UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud
Facultad de Química
Maestría en Investigación Clínica Experimental en Salud
Bioquímica Clínica

Frecuencia de los polimorfismos en el gen *CYP2C9* en pacientes Maya-mestizos con Diabetes Tipo 2 y su asociación con el desarrollo de hipoglucemia

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. AUREA CAROLINA ACOSTA TUN

Director de Tesis
Dra. María Guadalupe Ortiz López
Hospital Juárez de México

Comité Tutor
Dra. María Guadalupe Ortiz López, Hospital Juárez de México
Dra. Helgi H. Jung Cook, Facultad de Química-UNAM
M. en C. F. Mario A. Ramírez Camacho, Facultad de Química-UADY

Ciudad Universitaria, CD. MX. Noviembre 2019

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

Programa de Maestría y Doctorado en Investigación Clínica Experimental en Salud

Frecuencia de los polimorfismos en el gen *CYP2C9* en pacientes Maya-mestizos con Diabetes Tipo 2 y su asociación con el desarrollo de hipoglucemia

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A
Q.F.B. AUREA CAROLINA ACOSTA TUN

Tutor:
M. en C. María Guadalupe Ortiz López
Hospital Juárez de México

Comité Tutor
Dra. Helgi H. Jung Cook, Facultad de Química-UNAM
M. en C. María Guadalupe Ortiz López, Hospital Juárez de México
M. en C. F. Mario A. Ramírez Camacho, Facultad de Química-UADY

Ciudad Universitaria CD.MX., Noviembre 2019

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o los autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Menjívar por hacer de aquel sueño tan lejano, una realidad. Gracias por compartir sus conocimientos, enseñanzas pero sobre todo por sus consejos, paciencia y apoyo en mi formación académica y personal. Por impulsar el desarrollo de la investigación científica en México, mi admiración total. A la Dra. Guadalupe Ortiz López por la confianza, consejos y orientación en este proyecto y hacer que mi estancia junto con su equipo de trabajo del Hospital Juárez de México fuera productiva y de gran aprendizaje.

Mención especial a la Dra. Bárbara Peña Espinoza, por su orientación en los análisis estadísticos, trabajo de laboratorio, revisión de textos y presentaciones. Eres una investigadora digna de admiración, gracias por tu apoyo, consejos y confianza.

Compañeros del Posgrado ICES sede Mérida han sido un excelente grupo, gracias por su amistad y compañerismo, por haber creado un agradable ambiente de trabajo. Porque cada uno de ustedes aportó algo positivo en mi persona.

Al Comité Tutor e integrantes del Jurado por sus valiosas aportaciones, correcciones, y comentarios, que mejoraron sustancialmente el presente trabajo. Gracias por el tiempo dedicado

Gracias totales a todos los participantes y pacientes de este estudio, sin ellos esto no hubiera sido posible.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química UNAM, Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán (HRAEPY), Hospital Juárez de México, Posgrado en Ciencias Médicas Odontólogicas y de la Salud, Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la UNAM en Yucatán por las facilidades otorgadas para la realización del posgrado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (832636).

DEDICATORIA

Familia, ustedes me han motivado día a día. Mamá tú fuiste mi principal apoyo en esta etapa, este trabajo te lo dedico a tí, mi amor por siempre. Papá tu eres el claro ejemplo de responsabilidad, humildad y perseverancia, te quiero y admiro mucho. Lalo, tu forma de ver la vida me contagia, te quiero. A mi abuelita Consuelo, porque tus palabras siempre retumban en mi mente y corazón.

Jorge: Tú eres el principal responsable de este logro, siempre impulsándome en este maravilloso mundo de la ciencia. Estuviste conmigo en los momentos más difíciles y compartiste conmigo las alegrías, te amo.

A mis amigas Lili, Kary, Diana y Sherlin, las quiero y admiro mucho, gracias por sus palabras.

Dra. Liz y Maestro Javier, por creer en mí y creer que la ciencia siempre estará al servicio de la comunidad, son un ejemplo a seguir.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS……..3

DEDICATORIA……..4

INDICE GENERAL……5

INDICE DE TABLAS……7

INDICE DE FIGURAS……...8

ABREVIATURAS……..9

RESUMEN……12

1. INTRODUCCIÓN……13

1.1 Definición y diagnóstico de Diabetes……..……13

1.2 Epidemiología…….14

1.3 Terapias farmacológicas en el control de la DT2……14

1.4 Sulfonilureas……16

1.5 Farmacocinética……...18

1.6 Farmacodinamia……..18

1.7 Farmacogenética……..19

1.8 *CYP450*……20

1.9 *CYP2C9*……...20

1.10 *CYP2C9*2* Y *CYP2C9*3*……..21

1.11 Adherencia terapéutica y reacciones adversas de las sulfonilureas……...21

1.12 Hipoglucemia……24

1.12 Diversidad poblacional en México……24

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA……..26

3. JUSTIFICACIÓN…….27

4. HIPÓTESIS……...28

5. OBJETIVOS…….29

5.1 Objetivo general……..29

5.2 Objetivos específicos……...29

6. MATERIAL Y MÉTODOS……..30

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO……..34

8. RESULTADOS…….35

8.1 Descripción de la población……35

8.2 Descripción farmacológica……..37

8.2 Análisis molecular……...38

9.DISCUSIONES……..44

10. CONCLUSIONES……..50

11. ANEXOS ……51

11.1 Carta de Aceptación y Ejecución del Protocolo de Investigación por el Comité de Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad……...51

11.2 Consentimiento informado ……...52

11.3 Cuestionario……...56

11.4 Determinaciones bioquímicas……59

11.5 Extracción de ADN mediante la técnica modificada de Miller…….63

11.6 Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)……..64

11.7 Programa de amplificación de RT-PCR……65

11.8 Secuencias de las sondas……...65

11.9 Preparación de reactivos……65

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS……...….67

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Criterios para el diagnóstico de la diabetes…….13

TABLA 2. Terapias Farmacológicas utilizadas para el control de la DT2……...15

TABLA 3. Clasificación de las sulfonilureas……17

TABLA 4. Farmacocinética de las sulfonilureas……..18

TABLA 5. Mezcla de reacción de RT-PCR……..33

TABLA 6. Datos somatométricos de la población Maya-mestiza de Yucatán con DT2…..36

TABLA 7. Parámetros bioquímicos de la población Maya-mestiza de Yucatán con DT2..37

TABLA 8. Frecuencia alélica y genotípica de *CYP2C9* en la población Maya-mestiza….39

TABLA 9. Comparación de frecuencias alélicas de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* entre la población Maya-mestiza, Amerindia, Mestizos de México y EUA……..40

TABLA 10. Comparación de las frecuencias alélicas *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* entre la población Maya-mestiza y las poblaciones del 1000 Genomas……41

TABLA 11. Asociación de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* con síntomas de hipoglucemia en pacientes bajo tratamiento con sulfonilureas mediante regresión logística multinomial……..……..……..42

TABLA 12. Asociación de *CYP2C9*2* con síntomas de hipoglucemia en pacientes bajo tratamiento con sulfonilureas mediante chi cuadrada…….……..42

TABLA 13. Asociación de *CYP2C9*3* con síntomas de hipoglucemia en pacientes bajo tratamiento con sulfonilureas mediante chi cuadrada…….……..43

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura química de las sulfonilureas…….16

FIGURA 2. Mecanismo de acción de las sulfonilureas en las células β del páncreas……..19

FIGURA 3. Secuencia del gen *CYP2C9* y posición de los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*…….22

FIGURA 4. Diagrama del diseño experimental……30

FIGURA 5. Principales RAM's reportadas en la población Maya-mestiza en tratamiento con hipoglucemiantes……38

FIGURA 6. RT-PCR con sondas *TaqMan*®…….64

FIGURA 7. Programa de amplificación para las sondas *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*…….65

ABREVIATURAS

DT2	Diabetes Tipo 2
ADA	Asociación Americana de Diabetes
FID	Federación Internacional de Diabetes
OMS	Organización Mundial de la Salud
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
UKPDS	Estudio Prospectivo Inglés sobre Diabetes
HRAEPY	Hospital Regional de Alta Especialidad de Yucatán
HbA1c	Hemoglobina glicada
RAM	Reacción adversa a un medicamento
RAM's	Reacción adversa a medicamentos
EUA	Estados Unidos de América
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg	Arginina
Cys	Cisteína
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
g	gramos
cm	centímetros
ATP	Adenosín trifosfato
K_{ATP}	Canal de potasio dependiente de ATP
CYP2C9	Citocromo P450 Familia 2 subfamilia C polipéptido 9
CPIC	Consorcio de Implementación Farmacogenética Clínica
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido

HDL	Lipoproteína de alta densidad
mg/dL	miligramos sobre decilitro
HDL-c	Colesterol de HDL
ICC	índice cintura cadera
IMC	índice de masa corporal
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL-c	Colesterol de LDL
AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina transaminasa
PAD	Presión arterial diastólica
mmHg	milímetros de mercurio
PAS	Presión arterial sistólica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
hrs	horas
min	minutos
seg	segundos
DT1	Diabetes tipo 1
µL	microlitros
mL	mililitro
ng/uL	nanogramos sobre microlitro
pb	pares de bases
rpm	revolución por minuto
V	Volts
kDa	kilodalton
ºC	grado Celsius

SDS	duodecil sulfato de sodio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	PCR en tiempo real
H-W	equilibrio de Hardy-Weinberg
OR	Razón de probabilidades
DE	Desviación estándar
Q_1	Cuartil 25
Q_3	Cuartil 75
mmol/L	milimol sobre litro
nm	nanómetros
U/L	unidades sobre litro
NaCl	cloruro de sodio
$MgCl_2$	cloruro de magnesio
Na_2EDTA	sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético
M	molar
TBE	Tris/Borato/EDTA
B.M.	Biología molecular

RESUMEN

Las sulfonilureas son medicamentos empleados en el tratamiento farmacológico de la diabetes tipo 2 (DT2) para el control metabólico, prevención de complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad de esta enfermedad. Este grupo de medicamentos son metabolizados en el hígado por las enzimas *CYP2C19, CYP3A4* y en su mayoría por *CYP2C9*, la función reducida se debe a polimorfismos en el gen que codifican esta enzima ocasionando la acumulación del fármaco y por lo tanto mayores RAM's (reacciones adversas al medicamento). **Objetivo:** Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* en la población Maya-mestiza, y evaluar su asociación con síntomas de hipoglucemia. **Material y Métodos:** Fue un estudio transversal en participantes Maya-mestizos con recién diagnóstico de DT2 que acudían al Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán. Se obtuvieron datos sociodemográficos, somatométricos, bioquímicos, farmacológicos y genéticos. **Resultados:** Se incluyeron 250 pacientes, siendo 22% hombres y 78% mujeres con edad promedio 49 ± 10. Las alteraciones metabólicas presentes fueron sobrepeso-obesidad (96%), descontrol glicémico (46%), hipercolesterolemia (31%), hipertrigliceridemia (62%) e hipoalfalipoproteinemia (57%). El desapego terapéutico en esta población fue del 76%, la causa principal fue por RAM's, destacando la hipoglucemia, el 60% de los episodios estaban en tratamiento con sulfonilureas. La frecuencia alélica para el polimorfismo *CYP2C9*2* fue 6.6% y para el polimorfismo *CYP2C9*3* fue de 2.2%. Se encontró asociación del polimorfismo *CYP2C9*2* con síntomas de hipoglucemia en aquellos pacientes que estaban en tratamiento con sulfonilureas. **Conclusión:** Estudios de Farmacogenética como el presente permitirán al paciente con DT2 una terapia individualizada que contribuya a mejorar el control metabólico y la adherencia terapéutica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN Y DIAGNÓSTICO DE DIABETES TIPO 2 (DT2)

La DT2 es una enfermedad crónica metabólica que se caracteriza por una disminución en la secreción de insulina o por una marcada resistencia lo que ocasiona un aumento en los niveles de glucosa en el organismo, es desencadenada tanto por factores genéticos como ambientales (1-3). La incidencia se presenta cada vez más en personas jóvenes, lo cual se ha asociado al estilo de vida, como el sedentarismo y la alimentación inadecuada que conducen a obesidad y sobrepeso, que son factores de riesgo para DT2 (4).

El diagnóstico de DT2 se hace a través de la medición de glucosa en sangre, ya sea el valor de glucosa en ayunas, una prueba aleatoria de glucosa, la prueba de tolerancia oral a la glucosa y la hemoglobina glicada (HbA1c) de acuerdo a los criterios descritos en la Tabla 1 (5).

Tabla1. Criterios para el diagnóstico de la diabetes. Modificado de (5)

Glucosa en ayuno ≥ 126mg/dL (7.0 mmol/L). El ayuno se define como la no ingesta de calorías en al menos 8hrs.
ó
Medición de glucosa ≥ 200mg/dL (11.1mmol/L) después de 2hrs de su administración. La prueba debe realizarse como lo describe la Organización Mundial de la Salud (OMS), utilizando una carga de glucosa de 75g de glucosa anhidra disuelta en agua.
ó
HbA1c ≥ 6.5% (48 mmol/mol).
ó
En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, una glucosa aleatoria ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol / L)

1.2 EPIDEMIOLOGIA

La DT2 es considerada un problema de salud tanto a nivel mundial como nacional; la OMS reportó que en el año 2014 el número de personas con diabetes era de 422 millones (6) y la Federación Internacional en Diabetes (FID) estima que para el año 2040 el número de personas con diabetes será de 642 millones, de las cuales el 90% serán pacientes con DT2 (7). En México de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición a Medio Camino 2016 (ENSANUT) el 9.4% de las personas cuentan con un diagnóstico médico de DT2, de los cuales el 12.2% dijeron no estar bajo algún control farmacológico. En la zona sur del país, incluyendo Yucatán, la prevalencia reportada por ENSANUT 2016 en personas mayores a 20 años fue del 10.2%, mayor a la reportada en la ENSANUT 2012 (9.2%), lo cual coloca a esta región en el primer lugar a nivel nacional en prevalencia de diabetes (8).

1.3 TERAPIAS FARMACOLÓGICAS EN EL CONTROL DE LA DT2

El tratamiento farmacológico de la diabetes tiene como propósito mantener el control glicémico y metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones (9). Cuando la DT2 no es controlada, es decir, se tiene hiperglucemia por largos períodos de tiempo, se ven afectados órganos y tejidos, principalmente afección en vasos sanguíneos y nervios, lo que trae consigo una serie de complicaciones como la retinopatía, pie diabético, neuropatía y nefropatía (4). Un mayor control en los niveles de glucosa reduciría las complicaciones, lo que se vería reflejado en la disminución de costos de hospitalización y cirugías (10). Actualmente existen tanto medicamentos orales como inyectables para el control de la DT2, que pueden utilizarse como monoterapia o en combinación (Tabla 2) (1, 11).

Tabla 2. Terapias farmacológicas utilizadas para el control de la DT2

Grupo	Fármaco
Biguanida	Metformina Fenformina
Sulfonilureas	Glipizida Glibenclamida Glimepirida Gliclazida Clorpropamida Tolbutamida Tolazamida Acetohexamida
Tiazolidinedionas (glitazonas)	Pioglitazona Rosiglitazona
Inhibidores de la α-glucosidasa	Acarbosa Miglitol Voglibosa
Inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)	Sitagliptina Vildagliptina
Glinidas	Repaglinida Nateglinida Mitiglinida
Análogo del péptido similar al glucagón tipo I (Análogo de GLP-1)	Exenatida Liraglutida Lixisenatida
Insulina	

El tratamiento se elegirá con base en las características del paciente tales como peso, nivel de hiperglucemia, comorbilidades, tolerancia al medicamento, el tratamiento más eficaz y seguro para el paciente, y el más accesible en costos.

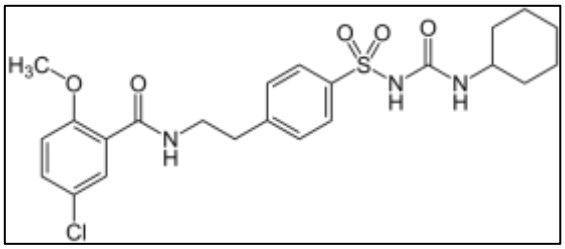
En primera instancia el médico recomienda al paciente cambiar los hábitos en la dieta y el estilo de vida, en conjunto con una monoterapia. Los fármacos de primera línea son las biguanidas, principalmente metformina. Si el paciente presenta intolerancia o contraindicación, puede iniciar con otro hipoglucemiante oral como las sulfonilureas, el más recetado es glibenclamida. Si se logra una adecuado control de la glucosa a los tres meses de haber iniciado con metformina, se continua esta monoterapia, pero si no se logra tener un adecuado control de la glucosa se añade otro hipoglucemiante; aquel paciente que

no presenta riesgo de enfermedades cardíacas se le prescribe en terapia combinada con sulfonilureas, tiazolidinedionas, inhibidor DPP-4 o insulina; si el paciente presenta riesgo de enfermedad cardíaca, se recomienda la metformina en terapia combinada con análogos de la GLP-1 (1, 12, 14).

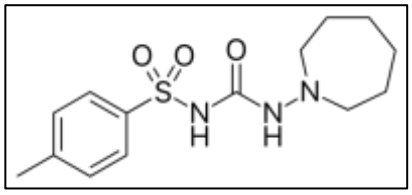
1.4 SULFONILUREAS

Las sulfonilureas son un grupo de medicamentos orales, recetados en el tratamiento de la DT2, llamados secretagogos por que promueven la secreción de insulina (2). Se eligen en primera línea, si el paciente presenta intolerancia o contraindicación a la metformina, o en terapia combinada con metformina cuando el paciente no presenta riesgo de enfermedad cardiovascular (1, 15). En la Figura 1 se observan las estructuras químicas de algunas sulfonilureas.

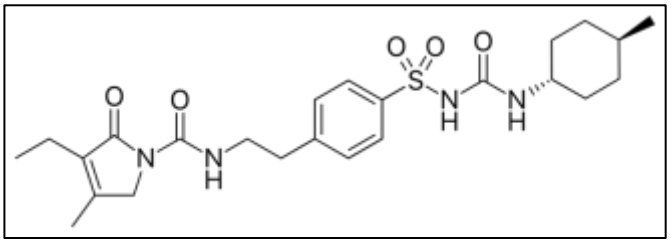
Figura 1. Estructura química de las sulfonilureas



Glibenclamida



Gliclazida



Glimepirida

Las sulfonilureas fueron los primeros medicamentos vía oral que aparecieron en el mercado en el año de 1956 para el control de la diabetes, siendo la tolbutamida la más prescrita (16). Hasta la fecha se continúan prescribiendo, por su eficacia en la reducción de glucosa, seguridad a largo plazo, bajo costo y porque son los medicamentos que tienen más ensayos clínicos (17). La eficacia de estos hipoglucemiantes se basa en la reducción de glucosa, se ha descrito que la reducción va de 1,5% a 2.0% HbA1c (18). Sin embargo, las sulfonilureas presentan una serie de eventos adversos, como son aumento de peso, riesgo cardiovascular, dermatosis, colestasis, hiponatremia y la hipoglucemia, siendo ésta última la más frecuente, llevando a estados mentales de confusión, dolor de cabeza, temblor, debilidad, mareos, vómitos, taquicardia, letargia, convulsiones, coma e incluso la muerte. La glibenclamida, es un medicamento de larga liberación, está muy relacionada con cuadros graves de hipoglucemia en pacientes (19-21). El grupo de las sulfonilureas se divide en 3 grupos (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de las sulfonilureas (22).

Grupo	**Medicamento**
Primera generación	Clorpropamida Tolazamida Acetohexamida Tolbutamida
Segunda generación	Glipizida Glibenclamida Glicazida
Tercera generación	Glimepirida

La clorpropamida y tolbutamida ya no son muy utilizadas en la práctica clínica, ya que su vida media es elevada lo que lleva a tener respuestas más prolongadas y con ello RAM’s más frecuentes (21).

1.5 FARMACOCINÉTICA

Las sulfonilureas de segunda generación presentan diferencias en la absorción, metabolismo y duración de la acción (11, 22). En la Tabla 4 se describen las diferencias farmacocinéticas entre las sulfonilureas

Tabla 4. Farmacocinética de las sulfonilureas

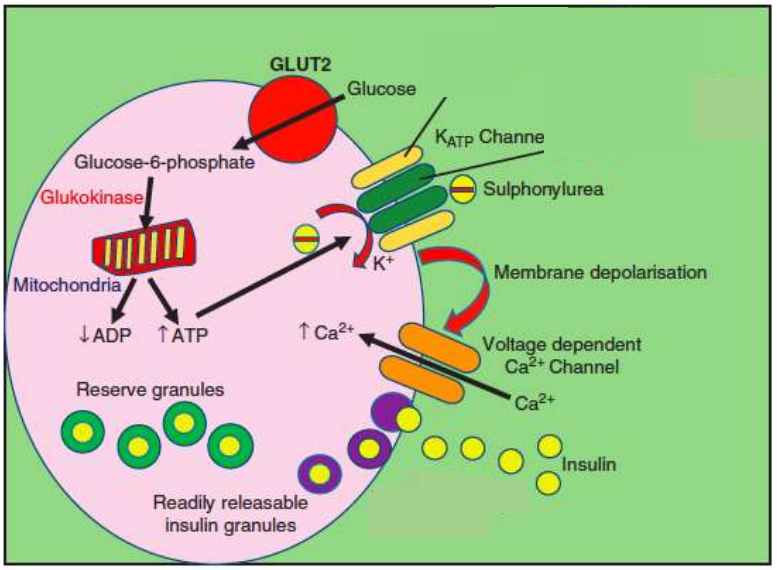
Medicamento	Biodisponibilidad (%)	Unión a proteínas (%)	Vida media (hrs)	Metabolitos	Excreción (%)
Gliclazida	97	95	10	Inactivos	Orina
Glipizida	80	95	2-4	Inactivos	Orina: 63-90 Heces: 11
Glibenclamida	90	99	5-7	Activos	Orina: 50 Bilis: 50
Glimepirida	100	>99	5-8	Activos	Orina: 60 Heces: 35

1.6 FARMACODINAMIA:

Las sulfonilureas se unen a las subunidades SUR-1 que en conjunto con la subunidades Kir 6.2 conforman los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) localizados en la membrana de las células β del páncreas, al unirse a estos canales, éstos se cierran, con lo cual se despolariza la membrana y hace que los canales de calcio se abran, con la posterior entrada de calcio y aumento en su concentración intracelular que activa a la fosfolipasa C, la cual da paso a la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol a partir del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato. El IP3 se une a receptores de la membrana del retículo endoplásmico dando lugar a la liberación de calcio del retículo endoplásmico a través de los canales IP3, lo cual, genera una concentración intracelular elevada de calcio. Estas concentraciones de calcio dentro de las células activan la sinaptotagmina, que ayuda a la

liberación de gránulos de insulina de vesículas secretoras. La insulina se une a su receptor con lo cual se estimula la actividad tirosina cinasa y la autofosforilación del receptor, fosforilación de residuos de tirosina en los IRS. El incremento de fosfotirosina estimula la actividad de otras moléculas intracelulares como GTPasas, fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y posteriormente activación de cascadas de señalización (Figura 2) (23, 24).

Figura 2. Mecanismo de acción de las sulfonilureas en las células β del páncreas. Modificado de (23).



1.7 FARMACOGENÉTICA

La farmacogenética involucra la personalización de los tratamientos farmacológicos basados en el genotipo del paciente para asegurar una adecuada respuesta al tratamiento ajustando la dosis, disminuyendo la toxicidad y las RAM's (25). La variabilidad interindividual en la respuesta a fármacos para determinados tratamientos es uno de los principales problemas en la práctica clínica. Los polimorfismos genéticos que modulan la actividad de las enzimas metabolizadores de fármacos representan la principal fuente de variabilidad. El 60 a 80% de los fármacos comercializados son metabolizados por enzimas

polimórficas, por lo que las RAM's y la falla terapeútica pueden atribuirse en parte a variaciones genéticas en las enzimas metabolizadoras de fármacos (25).

1.8 *CYP450*

Es una hemoproteína que se encuentra en la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico y mitocondrial de todos los tejidos. Se han descrito hasta el momento 18 familias de esta enzima. Algunos como *CYP1*, *CYP2* y *CYP3* han sido relacionados con el metabolismo de medicamentos y por lo tanto han sido los más estudiados (14, 25).

1.9 *CYP2C9*

El gen *CYP2C9* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10, que codifica para una proteína de 490 aminoácidos con un peso molecular de 55.6 kDa, es una de las enzimas más abundantes en el ser humano (20% del contenido total de *CYP* hepático), donde metaboliza aproximadamente del 15 a 20% de los fármacos, incluyendo antiinflamatorios no esteroideos, sulfonilureas, inhibidores de la ciclooxigenasa 2, diuréticos, antiepilépticos, inhibidores de la angiotensina II, y el anticoagulante warfarina. El gen *CYP2C9* es altamente polimórfico, destacando el impacto en la farmacoterapia (26, 27). En la actualidad se han descrito 60 variantes para este gen de las cuales solo se conoce la actividad de aproximadamente 7 variantes. Según la actividad de estas variantes estudiadas se puede clasificar a la enzima con función normal o reducida (28, 29).

Todas las sulfonilureas son metabolizadas en el hígado por la enzima *CYP2C9*, mediante la reacción de hidroxilación para poder ser eliminado adecuadamente del organismo (2, 30). Se ha encontrado que la eficacia del tratamiento con sulfonilureas depende de la variación genética en gen que codifica para la enzima *CYP2C9*. La mayoría de las personas tiene un alelo silvestre de esta enzima, *CYP2C9*1* y algunos tienen una función reducida debido a

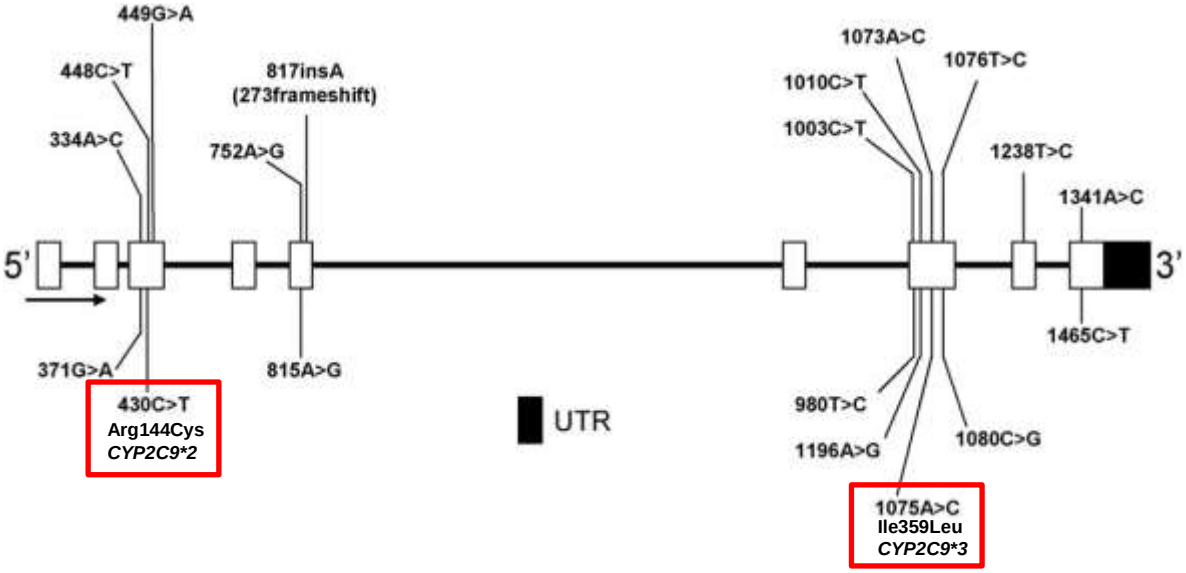
los polimorfismos *CYP2C9*2, *3, *4, *5* y **13*, son los pacientes que presentan más acumulación del fármaco y por lo tanto mayores RAM's. El polimorfismo *CYP2C9*6* genera una proteína con actividad nula, debido a una deleción de un par de bases en la posición 818 (2, 28, 31). Se cree que el 6% de la población tiene dos polimorfismos de función reducida y por lo tanto metaboliza lentamente a las sulfonilureas (2). Se ha reportado que en la población mexicana los polimorfismos más frecuentes son el *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* (28). Las personas portadoras de estos polimorfismos suelen tener altas concentraciones de estos fármacos en plasma debido a un metabolismo reducido, lo que conduce a síntomas de hipoglucemia; motivo por el que los pacientes al presentar esta reaccion adversa a un medicamento (RAM) tienen baja adherencia terapéutica e incluso abandono del tratamiento (28, 32). La identificación de genotipos de *CYP2C9* se considera una herramienta útil para identificar a pacientes en alto riesgo de ineficacia o toxicidad y ofrece una guía determinante para individualizar la prescripción de medicamentos (2). Ya que acuerdo a las guías de Consorcio de Implementación Farmacogenética Clínica (CPIC), hasta el momento la optimización de la terapia farmacológica conociendo el genotipo solamente se pude realizar con los medicamentos de warfarina y fenitoína (33).

1.10 *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*

Existen más de 60 polimorfismos para el gen *CYP2C9*, esto sugiere que existen diferencias individuales en las respuestas a los medicamentos que son metabolizados por la enzima *CYP2C9*. Sin embargo, los polimorfismos más estudiados *in vivo/in vitro* son el *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* en diversas partes del mundo como Japón, España y Estados Unidos (27, 29). El polimorfismo *CYP2C9*2* se encuentra en el exón 3 y se debe a un cambio en la posición 430 de citosina a timina lo que resulta en un cambio en la proteína en el codón 144 de arginina a cisteína, el polimorfismo *CYP2C9*3* se encuentra en el exón 7 y se debe a un

cambio en el codón 1075 de adenina a citosina lo que resulta en un cambio en la proteína en la posición 359 de isoleucina a leucina (26) (Figura 3). Las personas portadoras del polimorfismo *CYP2C9*3* tienen reducción en la actividad de la enzima del 80 a 90%, lo que resulta en individuos que requieren dosis más bajas del fármaco y muestran una mayor incidencia de RAM's, sobre todo en aquellos individuos que reciben medicamentos con un índice terapéutico estrecho como la warfarina (34). Diversos estudios en sujetos sanos demostraron que los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* se asocian con aumento de la concentración plasmática y disminución de la depuración de las sulfonilureas después de la administracion oral (35).

Figura 3. Secuencia del gen *CYP2C9* y posición de los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*. Modificado de (34)



1.11 ADHERENCIA TERAPÉUTICA Y REACCIONES ADVERSAS DE LAS SULFONILUREAS

El control glucémico de los pacientes con DT2 ha demostrado que reduce las complicaciones y mejora la calidad de vida, sin embargo, muchos pacientes que son

prescritos con fármacos hipoglucemiantes orales son poco adherentes al tratamiento farmacológico, y es algo que suele suceder con las enfermedades crónicas. Existen reportes que indican que la adherencia va del 65 a 85%, con tasas más bajas para ciertas poblaciones y se ha visto que durante los primeros 12 meses de tratamiento es cuando presentan mayor desapego terapéutico (36, 37). En México la DT2 es uno de los principales problemas de salud pública y no se debe solamente a su alta prevalencia, también se debe a las bajas tasas de adherencia al tratamiento farmacológico ocasionado principalmente por RAM's (38). La definición de reacción adversa a un medicamento (RAM) es la respuesta no deseada a un medicamento, en la cual la relación causal con éste es, al menos, razonablemente atribuible (39). La incidencia o la gravedad de las RAM's depende de las características del paciente o puede estar relacionado con el fármaco. En muchos casos depende de la dosificación y con ello la respuesta al tratamiento ya que existen medicamentos que tienen una ventana terapéutica estrecha, es por ello que los estudios de farmacogenética permitirían personalizar los tratamientos farmacológicos (37, 40)

Las principales reacciones adversas de las sulfonilureas son hipoglucemia, aumento de peso colestasis, erupción en la piel, anemia hemolítica, trombocitopenia y agranulocitosis (16), de igual manera se ha planteado la hipótesis de que las sulfonilureas tienen efectos en la fisiología cardíaca a través del canal K_{ATP} y en algunos ensayos clínicos con glimepirida, glibenclamida y clorpropamida han demostrado la inducción de apoptosis de células β del páncreas, por lo que la prescripción de este grupo de medicamentos debe hacerse con precaución (16, 41). En un estudio realizado con comunidades Mayas de Yucatán en tratamiento con sulfonilureas, el 30% reportó no tener adherencia terapéutica debido a RAM's (32).

1.12 HIPOGLUCEMIA

El grupo de estudio Internacional de Hipoglucemia la define como glucosa menor a 70 mg/dL (3.9 mmol/L) y como grave cuando la concentración es menor a 54 mg/dL (3.0 mmol/L) (1). La hipoglucemia es la RAM más reportada de las sulfonilureas, debido a la dosis, y en este grupo de medicamentos las tasas más altas se han observado con glibenclamida (42, 43). El Estudio Prospectivo Inglés sobre Diabetes, (UKPDS), reportó que las tasas de hipoglucemia son similares entre los pacientes con sulfonilureas y los que estaban bajo tratamiento con insulina (36). Los episodios de hipoglucemia pueden interferir con el nivel de conciencia, equilibrio, coordinación, visión y epidosios más graves pueden desencadenar en demencia, convulsiones, coma, eventos cardiovasculares graves y muerte (42-44). En Estados Unidos de América (EUA) el Plan de Accion Nacional para la prevención de Eventos Adversos a Fármacos del Departamento de Salud y Servicios Humanos clasificó a la hipoglucemia inducida por fármacos antidiabéticos como uno de los tres objetivos prioritarios para reducir los eventos adversos de medicamentos (42, 43). En México el 14% de los pacientes con DT2 reporta haber tenido algún evento de hipoglucemia, en contraste con el 2.5% del promedio mundial (45).

1.13 DIVERSIDAD POBLACIONAL EN MÉXICO

México es uno de los paises más ricos en cuanto a diversidad étnica en todo el continente Americano. Actualmente, la población mexicana se divide en dos grandes grupos la indígena y la mestiza. La población mestiza es una mezcla principalmente de Amerindios, Europeos y Africanos y en menor porcentaje la Asiática (26). Los grupos étnicos en México con mayor población, en orden descendente, son los Nahualt, Mayas, Zapotecos, Mixteco, Otomí, Totonaca, Tzotzil, Tzeltal, Mazahua, Mazateco, Huasteco, Choles, etc. El componente genético de las poblaciones Amerindias ha cambiado en los últimos 500 años

debido a procesos demográficos y migratorios. El más importante movimiento fue la conquista española, lo que generó que disminuyeran las poblaciones Amerindias y que surgieran las poblaciones mestizas, que actualmente constituyen el 93% de la población mexicana (26, 34). En Yucatán, las poblaciónes mestizas están conformadas principalmente de Europeos (43%), Amerindios (37%), Euroasiáticos (15%) y Africanos (5%). La población Amerindia se debe principalmente a la etnia Maya, que ha tenido un bajo flujo de deriva génica, por lo que es un grupo poblacional con un componente genético único. Es por ello que los polimorfismos de estas poblaciones de grupos geográficos específicos, permitiría conocer la evolución de las poblaciones, relaciones genéticas y los componentes principales, que resultan de importancia médica para la población (35).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La metformina y las sulfonilureas son los medicamentos más utilizados en el Sector Salud para el control glucémico de los pacientes con DT2. Sin embargo, varios estudios sugieren que la terapia con sulfonilureas, empleada por su eficacia y bajo costo, presenta una variabilidad inter-individual en la respuesta al medicamento en diversas poblaciones, ocasionando en muchos casos RAM's y como consecuencia abandono del tratamiento.

Tomando como base un estudio realizado en pacientes Mayas de la zona de Yucatán donde se reportó que la principal causa de abandono del tratamiento fue la presencia de síntomas de hipoglucemia, principalmente, en los pacientes que tenían tratamiento con sulfonilureas, en este estudio se pretende conocer si en la población Maya-mestiza existe desapego terapeútico por hipoglucemia, además de reportar las frecuencias de los polimorfismos involucrados en el metabolismo lento de las sulfonilureas.

3. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio permitirá conocer las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* en la población Maya-mestiza con DT2, además de conocer si tienen una asociación con la presencia de síntomas de hipoglucemia. Esto permitirá reducir el abandono al tratamiento farmacológico, minimizar las reacciones adversas, retrasar las complicaciones de la DT2, que se reflejará en la reducción de costos hospitalarios, mejor control de la glucosa y del estado metabólico de la enfermedad, así como menor frecuencia de hipoglucemia.

Cabe mencionar que conocer la frecuencia de los polimorfismos en la población Maya-mestiza permitirá realizar futuros estudios de farmacocinética, que sustentarán la personalización del tratamiento con sulfonilureas para DT2.

4. HIPÓTESIS

H_0 Los pacientes con diabetes tipo 2 portadores de los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* no se asocian con la presencia de síntomas de hipoglucemia

H_1 Los pacientes con diabetes tipo 2 portadores de los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* se asocian con la presencia de síntomas de hipoglucemia

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia alélica y genotípica de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* en la población población Maya-mestiza con DT2 y su asociación con síntomas de hipoglucemia

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir los parámetros bioquímicos y somatométricos de la población con DT2
- Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*
- Comparar las frecuencias obtenidas con la población Maya además de con otras poblaciones mestizas y con el promedio reportado a nivel mundial
- Determinar si los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* se asocian con la presencia de síntomas de hipoglucemia

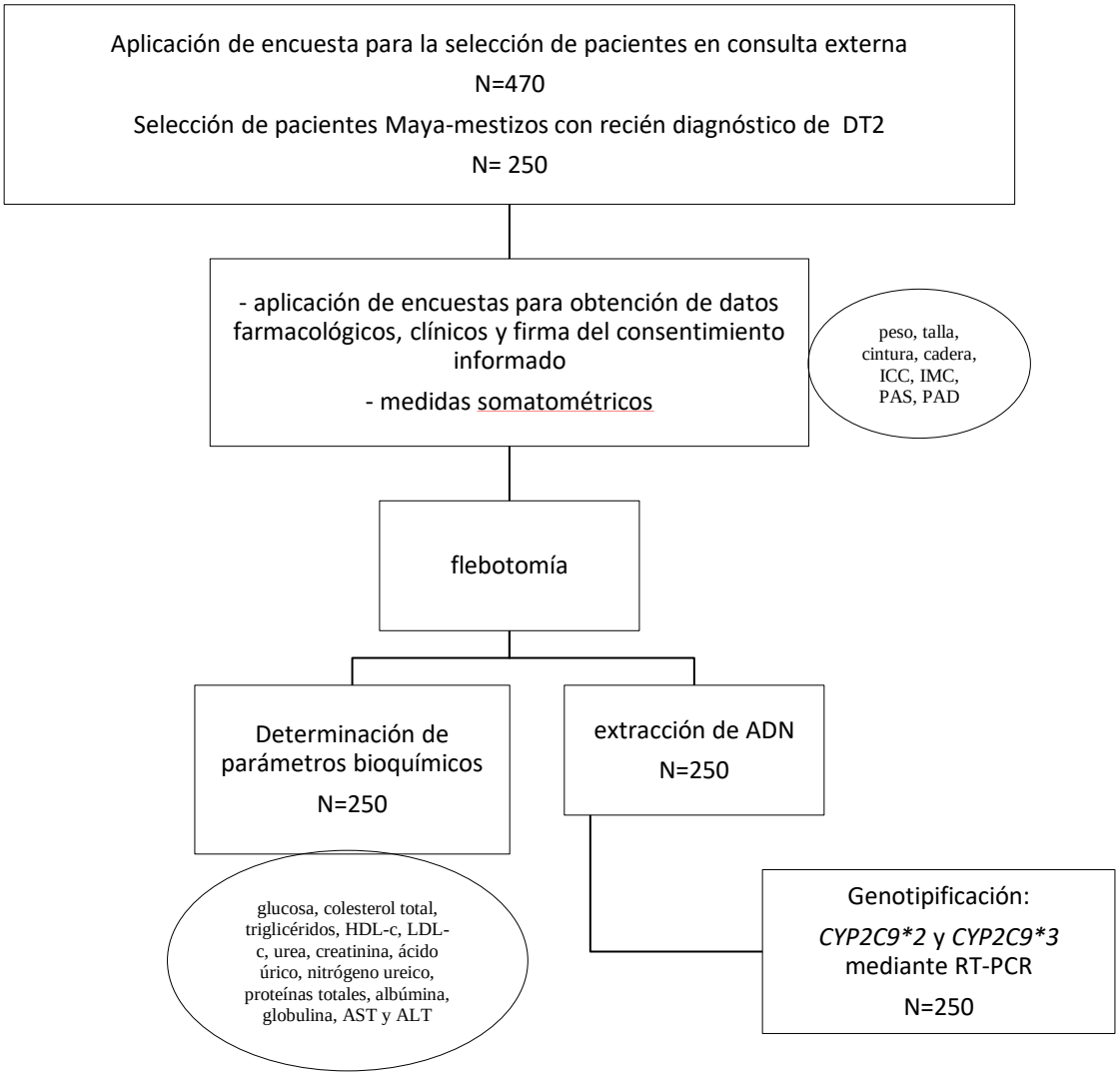
6. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Es un estudio experimental, transversal, cohorte. Los pacientes fueron reclutados en el Hospital Regional de Alta Especialidad de Yucatán (HRAEPY) en el área de consulta externa, de enero 2018 a febrero 2019, fueron informados de los objetivos del proyecto y firmaron el consentimiento informado para el uso de sus muestras y posteriores estudios relacionados con el proyecto.

Diseño Experimental

Figura 4. Diagrama del diseño experimental



Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue calculado con la fórmula de poblaciones finitas

$$n = \frac{(N) * z^2 * p * q}{(N-1) * e^2 + z^2 * p * q}$$

$$n = \frac{(1{,}404{,}457) * 1.96^2 * 0.102 * (1 - 0.102)}{(1{,}404{,}457) * 0.05^2 + 1.96^2 * 0.102 * (1 - 0.102)} = 141$$

N=Tamaño de la población
n= Tamaño de la muestra
z= 1.96 para el 95% de confianza
z^2= 1.96^2
p= frecuencia de DT2 en el sureste de México
q= 1-p
e= error admitido

El tamaño de la muestra considerando un 15% de pérdida fue de 163 individuos, sin embargo, fueron evaluados 250 individuos para fines del proyecto.

Criterios de inclusión

- Personas igual o mayor a 18 años, sexo indistinto
- Recién diagnóstico de DT2 (1 a 5 años)
- Contar con un apellido Maya, de lo contrario tener padres o abuelos con apellido Maya
- Tener ayuno de 10 a 12 hrs
- Que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado

Criterios de exclusión

- Pacientes con más de 5 años de diagnóstico de diabetes
- Menores de 18 años

- Diagnóstico de diabetes tipo 1 (DT1)

Medidas somatométricas

A todas las personas de este estudio se les midió cintura y cadera para el cálculo del índice cintura-cadera (ICC), talla y peso para el cálculo del índice de masa corporal (IMC). Se midió la presión arterial con el baumanómetro digital Marca Omron ® por duplicado

Determinaciones bioquímicas

Aquellos pacientes con ayuno previo de 10 a 12 hrs se les tomó 7mL de sangre venosa del antebrazo con el sistema de vacío en un tubo sin anticoagulante y gel separador, las muestras se centrifugaron para obtener el suero y realizar los análisis bioquímicos de glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL-c, LDL-c, urea, creatinina, ácido úrico, nitrógeno ureico, proteínas totales, albúmina, globulina, AST y ALT. Las muestras fueron procesadas en el analizador ADVIA 1800 Chemistry System Siemens® del Laboratorio Central del Hospital Juárez de México, los métodos empleados para las determinaciones se describen en el anexo 4.

Extracción de ADN

A los pacientes se les tomaron 8mL de sangre venosa del antebrazo con el sistema de vacío en dos tubos con anticoagulante EDTA para extraer el ADN genómico mediante la técnica modificada de Miller et. al (33) se describe en el anexo 5, fueron cuantificadas en el espectrofotómetro *NanoDrop Lite*®, se verificó la integridad mediante elecroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 90V por 30min y se realizaron diluciones a una concentración de 20ng/µL para el análisis de genotipificación.

Genotipificación de *CYP2C9*1* y *CYP2C9*2*

Se utilizaron las sondas *TaqMan*® C__25625805_10, rs1799853 para *CYP2C9*2* y C__27104892_10, rs1057910 para *CYP2C9*3*; la genotipificación se realizó en el equipo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) *QuantStudio™ 5* Marca Applied Biosystems por discriminación alélica. El programa fue 60ºC por 30 seg, 95ºC por 10min, posteriormente 40 ciclos de desnaturalización 95ºC por 15seg y alineación 60ºC por 1min, seguido de 60 ºC por 30 seg (anexo 7). Como control de calidad, el 10% de las muestras fueron genotipificadas por duplicado.

Tabla 5. Mezcla de reacción de RT-PCR

Reactivo	**Volumen (µL)**	**concentración**
TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems)	10	2X
rs1799853 (*CYP2C9*2)* rs1057910 (*CYP2C9*3)*	0.5	20X
Agua grado B.M.	8.5	-
ADN	1	20ng/µL

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la población de estudio se realizaron análisis descriptivos tanto de los datos somatométricos como bioquímicos de los cuales se determinó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnoff, los datos no normales se expresaron en mediana y cuartiles (Q_1 y Q_3). Las variables nominales se expresaron en frecuencias (%). Se calcularon las frecuencias genotípicas partir de frecuencias alélicas con el equilibrio de Hardy-Weinberg, posteriormente se utilizó la prueba de chi cuadrada para verificar si entre los valores observados y los obtenidos existian diferencias significativas con un cuadro de contingencia. Las asociaciones de las variables cualitativas se realizaron por medio de regresión logística multinomial bajo el modelo dominante. Los datos fueron capturados y analizados con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 21®).

8. RESULTADOS

8.1 Descripción de la población

En el estudio participaron un total de 250 personas con DT2 de recién diagnóstico, pertenecientes al Estado de Yucatán que acudían a la consulta externa del HRAEPY. El 22% fueron hombres y el 78% mujeres.

La ocupación de la población en orden descendente fue amas de casa (62%), empleados (23%), trabajadores de campo (7%), profesionistas (4%), comerciantes (3%), desempleados (0.8%) y estudiantes (0.2%).

El nivel de escolaridad fue primaria (47%), secundaria (30%), licenciatura (8%), preparatoria (7%), posgrado (1%) y sin estudios (8%).

Los antecedentes familiares de DT2 estuvieron caracterizados por 64% con un familiar en primer grado (padre, madre o hermano), 8% con un familiar en segundo grado (abuelos, tíos, primos) y el 28% reportó no tener antecedentes familiares.

Respecto al diagnóstico clínico, el 20% desconocía tener DT2, 35% tenía un año, 11% dos años, 8% tres años, 13% cuatro años, 14% cinco años y el 1% 6 años.

Las alteraciones metabólicas presentes en esta población fueron sobrepeso-obesidad (96%), descontrol glicémico (46%), hipercolesterolemia (31%), hipertrigliceridemia (62%) e hipoalfalipoproteinemia (57%). En la Tabla 6 y 7 se describen las características somatométricas y bioquímicas de la población.

Tabla 6. Datos somatométricos de la población Maya-mestiza de Yucatán con DT2

Variable		Valores de referencia
Edad (años)	49.87 ± 10.50	
Sexo		
Hombres	54 (22%)	
Mujeres	196 (78%)	
ICC		
Hombres	0.94 ± 0.06	<0.90 [(a)]
Mujeres	0.89 ± 0.06	<0.80 [(a)]
IMC (kg/m^2)	30.9 (28.0, 34.9)	<25 kg/cm^2 [(a)]
PAS (mmHg)	130 (120, 144)	<140 mmHg [(b)]
PAD (mmHg)	76 (70, 84)	< 90 mmHg [(b)]

Los datos representan la media ± SD y la mediana (percentil 25-75). Normalidad-Prueba de Kolmogorov-Smirnov.
ICC: índice cintura cadera, IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica.
(a) NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2010, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad
(b) American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes -2019. S1, Vol 41.

Tabla 7. Parámetros bioquímicos de la población Maya-mestiza de Yucatán con DT2		
Variable		**Valores de referencia**
Glucosa en ayuno (mg/dL)	124.5 (97.0, 172.7)	80-130 mg/dL[(a)]
Colesterol total (mg/dL)	184.9 ± 38.6	<200 mg/dL[(b)]
Triglicéridos (mg/dL)	180.0 (130.5, 263.0)	<150mg/dL [(a)]
HDL-c (mg/dL)	46.3 ± 10.4	>50 mg/dL [(a)]
LDL-c (mg/dL)	117.7 ± 32.3	<100 mg/dL [(a)]
Urea (mg/dL)	28.0 (21.0, 34.0)	10-50 mg/dL [(c)]
Creatinina (mg/dL)	0.66 (0.55, 0.82)	0.4-1.4 mg/dL[(c)]
Ácido úrico (mg/dL)	4.8 (3.7, 5.7)	3.7-9.2 mg/dL [(c)]
Nitrógeno ureico (mg/dL)	13.0 (10.0, 16.0)	9-23 mg/dL [(c)]
Proteínas totales (mg/dL)	7.1 ± 0.5	5.7-8.2 mg/dL [(c)]
Albúmina (mg/dL)	4.4 (4.2, 4.6)	3.2-4.8 mg/dL [(c)]
Globulina (mg/dL)	2.7 (2.5, 3.1)	2.3-3.8 mg/dL [(c)]
Rel. A/G	1.6 (1.4, 1.8)	1-2 mg/dL [(c)]
AST (U/I)	22.0 (18.0, 30.0)	0-34 U/I [(c)]
ALT (U/I)	13.0 (8.2, 20.0)	10-49 U/I [(c)]

Los datos representan la media ± SD y la mediana (percentil 25-75). Normalidad-Prueba de Kolmogorov-Smirnov
HDL-c: colesterol HDL, LDL-c: colesterol LDL, Rel. A/G: relación albúmina/globulina, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa
(a) American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes -2019. S1, Vol 41.
(b) NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus
(c) Valores de referencia del Laboratorio Central del Hospital Juárez de México

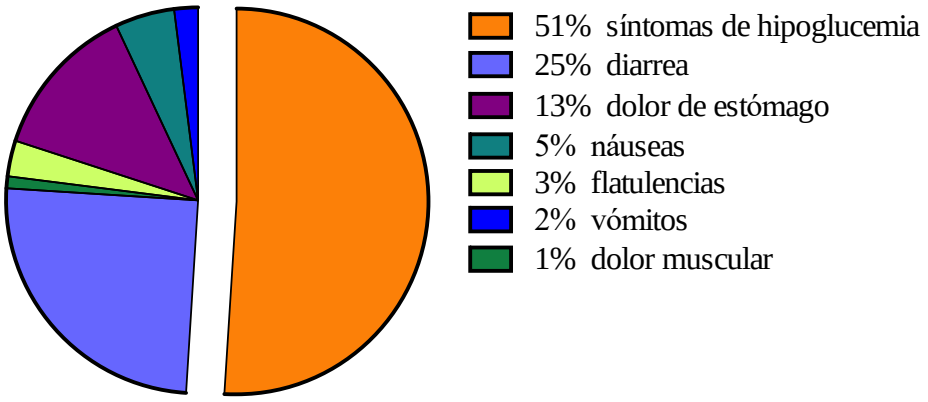
8.2 Descripción Farmacológica

La DT2 al ser una enfermedad crónica requiere de tratamientos farmacológicos por largos períodos de tiempo, es por ello que para evaluar la adherencia terapéutica, se utilizó la herramienta de Morisky-Green (47), y se obtuvo que el 76% de la población reportó no ser adherente, las principales causas fueron por RAM's, olvido o porque sentía mejoría. Cabe destacar que el 60% de las personas que reportaron haber tenido un episodio de

hipoglucemia estaban en tratamiento con sulfonilureas. En la Figura 5 se presentan las principales sospechas de RAM`s.

Los esquemas terapéuticos fueron principalmente metformina (24%), metformina + sulfonilurea (22%), sulfonilurea (6.4%) y otros (6.6%), cabe destacar que el 41% no contaba con algun tipo de terapia farmacológica para la DT2.

Figura 5. Principales sospechas de RAM's reportadas en la población Maya-mestiza en tratamiento con hipoglucemiantes



8.3 Análisis molecular

Las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* se muestran en la Tabla 8. La muestra analizada cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W).

Tabla 8. Frecuencia alélica y genotípica de *CYP2C9* en la población Maya-mestiza

SNP	genotipo	n	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica	H-W (P)
*CYP2C9*2*	C/C	217	0.868	C (0.934) T (0.066)	0.26
	C/T	33	0.132		
	T/T	0	0.000		
*CYP2C9*3*	A/A	239	0.956	A (0.978) C (0.022)	0.72
	A/C	11	0.044		
	C/C	0	0.0		

H-W: equilibrio de Hardy-Weinberg, SNP: polimorfismo de un solo nucleótido, n: tamaño de la muestra.
Prueba estadística de chi cuadrada, P>0.05

Las frecuencias alélicas se compararon con la población Amerindia, grupos mestizos de México, EUA y con las poblaciones del proyecto 1000Genomas (Tabla 9 y 10)

Tabla 9. Comparación de las frecuencias alélicas de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* entre la población Maya-mestiza, Amerindias y Mestizas de México y EUA.

Población	**Frecuencia alélica *CYP2C9*2* (%)**	**Frecuencia alélica *CYP2C9*3* (%)**	**Tamaño de muestra**	**referencia**
Maya-mestiza	T (6.6) C (93.4)	C (2.2) A (97.8)		
Amerindias				
Maya	**T (1.0)**	C (2.8)	199	32
Mazahua	**T (0.0)**	**C (0.0)**	47	32
Chatino	**T (0.0)**	C (3.2)	31	32
Teenek	**T (0.0)**	C (3.3)	30	32
Mixteco	**T (0.0)**	C (1.7)	30	32
Chontal	T (1.7)	C (5.0)	30	32
Cora	**T (0.0)**	C (1.7)	30	32
Mestiza de México				
Mestizo-mexicano (CDMX)	T (4.0)	C (3.0)	496	38
Colima	T (5.5)	C (2.5)	100	46
Jalisco	T (4.8)	C (2.7)	147	46
Michoacán	T (5.5)	C (3.0)	117	46
Nayarit	T (5.5)	C (2.2)	113	46
Mestizas de EUA				
Mexicanos L.A.	T (10.2)	T (2.3)	98	1000 Genomas

Prueba estadística de chi cuadrada, en letras negras P<0.05

Tabla 10. Comparación de las frecuencias alélicas de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* entre la población Maya-mestiza y las poblaciones del 1000 Genomas

Población	**Frecuencia alélica *CYP2C9*2* (%)**	**Frecuencia alélica *CYP2C9*3* (%)**
Maya-mestiza	T (6.6)	C (2.2)
	C (93.4)	A (97.8)
Africana	**T (0.8)**	C (0.2)
ACB	T (2.6)	C (0.5)
ASW	T (4.1)	C (1.6)
GWD	**T (0.4)**	-
Amerindia	T (9.9)	C (3.7)
CLM	T (12.2)	C (6.4)
MXL	T (10.2)	C (2.3)
PEL	T (2.4)	C (1.2)
PUR	T (13.9)	C (4.3)
Este de Asia	**T (0.1)**	C (3.4)
CHS	**T (0.5)**	C (4.8)
CDX	-	C (2.7)
CHB	-	C (3.9)
JPT	-	C (1.9)
KHV	-	C (3.5)
Europa	T (12.4)	C (7.3)
CEU	**T (15.2)**	C (6.6)
FIN	T (8.1)	C (5.6)
GBR	T (8.8)	C (7.1)
IBS	T (14.0)	**C (8.4)**
TSI	**T (15.4)**	**C (8.4)**
Sur de Asia	T (3.5)	**C (10.9)**
BEB	T (1.7)	**C (11.6)**
GIH	T (4.9)	**C (13.1)**
ITU	T (2.5)	**C (10.3)**
PJL	T (5.2)	**C (9.9)**
STU	T (2.9)	**C (9.8)**

Prueba estadística de chi cuadrada, en letras negras $P<0.05$

ACB: Africana Caribeña en Barbados, ASW: Americanos de ancestría Afroamericana en el suroeste de EUA, GWD: Gambiano en la división Occidental de Gambia, CLM: Colombianos de Medellín, MXL: Mexicanos de los Angeles EUA, PEL: Peruanos de Lima, PUR: Puertoriqueños de Puerto Rico, CHS: China del Sur, CDX: Chinos en Xishuangbanna en China, CHB: Chinos en Beijing China, JPT: Japoneses en Tokio Japón, KHV: Ciudad Kihn en Chi Minh Vietnam, CEU: residentes de Utah con ascendencia del norte y oeste de Europa, FIN: Finlandés, GBR: Británicos en Inglaterra y Escocia, IBS: población Ibérica en España, TSI: Toscanos en Italia, BEB: Bengalíes de Bangladesh, GIH: Indios Gujarati de Houston Texas, ITU: Indios Telugu de Reino Unido, PJL: Punjabi de Lahore Pakistán, STU: Sri Lanka Tamil de Reino Unido.

Los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* generalmente suelen asociarse con variaciones en las concentraciones del fármaco en plasma, sin embargo, algunos estudios han realizado asociaciones con hipoglucemia, en este proyecto se realizaron solamente en los pacientes que estaban en tratamiento con sulfonilureas, tomando como base que estos polimorfismos estan involucrados en el metabolismo de este grupo de fármacos, por lo cual se redujo a un subgrupo de 45 pacientes, además el 60% de los episodios con sospecha de hipoglucemia en la población Maya-mestiza fueron en pacientes con tratamiento con sulfonilureas. El análisis en ambos polimorfismos se realizó con el modelo dominante.

Tabla 11. Asociación de CYP2C9*2 y CYP2C9*3 con síntomas de hipoglucemia en pacientes bajo tratamiento con sulfonilureas
N=45

SNP	Alelo	P	OR IC95%
*CYP2C9*2 rs1799853*	T	0.378	1.85 (0.47-7.29)
*CYP2C9*3 rs1057910*	C	0.638	1.59 (0.22-11.10)

Regresión logística multinomial con variables fijas : edad, sexo, y tiempo de evolución de la DT2

De igual manera se realizaron asociaciones mediante la prueba de chi cuadrada sin variables fijas de acuerdo al modelo dominante.

Tabla 12. Asociación de *CYP2C9*2* con síntomas de hipoglucemia en pacientes bajo tratamiento con sulfonilureas
N=45

Parámetro	Frecuencia (CT + TT)	Frecuencia (CC)	P
síntomas de hipoglucemia	83%	56%	**<0.0001**

Prueba estadística de chi cuadrada, en letras negras P<0.05

Tabla 13. Asociación de *CYP2C9*3* con síntomas de hipoglucemia en pacientes bajo tratamiento con sulfonilureas

N=45

Parámetro	Frecuencia (AC + CC)	Frecuencia (AA)	P
síntomas de hipoglucemia	33%	62%	**<0.0001**

Prueba estadística de chi cuadrada, en letras negras P<0.05

9. DISCUSIONES

Los diversos estudios enfocados en los medicamentos hipoglucemiantes tienen el fin de lograr que un paciente con diabetes tenga una mejor respuesta al tratamiento, evitar RAM`s y asegurar un adecudo control metabólico. Existen diversos fármacos, sin embargo, los más eficaces y que suelen ser proporcionados por los las instituciones de salud son las sulfonilureas, las cuales, a pesar de su eficacia también presentan diversas RAM's. Los estudios de farmacogenética permitirían personalizar el tratamiento y adecuarlo a las poblaciones. En el presente estudio se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2C9* y su asociación con síntomas de hipoglucemia. Para ello se incluyeron a 250 pacientes Maya-mestizo con DT2 de recién diagnóstico que acudían al HRAEPY del estado de Yucatán, se les realizaron evaluaciones bioquímicas, farmacológicas y análisis molecular.

En la primera etapa se realizaron determinaciones somatométricas y bioquímicas con el fin de conocer si la población estaba en adecuado control metabólico y conocer las características de estos pacientes con DT2 de recién diagnóstico. La edad promedio fue de 49 ± 10 años , en su mayoría mujeres (78%), estos datos indican que la DT2 en Yucatán se presenta en personas jóvenes, estos datos son alarmantes al comparar con la media nacional (60 ± 9 años) (8) y otras poblaciones, como China donde la edad promedio es de 56 ± 7.78 años (51) y en Reino Unido de 54 años (52). En las determinaciones somatométricas de este estudio, se encontró que el 88% tenía obesidad central y el 96% sobrepeso-obesidad de acuerdo a la clasificación del IMC y al ajuste por talla baja establecidos en la NOM-008 (48), es importante destacar que los resultados obtenidos no solo superan la prevalencia nacional reportada en la ENSANUT 2016 (8) para sobrepeso-obesidad (72.5%), sino también a lo reportado en la zona sur del país (72.7%) (8) y en la zona Maya (90%)(55).

Estos resultados denotan que la zona sureste del país tiene un grave problema de sobrepeso-obesidad y que este es un factor de riesgo en conjunto con la DT2 para el desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares como aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares e infarto al miocardio

En cuanto a los resultados bioquímicos se obervó que el 46% de la población estudiada no tenía un adecuado control glucémico, lo que coincide con lo reportado para el centro del país (48.7%) (56) y difieren del norte del país (29.6%) (57). Este descontrol metabólico se empieza a reflejar con la aparición de complicaciones, en este estudio los pacientes ya presentan complicaciones visuales y neuropatía.

Los pacientes diabéticos no solo presentan descontrol glicémico, sino también dislipidemias, caracterizadas por la presencia de hipertrigliceridemia (62%) e hipoalfalipoproteinemia (57%), diversos estudios han reportado que las dislipidemias son muy frecuentes en México y son considerados factores de riesgo por inducir inflamación crónica y resistencia a la insulina (58, 59). Un estudio realizado en la población Maya (55) informó que existe alta frecuencia de hipoalfalipoproteinemia (46%), lo que nos indicaría que en la población Maya-mestiza del presente estudio existiría cierta susceptibilidad en desarrollar este tipo de dislipidemias.

Se realizó un análisis descriptivo referente al tratamiento farmacológico con el fin de saber si el pacientes contaba con medicamento y si tenía adherencia. Llama la atención que el 20% de los participantes desconocía tener DT2, lo que significa que no han tomado alguna acción para tratar la enfermedad y controlarla. Además, solo el 59% de los pacientes contaba con algún tratamiento farmacológico, inferior a lo reportado a nivel nacional (87.8%) (8). Algo que llama la atención es el uso preferente de remedios herbolarios, principalmente la *Moringa oleifera*, Andrews et al. (60) reportó que el 63.6% de la población de Guatemala utilizaba esta planta para el tratamiento de la DT2 de igual manera

en ese estudio se identificó que algunas personas presentaron eventos de hipoglucemia, en este trabajo se encontró que el 45% emplea la *Moringa oleifera* para el control glucémico. Los mecanismos propuestos por lo cuales la *Moringa oleifera* reduce las concentraciones de glucosa en plasma incluyen la inhibición de las actividades de α-amilasa y α-glucosidasa, aumento de la captación de glucosa en los músculos y el hígado, inhibición de la captación de glucosa desde el intestino, disminución de la gluconeogénesis y sensibilidad a la insulina, sin embargo, estos estudios son limitados y se han realizado principalmente en modelos animales, *in vitro* e *in vivo* (61). De los pacientes que si contaban con algún tratamiento farmacológico (59%), solo el 24% era adherente, la falta de adherencia (76%) fue por las RAM's descritas en la Figura 5; llama la atención la elevada frecuencia de eventos hipoglucémicos que se presentaron en los pacientes con tratamiento a base de sulfonilureas (60%), siendo superior a lo reportado en población asiática (33.1%) (62), londinense (23.2%), caribeña (39.1%) y en los indios de Bangladesh (47.5%) (63).

La importancia de estudiar a los *CYPs* radica en conocer la variabilidad entre diversas poblaciones, que sirven como base para posteriormente realizar estudios de farmacocinética y así personalizar los tratamientos farmacológicos. Se han realizado diversos estudios sobre el gen *CYP2C9* encargado de metabolizar cerca del 20% de los fármacos en existencia, como los farmácos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), los anticoagulantes orales (warfarina), antiepilépticos (fenitoína), antidepresivos, antibióticos y las sulfonilureas (32, 35, 54). Las frecuencias alélicas y genotípicas del *CYP2C9* son diferentes en las diversas poblaciones e incluso dentro de un mismo país, sin embargo, conocer las frecuencias e identificar los diversos tipos de metabolizadores permitirá realizar estudios farmacocinéticos y con ello definir mejores esquemas de tratamiento farmacológico. México es considerado un país con una población muy diversa y eso se debe a la existencia de 65 etnias indígenas distribuidas a lo largo de todo el país, actualmente el 93% de la

población mexicana es mestiza (26). La población Yucateca (Maya-mestiza), es diferente al resto de las poblaciones mestizas de México, en esta población se habla de un componente genético único resultado de la proporción Amerindia, principalmente Maya (50%) y al aporte Mestizo, proveniente de Europa-Asia (45%) y Africa (5%) (26, 50). Con base en lo anterior, además de la elevada prevalencia de DT2 de la zona Maya (8) la frecuencia elevada de RAM's respecto a otras regiones de México en tratamiento con sulfonilureas (38) y que en un estudio previo en la población Maya (55) donde se identificaron episodios de hipoglucemia en personas que estaban principalmente en tratamiento con sulfonilureas se planteó este proyecto. Se decidió estudiar los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* ya que de acuerdo a la guías del grupo de trabajo de farmacogenética de la asociación real de Farmacéuticos Holandeses (DPWG) estas variantes son las que presentan relevancia clínica en la eficacia de la glibenclamida, pero es de destacar que existen reportes de otras variantes en la plataforma PharmGKB® como son rs5219 en el gen *KCNJ11*, rs889299 en el gen *SCNN1B*, rs202A_376G en el gen *G6PD* y rs5030868 en el gen *G6PD*.

En el presente estudio la frecuencia de la población Maya-mestiza del polimorfismo *CYP2C9*2* fue del 6.6% y del *CYP2C9*3* fue del 2.2%, cuando se compararon con la población Maya se obtuvo diferencia significativa con el *CYP2C9*2*, estudios indican que este polimofismo tiene una influencia principalmente Europea y Africana (28), lo que sugiere que *CYP2C9*2* se debe en gran parte al componente mestizo de esta población Yucateca, compuesto principalmente de la mezcla Europea, Africana y Asiática y también al aporte de la proporción Amerindia (Maya), lo cual hace que su frecuencia sea mas elevada incluso que la Maya. La frecuencia alélica de *CYP2C9*3* fue semejante a la etnia Maya, este polimorfismo ha sido más asociado con metabolismo lento y su frecuencia es baja en diversas poblaciones (54).

Cuando se compararon las frecuencias de ambos polimorfismos con otras poblaciones mestizas de México se observa que no presentan diferencias significativas, lo cual nos indica que el comportamiento es semejante, sin embargo, cuando se hace la comparación con otras poblaciones Amerindias de México, la frecuencia del polimorfismo *CYP2C9*2* tiene similitud con el grupo Chontal y eso puede deberse a su proximidad geográfica de Tabasco (32) dado su componente Maya; en el caso del polimorfismo *CYP2C9*3* la frecuencia fue semejante a los otros grupos étnicos. Respecto a la comparación con el 1000 Genomas la frecuencia del polimorfismo *CYP2C9*3* de la población estudiada tuvo mayor diferencia con las poblaciones del sur de Asia, ya que en ésta región continental las frecuencias son las más elevadas, incluso a nivel mundial.

El enfoque principal de los estudios dirigidos a la identificación de los polimorfismos *CYP2C*2* y *CYP2C9*3* es correlacionarlos con las concentraciones de fármacos en plasma, sin embargo, algunos estudios han reportado la asociación de éstos polimorfismos con eventos de hipoglucemia (42-44). Los primeros estudios de estos polimorfismos asociados con hipoglucemia fueron reportados por Holstein en donde se demostró que los pacientes que estaba en tratamiento con sulfonilureas y que eran portadores de los alelos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* tenían 5.2 veces más riesgo de tener eventos de hipoglucemia (49).

En el presente estudio se encontró que la presencia del polimorfismo *CYP2C9*2* no presentaba asociación con hipoglucemia bajo el modelo de regresión logística multinomial, sin embargo, mediante comparación de frecuencias y sin variables fijas la presencia de la variante se asocia con síntomas de hipoglucemia en pacientes bajo tratamiento con sulfonilureas ya sea en monoterapia o terapia combinada ($P<0.0001$). Otro hallazgo importante fue que los portadores del *CYP2C9*3* presentan un menor riesgo a presentar eventos de hipoglucemia ($P<0.0001$), sin embargo, es importante mencionar que son necesarios más estudios que confirmen estos resultados. Ya que algunos autores como

Dujic T. en Escocia (64) reportan no haber encontrado riesgo al ser portador de los polimorfismos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* con síntomas de hipoglucemia (P=0.177) al igual que Zeng en China (54) no encontraron mayor riesgo en presencia de estos polimorfismos (P=0.183); sin embargo, Yin O et al. (65) en China si reportó asociación del polimorfismo CYP2C9*3 con la presencia de hipoglucemia (P=0.029). En el presente estudio los análisis de asociación se realizaron en un subgrupo 45/250 participantes, ya que solo se seleccionaron aquellos que estaban bajo tratamiento con sulfonilureas, cuando existen resportes de estudios en los cuales las asociaciones se han realizado en paciente que estan en tratamiento concomitante con otro hipoglucemiante oral.

10. CONCLUSIONES

Se encontró que los pacientes estaban en descontrol glicémico, además presentaban hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia, considerados factores de riesgo para la aparición temprana de complicaciones micro y macrovasculares, aunado a que la adherencia terapéutica es menor a lo reportado en la población general del país. La frecuencia de sobrepeso-obesidad en la población Maya-mestiza (96%) con DT2 de recién diagnóstico supera a la media nacional (72.5%).

La frecuencia alélica de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* fue de 6.6% y 2.2% respectivamente. Se encontró que el polimorfismo *CYP2C9*2* esta asociado a síntomas de hipoglucemia en tratamiento con sulfonilureas, sin embargo, se requieren mayores estudios en la población y continuar con el estudio farmacocinético.

Este estudio establece las bases de la medicina personalizada que permitarán atender a la población diabética Maya-mestiza con una dosificación adecuada para cada individuo. Asimismo, los resultados señalan la necesidad de realizar estudios posteriores de farmacocinética y farmacodinamia de las sulfonilureas en esta población que permitan profundizar en el conocimiento y manejo adecuado de fármacos hipoglicemiantes, lo cual impactará en la reducción de la aparición de complicaciones metabólicas asociadas a la diabetes como consecuencia del abandono de la terapia.

11. ANEXOS

Anexo 11.1 Carta de Aceptación y Ejecución del Protocolo de Investigación por el Comité de Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán

OFICIO DG/2330/2017
DIRECCIÓN GENERAL

Mérida, Yucatán., a 02 de agosto del 2017

2017 "Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Asunto: Autorización de ejecución de protocolo de investigación.

DRA. MARTHA ALICIA MENJIVAR IRAHETA
INVESTIGADOR PRINCIPAL

DRA. KATY ALEJANDRA SANCHEZ POZOS
ESTUDIANTE DE LA MAESTRIA EN INVESTIGACIÓN
PRESENTE.-

Con fundamento en lo establecido al artículo 14 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y de acuerdo al dictamen de **APROBADO** por el Comité de Investigación de este Hospital en la 6ª. Sesión Ordinaria de fecha 28 de Junio del 2017, se **AUTORIZA** la ejecución del protocolo 2017-001 con título:

"PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CYP2C9, OCT1; OCT2, MATE1 Y MATE2 EN LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON SULFONILUREAS Y METFORMINA EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 DE LA PENINSULA DE YUCATAN"

Toda vez que ésta autorización no implica compromiso de proveer recursos humanos, materiales y/o financieros de manera parcial o total por parte del Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán, lo cual deberá gestionarse a través de la convocatoria que para tal efecto se emita.

Así mismo se le exhorta a mantener apego a la normatividad vigente materia de investigación en salud y a presentar los informes correspondientes en los tiempos y formas que marca el Comité de Investigación de este Hospital.

Sin otro particular reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Rafael Antonio Barrera Zoreda
Director General

C.c.p. M en C. Saúl de los Santos Briones. Director de Planeación, Enseñanza e Investigación.- HRAEPY
MCE. Rolando Aurelio Díaz Castillo. Subdirector de Enseñanza e Investigación.- HRAEPY
Comité de Investigación del HRAEPY
Minutario
RABZ/SSB/RADC/MACT/cabm

Calle 7, No. 433 por 20 y 22, Fracc. Ahuatina, C.P. 97130, Mérida, Yucatán
Tel. (999) 942 7600www.hraeyucatan.salud.gob.mx

2014 - 2017

Anexo 11.2 Consentimiento informado

Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán
Laboratorio de diabetes-Unidad de Medicina personalizada
Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química

CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO

Titulo del Estudio:	Papel de los polimorfismos en los genes CYP2C9, OCT1, OCT2, MATE1 y MATE2 en la eficacia del tratamiento con sulfonilureas y metformina en pacientes con diabetes tipo 2 de la Península de Yucacán
Nombre del Investigador Responsable	Dra. Marta Menjívar Iraheta
Dirección:	Laboratorio de Diabetes, Facultad de Química, UNAM, CU. y Unidad de Medicina Personalizada, Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán, Calle 7, No. 433 por 20 y 22, Fracc. Altabrisa Mérida, Yucatán CP. 97130
Teléfono de contacto	56-22-38-22-UNAM y 9 942 7600 Ext. 54404 HRAEPY

Introducción:
El documento que se expone a continuación cumple con lo dispuesto por el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud. Artículos 1o., 2o., fracción VII, 3o. fracción IX, 4o., 7o.,13 apartado "A" fracciones I, IX, X, apartado "B" fracciones I y VI, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103 y demás relativos a la Ley General de Salud.

Queremos invitarlo a formar parte del proyecto "Papel de los polimorfismos en los genes CYP2C9, OCT1, OCT2, MATE1 y MATE2 en la eficacia del tratamiento con sulfonilureas y metformina en pacientes con diabetes tipo 2 de la Península de Yucacán", que será desarrollado por investigadoras de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán, preocupadas por el alarmante alza de personas que son afectadas de diabetes en nuestro país. Esta enfermedad se caracteriza por aumentar el azúcar en sangre y que con el tiempo daña los riñones, los ojos y el corazón entre otras cosas. La metformina y glibenclamida, son los medicamentos principales para el control de la diabetes tipo 2. Estos tratamientos son caracterizados por una variabilidad interindividual, eficacia clínica y presencia de reacciones adversas (RAM). El desarrollo de estudios farmacogenéticos en poblaciones mexicanas representa una contribución al conocimiento sobre la variabilidad genética en la respuesta a los fármacos para mejoramiento del tratamiento y control de la enfermedad.

Este estudio tiene como objetivo principal: Evaluar el efecto de los polimorfismos en los genes CYP2C9, OCT1, OCT2, MATE1 y MATE2 en la eficacia de sulfonilureas y metformina en pacientes con diabetes tipo 2, que afecta en la disminución de la calidad de vida de las personas que la presentan.

Antes de que usted acepte participar en este estudio, se le presenta este documento de nombre "Consentimiento Informado", que tiene como objetivo comunicarle de los posibles riesgos y beneficios para que usted pueda tomar una decisión informada y voluntaria.

El consentimiento informado le proporciona información sobre el estudio al que se le está invitando a participar, por ello es de suma importancia que lo lea cuidadosamente antes de tomar alguna decisión y si usted lo desea, puede comentarlo con quien desee (un amigo, un familiar de confianza, etc.) Si usted tiene preguntas puede hacerlas directamente a su médico tratante o al personal del estudio quienes le ayudarán a resolver cualquier duda

Una vez que tenga conocimiento sobre el estudio y los procedimientos que se llevarán a cabo, se le pedirá que firme esta forma para poder participar en el estudio. Su decisión de que es voluntaria, lo que significa que usted es totalmente libre de ingresar a o no en el estudio. Podrá retirar su consentimiento en cualquier momento y sin tener que explicar las razones sin que esto signifique una disminución en la calidad de la atención médica que se le brinde, ni afectará la relación con su médico. Si decide no participar, usted puede platicar con su médico sobre los cuidados médicos regulares. Su médico puede retirarlo o recomendarle no participar en caso de que así lo considere.

Este estudio representará un recurso de investigación útil para conocer sobre la variabilidad genética en la respuesta a los fármacos para mejoramiento del tratamiento para la diabetes en población mexicana que implicará:

Toma de una muestra de sangre, mediante punción venosa del brazo de un volumen de aproximadamente 20 ml para que con su sangre se hagan 3 cosas:

(1) La extracción de material genético (ADN) para el estudio de los genes especificados en el protocolo "Búsqueda de polimorfismos y mutaciones en genes relacionados con la aparición de diabetes, en población indígena mexicana".
(2) Es probable que en un futuro se descubran nuevos genes relacionados con la "Diabetes", por ello se le solicita que autorice al investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en el futuro. Si usted acepta autorizar este almacenamiento, se eliminarán de la muestra todos los vínculos con su identidad, antes de guardarla, y no será posible llegar a conocer su identidad a partir de ella. Esta muestra sólo se utilizará para estudiar genes importantes implicados en la Diabetes y no se realizarán otros estudios con ella.
(3) Evaluación de azúcar y grasas en sangre.

- Usted también puede aceptar que en dicha muestra de sangre donde se extraerá el material de herencia (ADN) se realicen otros estudios para estudiar otras enfermedades diferentes.
- Si usted acepta sólo los estudios de herencia descritos en el punto 1, su muestra se destruirá después de completar la prueba. Si usted acepta que se guarde esa muestra para futuros estudios como se describe en el punto 2, el investigador garantiza que guardará y utilizará la muestra hasta que ya no quede más. Una vez separada la muestra no podrá ser destruida, pero no se podrá relacionar con usted.
- Usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando qué parte del estudio genético acepta y firmando este documento, antes de la obtención del material genético.

(4) Evaluación de los niveles de medicamento en sangre. Después de los análisis de DNA si usted desea participar en la prueba funcional se le realizará un estudio en donde se tomarán 17 muestras de sangre en 24 horas.

En caso de ser voluntario:

1. Cada voluntario será recibido en el centro de salud o en la unidad metabólica del Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán por 12h.
2. Se le realizará una punción venosa en el brazo para colocar un catéter que se dejara durante las 12 horas de estancia en el hospital.
3. Se administrará una dosis única de glibenclamida o metformina.
4. Se tomarán 5ml de muestra sanguínea en diferentes intervalos de tiempo durante 12h y una última muestra a las 24h.

Procedimiento

- Si acepta a participar en el estudio, tendrá lugar lo siguiente:
- Se le examinará físicamente, tomarán medidas de peso, estatura, cintura y cadera para determinar el Índice de Masa Corporal (IMC) y presión arterial.
- Se someterá a un análisis de laboratorio en el cual le harán una extracción de sangre Le pedirán que mantenga un ayuno de al menos 8 horas antes de la toma de muestra.
- Le solicitarán que responda a un cuestionario para evaluar sus hábitos alimenticios, nivel de estrés y actividad física. En el mismo cuestionario le pedirán algunos datos personales y antecedentes de enfermedades.

Riesgos

Los riesgos de la extracción de sangre incluyen molestias temporales ocasionadas por la punción con la aguja y/o hematomas.

Beneficios
Se le entregarán al participante los resultados bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, creatinina) y será de su conocimiento si es diabético, propenso a la diabetes o una persona sana.

Confidencialidad
Usted tiene derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo a la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La información será procesada de acuerdo a las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo, cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto es con la finalidad de proteger la integridad del estudio.

No se revelará la identidad de las personas que participen en el estudio en ningún informe o publicación que se genere a partir de este trabajo.

¿A quién puedo llamar si tengo preguntas sobre este proyecto?
Si usted tiene preguntas acerca de la recolección de muestras, sus derechos en este proyecto o sobre el almacenamiento de las mismas, puede llamar a la Unidad de Medicina Personalizada en el HRAEPY al teléfono 999-942-76-00 ext. 54404 con la Dra. Marta Menjívar Iraheta o al Parque Científico y Teconológico de Yucatán-Facultad de Química-UNAM al teléfono 999-688-53-04 ext. 7621.

Consentimiento
1. Yo _____ declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto participar en este estudio genético.
2. Se me ha entregado una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
3. Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificará mi sangre y mis muestras de material genético (ADN) con un número codificado.
4. Soy libre de retirarme del estudio genético en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico futuro. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra, no se podrá relacionar conmigo, de forma que no se podrá destruir.
5. Me han informado que la evaluación física, de laboratorio clínico y el estudio genético no tiene ningún costo, y no habrá ningún gasto adicional para mí.
6. En que toda la información genética de la muestra sea depositada en bases de datos científicas de libre acceso (públicas) en Internet.
7. En que una vez que la muestra haya sido estudiada, no podré retirar la información de mi muestra de las bases de datos científicas.
He leído o escuchado toda la información, he hecho todas las preguntas que he tenido, y todas mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Soy consciente que dar una muestra es mi decisión.
Medite su elección, elija uno de los siguientes puntos y firme si usted está de acuerdo.

Punto 1. Yo DOY mi consentimiento voluntariamente para que se pueda realizar el estudio genético referente a la "Diabetes" en mi muestra de material genético (ADN).

Punto 2. Yo DOY mi consentimiento voluntariamente para que se guarde mi muestra material genético (ADN), con desvinculación de la identidad. Esto permitirá la realización de nuevas

pruebas en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con la "Diabetes".

Punto 3. Yo DOY mi consentimiento voluntariamente para que en mi muestra de material genético (ADN) desvinculada se puedan realizar futuros estudios en otras enfermedades.

Acepto que se me realice la toma de muestra de sangre periférica.

Lugar y fecha _____

Nombre del participante: _____

Dirección: _____

Firma del participante: _____

¿Se le otorgó copia al participante? _____Sí _____No

Firma del Investigador _____

Nombre del testigo:	
Firma:	Fecha: _____ dd-mmm-aaaa
Dirección:	Relación con el participante:

Nombre del testigo:	
Firma:	Fecha: _____ dd-mmm-aaaa
Dirección:	Relación con el participante:

_____
Nombre escrito de la persona que explica el consentimiento

_____ _____
Firma de la persona que explica el consentimiento dd-mmm-aaaa
Fecha

Anexo 11.3 Cuestionario

CUESTIONARIO "PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN *CYP2C9* EN LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON SULFONILUREAS EN PACIENTES MAYAS CON DIABETES TIPO 2"

Fecha: _____

No. Afiliación: _____ ID del paciente: _____

Nombre del Paciente: _____

Fecha de nacimiento: _____ Edad: _____ años

Género: 1☐Femenino 2☐Masculino Ocupación: _____

Teléfono(s): _____ Domicilio: _____

Estado civil: 1☐Soltero 2☐Casado 3☐Viudo 4☐Separado

Nivel de escolaridad: 1☐sin estudios 2☐Primaria 3☐Secundaria 4☐Preparatoria 5☐Licenciatura 6☐Posgrado

Fecha de Diagnóstico: _____

1. ¿Usted, sus padres o abuelos tienen al menos un apellido Maya?

( )	1. Si
( )	2. No

2. ¿Tiene parientes o antecedentes familiares con diabetes tipo 2?

( )	1. Si ¿Quien? _____
( )	2. No

3. ¿Presenta o ha presentado algún problema en el riñón?

( )	1. Si ¿Cuándo? _____
( )	2. No

4. ¿Presenta o ha presentado algún problema en el hígado?

( )	1. Si ¿Cuándo? _____
( )	2. No

5. ¿Usted fuma?

( )	1. Si ¿Con qué frecuencia? _____
( )	2. No

6. ¿Ingiere bebidas alcohólicas?

( )	1. Si ¿Con qué frecuencia? _____
( )	2. No

7. ¿Realiza alguna actividad física?

( )	1. Si ¿Con qué frecuencia?
( )	2. No

8. ¿Considera tener buenos hábitos alimenticios?

( )	1. Si
( )	2. No ¿Por qué? _____

9. ¿Que medicamento se le prescribe para el tratamiento de la diabetes tipo 2? (Puede elegir más de una opción)

	Medicamento	Dosis
( )	1. Metformina	
( )	2. Glibenclamida	
( )	3. Glipizida	
( )	4. Glimepirida	
( )	5. Repaglinida	
( )	6. Nateglinida	
( )	7. Pioglitazona	
( )	8. Acarbosa	
( )	9. Exenatida	
( )	10. Sitagliptina	
( )	11.Vildagliptina	
( )	12. Insulina	
( )	13. Otro ¿Cuál? _____	

10. ¿Dejó de tomar alguna vez el medicamento?

( )	1. Si
( )	2. No

11. ¿Porque razón dejó de tomar el medicamento?

( )	1. Falta de tiempo
( )	2. Olvido
( )	3. Porque siente mejoría
( )	4. Presenta algún malestar ¿Cuál? _____
( )	5. Otra razón ¿Cuál? _____

12. ¿Cuánto tiempo lleva con el tratamiento?

( )	1. De 1 a 5 años
( )	2. De 5 años 1 mes a 10 años
( )	3. De 10 años 1 mes a 15 años
( )	4. Más de 15 años

13 ¿Toma el medicamento a las horas indicadas?

( )	1. Si
( )	2. No

14. ¿Ha presentado mejoría con el medicamento prescrito para el tratamiento de la diabetes?

( )	1. Si
( )	2. No ¿Por qué?

15. ¿Ha presentado alguna de las siguientes complicaciones? (Puede elegir más de una opción:

( )	1. Problemas cardiovasculares (Cardiopatía)
( )	2. Problemas visuales (Retinopatía)
( )	3. Pie diabético
( )	4. Problemas en el riñón (Nefropatía)
( )	5. Complicaciones nervioso-cerebral (Neuropatía)
( )	6. Ninguna

16. Cuando se encuentra bien, ¿deja de tomar la medicación?

( )	1. Si
( )	2. No

17. Actualmente ¿toma otros medicamentos?

( )	1. Si ¿Cuál? _____
( )	2. No

18. ¿Toma algún remedio herbolario, suplemento alimenticio o vitamina?

( )	1. Si ¿Cuál?
( )	2. No

19. ¿Presentó algún evento adverso cuando inicio el tratamiento para la diabetes tipo 2?

( )	1. Si
( )	2. No (Aquí termina el cuestionario)

20. ¿Qué evento adverso presenta o presentó al iniciar o durante el tratamiento para la diabetes tipo 2? (Puede ser una o más opciones a elegir).

( )	1. Nauseas
( )	2. Vómito
( )	3. Hipoglucemia
( )	4. Diarrea
( )	5. Dolor de cabeza
( )	6. Dolor de estómago
( )	7. Gastritis
( )	8. Flatulencias
( )	9. Estreñimiento
( )	10. Dolor muscular
( )	11. Otros

21. ¿Cuánto tiempo cursó o lleva cursando los eventos adversos

( )	1. Días ¿Cuántos? _____
( )	2. Semanas ¿Cuántas? _____
( )	3. Meses ¿Cuántos? _____
( )	4. Años ¿Cuántos? _____

22. Si alguna vez le sienta mal, ¿deja usted de tomarla?

( )	1. Si
( )	2. No

DATOS ANTROPOMÉTRICOS

( )	1. Peso_____kg
( )	2. Talla cm
( )	3. IMC_____
( )	4. Presión arterial_____mmHg
( )	5. Dextrosis_____mg/dL

Comentarios:_____

_____

_____

_____

_____

Anexo 11.4 Determinaciones Bioquímicas

11.4.1 Glucosa

Para su determinación, la glucosa es oxidada a ácido glucónico en presencia de la enzima glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido en esta reacción, se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):

$$\beta\text{-D Glucosa} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Ácido glucónico} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Fenol} + \text{Ampirona} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Quinona} + H_2O$$

Condiciones del ensayo: 505nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37ºC

Valores de referencia: Suero o plasma 80-130mg/dL (3.33-6.10 mmol/L)

11.4.2 Colesterol Total

La determinación de colesterol es una de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias, el aumento del nivel del colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular

Fundamento: El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la siguiente reacción

$$\text{Ésteres colesterol} + H_2O \xrightarrow{\text{Colesterol esterasa}} \text{colesterol} + \text{ácidos grasos}$$

$$\text{Colesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{colesterol oxidasa}} \text{4-colestenona} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{fenol} + \text{4-aminofenazona} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Quinonimina} + 4H_2O$$

Condiciones del ensayo: 505nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37ºC

Valores de referencia: Suero <200mg/dL

11.4.3 Colesterol HDL

Las partículas de HDL son lipoproteínas que transportan el colesterol a las células. Un nivel bajo de HDL es considerado un factor de riesgo cardiovascular y de enfermedades de las arterias coronarias

Fundamento: El método se basa en las propiedades de un detergente que solubiliza solo la fracción HDL de forma que el HDL-c se libera reaccionando con el colesterol esterasa, la colesterol oxidasa y los cromógenos.

Condiciones del ensayo: 600 a 700nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37ºC

Valores de referencia: Suero en hombres > 50mg/dL y mujeres > 60mg/dL

11.4.4 Urea

Es excretada del organismo por los riñones por lo que su determinación es importante para el diagnóstico de algunas enfermedades renales y metabólicas

Fundamento: Para su determinación la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea presente en la muestra, en amoníaco (NH_3) y anhídrido carbónico (CO_2). El amoníaco formado se incorpora al α-cetoglutarato por acción del glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a NAD. La disminución de la concentración de NAD^+ en el medio es proporcional a la concentración de la muestra a analizar

$$\text{Urea} + H_2O + 2H^+ \xrightarrow{\text{ureasa}} 2\,NH_3 + CO_2$$

$$2\,NH_3 + \alpha\text{-cetoglutarato} + NADH \xrightarrow{\text{GLDH}} H_2O + NAD^+ + \text{L-glutamato}$$

Condiciones del ensayo: 340nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37ºC

Valores de referencia: suero 15-45mg/dL, orina 20-35g/24hrs

11.4.5 Creatinina

El ensayo esta basada en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino produciendo un complejo rojizo descrito por Jaffé. El intervalo de tiempo elegido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina de la muestra a analizar

Condiciones del ensayo: 492nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37°C

Valores de referencia: suero o plasma en hombres 0.7-1.4mg/dL y mujeres 0.6-1.1mg/dL

11.4.6 Ácido úrico

El ácido úrico proviene del metabolismo del nitrógeno por degradación de las purinas y es tóxico en el organismo, por lo cual se elimina principalmente en orina.

Fundamento: el ácido úrico es oxidado por la uricasa produciendo alantoína y peróxido de hidrógeno (2 H_2O_2). Posteriormente, en presencia de la peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y 2-4 Diclorofenol Sulfonato (DCPS) forma un compuesto rosáceo.

$$\text{Ácido úrico} + 2H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{uricasa}} \text{Alantoína} + CO_2 + 2H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-AF} + \text{DCPS} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Quinonaimina} + 4H_2O$$

Condiciones del ensayo: 520nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37°C

Valores de referencia: suero o plasma en hombres 3.6-7.7mg/dL y mujeres 2.5-6.8mg/dL

11.4.7 Alanina aminotransferasa (ALT)

La ALT es una enzima intracelular que se encuentra principalmente en el hígado, se encuentra elevado en enfermedades hepáticas

Fundamento: La ALT cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α-cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:

$$\text{alanina} + \alpha\text{-cetoglutarato} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{Glutamato} + \text{piruvato}$$

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactato} + NAD^+$$

Condiciones del ensayo: 340nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37ºC

Valores de referencia: suero en hombres 40U/L y mujeres 32U/L

11.4.8 Aspartato aminotransferasa (AST)

ES una enzima intracelular se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado y en menor cantidad en otros tejidos, un nivel elevado de AST no es específico de enfermedad hepática, se emplea con otras enzimas como ALT. Fundamento: La AST cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α-cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH

$$\text{aspartato} + \alpha\text{-cetoglutarato} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Glutamato} + \text{oxalacetato}$$

$$\text{oxalacetato} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Malato} + NAD^+$$

Condiciones del ensayo: 340nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37ºC

Valores de referencia: suero en hombres 38 U/L y mujeres 31 U/L

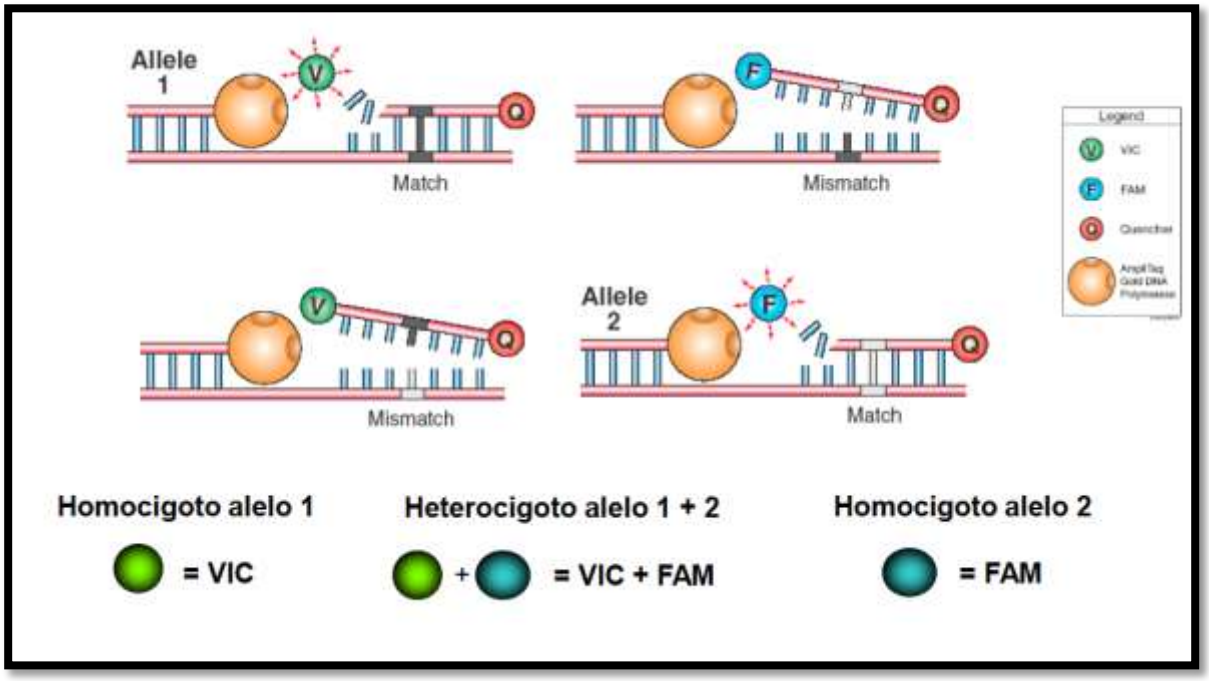
Anexo 11.5 Extracción de ADN mediante la técnica modificada de Miller et. al.

1. En un tubo de 15mL colocar 2mL de sangre total (EDTA), agregar 5mL de una solución sacarosa tritón 2X frío, llevar a un volumen final de 10mL con agua estéril, mezclar suavemente por inversión e incubar en hielo 30min (mezclar de ves en cuando suavemente).
2. centrifugar a 2500rpm durante 15min a 4ºC.
3. Decantar el sobrenadante y desechar.
4. Lavar el botón con 2mL de solución sacarosa-tritón 1X (frío).
5. centrifugar a 2500rpm durante 15min a 4ºC.
6. Tirar el sobrenadante (con gasa estéril limpiar boca del tubo), el pellet debe verse rosado, si no, lavar nuevamente con sacarosa-tritón 1X
7. Agregar 800µL de buffer de lisis nuclear, 45µL de SDS 10% y 20µL de Proteinasa K, incubar a 37ºC con agitación suave toda la noche
8. Pasada la incubación agregar 480µL de cloruro de sodio saturado y agitar vigorosamente
9. centrifugar a 3000rpm durante 20min a 4ºC.
10. Incubar en hielo 20min
11. Transferir el sobrenadante a otro tubo cónico estéril
12. Agregar 2 volúmenes de etanol al 100% frío
13. Sacar el ADN con una pipeta Pasteur, mezclar por inversión y sacar el ADN restante.
14. Lavar el ADN con etanol al 70% dentro de u tubo de 600µL.
15. Dejar secar y depositar en 200µL de agua grado biología molecular en un tubo de 600µL por 30min a 37ºC
16. Almacenar a -20 ºC

Anexo 11.6 Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

El objetivo de la RT-PCR ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que 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 punto final. Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia.

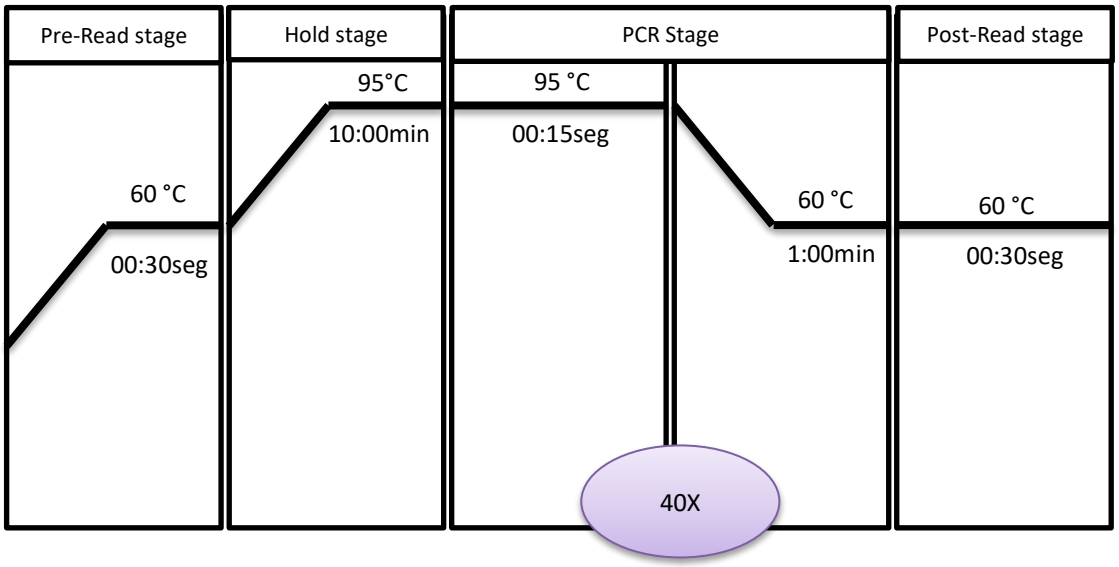
Figura 6. RT-PCR con sondas *TaqMan*®



Anexo 11.7 Programa de amplificación de RT-PCR

El programa de amplificación para las sondas *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* fue:

Figura 7. Programa de amplificación para la sondas *CYP2C9*2 y CYP2C9*3*



Anexo 11.8 Secuencias de las sondas

Sonda	Secuencia	VIC	FAM
*CYP2C9 *2*	GATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGAC**[C/T]**GTGTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCT	C	T
*CYP2C9 *3*	TGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATAC**[C/A]**TTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCC	C	A

Anexo 11.9 Preparación de reactivos

11.9.1 Cloruro de sodio saturado (1L)

En un vaso de precipitado agregar 500mL de agua destilada y agregar poco a poco los 350g de cloruro de sodio (NaCl), solubilizar lo más posible y agregar posteriormente los otros 500mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente

11.9.2 Sacarosa-Tritón 2X (1L)

Pesar 219g de sacarosa, 2.42g de tris base, 2.03g de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), y disolver en 500mL de agua destilada, solubilizar lo más posible y agregar lentamente 10mL de Tritón 100X, transferir la solución a un matraz aforado y ajustar la solución a 1000mL con agua destilada, filtrar y almacenar a 4ºC.

11.9.3 Buffer de lisis nuclear (500mL)

En un vaso de precipitado con 500mL de agua destilada agregar 1.21g de tris base, 23.4 de NaCl y 0.75g de sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético (Na_2EDTA), solubilizar lo mas posible, esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

11.9.4 Buffer TBE 5X (500mL)

En un vaso de precipitado con 250mL de agua estéril agregar 27g de tris base y 13.75g de ácido bórico, disolver lo mas posible y transferir a un matraz aforado, agregar lentamente 10mL de EDTA 0.5M pH 8.0, ajustar a a marca de 500mL con agua destilada, filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

11.9.5 Gel de agarosa al 1.5%

En un matraz de 250mL disolver 0.75g de agarosa con 50mL de buffer TBE 1X, calentar para disolver, esperar que enfríe aproximadamente a temperatura ambiente y agregar 0.5µL de colorante gel green, verter en el molde, agregar los peines y esperar que el gel se solidifique.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. Diabetes Care. 2019;42(1):S1-S2.

2. Pearson ER. Personalized medicine in diabetes: the role of 'omics' and biomarkers. Diabet Med. 2016;33(6):712-7.

3. Rodriguez-Rivera NS, Cuautle-Rodriguez P, Castillo-Najera F, Molina-Guarneros JA. Identification of genetic variants in pharmacogenetic genes associated with type 2 diabetes in a Mexican-Mestizo population. Biomed Rep. 2017;7(1):21-8.

4. Marin-Penalver JJ, Martin-Timon I, Sevillano-Collantes C, Del Canizo-Gomez FJ. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes. 2016;7(17):354-95.

5. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. Diabetes Care. 2019;42(1):S13-S28.

6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Nota Descriptiva. Julio 2017. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/

7. International Diabetes Federation. Atlas 2015. http://www.diabetesatlas.org/

8. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe final de resultados, Instituto Nacional de Salud Pública, 2016. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT

9. Thrasher J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus: Available Therapies. Am J Cardiol. 2017;120(1):S4-S16.

10. Holstein A, Beil W, Kovacs P. CYP2C metabolism of oral antidiabetic drugs - impact on pharmacokinetics, drug interactions and pharmacogenetics aspects. Drug Metab. Toxicol. (2012); 8(12):1549-1563

11. Tornio A, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. Drug interactions with oral antidiabetic agents: pharmacokinetic mechanisms and clinical implications. Trends Pharmacol Sci. 2012;33(6):312-22.

12. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/dirgral/marco_juridico/normas/nom_14.pdf

13. Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 en el primer nivel de Atención. México: Instituto Mexicano del Seguro Social; 08/07/2014

14. Cuautle-Rodriguez P, Llerena A, Molina-Guarneros J. Present status and perspective of pharmacogenetics in Mexico. Drug Metabol Drug Interact. 2014;29(1):37-45.
15. Maruthur N, Gribble M, Bennett W, Bolen S, Wilson L, et.al. The Pharmacogenetics of Type 2 Diabetes: A Systematic Review. Diabetes Care 2014; 37(4): 876-886.
16. Gupta P, Bala M, Gupta S, Dua A, Dabur R, Injeti E, et al. Efficacy and risk profile of anti-diabetic therapies: Conventional vs traditional drugs-A mechanistic revisit to understand their mode of action. Pharmacol Res. 2016;113(5):636-74.
17. Ren Q, Han X, Zhang S, Cai X, Ji L. Combined Influence of Genetic Variants and Gene-gene Interaction on Sulfonylurea Efficacy in Type 2 Diabetic Patients. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2016;124(3):157-62.
18. Pallardo Sánchez LF. Sulfonilureas en el tratamiento del paciente con diabetes mellitus tipo 2. Endocrinología y Nutrición. 2008;55:17-25.
19. Grant RW, Wexler DJ. Loss-of-function CYP2C9 variants: finding the correct clinical role for Type 2 diabetes pharmacogenetic testing. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2010;8(3):339-43.
20. Tirkkonen T, Heikkila P, Huupponen R, Laine K. Potential CYP2C9-mediated drug-drug interactions in hospitalized type 2 diabetes mellitus patients treated with the sulphonylureas glibenclamide, glimepiride or glipizide. J Intern Med. 2010;268(4):359-66.
21. Escorcia S. Hipoglucemia por fármacos antidiabéticos. Revista de Endocrinología y Nutrición. 2009; 17: 120-128.
22. Amin M, Suksomboon N. Pharmacotherapy of type 2 diabetes mellitus: an update on drug-drug interactions. Drug Saf. 2014;37(11):903-19.
23. Loganadan NK, Huri HZ, Vethakkan SR, Hussein Z. Genetic markers predicting sulphonylurea treatment outcomes in type 2 diabetes patients: current evidence and challenges for clinical implementation. Pharmacogenomics J. 2016;16(3):209-19.
24. Seino S, Sugawara K, Yokoi N, Takahashi H. beta-Cell signalling and insulin secretagogues: A path for improved diabetes therapy. Diabetes Obes Metab. 2017;19(1):22-9.
25. Samer CF, Lorenzini KI, Rollason V, Daali Y, Desmeules JA. Applications of CYP450 testing in the clinical setting. Mol Diagn Ther. 2013;17(3):165-84.
26. Sosa-Macias M, Llerena A. Cytochrome P450 genetic polymorphisms of Mexican indigenous populations. Drug Metabol Drug Interact. 2013;28(4):193-208.

27. Zhou SF, Zhou ZW, Huang M. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. Toxicology. 2010;278(2):165-88.
28. Suarez-Kurtz G. Pharmacogenomics in admixed populations. Trends Pharmacol Sci. 2005;26(4):196-201.
29. Hiratsuka M, Genetic Polymorphisms and in Vitro Functional Characterization of CYP2C8, CYP2C9, and CYP2C19 Allelic Variants. Biol. Pharm. Bull. 2016;39:1748–1759.
30. He, S. Zhou Z, Li X, Zhou S. Clinical Drugs Undergoing Polymorphic Metabolism by Human Cytochrome P450 2C9 and the Implication in Drug Development. Current Medicinal Chemistry, 2011; (18): 667-713.
31. Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE, et al. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. Pharmacogenet Genomics. 2010;20(4):277-81.
32. Sánchez-Pozos K, Rivera-Santiago C, García Rodríguez M.H, et al. Genetic variability of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 in seven indigenous groups from Mexico. Pharmacogenomics. 2016; 10.2217/pgs-2016-0099.
33. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988; 16(3): 1215.
34. Subramanian M, Agrawal V, Sandee D. Effect of P450 oxidoreductase variants on the metabolism of model substrates mediated by CYP2C9.1, CYP2C9.2, and CYP2C9.3. Pharmacogenet Genomics. 2012; 22(8): 590-7.
35. Kirchheiner J, Brockmöller J, Meineke I. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2001; 71(4): 286-296.
36. Quilliam BJ, Ozbay AB, Sill BE. The association between adherence to oral anti-diabetic drugs and hypoglycaemia in persons with Type 2 diabetes. Diabetes. 2013; (30): 1305-1313.
37. Haga SB, LaPointe NMA. The potential impact of pharmacogenetic testing on medication adherence. The Pharmacogenomics Journal. 2013; (13): 481- 483.
38. Cuautle-Rodríguez P, Rodríguez-Rivera N, Llerena A. Frequency of CYP2C9 (*2, *3 and IVS8-109A>T) allelic variants, and their clinical implications, among Mexican patients with diabetes mellitus type 2 undergoing treatment with glibenclamide and metformin. Biomedical Reports. 2019; (10): 283-295.

39. Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2016, Instalación y operación de la Farmacovigilancia
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5490830&fecha=19/07/2017
40. Cacabelos R, Cacabelos N, Carril J. The role of pharmacogenomics in adverse drug reactions. Expert Review of Clinical Pharmacology. 2019; 1751-2441.
41. Juurlink DN, Gomes T, Shah BR. Adverse cardiovascular events during treatment with glyburide (glibenclamide) or gliclazide in a high-risk population. Diabetic Medicine. 2012; (29):1524-1528.
42. Leonard CE, Han X, Bresinger CM. Comparative risk of serious hypoglycemia with oral antidiabetic monotherapy: A retrospective cohort study. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2018;(27):9–18.
43. Leonard CE, Bilker WB, Brensinger CM. Severe hypoglycemia in users of sulfonylurea antidiabetic agents and antihyperlipidemics. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2015; (99)5: 538-547.
44. Andersen SE, Christensen M. Hypoglycaemia when adding sulphonylurea to metformin: a systematic review and network meta-analysis. Br J Clin Pharmacol. 2016; 82(5): 1291-1302.
45. Federación Mexicana de Diabetes A.C. 2015. http://fmdiabetes.org/hipoglucemia-aumenta-en-mexico/
46. Saldaña-Cruz AM, León-Moreno LC, Sánchez-Corona JS. CYP2C9 and CYP2C19 Allele and Haplotype Distributions in Four Mestizo Populations from Western Mexico: An Interethnic Comparative Study. Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2016;20(11): 1-8.
47. Morisky DE, Green LW, Levine DM. Concurrent and Predictive Validity of a Self-reported Measure of Medication Adherence. Medical Care. 1986; 24(1): 67-74
48. NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2017, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad.
https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5523105&fecha=18/05/2018
49. Holstein A, Plaschke A, Ptak M. Association between CYP2C9 slow metabolizer genotypes and severe hypoglycaemia on medication with sulphonylurea hypoglycaemic agents. Br J Clin Pharmacol. 2005; (60):103–106

50. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. Science. 2014; 344(6189): 1280-5

51. He R. Zhang D, Lu W. 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. 2015;(109):57-63.

52. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. J Clin Pharmacol. 1999; (48): 643–648.

53. Quilliam BJ, Ozbay AB, Sill BE. The association between adherence to oral anti-diabetic drugs and hypoglycaemia in persons with Type 2 diabetes. Diabetes. 2013;(30): 1305-1313.

54. Zeng W, Guo Y, Peixian C. CYP2C93 variant is associated with antidiabetes efficacy of gliclazide in Chinese type 2 diabetes patients. J Diabetes Investig. 2016;7(5):764-768.

55. Lara-Riegos JC, Ortíz Lopez MG, Menjivar M. Diabetes susceptibility in Mayas: Evidence for the involvement of polymorphisms in HHEX, HNF4α, KCNJ11, PPARγ, CDKN2A/2B, SLC30A8, CDC123/CAMK1D, TCF7L2, ABCA1 and SLC16A11 genes. Gene. 2015; 33(11):1-8.

56. Reséndiz-Abarca CA, Flores-Alfaro E, Suárez-Sanchez F. Altered Glycemic Control Associated With Polymorphisms in the SLC22A1 (OCT1) Gene in a Mexican Population With Type 2 Diabetes Mellitus Treated With Metformin: A Cohort Study. The Journal of Clinical Pharmacology. 2019;(0)0:1-7.

57. Urbán-Reyes BR, Coghlan-López JJ, Castañeda-Sánchez O, Estilo de vida y control glucémico en pacientes con Diabetes Mellitus en el primer nivel de atención. Aten Fam. 2015;22(3):68-71.

58 Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M. The ATP-Binding Cassette Transporter A1 R230C Variant Affects HDL Cholesterol Levels and BMI in the Mexican Population. Diabetes. 2007;(56):1881-1887.

59. Gallardo-Blanco HG, Villarreal-Pérez JZ, Cerda-Flores RM. Genetic variants in KCNJ11, TCF7L2 and HNF4A are associated with type 2 diabetes, BMI and dyslipidemia in families of Northeastern Mexico: A pilot study. Experimental and Therapeutic Medicine. 2017;13:523-529.

60. Andrews CM, Wyne K, Svenson JE. The Use of Traditional and Complementary Medicine for Diabetes in Rural Guatemala. J Health Care Poor Underserved. 2018;29(4):1188-1208.

61. Ahmad J, Khan I, Blundell R. Moringa oleifera and glycemic control: A review of current evidence and possible mechanisms. Phytotherapy Research. 2019: 1–8.

62. Namba M, Iwakura T, Nishimura R. The current status of treatment-related severe hypoglycemia in Japanese patients with diabetes mellitus: a report from the committee on a survey of severe hypoglycemia in the Japan Diabetes Society. Diabetology International 2018; (9):84–99.

63. Malawana M, Hutchings A, Mathur R. Ethnic variations in the risk of hypoglycaemia among people with Type 2 diabetes prescribed insulins and/or sulfonylureas: a historical cohort study using general practice-recorded data. Diabet. Med. 2018;35(4):1707–1715.

64. Dujic T, Zhou K, Donnelly L. Interaction between variants in the CYP2C9 and POR genes and the risk of sulfonylurea-induced hypoglycaemia: A GoDARTS Study. Diabetes Obes Metab. 2018;20:211–214.

65. Yin O, Tomlinson B, Chow M. CYP2C9, but not CYP2C19, polymorphisms affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in Chinese subjects. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2005;78(4):370-7.