°C por 10 minutos
50 ciclos	92°C por 15 segundos
	60°C por 1 minuto*
Holding stage (Etapa de reposo)	60°C por 30 segundos*

*Se programó el equipo para la recolección de datos.

2.8. Análisis Estadístico

El análisis de la información se realizó con el programa Excel de Office versión 2016, se utilizó estadística descriptiva para: edad, peso, circunferencia de cintura, IMC, HbA1c, etcétera.

Para las frecuencias genotípicas y alélicas los resultados fueron presentados en porcentajes, al igual que la reducción de HbA1c. Las pruebas estadísticas utilizadas para

comparar las distribuciones genotípicas y alélicas fueron por medio de la prueba de χ^2 y el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para la asociación entre los diferentes genotipos y la reducción en HbA1c se utilizó un ANOVA para comprobar si realmente existe una diferencia significativa en los pacientes que presentaban los SNPs de interés y una prueba de Tukey para identificar en cuáles existía diferencia, utilizando el software Minitab Statistical Software versión 17.

2.9. Disposición de los Residuos Generados

Para la realización del presente trabajo se recolectaron residuos químicos y biológicos para su disposición final, los cuales fueron colocados en los contenedores adecuados para cada tipo de residuo, a continuación, se describe su manejo:

- Contenedores A: Soluciones salinas pH 6.8. Soluciones de sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.
- Contenedores D: Tóxicos inflamables. Combinaciones orgánicas halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas.
- Colector de colorantes y lugol.
- Contenedor para basura industrial.
- Contenedor rojo: Residuos punzocortantes biológico infecciosos

Los contenedores se encuentran ubicados en el laboratorio de Farmacobiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y en la división de estudios de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1. Características Generales de la Población

Para el reclutamiento de la población se tomaron en cuenta a hombres y mujeres mayores de 18 años, de nacionalidad mexicana con residencia en el estado de Nuevo León, los cuales aceptaron participar en el presente estudio y firmaron una carta de consentimiento informado.

La muestra poblacional cumplió con los criterios de inclusión establecidos, por lo que solo se incluyeron hombres y mujeres que presentaron diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 2 conforme a los lineamientos marcados por la ADA, que no estuvieran bajo algún tratamiento antidiabético diferente a la monoterapia con metformina, se excluyeron pacientes con daño hepático y/o renal, ya que esto podía alterar los resultados.

Las características generales de la población de estudio (n=96) se describen en la tabla 11, donde se incluyen datos de antropometría, composición corporal y valores de HbA1c.

Tabla 11. Características generales de la población total.

Variable	Media \pm (DE)
Edad (años)	56.25 \pm (11.09)
Estatura (cm)	161.22 \pm (11.23)
Peso (kg)	77.59 \pm (17.13)
IMC (kg/m ²)	30.05 \pm (7.61)
CC (cm)	98.04 \pm (12.41)
HbA1c (%)	6.84 \pm (0.89)

n= 96 IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

3.2. Características de la Población Dividida por Género

La población de estudio se agrupó por género para observar las diferencias en los valores generales, las proporciones se muestran en la figura 3 y las características en la tabla 12.

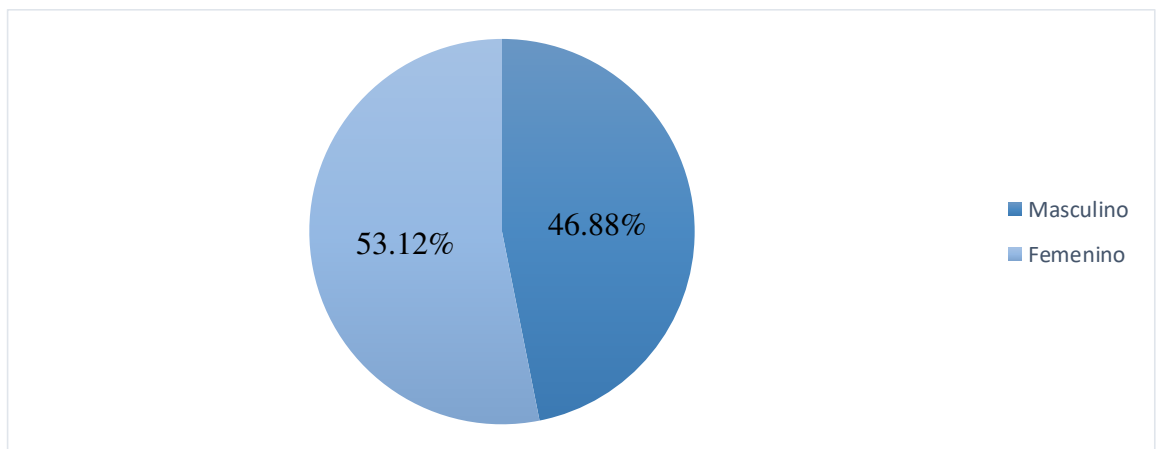


Figura 3. Distribución de la población dividida por género (n=96).

Tabla 12. Características generales de la población dividida por género.

Variable	Hombres Media \pm (DE)	Mujeres Media \pm (DE)
Edad (años)	56.38 \pm (12.27)	56.14 \pm (10.06)
Estatura (cm)	168.69 \pm (6.27)	154.63 \pm (10.51)
Peso (kg)	81.87 \pm (16.40)	73.81 \pm (17.01)
IMC (kg/m ²)	28.72 \pm (5.37)	31.22 \pm (9.04)
CC (cm)	99.90 \pm (12.06)	96.33 \pm (12.60)
HbA1c (%)	6.85 \pm (0.82)	6.83 \pm (0.96)

n Hombres: 45, n Mujeres: 51. IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

Se realizó además una división de la población donde se agruparon por la clasificación de su IMC de acuerdo a la OMS en: normal (18.50-24.90 kg/m²), sobrepeso (25.00-29.90) y obesidad (≥ 30.00), en la figura 4 se muestran los porcentajes.

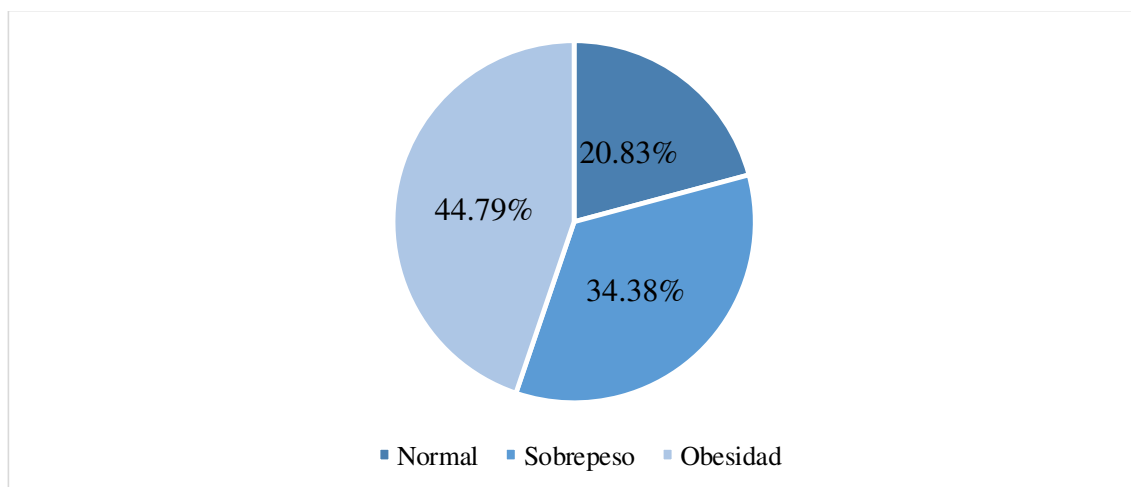


Figura 4. Clasificación de la población de estudio conforme al IMC (n=96).

En la tabla 13 se muestran con detalle los datos clínicos y antropométricos clasificados por su IMC, los resultados se analizaron utilizando un ANOVA, con el objetivo de observar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y la clasificación asignada. Se tomaron como significativos los valores de $p < 0.05$ y posteriormente se realizó una prueba de Tukey para identificar cuales resultados presentaban diferencias.

Tabla 13. Datos clínicos y antropométricos y su relación con la clasificación del IMC.

Variable	IMC Normal	IMC sobrepeso	IMC obesidad	p
	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Edad (Años)	*62.10 ± (12.10)	55.33 ± (11.58)	*54.23 ± (9.42)	0.025
Estatura (cm)	160.75 ± (8.78)	164.86 ± (9.03)	158.86 ± (13.01)	0.086
Peso (kg)	*58.17 ± (8.24)	*74.44 ± (8.85)	*89.03 ± (15.87)	0.000
CC (cm)	*84.22 ± (8.10)	*94.59 ± (5.51)	*107.55 ± (10.24)	0.000
HbA1c (%)	6.83 ± (0.86)	6.62 ± (0.64)	7.01 ± (1.04)	0.169

n=96. CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada. *Valores estadísticamente diferentes por medio de prueba de ANOVA y Tukey.

Como se muestra en la tabla 13 se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el IMC normal (20.83%) y el IMC obesidad (44.79%) con respecto a la edad, teniendo una edad mayor los que tienen un IMC normal (62.10 ± 12.10), en el peso se observa que los 3 grupos tienen diferencia estadísticamente significativa, teniendo el valor mayor los pacientes clasificados con IMC obesidad ($89.03 \text{ kg} \pm 15.87$) reforzando lo reportado anteriormente por los sistemas de salud. En los pacientes con genotipo CC existen resultados estadísticamente significativos, donde los pacientes

clasificados como obesos presentan el valor más alto en la circunferencia de cintura (107.55 cm \pm 10.24).

3.3. Extracción de DNA y Cuantificación del DNA Extraído

En la figura 5 se observa la integridad del DNA extraído de muestras de sangre, se obtuvo una buena integridad en las muestras de DNA.

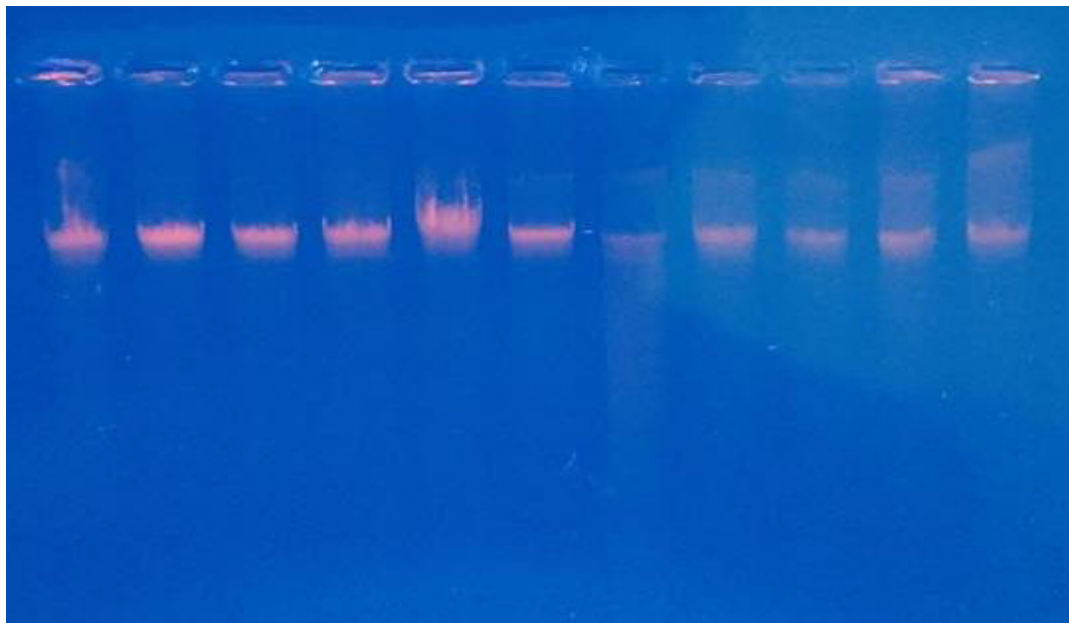


Figura 5. DNA genómico en gel de agarosa al 1% teñido con RedGel®.

La cuantificación se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ y los resultados se muestran en la tabla 14, se observa una elevada concentración de DNA extraído, la relación de absorbancias A 260/280 indica la pureza del DNA, una relación óptima es de ~1.80; sin embargo, valores que se encuentren en el rango de 1.7-1.9 se consideran muestras con pureza aceptable, muestras con valores más bajos de 1.7 se consideran que se encuentran contaminados con compuestos aromáticos y/o proteínas, muestras con valores mayores a 1.9 pueden estar contaminados con RNA.

La relación promedio obtenida es de 1.70 por lo que se encuentra dentro del rango aceptable de pureza.

Tabla 14. Cuantificación DNA genómico.

Variable	Media \pm (DE)
Concentración (ng/ μ l)	177.20 \pm (57.48)
Relación A 260/280	1.70 \pm (0.19)

n=96

3.4. Genotipificación del SNP rs2289669 en el gen MATE1 por PCR-RFLP

La amplificación del fragmento se observa en la figura 6, el fragmento se encuentra en la región esperada (293 pb) conforme al marcador de Peso Molecular (PM), por lo que los primers diseñados amplificaron la región de interés para el posterior estudio del polimorfismo y las condiciones de amplificación fueron las adecuadas para obtener una cantidad de fragmento suficiente para su posterior digestión.

Para la digestión de fragmentos de PCR se utilizó la enzima TaqI la cual reconoce la secuencia 5'-TCGA-3' y hace un corte cohesivo en la secuencia, en la figura 7 se observan los fragmentos después de la digestión, se observan los 3 tipos de cortes esperados, para los homocigotos GG la banda de 293, para los heterocigotos las dos bandas de 293 y 272, y por último, para los homocigotos AA la banda de 272; para el caso de los heterocigotos y homocigotos AA se obtendría además una banda de 21 pb, pero por el tamaño de la banda no pudo ser identificada con las condiciones propuestas.

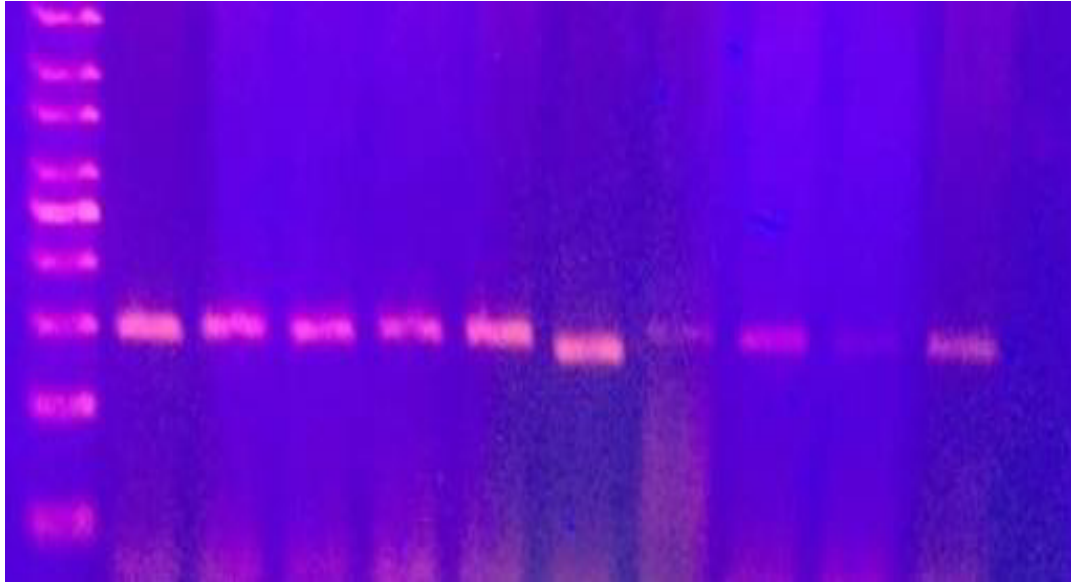


Figura 6. Amplificación de fragmentos de PCR (293 pb) en gel de agarosa al 1% teñido con RedGel® y marcador de PM de 100 pb por banda.

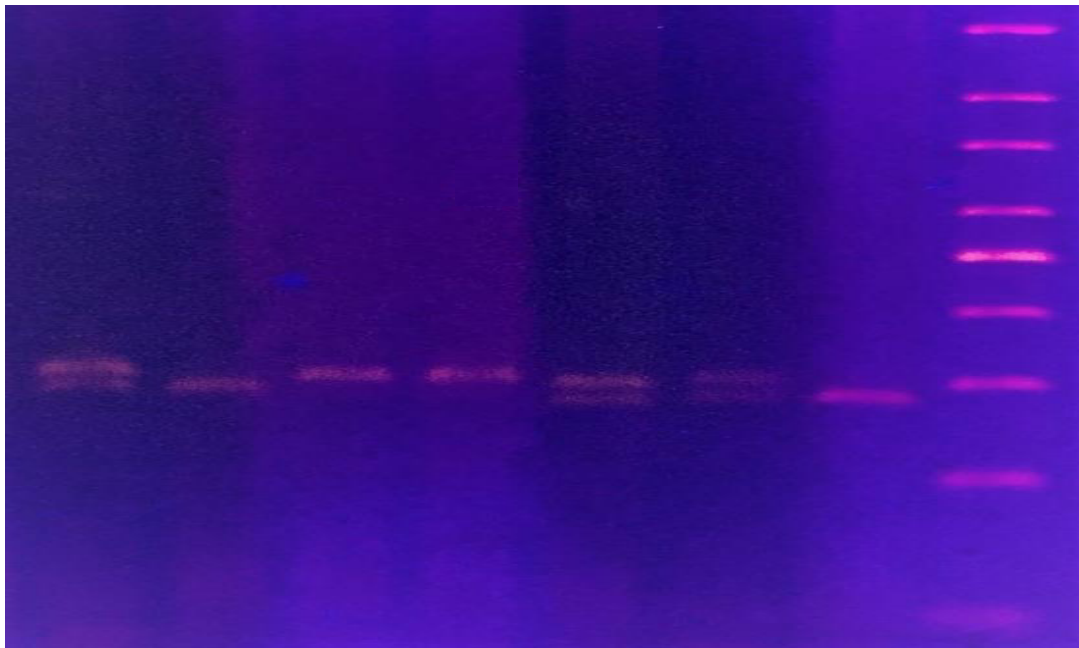


Figura 7. Digestión del producto de PCR con la enzima TaqI en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed®, utilizando un marcador de PM de 100 pb.

3.5. Genotipificación del SNP rs622342 en el gen OCT1 por PCR en Tiempo Real

El diagrama de la figura 8 es una representación de algunas de las muestras analizadas. Se puede observar cómo se distribuyen los diferentes genotipos presentes en las muestras, en el eje de las Y se presentan los individuos que presentan el genotipo CC, mientras que en el eje de las X se encuentran los genotipos AA, al centro del plano se ubican los heterocigotos es decir los que presentan ambos alelos, mientras que cercanos al origen se encuentran los blancos negativos (agua) que se utilizaron.

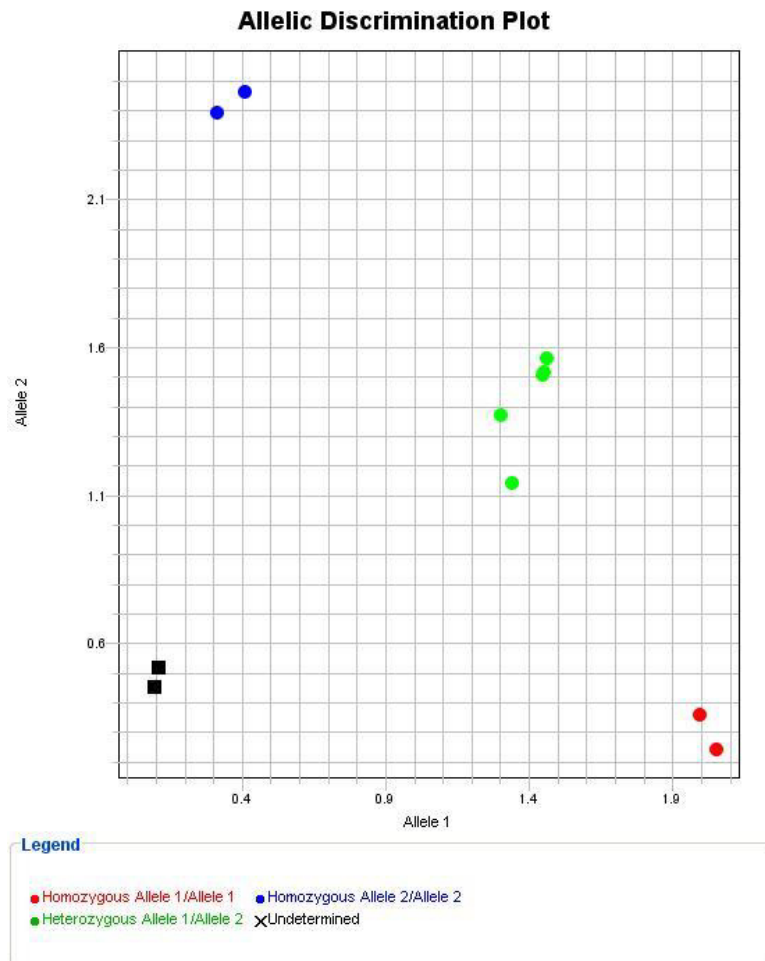


Figura 8. Diagrama de discriminación alélica.

En la figura 9 se presenta un diagrama de amplificación de 31 muestras que se analizaron, la amplificación del fragmento inicia cerca del ciclo 30 en todas las muestras y se va aumentando exponencialmente conforme avanzan los ciclos.

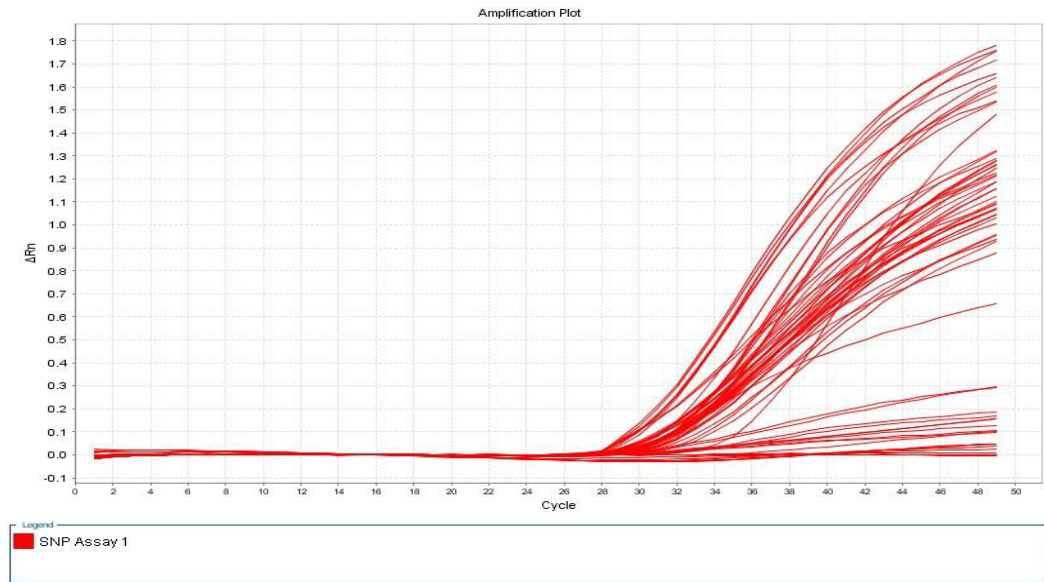


Figura 9. Diagrama de amplificación.

En la figura 10 se comprueba el tamaño aproximado del fragmento esperado en las muestras analizadas.

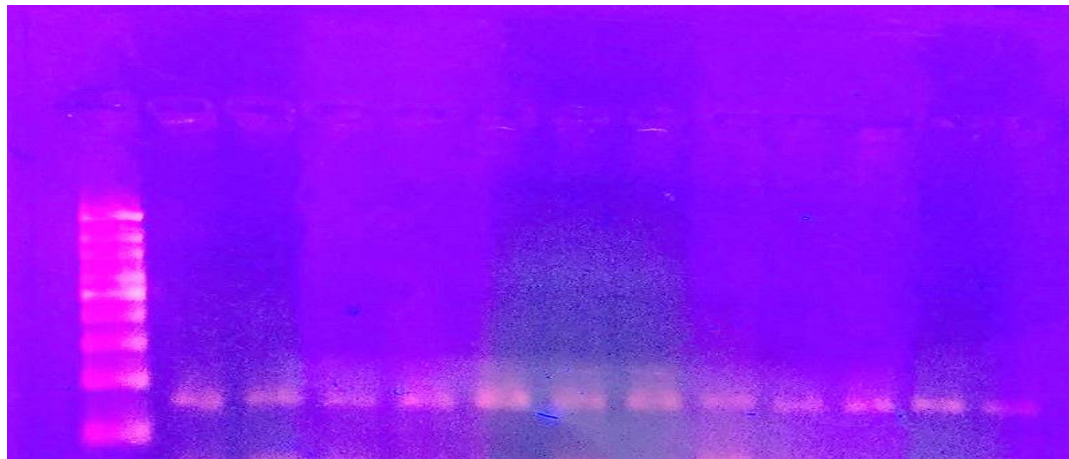


Figura 10. Fragmentos de amplificación en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed®, utilizando un marcador de PM de 100 pb.

En la figura 11 se presenta el diagrama de una muestra para el genotipo AA, se observa que el equipo solo registra la fluorescencia emitida por VIC que corresponde al alelo A, mientras que la emisión de FAM no presenta registro alguno, por lo que fue asignado el genotipo AA a las muestras que presentaron este comportamiento.

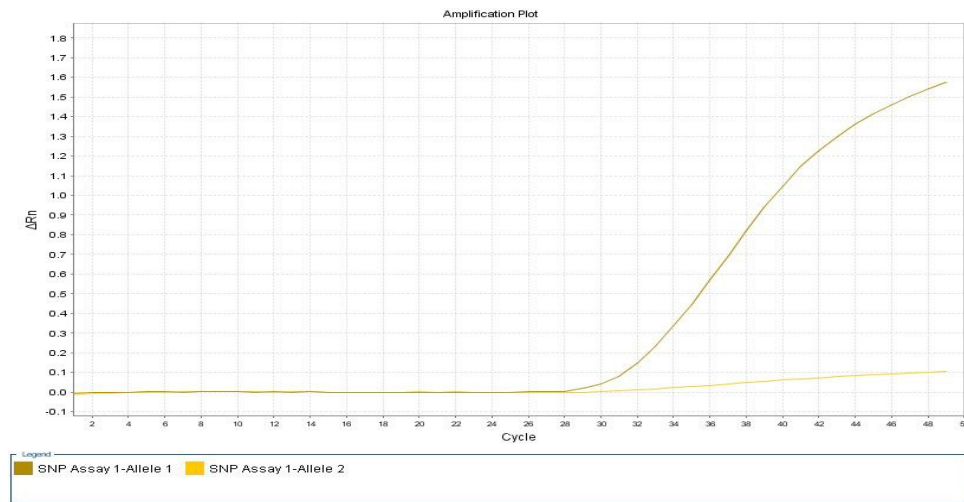


Figura 11. Diagrama de amplificación del genotipo AA.

En el diagrama de la figura 12 se muestra el patrón de amplificación para el genotipo CC, se observa la amplificación sólo de FAM.

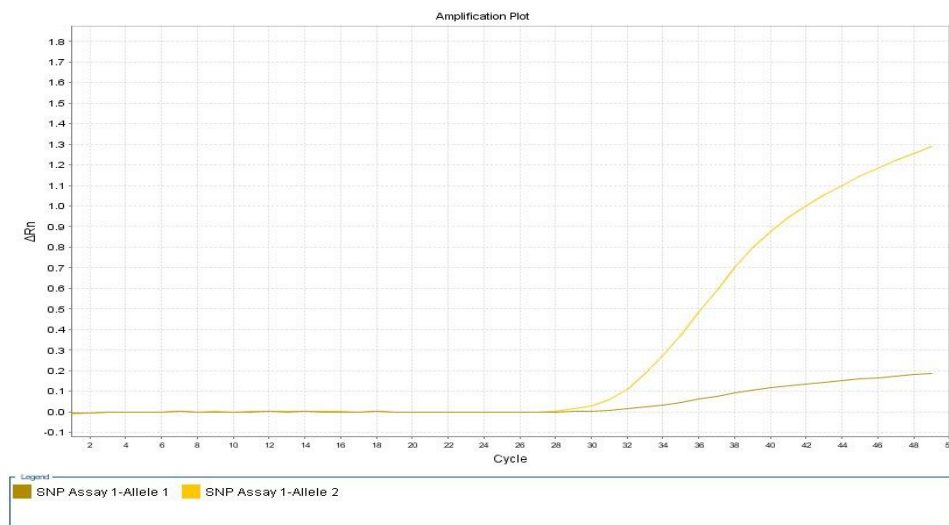


Figura 12. Diagrama de amplificación del genotipo CC.

El diagrama de la figura 13 muestra el comportamiento de amplificación de una muestra con genotipo CA, observando la amplificación de ambos fluorocromos en el plano.

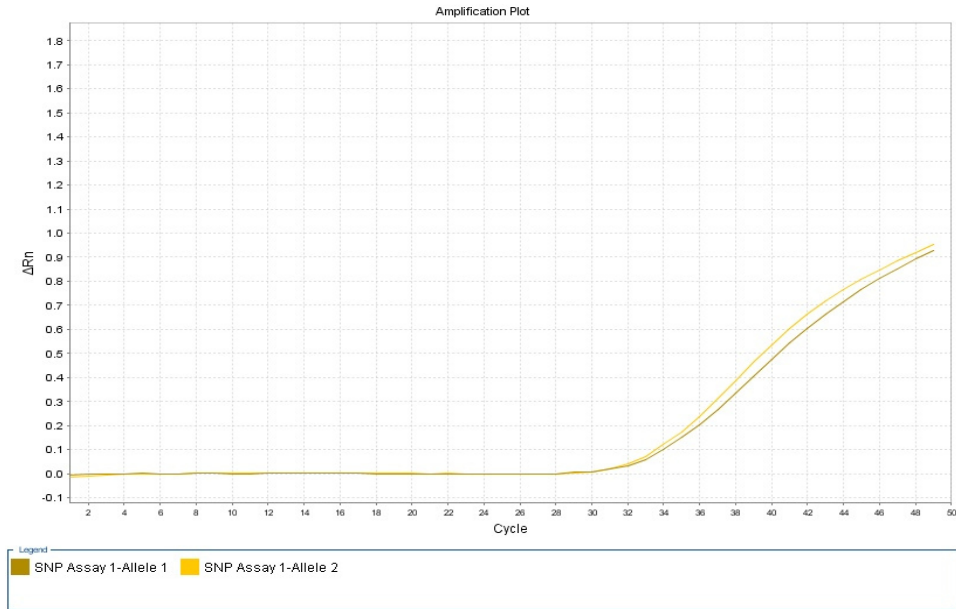


Figura 13. Diagrama de amplificación del genotipo CA.

En el diagrama multicomponente de la figura 14 se muestra que el blanco negativo no registra ninguna amplificación en ningún ciclo del proceso de amplificación.

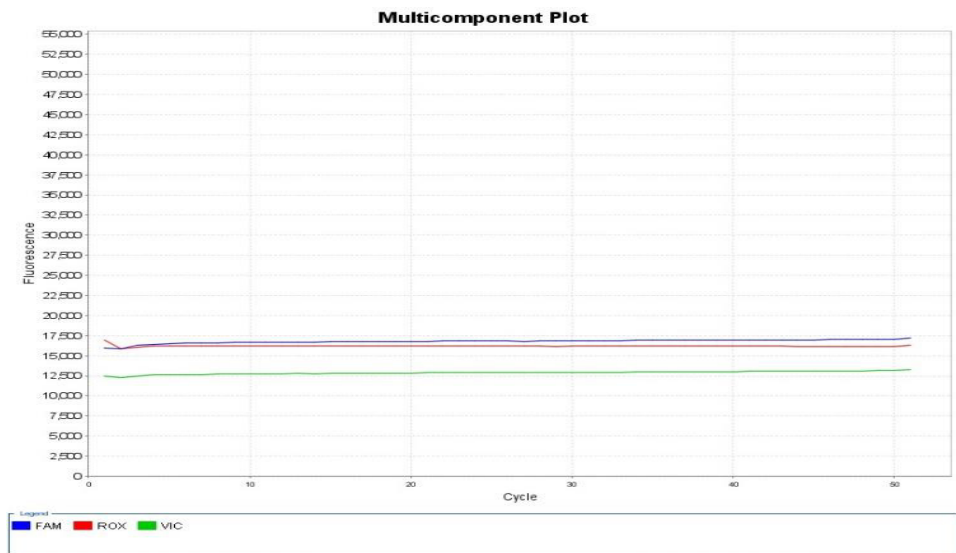


Figura 14. Diagrama multicomponente del blanco negativo.

3.6. Frecuencias Genotípicas y Alélicas de los SNPs rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1

Para determinar las frecuencias genotípicas y alélicas se comprobó que la población estudiada cumple con el principio de Hardy-Weinberg utilizando el Software de la Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies (<http://www.oege.org>), en la tabla 15 se muestran los resultados.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas, alélicas y valores de p para el equilibrio de Hardy-Weinberg.

SNP	Genotipo	n	%	p
rs622342	C/C	12	12.5	0.806
	C/A	48	50.0	
	A/A	36	37.5	
Frecuencias alélicas	C	72	37.5	
	A	120	62.5	
rs2289669	G/G	31	32.3	0.641
	G/A	43	44.8	
	A/A	22	22.9	
Frecuencias alélicas	G	105	54.7	
	A	87	45.3	

n=96, g : 2, $p > 0.05$.

Como se muestra en la tabla 15 las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo rs2289669 en MATE1 y rs622342 en OCT1 se encuentran en equilibrio de

Hardy-Weinberg por lo que pueden ser analizadas con las diferentes variables del presente estudio.

3.7. Asociación de los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con las Variables Antropométricas y Bioquímicas en la Población Total

Para identificar si existe una relación entre los SNP de estudio con alguna de las variables que se midieron durante el proyecto, se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA de un factor para identificar alguna relación estadísticamente significativa entre el fondo genético y las variables que se midieron en nuestro estudio y una posterior prueba de Tukey cuando se presentó alguna asociación estadísticamente significativa con el fin de identificar cuales grupos eran diferentes.

Como se muestra en las tablas 16 y 17, se analizó la población total, para ambos SNP (rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1) no se encontró alguna asociación estadísticamente significativa entre sus diferentes genotipos y las diferentes variables de estudio.

Tabla 16. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con las variables de estudio.

OCT1 rs622342 A>C	CC n=12 Media ± (DE)	CA n=48 Media ± (DE)	AA n=36 Media ± (DE)	Total n=96 Media ± (DE)	<i>p</i>
Edad	53.75 ± (11.95)	55.21 ± (11.82)	58.47 ± (9.63)	56.25 ± (11.09)	0.292
Peso (kg)	80.15 ± (13.36)	80.09 ± (16.52)	73.39 ± (18.56)	77.59 ± (17.13)	0.179
Talla (cm)	166.75 ± (8.01)	160.42 ± (12.99)	160.44 ± (9.12)	161.22 ± (11.23)	0.190
CC (cm)	97.04 ± (11.72)	100.21 ± (12.72)	95.32 ± (11.96)	98.04 ± (12.41)	0.206
IMC (kg/m ²)	28.92 ± (4.98)	31.63 ± (8.83)	28.31 ± (6.13)	30.05 ± (7.61)	0.122
HbA1c inicio (%)	6.97 ± (0.78)	6.78 ± (0.86)	6.88 ± (0.99)	6.84 ± (0.89)	0.748

IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

Tabla 17. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con las variables de estudio.

MATE1 rs2289669 A>G	GG n=31 Media ± (DE)	GA n=43 Media ± (DE)	AA n=22 Media ± (DE)	Total n=96 Media ± (DE)	<i>p</i>
Edad	56.52 ± (11.22)	54.14 ± (12.12)	60.00 ± (7.66)	56.25 ± (11.09)	0.129
Peso (kg)	74.95 ± (18.24)	79.23 ± (14.47)	78.08 ± (20.42)	77.59 ± (17.13)	0.568
Talla (cm)	159.52 ± (14.69)	161.49 ± (9.15)	163.09 ± (9.28)	161.22 ± (11.23)	0.514
CC (cm)	96.61 ± (13.47)	100.20 ± (11.31)	95.81 ± (12.78)	98.04 ± (12.41)	0.310
IMC (kg/m ²)	30.19 ± (10.54)	30.31 ± (4.74)	29.34 ± (7.58)	30.05 ± (7.61)	0.885
HbA1c inicio (%)	6.74 ± (0.73)	6.90 ± (0.96)	6.85 ± (0.99)	6.84 ± (0.89)	0.754

IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

3.8. Asociación de los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con las Variables Antropométricas y Bioquímicas en la Población Clasificada según su IMC

Se dividió la población total según su clasificación de IMC para comprobar si existía alguna relación entre las variables y los genotipos de los SNP de interés.

Se encontró una asociación significativa entre el genotipo AA del gen OCT1 en los pacientes con IMC clasificación normal los cuales tienen un peso menor comparándolos con los pacientes con genotipo CC, mientras que en la talla los pacientes con IMC normal y genotipo CC presentan una mayor estatura que los pacientes con IMC normal y genotipo AA (Tabla 18) mientras que para el gen MATE1 no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variables y los diferentes genotipos (Tabla 19). En las tablas 20 y 21 se muestran los resultados para los pacientes clasificados con sobrepeso y los diferentes genotipos para los genes OCT1 y MATE1, ningún resultado mostró ser estadísticamente significativo, al igual que para la comparación entre los genotipos y los pacientes clasificados como obesos (Tablas 22 y 23).

Tabla 18. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con las variables de estudio en pacientes con IMC normal

OCT1 rs622342 A>C	CC n=3	CA n=5	AA n=9	p
	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Edad	54.33 ± (11.26)	69.00 ± (10.56)	58.33 ± (11.26)	0.188
Peso (kg)	*69.63 ± (2.95)	56.46 ± (3.40)	*54.63 ± (8.89)	0.020
Talla (cm)	*171.33 ± (4.04)	159.80 ± (6.53)	*155.89 ± (7.98)	0.020
CC (cm)	88.67 ± (5.86)	79.20 ± (6.47)	86.06 ± (9.90)	0.263
HbA1c inicio (%)	6.50 ± (0.46)	6.55 ± (0.18)	6.51 ± (0.25)	0.948

IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada. *Valores estadísticamente diferentes a p<0.05.

Tabla 19. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con las variables de estudio en pacientes con IMC normal

MATE1 rs2289669 A>G	GG n=9	GA n=5	AA n=3	p
	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Edad	64.56 ± (9.88)	53.80 ± (17.47)	61.00 ± (5.29)	0.312
Peso (kg)	58.54 ± (6.79)	58.74 ± (11.48)	54.10 ± (11.61)	0.743
Talla (cm)	162.11 ± (6.92)	158.40 ± (11.80)	155.00 ± (9.54)	0.472
CC (cm)	83.61 ± (7.46)	82.40 ± (7.23)	90.67 ± (14.77)	0.422
HbA1c inicio (%)	6.47 ± (0.25)	6.68 ± (0.15)	6.42 ± (0.36)	0.265

IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

Tabla 20. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con las variables de estudio en pacientes clasificados con sobrepeso por su IMC.

OCT1 rs622342 A>C	CC n=1	CA n=10	AA n=13	p
	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Edad	56.0	50.00 ± (12.82)	56.92 ± (11.20)	0.396
Peso (kg)	88.0	74.88 ± (8.05)	72.91 ± (9.04)	0.257
Talla (cm)	172.0	166.10 ± (8.49)	162.54 ± (9.96)	0.484
CC (cm)	98.00	93.10 ± (6.74)	93.58 ± (4.99)	0.727
HbA1c inicio (%)	7.10	6.37 ± (0.43)	6.71 ± (0.55)	0.192

IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

Tabla 21. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con las variables de estudio en pacientes clasificados con sobrepeso por su IMC

MATE1 rs2289669 A>G	GG n=8	GA n=10	AA n=6	p
	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Edad	53.88 ± (13.25)	52.40 ± (12.76)	56.83 ± (9.93)	0.786
Peso (kg)	69.69 ± (7.20)	77.08 ± (8.81)	76.05 ± (9.53)	0.183
Talla (cm)	160.75 ± (7.70)	166.40 ± (8.36)	166.00 ± (12.38)	0.407
CC (cm)	91.94 ± (3.32)	93.60 ± (5.44)	95.67 ± (8.22)	0.491
HbA1c inicio (%)	6.36 ± (0.44)	6.79 ± (0.58)	6.53 ± (0.45)	0.215

IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

Tabla 22. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con las variables de estudio en pacientes clasificados como obesos por su IMC.

OCT1 rs622342	CC n=4	CA n=19	AA n=6	p
A>C	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Edad	46.25 ± (11.03)	52.84 ± (9.49)	55.00 ± (6.81)	0.334
Peso (kg)	90.45 ± (12.68)	89.79 ± (17.84)	97.25 ± (13.55)	0.630
Talla (cm)	164.00 ± (5.72)	159.84 ± (9.63)	161.50 ± (4.28)	0.656
CC (cm)	107.50 ± (12.07)	109.47 ± (10.11)	112.40 ± (13.95)	0.794
HbA1c inicio (%)	7.31 ± (0.80)	6.73 ± (0.83)	7.86 ± (1.75)	0.086

IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

Tabla 23. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con las variables de estudio en pacientes clasificados como obesos por su IMC

MATE1 rs2289669	GG n=8	GA n=17	AA n=4	p
A>G	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Edad	51.63 ± (7.91)	51.24 ± (10.44)	58.75 ± (3.77)	0.346
Peso (kg)	97.99 ± (17.58)	86.16 ± (13.36)	100.7 ± (20.1)	0.110
Talla (cm)	165.00 ± (12.60)	158.76 ± (5.97)	160.75 ± (2.87)	0.219
CC (cm)	114.25 ± (9.52)	107.63 ± (8.55)	109.00 ± (19.51)	0.372
HbA1c inicio (%)	7.28 ± (0.99)	7.06 ± (1.30)	6.47 ± (0.21)	0.516

IMC= Índice de masa corporal, CC= Circunferencia de cintura, HbA1c= Hemoglobina glucosilada.

3.9. Asociación de los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con la Reducción de HbA1c en los Pacientes que Siguieron el Tratamiento

Para la asociación del efecto terapéutico de la metformina con los SNP se evaluó la diferencia del valor de HbA1c inicial con el valor de HbA1c final a los 3 meses de tratamiento con metformina.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa en los valores iniciales de HbA1c cuando se realizó un ANOVA, en el caso del SNP rs622342 en OCT1, el genotipo AA fue el que presentó el valor más alto en comparación con los demás (Tabla 24), para el SNP rs2289669 en MATE1 se observó también diferencias estadísticamente significativas en los valores iniciales de HbA1c, en donde, el valor más alto lo presentó el genotipo heterocigoto (Tabla 25). Para los valores en la diferencia de entre la HbA1c inicial y final se encontró una asociación estadísticamente significativa en el SNP rs2289669, como se observa en la tabla 25, los resultados del ANOVA indica que existe una asociación estadísticamente significativa, y la posterior prueba de Tukey nos indica que los pacientes con el genotipo GA y GG son estadísticamente diferentes, teniendo para el genotipo GA la mayor reducción en los valores de HbA1c en comparación con los pacientes con genotipo GG.

Tabla 24. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con la reducción de la HbA1c.

OCT1 rs622342 A>C	CC n=7 Media ± (DE)	CA n=25 Media ± (DE)	AA n=22 Media ± (DE)	Total Media ± (DE)	<i>P</i> ^{adj}
HbA1c inicio	6.95 ± (0.75)	*6.55 ± (0.53)	*7.05 ± (1.06)	6.80 ± (0.83)	0.018
HbA1c final	6.46 ± (0.76)	6.24 ± (0.40)	6.57 ± (0.91)	6.40 ± (0.70)	0.219
Diferencia	0.48 ± (0.34)	0.30 ± (0.24)	0.49 ± (0.57)	0.40 ± (0.42)	0.249

n=54, HbA1c: Hemoglobina glucosilada, *p*^{adj} por edad, peso e IMC. *Valores estadísticamente diferentes a *p*<0.05.

Tabla 25. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con la reducción de la HbA1c

MATE1 rs2289669 A>G	GG n=18 Media ± (DE)	GA n=26 Media ± (DE)	AA n=10 Media ± (DE)	Total Media ± (DE)	<i>P</i> ^{adj}
HbA1c inicio	*6.50 ± (0.68)	*7.06 ± (0.99)	*6.51 ± (0.39)	6.80 ± (0.83)	0.018
HbA1c final	6.27 ± (0.34)	6.54 ± (0.94)	6.25 ± (0.30)	6.40 ± (0.70)	0.542
Diferencia	*0.23 ± (0.47)	*0.51 ± (0.43)	0.26 ± (0.18)	0.40 ± (0.42)	0.018

n=54, HbA1c: Hemoglobina glucosilada, *p*^{adj} por edad, peso e IMC. *Valores estadísticamente diferentes a *p*<0.05.

Los resultados se clasificaron en intervalos de reducción de HbA1c para analizar si de esta manera se podrían encontrar algunas otras asociaciones importantes entre la reducción de HbA1c y los diferentes genotipos de los SNP de estudio. En la tabla 26 se

muestran los resultados para los diferentes intervalos de reducción, se encontró una asociación estadísticamente significativa en el intervalo de reducción de 0.26-0.50, donde hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el genotipo CC y AA, y la mayor diferencia se presentó para el genotipo AA. Para rs2289669 en MATE1 no se encontró alguna asociación estadísticamente significativa en ninguno de los intervalos analizados como se observa en la tabla 27.

Tabla 26. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con los intervalos de reducción de HbA1c.

OCT1 rs622342 A>C	CC	CA	AA	<i>p</i>
	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Sin reducción	-0.03 (‘)	-0.63 ± (0.81)	-0.26 ± (0.27)	0.511
Intervalo de reducción de HbA1c de 0.01-0.25	0.14 ± (0.03)	0.13 ± (0.08)	0.10 ± (0.08)	0.639
Intervalo de reducción de HbA1c de 0.26-0.50	*0.34 ± (0.01)	0.31 ± (0.04)	*0.41 ± (0.06)	0.003
Intervalo de reducción de HbA1c ≥ 0.51	0.80 ± (0.24)	0.71 ± (0.20)	1.27 ± (0.78)	0.247

n=70, HbA1c: Hemoglobina glucosilada, *Valores estadísticamente diferentes a $p < 0.05$.

Tabla 27. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con los intervalos de reducción de HbA1c.

MATE1 rs2289669 A>G	GG	GA	AA	<i>p</i>
	Media ± (DE)	Media ± (DE)	Media ± (DE)	
Sin reducción	-0.61 ± (0.86)	-0.38 ± (0.55)	-0.27 ± (0.37)	0.739
Intervalo de reducción de HbA1c de 0.01-0.25	0.11 ± (0.07)	0.13 ± (0.09)	0.13 ± (0.06)	0.834
Intervalo de reducción de HbA1c de 0.26-0.50	0.37 ± (0.07)	0.37 ± (0.07)	0.32 ± (0.07)	0.513
Intervalo de reducción de HbA1c ≥ 0.51	1.34 ± (1.06)	0.90 ± (0.47)	0.67 ± (*)	0.543

n=70, HbA1c: Hemoglobina glucosilada.

3.10. Asociación de los SNP rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1 con la Reducción de HbA1c por los Modelos de Herencia y Cálculo de Odds Ratio (OR)

El análisis de asociación de los polimorfismos y la reducción de HbA1c se llevó a cabo considerando dos modelos de herencia (dominante y recesivo) para buscar alguna asociación de los modelos de herencia con la reducción de HbA1c. Para el SNP rs622342 en OCT no se encontró asociación estadísticamente significativa en los dos modelos de herencia analizados (Tabla 28). En la tabla 29, se puede observar que al realizar el análisis estadístico de los 2 modelos de herencia en el SNP rs2289669 del gen MATE1 se encontró

una asociación estadísticamente significativa en el modelo recesivo, y el alelo A es el que presenta la mayor reducción en los valores de HbA1c.

Tabla 28. Asociación del polimorfismo rs622342 del gen OCT1 con la reducción por medio de los modelos de herencia.

Modelo	OCT1 rs622342 A>C	Reducción HbA1c	
		Media ± (DE)	<i>p</i>
Dominante	CC+CA	0.34 ± (0.27)	0.674
	AA	0.49 ± (0.57)	
Recesivo	CC	0.48 ± (0.34)	0.295
	AA+CA	0.39 ± (0.43)	

n=54

Tabla 29. Asociación del polimorfismo rs2289669 del gen MATE1 con la reducción por medio de los modelos de herencia.

Modelo	MATE1 rs2289669 A>G	Reducción HbA1c	
		Media ± (DE)	<i>p</i>
Dominante	GG+GA	0.43 ± (0.45)	0.517
	AA	0.26 ± (0.18)	
Recesivo	GG	*0.23 ± (0.47)	0.021
	AA+GA	*0.44 ± (0.39)	

n=54, *Valores estadísticamente diferentes a $p < 0.05$.

Se calculó la razón de momios (OR por sus siglas en inglés) para conocer si respondieron de una mejor manera los pacientes que presentan el alelo A, para esto se realizó una división de la población en “responders” y “no responders”, tomando como “responders” a todos los sujetos que su HbA1c haya tenido una reducción >0.01 , y como “no responders” los pacientes que no tuvieron reducción en sus valores de HbA1c iniciales

o los que presentaron un aumento en sus valores de HbA1c al final del tratamiento. En la tabla 30 se presentan los resultados, y como se observa no existe diferencia estadísticamente significativa para el SNP rs622342 en OCT1 y para el SNP rs2289669 en MATE1.

Tabla 30. Cálculo de la Razón de Momios (OR) para rs622342 en OCT1 y rs2289669 en MATE1.

Modelo para OCT1 rs622342 A>C	OR	<i>p</i>
CC+CA	1	
AA	1.30	0.46
CC	1	0.80
AA+CA	2.43	
CC	1	
CA	1.52	0.48
AA	0.52	0.58
Modelo para MATE1 rs2289669	OR	<i>p</i>
GG+GA	1	0.90
AA	1.08	
GG	1	
AA+GA	1.88	0.26
GG	1	
GA	0.76	0.74
AA	1.56	0.57

n=70

CAPÍTULO 4

4. DISCUSIÓN

Se ha reportado que existe una marcada variabilidad en la respuesta a la metformina en pacientes diabéticos, es por eso que se busca encontrar una asociación entre los polimorfismos de OCT1 y MATE1 los cuales están involucrados directamente en el transporte de este fármaco, para poder obtener información de utilidad y así proporcionar un tratamiento más eficaz y personalizado (Arocha *et al.*, 2017).

En el presente trabajo se reportaron las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs622342 del gen OCT1 y rs2289669 en el gen MATE1 en hombres y mujeres mayores de 18 años del estado de Nuevo León. El gen OCT1 pertenece a una familia de transportadores de cationes orgánicos que están involucrados en el transporte de xenobióticos entre ellos la metformina, en específico OCT1 se ha reportado que ciertas variaciones en su secuencia afectan su capacidad de transporte (Tzvetkov *et al.*, 2009). Con respecto a MATE1 es un transportador de salida renal involucrado en la excreción de ciertos fármacos, en un estudio realizado por Oh y cols en 2016 inhibieron la acción de éste transportador por medio de un potente inhibidor (pirimetamina) y observaron que el efecto de reducción de la metformina era afectado por esta inhibición, concluyendo que el transportador está directamente involucrado en la eficacia de la metformina.

Las frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP rs622342 en OCT1 que se obtuvieron en el presente estudio fueron las siguientes: genotipo CC=12.5%, genotipo CA=50%, genotipo AA=37.5%, las frecuencias alélicas para el alelo C=37.5% y para el alelo A=62.5%. Becker y cols en 2010 en población holandesa reportaron las siguientes frecuencias genotípicas: genotipo CC=13%, genotipo CA=48%, genotipo AA=39%, para las frecuencias alélicas: para el alelo C=37% y para el alelo A=63% (n=98). Tkáč y cols en 2013 en población eslovaca reportan las siguientes frecuencias genotípicas: para el genotipo CC=5%, genotipo CA=41% y genotipo CC=5%, ellos no reportaron las frecuencias alélicas en su estudio (n=148). Umamaheswaran y cols en 2014 en población del sur de la India obtuvieron para los genotipos en OCT1 las siguientes frecuencias genotípicas: genotipo CC=6.5%, genotipo CA=27.9% y genotipo AA=65.6%, y las frecuencias alélicas: para el alelo C=20.5% y para el alelo A=79.5% (n=122).

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas son comparables a las obtenidas en la población holandesa (Becker *et al.*, 2010), por otra parte, con los resultados de los otros dos estudios las frecuencias difieren (población eslovaca y población del sur de la India); sin embargo, esta variación puede deberse a la diferencia en el número de muestra, ya que los estudios de 2013 (Tkáč y cols) y 2014 (Umamaheswaran y cols) utilizaron un número de muestra mucho mayor al utilizado en el presente estudio.

Para el SNP rs2289669 en MATE1 las frecuencias genotípicas y alélicas fueron las siguientes: genotipo GG=32.3%, genotipo GA=44.8%, genotipo AA=22.9% y las frecuencias alélicas: alelo G=54.7% y alelo A=45.3%. Becker y cols en 2009 en población holandesa reportó las siguientes frecuencias genotípicas para el SNP en cuestión: genotipo GG=31%, genotipo GA=50%, genotipo AA=18% y para las frecuencias alélicas fue para

el alelo G=57% y para el alelo A=43% (n=116). Los resultados de Tkáč y cols en 2013 en población eslovaca fueron para el genotipo GG=30%, genotipo GA=50% y genotipo AA=20%, ellos no reportaron las frecuencias alélicas (n=148). He y cols en 2015 en población china reportan para el genotipo GG=24%, genotipo GA=51%, genotipo AA=25% y las frecuencias alélicas para el alelo G=79.25% y alelo A=20.75% (n=202). Nuevamente en población china en el 2016, Xiao y cols reportan para el genotipo GG=23%, genotipo GA=48%, genotipo AA=29% y para el alelo G=47.19 y alelo A=52.81% (n=267). Mousavi y cols en 2017 en población iraní reportan solamente las frecuencias genotípicas para el genotipo GG=33%, genotipo GA=52% y genotipo AA=14% (n=71).

Los resultados obtenidos son comparables con los antecedentes previamente discutidos para este polimorfismo, encontrando solamente diferencia, con los estudios realizados por He en el 2015 y de Xiao en 2016, ambos realizados en población china, donde las frecuencias alélicas fueron distintas a las que se obtuvieron en el presente trabajo, nuevamente se puede atribuir esta diferencia al número de muestra utilizado.

En el presente trabajo se encontró una asociación estadísticamente significativa en el SNP rs2289669 en el gen MATE1, donde la mayor reducción en los valores de HbA1c fue para el genotipo GA en MATE1 ($p < 0.05$ y una media de reducción de 0.51 ± 0.43), Mousavi y cols en 2017 reportaron un resultado similar, ya que analizaron el SNP en población de Irán, donde encontraron que el genotipo GA presentaba una mayor reducción comparado con los demás genotipos; ellos obtuvieron una media de reducción en la HbA1c de 2.44 ± 1.51 para los pacientes con genotipo GA con un valor de $p < 0.05$.

Al analizar los resultados por los diferentes modelos de herencia (dominante y recesivo) se encontró nuevamente una asociación estadísticamente significativa para el SNP rs2289669 en MATE1, cuando se analizó por medio del modelo recesivo, donde los pacientes que presentan el alelo A tienen la mayor reducción en los valores de HbA1c (media de reducción de 0.44 ± 0.39) en comparación con los que tienen el alelo G (media de reducción de 0.23 ± 0.43). En otras poblaciones ya han sido reportados estos mismos resultados, en 2013 Becker y cols en población holandesa reportaron que los pacientes que presentaban el alelo A tenían una reducción mayor de 0.30, Tkáč y cols en el 2016 en población eslovaca reportaron que la mayor reducción de HbA1c la presentaban los pacientes con genotipo AA (media de reducción de 1.10), en 2015 en población china, Xiao y cols encontraron la misma asociación obteniendo una media de reducción de 1.21 en los pacientes que presentaban el genotipo AA, lo que puede resultar en que el alelo A es responsable de una mejor respuesta a la metformina en los pacientes diabéticos.

Para el caso del SNP rs622342 en el gen OCT1 no se encontró una asociación estadísticamente significativa cuando se analizó la reducción de HbA1c ni en los diferentes modelos de herencia.

Los resultados fueron analizados clasificando la población por grupos de intervalos de reducción de HbA1c y se obtuvo una asociación estadísticamente significativa para el SNP rs622342 en OCT1, en específico en el intervalo de 0.26-0.50, donde el genotipo AA presentó el mayor efecto, con una media de reducción de 0.41 ± 0.06 , en comparación con el genotipo CC y CA en donde la reducción en los sujetos con estos genotipos no tuvo diferencia estadísticamente significativa. Un resultado similar al obtenido por Becker y cols en 2009 donde obtuvieron la mayor reducción en los pacientes con genotipo AA

teniendo una media de reducción de 0.53 siendo éste genotipo el que tuvo la mayor reducción, en 2014 Umamaheswaran y cols reportaron los mismos resultados, ellos dividieron la población en pacientes que respondieron al tratamiento y pacientes que no respondieron al tratamiento, poniendo como respondedores a todos los pacientes que su HbA1c se había reducido más del 0.5, ellos reportan que los pacientes con genotipo AA responden 5.6 veces mejor al tratamiento con metformina que los pacientes con genotipo CC ($p=0.033$).

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo es el primer reporte de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs622342 en el gen OCT1 y rs2289669 en el gen MATE1 en personas con diagnóstico de diabetes del noreste de México.

De acuerdo a los resultados obtenidos existe una asociación entre el SNP rs622342 del gen OCT1 y la disminución de HbA1c en pacientes diabéticos con tratamientos por tres meses con metformina, aquellos con genotipo AA presentan mayor efecto terapéutico, comparados con pacientes diabéticos con los genotipos CC y CA.

Para el SNP rs2289669 en el gen MATE1 existe una asociación de la reducción en los valores de HbA1c con el genotipo GA. Los pacientes con el genotipo GA presentan una mayor disminución en los valores de HbA1c después de tres meses con metformina como única terapia farmacológica a dosis de 800 mg diarios.

Los resultados analizados por los diferentes modelos de herencia (dominante y recesivo) muestran una asociación estadísticamente significativa para el SNP rs2289669 en MATE1, donde los pacientes que presentan el alelo A tienen la mayor reducción en los valores de HbA1c en comparación con los que tienen el alelo C.

5.1. Perspectivas.

La nueva era de las ciencias genómicas nos abre una pauta para poder buscar soluciones nuevas, los estudios de asociación son una herramienta útil y que están en constante crecimiento, con los estudios genéticos se han encontrado que ciertas enfermedades están relacionadas con el fondo genético, así como en la farmacocinética de los fármacos.

Actualmente la farmacogenómica es un área que está en expansión, siendo cada vez más los estudios de este tipo. En un futuro, la medicina personalizada podrá ayudar a mejorar los tratamientos para las diversas enfermedades, haciendo que las respuestas sean más efectivas y ayudando a la economía de los pacientes, ya que con el conocimiento de su fondo genético el médico podrá establecer el tratamiento más adecuado y el que va a tener un mejor efecto terapéutico, disminuyendo además los efectos adversos.

Cómo perspectivas futuras de este trabajo se propone aumentar el tamaño de muestra para ver si los resultados son similares al haber un aumento en el número de individuos, además la posibilidad de analizar otras regiones de México para ver el comportamiento de los polimorfismos.

En el área de las técnicas moleculares se sugeriría realizar una secuenciación de los fragmentos para evaluar la exactitud de las técnicas empleadas en la identificación de los diferentes genotipos.

REFERENCIAS

- American Diabetes Association. Disponible en: <http://www.diabetes.org/>
- American Diabetes Association. (2018). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 41 (1): S13-S27.
- Arocha J., Blanco T., Aure G. & Palacios A. (2017). Metformina, el fármaco paradigma del siglo XXI. *Medicina Interna*. 33 (1): 4-18.
- Aguilar S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*. 11 (1-2): 333-338.
- Balderas I. (2015). Diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Un abordaje multidisciplinario. México, D.F. 1ª Edición, Editorial El Manual Moderno.
- Banda S., Torres E. & Chávez H. (2010). Farmacogenética y farmacogenómica: hacia una medicina personalizada. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 53 (2): 55-59.
- Becker M., Visser L., Van Schaik R., Hofman A., Vitterlinden A. & Stricker B. (2009). Genetic variation in the Multidrug and Toxin Extrusion 1 Transporter Protein influences the glucose-lowering effect of metformin in patients with Diabetes: A preliminary study. *Diabetes*. 58 (3): 745-749.
- Becker M., Visser L., Van Schaik R., Hofman A., Vitterlinden A. & Stricker B. (2009). Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes mellitus. *The Pharmacogenomics Journal*. 9: 242-247.
- Becker M., Visser L., Van Schaik R., Hofman A., Vitterlinden A. & Stricker B. (2010). Interaction between polymorphisms in the OCT1 and MATE1 transporter and

- metformin response. *Pharmacogenetics and Genomics*. 20 (1): 38-44.
- Bravo S., Caminos J. & Eslava J. (2011). Medicina personalizada: farmacogenómica y farmacoepigénica. *Revista Colombiana de Anestesiología*. 39 (3): 308-313.
- Cerna L. & Maresova P. (2016). Patients attitudes to the use of modern technologies in the treatment of diabetes. *Patients Preference and Adherence*. 10: 1869-1879.
- Checa Caratachea M. (2007). Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas*. 20 (3): 213-221.
- Chen Y., Li S., Brown C., Cheatham S., Castro R., Leabman M., Urban T., Chen L., Yee S., Choi J., Huang Y., Brett C., Burchard E. & Giacomini K. (2009). Effect of Genetic Variation in the Organic Cation Transporter 2, OCT2, on the Renal Elimination of Metformin. *Pharmacogenet Genomics*. 19 (7): 497-504.
- Crespo S. (2009). Metformina, a 50 años de su uso: Eficacia, tolerancia, seguridad y nuevas indicaciones. *Revista Científica Médica*. 12 (2): 23-25.
- Cuautle-Rodríguez P., Llerena A. & Molina-Guarneros J. (2013). Present status and perspective of pharmacogenetics in México. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 29 (1): 37-45.
- Daudén E. (2007). Farmacogenética II. Métodos moleculares de estudio, bioinformática y aspectos éticos. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 98 (1): 3-13.
- Dawed A., Zhou K. & Pearson E. (2016). Pharmacogenetics in type 2 diabetes: influence on response to oral hypoglycemic agents. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2016 (9): 17-29.
- Dean L. & McEntyre J. (2004). The Genetic Landscape of Diabetes [Internet]. Bethesda

(MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1667/>

- He R., Zhang D., Lu W., Zheng T., Wan L., Liu F. & Jia W. (2015). SLC47A1 gene rs2289669 G>A variants enhance the glucose-lowering effect of metformin via delaying its excretion in Chinese type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 109 (1): 57-53.
- Hernández-Ávila M., Gutiérrez J. & Reynoso-Noverón N. (2013). Diabetes mellitus en México. *Salud Pública de México*. 55 (2): S129-S136.
- Hosseyini-Talei S., Mahrooz A., Hashemi-Soteh M., Ghaffari-Cherati M. & Alizadeh A. (2017). Association between the synonymous variant organic cation transporter 3 (OCT3)-12334G>A and the glycemic response following metformin therapy in patients with type 2 diabetes. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 20 (3): 250-255.
- Iniesta R., Guino E. & Moreno V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*. 19 (4): 334-341.
- Itoda M., Saito Y., Maekawa K., Hichiya H., Komamura K., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Ueno K., Ozawa S. & Sawada J. (2004). Seven novel nucleotide polymorphisms in the Human SLC22A1 gene encoding Organic Cation Transporter 1 (OCT1). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 19 (4): 308-312.
- Jacobs C., Pearce B., Plessis M., Hoosain N. & Benjeddou M. (2014). Genetic polymorphisms and haplotypes of the organic cation transporter 1 gene (SLC22A1) in the Xhosa population of South Africa. *Genetics and Molecular Biology*. 37 (2): 350-359.
- Kerb R., Ulrich B., Chatskaia N., Gorbunov D., Gorboulev V., Mornhinweg E., Keil A., Eichelbaum M. & Koepsell H. (2002). Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*. 12 (8): 591-595.

- Kleinberger J. & Pollin T. (2015). Personalized medicine in diabetes mellitus: current opportunities and future prospects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1346 (1): 45-56.
- Luo J., Ren H., Liu M., Fang P. & Xiang D. (2018). European versus Asian difference for the associations between paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 20 (10): 1-13.
- Manolopoulos VG., Ragia G. & Tavridou A. (2011). Pharmacogenomics of oral antidiabetic medications: current data and pharmacogenomic perspective. *Pharmacogenomics*. 12 (8): 1161-1191.
- Mata M. (2008). Metformina y diabetes mellitus tipo 2. *Atención Primaria*. 40 (3): 147-153.
- Meyer M., Brockmöler J., Tzvetkov M. (2017). Effects of genetic polymorphisms on the OCT1 and OCT2-mediated uptake of ranitidine. *PLoS ONE*. 12 (2): 1-20.
- Miranda N. Tovar A., Palacios B & Torres N. (2007). La AMPK como un sensor de energía celular y su función en el organismo. *Revista de Investigación Clínica*. 59 (6): 458-469.
- Mousavi S., Kohan L., Yavarian M. & Habib A. (2017). Pharmacogenetic variation of SLC47A1 gene and metformin response in type 2 diabetes patients. *Molecular Biology Research Communications*. 6 (2): 91-94.
- Nies A., Damme K., Kruck S., Schaeffeler E. & Schwab M. (2016). Structure and function of multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) and their relevance to drug therapy and personalized medicine. *Archives of Toxicology*. 90: 1555-1584.

- Oh J., Chung H., Park S., Yi S., Jang K., Kim A., Yoon J., Cho J., Yoon S., Jang I., Yu K. & Chung J. (2016). Inhibition of the multidrug and toxin extrusion (MATE) transporter by pyrimethamine increases the plasma concentration of metformin but does not increase antihyperglycaemic activity in humans. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 18 (104): 104-108.
- Ortega C. (2003). Metformina (primer escalón terapéutico): titulación de la dosis. Suplemento Extraordinario. *Diabetes práctica. Actualización y habilidades en atención primaria*. 3-10.
- Ortiz M., Solorio C. & Ruiz A. (2017). Síntesis de antidiabéticos N-alkil-N-arilbisanidínicos derivados de metformina. *Verano de la Investigación Científica*. 3 (2): 908-912.
- Pawlyk A., Giacomini K., McKeon C., Schuldiner A. & Florez J. (2014). Metformin Pharmacogenomics: Current Status and Future Directions. *Diabetes*. 63: 2590-2599.
- Pérez E. (2005). Caracterización del genotipo N-Acetiltransferasa 2(NAT2) en una muestra de la población del noreste de México (Tesis de Postgrado). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León.
- Rena G., Pearson E. & Sakamoto K. (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights. *Diabetologia*. (56) 1898-1906.
- Reyes F., Pérez M., Figueredo E., Ramírez M. & Jiménez Y. (2016). Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *Correo Científico Médico de Holguin*. 20 (1): 98-121.
- Rosas J., Lyra R. & Cavalcanti N. (2009). *Diabetes Mellitus: Visión Latinoamericana*. 1ª Edición, Editorial Intersistemas.

- Sakata T., Anzai N., Jung Shin H., Noshiro R., Hirata T., Yokoyama H., Kanai Y. & Endou H. (2004). Novel Single Nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (SLC22A1) affecting transport functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313 (3): 789-793.
- Singh S., Usman K. & Banerjee M. (2016). Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 7 (15): 302-315.
- Tamay L., Ibarra C. & Velasquillo C. (2013) Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud*. 2 (2): 70-78.
- Tietz N. (1999). *Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia. W.B. Saunder Company. p. 93-97.
- Tkáč I., Klimčáková L., Javorský M., Fabianová M., Schroner Z., Hermanová H., Babjaková E. & Tkáčová R. (2013). Pharmacogenomic association between a variant in SLC47A1 gene and therapeutic response to metformin in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity and metabolism*. 15 (2): 189-191.
- Todd. J. & Florez J. (2014). An update on the pharmacogenomics of metformin: progress, problems and potential. *Pharmacogenomics*. 15 (4): 529-539.
- Tzvetkov MV., Vormfelde SV., Balen D., Meineke I., Schmidt T., Sehr T., Sabolic I., Koepsell H. & Brockmoller J. (2009). The effects if genetic polymorphisms in the Organic Cation Transporters OCT1, OCT2 and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 86 (3): 299-306.
- Umamaheswaran G., Praveen R., Damodaran S., Das A. & Adithan C. (2014). Influence of SLC22A1 rs622342 genetic polymorphism on metformin response in South Indian type 2 diabetes mellitus patients. *Clinical and Experimental Medicine*. 15 (4): 511-517.
- Velázquez O., Lara A. & Tapia R. (2002). *Metformina y Síndrome Metabólico*. Manual de Uso, Secretaria de Salud.

- Viollet B., Guigas B., Sanz N., Leclerc J., Foretz M. & Andreelli F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*. 122 (6): 253-270.
- Wilson NC., Choudhury A., Carstens N. & Mavri-Damelin D. (2017). Organic Cation Transporter 2 (OCT2/SLC22A2) Gene Variation in the South Africans Bantu Speaking Population and Functional Promoter Variants. *OMICS*. 21 (3): 169-176.
- Xiao D., Guo Y., Li X., Yin J., Zheng W., Qiu X., Xiao L., Liu R., Wang S., Gong W., Zhou H. & Liu Z. (2016). The impacts of SLC22A1 rs594709 and SLC47A1 rs2289669 Polymorphisms on metformin therapeutic efficacy in Chinese type 2 diabetes patients. *International Journal of Endocrinology*. 2016: 1-7.
- Ye S. Dhillon S. Ke X., Collins AR. & Day IN. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acid Research*. 29: E88-8.
- Yonezawa A. & Inui K. (2011). Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics. *British Journal of Pharmacology*. 167 (7): 1817-1825.

APÉNDICES

APÉNDICE A

INVITACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

APÉNDICE A

Invitación para participar en el estudio de investigación



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Invitación a participar en estudio de investigación

¿Quiénes pueden participar?

Hombres y mujeres mayores de edad, que no se encuentren bajo algún tratamiento hipoglucemiante.



Beneficios

Conocer el comportamiento de los niveles de azúcar en sangre y triglicéridos por medio de técnicas confiables y seguras.



Además se determinara el índice de masa corporal (IMC).



SIN COSTO

Interesados comunicarse a los siguientes contactos:
Subdirección de Químico Farmacéutico Biólogo FCQ UANL
Tel. 83294000 ext. 6221
8441016257 QFB Jorge Luis Guía García
(jorge.guía.g92@gmail.com)

APÉNDICE B

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

APÉNDICE B

Carta de Consentimiento Informado



Carta de consentimiento informado



Monterrey, Nuevo León a ___ de _____ de _____

Por medio de la presente, yo _____ autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado "Estudio de la asociación entre los polimorfismos rs2289669 en el gen MATE1 y rs622342 en el gen OCT1, y la efectividad terapéutica de la metformina en pacientes diabéticos del noreste de México". El objetivo de este estudio es analizar la posible asociación que existe entre los polimorfismos rs622342 en el gen OCT1 y rs2289669 en el gen MATE1 con la efectividad terapéutica de metformina en pacientes con Diabetes tipo 2.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

- Completar la encuesta de datos clínicos.
- Permitir la extracción de una muestra de 10 ml de sangre si fuera requerido.
- Evaluación de composición corporal.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

- Por la toma de muestra de sangre: malestar, dolor y formación de hematoma en el sitio del piquete de la vena.
- Por la evaluación de composición corporal, al ser un método simple, rápido y no invasivo no requiere preparación especial y se considera que no tiene efectos secundarios y sus riesgos son considerados mínimos.

Con lo anterior se generará información para determinar la asociación que existe entre los polimorfismos rs622342 en el gen OCT1 y rs2289669 en el gen MATE1 con la efectividad terapéutica de metformina en pacientes con Diabetes tipo 2. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica en cualquier momento que lo considere conveniente. El investigador principal, Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez ha confirmado que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos, número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato y la información será manejada en grupos.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del investigador responsable

Testigo 1

Testigo 2

APÉNDICE C

EXPEDIENTE

APÉNDICE C

Expediente



Proyecto: Estudio de la asociación entre los polimorfismos rs2289669 en el gen MATE1 y rs622342 en el gen OCT1, y la efectividad terapéutica de la metformina en pacientes diabéticos del noreste de México.

DATOS PERSONALES

Folio

Nombre _____

Fecha de nacimiento _____ Lugar de nacimiento _____

Edad _____ Estado civil _____
Estado _____

Municipio _____ Teléfono _____

Deporte y /o actividad física que practica _____
Frecuencia _____

Fuma _____ Cantidad _____
Frecuencia _____

Alcohol _____ Cantidad _____

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

Lugar de nacimiento

Padre _____

Abuelo paterno _____

Abuela paterna _____

Madre _____

Abuelo materno _____

Abuela materna _____

Enfermedades en la familia

	Si/No	Familiar
Hipertensión		
Infarto al miocardio		
Hipercolesterolemia		
Diabetes Mellitus		
Obesidad		
Cáncer		
Hipertrigliceridemia		
Osteoporosis		
Fracturas		
Otra (especificar)		

ANTECEDENTES PATOLOGICOS PERSONALES

Alergias : _____ Especificar: _____ Obesidad: ____ HTA: _____

Intervenciones quirúrgicas: _____ Enfermedad cardiovascular: ____ Hormonales: ____

Diarrea: _____ Estreñimiento: _____ Gastritis: ____ Colitis: _____

Neuropatía diabética: ____ Glaucoma: ____

Nefropatía: ____ Úlceras diabéticas: ____

Padecimiento actual: _____

Tiempo padeciendo la enfermedad: _____

Complicaciones presentes durante su enfermedad: _____

Toma algún medicamento actualmente: Si / No

En caso afirmativo especifique cual(es) y dosis: _____

MEDICAMENTOS

¿Qué medicamentos ha tomado últimamente? (últimos 6 meses)

Medicamento	Dosis	Tiempo tomando el medicamento

Ha presentado alguno de los siguientes síntomas en fechas recientes:

Pérdida de peso: ____ Si ____ No

Aumento de apetito: ____ Si ____ No

Orina frecuentemente y abundante: ____ Si ____ No

Sed excesiva: ____ Si ____ No

Fatiga: ____ Si ____ No

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jorge Luis Guía García

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS rs2289669 EN EL GEN MATE1 Y rs622342 EN EL GEN OCT1 CON LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE LA METFORMINA EN PACIENTES DIABÉTICOS DEL NORESTE DE MÉXICO.

Campo de Estudio: Farmacia

Biografía:

Datos personales: Nacido en Saltillo, Coahuila el 28 de diciembre de 1992, hijo de Víctor Manuel Guía Rivera y Rosalinda García Salas.

Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Coahuila, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2015, primer lugar en aprovechamiento en la generación.

Experiencia Profesional:

Químico en Documentación en Laboratorios Diba S.A. en el periodo de Julio 2015 a Julio 2016.