



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD.**

CAMPO DE CONOCIMIENTO: INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y EXPERIMENTAL EN SALUD.

CAMPO DISCIPLINARIO: FARMACOLOGÍA CLÍNICA.

**Frecuencias de los polimorfismos de los genes *SLC22A1/OCT1*, *SLC22A2/OCT2*,
SLC47A1/MATE1 Y *SLC47A2/MATE2*, *SLC29A4/HENT4* (PMAT), *ABCB1* (P-gp/MDR1) y
CYP2C9 en pacientes diabéticos tipo 2 mestizos mexicanos y su posible asociación con la
eficacia terapéutica.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C. ADIEL ORTEGA AYALA

TUTOR:

DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS. Facultad de Medicina UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ. Hospital Conde de Valenciana.

Ciudad Universitaria, CD. MX. Febrero 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

1.- RESUMEN	12
2.- ANTECEDENTES.	14
2.1.- Definición de diabetes.	14
2.2.- Tipos de diabetes.	14
2.3.- Diagnóstico de diabetes.	16
2.4.- Epidemiología de la diabetes en el mundo.	17
2.5.- Epidemiología de la diabetes en México.	18
2.6.- Prediabetes.	20
2.7.- Diabetes tipo 2.	21
2.7.1.- Complicaciones agudas de la diabetes.	22
2.7.2.- Complicaciones crónicas de la diabetes.	24
2.7.2.1.- Complicaciones microvasculares de la diabetes.	25
2.7.2.2.- Complicaciones macrovasculares de la diabetes.	26
2.8.- Tratamiento para la diabetes tipo 2.	28
2.8.1.- Metformina.	35
2.8.1.1.- Farmacocinética de la metformina.	35
2.8.1.2.- Farmacodinamia de la metformina.	36
2.8.1.2.1.- Mecanismos propuestos mediante los cuales la metformina inhibe la gluconeogénesis hepática.	36
2.8.1.3.- Farmacogenética de la metformina.	38
2.8.1.3.1.- Transportadores de cationes orgánicos	38
2.8.1.3.1.1.- Transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1).	39
2.8.1.3.1.1.1.- OCT1 Met420 delección (p.M420del) (rs72552763).	40
2.8.1.3.1.1.2.- C1386A (rs622342).	41
2.8.1.3.1.2.- Transportador de cationes orgánicos 2 (OCT2).	42
2.8.1.3.1.2.1.- G808T (rs316019).	43
2.8.1.3.1.3.- Transportador de cationes orgánicos 3 (OCT3).	43
2.8.1.3.1.3.1.- C698G (rs2076828).	44
2.8.1.3.2.- Generalidades de la superfamilia ATP binding cassette (ABC).	45
2.8.1.3.2.1.- C1236T (rs1128503).	45
2.8.1.3.2.2.- G2677T/A (rs2032582).	46
2.8.1.3.2.3.- C3435T (rs1045642).	47
2.8.2 Glibenclamida.	47

2.8.2.1.- Farmacodinamia de la glibenclamida.	47
2.8.2.2.- Farmacocinética de la glibenclamida.	48
2.8.2.3.- Farmacogenética de la cinética de la glibenclamida.	48
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	54
4.- JUSTIFICACIÓN.	55
5.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	56
6.- PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.	57
7.- OBJETIVOS.	58
8.- MATERIAL Y MÉTODOS.	59
8.1.- Tipo y diseño del estudio.	59
8.2.- Población.	59
8.3.- Tamaño de la muestra.	59
8.4.- Criterios de selección.	61
8.4.1.- Inclusión.	61
8.4.2.- Exclusión.	61
8.4.3.- Eliminación.	61
8.5.- Operacionalización de variables.	62
8.6.- Procedimiento de obtención de la información.	66
8.6.1 Genotipificación.	66
8.6.2. Determinación plasmática de metformina.	68
8.6.3. Evaluación clínica.	70
8.7.- Análisis estadístico.	72
8.7.1. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas.	72
8.7.2. Regresión logística.	72
9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	74
9.1 Características generales de los pacientes por agrupados por tipo de tratamiento.	74
9.2 Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg.	76
9.3.- Frecuencias genotípicas de los pacientes agrupados según el criterio de control de HbA1c.	77
9.4.- Concentración plasmática de metformina en pacientes agrupados según criterio de control por HbA1c y terapia recibida.	79
9.5.- Niveles de HbA1c en pacientes agrupados por tipo de tratamiento.	87
9.6.- Análisis de regresión logística entre SNPs estudiados y control según HbA1c.	89
9.7.- Análisis de la dosis de metformina por genotipo con los pacientes agrupados por tipo de tratamiento.	91

10.- CONCLUSIONES.	93
10.1 Limitaciones.	94
11.- ASPECTOS ÉTICOS.	95
12.- ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD.	95
13.- REFERENCIAS.	96
14.- ANEXOS	103
14.1.- ANEXO 1: Aprobación del proyecto por las comisiones de investigación y ética de la FM.	103
14.2.- ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO.	104
14.3.- ANEXO 3: ARTÍCULO EN REVISTA INDIZADA.	110

Agradecimientos.

La elaboración de este proyecto fue posible gracias al apoyo de del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Número de proyecto IN203418 e IN205121) de la Dirección General de Apoyo a Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente estudio fue también apoyado por la Junta de Extremadura, Agencia Extremeña de Cooperación Internacional para el desarrollo, España (Número otorgado. PATLI 18IA003) RIBEF/SIFF (Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica).

Mis estudios de posgrado de maestría y doctorado fueron realizados gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de becario: 780213. El apoyo económico a los estudiantes de posgrado es sumamente crucial para el desarrollo de profesionales altamente capacitados en nuestro país.

Este estudio no hubiera sido posible sin el apoyo del personal del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca. Agradecimiento especial a la química Emma, por su apoyo logístico.

Agradecimientos personales en el desarrollo del proyecto.

Agradecimiento especial al personal del HRAEI:

A Marlen Arenas Carmona, quien me ayudó muchísimo en la toma de muestras y con su gran entusiasmo, me hizo sentir como en casa.

A Marcela Yetlanezi Hernández Pérez, Yazmín Alejandra Villegas Muñoz y Alma Leticia García Mendoza, “Las chicas de recepción” que con su labor y esfuerzo adicional hicieron posible el desarrollo de este proyecto.

A Barucht Villela Roa, un taxista que trae el Google maps y más en la cabeza ¡Gracias Barucht!, ya que, no hubiera podido realizar todo esto sin tu apoyo en el transporte y compañía de casi 4 horas cada día que asistía a Ixtapaluca, nunca me cobró la cantidad que tenía que cobrar, me apoyó demasiado y lo sigue haciendo.

Agradecimientos familiares.

Fueron un 10 de octubre de 2015 y un 4 de marzo de 2017 los días más dolorosos de mi vida y que, sin lugar a dudas, considero días de “encrucijada”, pues son los días en que partieron las personas a las que quizá más he amado en esta vida, mis abuelitos: María Antonieta Camacho Hernández y Ángel Ayala Morales, su partida me sigue doliendo hasta el día de hoy. No hay un solo día en que no los tenga en mente, ellos están inmortalizados en mi corazón. Fueron días de encrucijada porque un entusiasta tutor de posgrado, me hizo ver, que lo que ellos más hubiesen querido, era verme realizado y titulado, como pocos miembros de mi humilde familia, gracias a este tutor y a mis abuelitos, no abandoné mis estudios de posgrado.

Gracias a mi madre, que ha estado conmigo siempre. Nunca es, ha sido ni será mi intención decepcionarte, pero, déjame hacerte sentir orgullosa de mí de la mejor manera que sé o, mejor dicho, de la manera en que a mí me gusta.

A mi padre, que no sé ni cómo escribirle unas palabras aquí, solo diré que todo lo que tienes, te lo has ganado tú solo y tal parece que tu vida se ha empeñado en eso, yo sigo protestándote mi respeto.

A mi hermano Marco Antonio, carnalito ¡Ya no mms! ¿Qué coño esperas para retomar el vuelo? Te amo hermano mío. No voy a olvidar jamás que tú me ayudaste en mi carrera, sin esos 3 mil pesos que me diste para mis pijamas quirúrgicas aquel 17 de diciembre de 2014, entre otras cosas por las cuales, si no hubieras hecho, yo no estaría aquí. Quizá no lo ves o no quieres verlo, pero te necesito más yo a ti que tú a mí y mira, casi un doctorado en medicina y no dejo de ser un idiota.

A mi hermano Emmanuel, no tienes idea de lo mucho que te amo, perdón por no dejarte dormir y gracias por estar conmigo.

A mi hermana Barbie, mi bebocs, crece, vive y disfruta. Tienes 3 hermanos que te aman.

A Silvia Suárez Hernández, mi Silvita, mi amor bebé, de verdad que tú eres un ángel, una bendición de persona, eres la mejor persona que conozco y me siento muy feliz de que también seas la persona a quien amo, mi niña, mi amiga y mi pareja ¡Te amo!

Agradecimiento a profesores.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz y al Dr. Rafael Villalobos Molina a quienes protesto mi respeto y agradecimiento por tan atinadas y siempre bien dirigidas observaciones. Admiro su sabiduría y paciencia, corrí con suerte de que me hayan acompañado en este camino del doctorado.

A los miembros del jurado de tesis: Dra. Diana Barrera Oviedo, Dra. Maricarmen Jiménez Martínez, Dr. Vicente de Jesús Hernández Abad y Dra. Helgi Helene Jung Cook, mi más sincero agradecimiento por su tiempo y valiosísima intervención para la culminación de esta tesis.

Mi agradecimiento final es para un hombre de la séptima década de la vida. Lo conocí porque el día que falleció mi abuela, no pude dormir nada y me perdí una práctica en el CECAM que tuve que reponer con los estudiantes del Hospital General de Iztapalapa, donde Adriana Espinosa Sánchez, a quien le agradezco tanto, me contó sobre él y así lo pude conocer.

Todo mundo me lo dice, él y yo somos parecidos en muchos aspectos, hablo por mí cuando digo que soy necio, terco, testarudo, con un sentido de lealtad, justicia y respeto inquebrantables en mis protocolos hacia mis mayores y mis maestros, cosa que bien me enseñaron mis abuelos y creo que, él es igual. Soy una persona de carácter sumamente combativo, aferrado a ideales y que siempre lucha por sus objetivos, él es la única persona en el mundo que puede decirme que no sirvo para esto y muy seguramente no estaré de acuerdo. A mi querido mentor, guía, maestro y tutor de maestría y doctorado: El Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros, gracias doctor Molina, si he crecido tanto y si se puede decir que he tenido algo de éxito en mi vida, en gran parte, se lo debo a usted.

LISTADO DE ABREVIATURAS.

μM : Micro molar.

ABC: ATP Binding Cassette.

ADA: American diabetes asociation.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADP: Adenosín Difosfato.

AMP: Adenosín Monofosfato.

ATP: Adenosin Trifosfato.

AUC: Área Bajo la Curva.

CAD: Cetoacidosis diabética.

cAMP: Adenosín Monofosfato Cíclico.

COVID: Enfermedad por Coronavirus.

CYP: Citocromo P450.

DT2: Diabetes tipo 2.

EAP: Enfermedad Arterial Periférica.

ECV: Enfermedad Cerebrovascular.

EHH: Estado Hiperosmolar Hiperglucémico.

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

ENT4: Transportador Equilibrante de Nucleósidos 4.

ERC: Enfermedad Renal Crónica.

EVAEC: Enfermedad Vasular Ateroesclerótica.

FAD: Flavín Adenín Dinucleótido.

FC: Falla Cardíaca.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos.

FID: Federación Internacional de Diabetes.

GLP-1 AR: Agonista del Receptor tipo 1 del Péptido Parecido al Glucagón.

H0: Hipótesis nula.

H1: Hipótesis alterna.

HbA1c: Hemoglobina glucosilada.

HOMA-IR: Evaluación del Modelo Homeostático de Resistencia a la Insulina.

HRAEI: Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca.

IC95%: Intervalo de Confianza al 95%.

iDPP-4: Inhibidor de la Dipeptidil Peptidasa 4.

IMC: Índice de Masa Corporal.

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social.

INSP: Instituto Nacional de Salud Pública.

iSGLT2: Inhibidor del Cotransportador Sodio-Glucosa 2.

K_{ATP}: Canal de Potasio dependiente de ATP.

Km: Constante de Michaelis-Menten.

MATE: Transportador de Extrusión de Múltiples Fármacos.

MDR1: Proteína de Resistencia a Múltiples Fármacos 1.

Mg: Miligramos.

MODY: Diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes.

MPP: 1-metil-4-fenilpiridina.

NAD: Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina.

ND: Nefropatía Diabética.

NeD: Neuropatía diabética.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

NPH: Protamina Neutra Hagedorn.

OAT: Transportador de Aniones Orgánicos.

OCT: Transportador de Cationes Orgánicos.

OCTNs: Transportadores de Cationes Orgánicos/Carnitina.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

OR: Odds Ratio.

P-gp: P glicoproteína.

RD: Retinopatía Diabética.

RI: Resistencia a la Insulina.

RR: Riesgo Relativo.

SEM: Error Estándar a la Media.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido.

SQ: Subcutáneo.

SU: Sulfonilureas.

T_{1/2}: Tiempo de vida media.

TFG: Tasa de Filtración Glomerular.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α .

TZD: Tiazolidinediona.

UKPDS: Estudio prospectivo de diabetes del Reino Unido.

URAT: Transportador de Urato.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

1.- RESUMEN

La diabetes mellitus o simplemente llamada diabetes, es una enfermedad crónica y seria que ocurre cuando los niveles de glucosa se elevan debido a que el cuerpo no produce insulina suficiente o no puede ser utilizada de manera eficiente. Variaciones genéticas inherentes contribuyen a la variabilidad de respuesta a fármacos, ya que, múltiples genes codifican proteínas directamente involucradas en la farmacocinética y farmacodinamia de los fármacos. Aunque existen terapias novedosas disponibles para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (DT2), en México, la terapia combinada más utilizada es metformina+glibenclamida, ya que, se ha reportado que la glibenclamida es el fármaco con mayor costo-beneficio para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en etapas tempranas (Rodríguez-Rivera et al., 2017). Tomando los datos de la ENSANUT que reporta la prevalencia de personas con DT2 en estatus de control, se asume que cerca del 75% de la población mexicana que padece DT2 no está bajo criterios de control glucémico.

Se realizó un estudio en 103 pacientes con diagnóstico de DT2 que reciben tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas. Se encontró que los polimorfismos de *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC22A3*, *CYP2C9* y *ABCB1* no tienen asociación con el control glucémico definido por los niveles de glucosa en ayuno y HbA1c. En el grupo que recibe la monoterapia, los pacientes con genotipo GAT/GAT (rs72552763) del gen OCT1, tienen los niveles de HbA1c más bajos ($p=0.022$). Los pacientes que toman la monoterapia con metformina y que son portadores del genotipo C/C (rs622342) del gen OCT1, tienen mayores niveles de HbA1c ($p=0.009$). Un modelo de regresión logística múltiple, arrojó que existe asociación entre la edad en años, el IMC mayor a 25 Kg/m², el tiempo de tratamiento y el tipo de tratamiento y el no control definido por HbA1c.

Abstract: Mexico has been under official epidemiological alert due to diabetes since 2016. This study presents new information on the frequency and variants of metformin transporters OCT1, OCT2, OCT3, *ABCB1*, and *CYP2C9* variants as well. It also reports the association with HbA1c control on 103 DMT2 patients. They were genotyped through real-time PCR (TaqMan assays) and grouped according to treatment: metformin and metformin + glibenclamide. Metformin plasmatic levels were determined through mass spectrometry. The analysis of HbA1c showed statistical significance across genotypes in polymorphisms rs72552763 ($p = 0.022$), rs622342 ($p = 0.009$), rs1128503 ($p = 0.021$), and rs2032582 ($p = 0.009$) within the monotherapy group. Bivariate analysis found no association between any polymorphism and HbA1c control. Two logistic regression models accounted for two diplotypes in OCT1 and *ABCB1*, including statistically significant covariates. The first model yielded significance in age ($p = 0.026$), treatment period [$p = 0.001$], BMI ≥ 25 kg/m² ($p = 0.043$), and combined therapy ($p < 0.001$). There was no association with GAT/GAT of rs72552763 or A/A rs622342 in *OCT1*. The second model yielded significance in age ($p = 0.017$), treatment period ($p = 0.001$), BMI ≥ 25 kg/m² ($p = 0.042$), and combined therapy ($p < 0.001$), finding no association with C/C of rs1128503 or G/G of rs2032582 in *ABCB1*. Our multinomial logistic regression results may benefit future predictive analyses in diabetic populations.

2.- ANTECEDENTES.

2.1.- Definición de diabetes.

La diabetes mellitus o simplemente llamada diabetes, es una enfermedad crónica y seria que ocurre cuando los niveles de glucosa se elevan debido a que el cuerpo no produce insulina suficiente o no puede ser utilizada de manera eficiente. Una disminución de insulina o la incapacidad celular para responder a ella, es lo que lleva a tener altos niveles de glucosa, lo cual es un indicador clínico de diabetes (International Diabetes Federation, 2021). La Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han señalado a la diabetes como el mayor problema de salud en vista de la perspectiva epidémica global (Standl et al., 2019).

2.2.- Tipos de diabetes.

La guía de la American Diabetes Association por sus siglas ADA (ADA, 2022) dice que la diabetes puede ser clasificada en cualquiera de las siguientes categorías:

1.- *Diabetes tipo 1*: Es debida a destrucción de células β , deficiencia de insulina, incluida la diabetes autoinmune del adulto.

2.- *Diabetes tipo 2*: Es debida a la pérdida progresiva de la adecuada secreción de insulina de la célula β pancreática, frecuentemente precedida de resistencia a la insulina.

3.- *Tipos específicos de diabetes debido a otras causas*: En esta clasificación se encuentran síndromes de diabetes monogénica, como la diabetes neonatal y la diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes por sus siglas en inglés, diabetes tipo MODY (maturity-onset diabetes of the young), así como enfermedades exocrinas del páncreas como fibrosis quística y pancreatitis. También se encuentra la diabetes inducida por fármacos o químicos como por el uso de glucocorticoides en pacientes con VIH/SIDA o después del trasplante de un órgano.

4.- *Diabetes gestacional*: Es el tipo de diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo y que no era diabetes claramente manifiesta antes del embarazo.

La clasificación es de suma importancia ya que, con base en esta, se determina el tratamiento a seguir (ADA, 2022).

La diabetes tipo 1 y tipo 2 son enfermedades en las cuales la presentación clínica y sobre todo la progresión de la enfermedad, pueden variar considerablemente. Los paradigmas tradicionales indican que la diabetes tipo 2 es propia de los adultos y que la diabetes tipo 1 es propia de los niños, pero, ambas enfermedades pueden presentarse en ambos grupos de edad. Los niños con diabetes tipo 1, a menudo presentan poliuria, polidipsia y aproximadamente el 50% inicia con cetoacidosis diabética (CAD) que, ocurre por deficiencia de insulina con aumento relativo o absoluto de glucagón, lipólisis y cetosis progresiva (Kassper, 2016), a diferencia de los adultos en los que los síntomas clásicos pueden no estar presentes. Las características más utilizadas para discriminar sobre diabetes tipo 1 es la edad (<35 años), IMC bajo (<25 Kg/m²), disminución de peso no intencional, CAD y presentación con cifras de glucosa por arriba de 360 mg/dL. Ocasionalmente, los pacientes con diabetes tipo 2, pueden debutar con CAD. Tanto en diabetes tipo 1 como diabetes tipo 2, varios factores tanto genéticos como ambientales pueden resultar en la pérdida progresiva de masa/función de células β pancreáticas que termina por manifestarse clínicamente como hiperglucemia y una vez que ocurre, las personas con todas las formas de diabetes están en el riesgo de desarrollar las mismas complicaciones crónicas, aunque, la progresión es muy diferente, aunque, la diabetes tipo 2 es el tipo más común de diabetes, con una proporción del 90% a nivel mundial respecto a las otras (ADA, 2022; IMSS, 2018) y es el tipo de diabetes que se estudia en la presente tesis.

La caracterización fisiopatológica es más precisa y mejor estudiada en diabetes tipo 1 que en diabetes tipo 2. Aunque en DT2 las vías por las que la célula β pancreática muere o comienza a perder su función son menos claras, la disminución de la secreción de insulina con el respectivo ajuste que lleva a resistencia a la insulina, parece ser el común denominador en la fisiopatología de la diabetes tipo 2. A la DT2 es común asociarla con este defecto de secreción de insulina que a su vez es relacionado con factores genéticos, inflamatorios y de estrés metabólico (ADA, 2022).

2.3.- Diagnóstico de diabetes.

La diabetes puede ser diagnosticada basada en criterio de glucosa plasmática en ayuno, glucosa plasmática a 2 horas posterior a una ingesta de 75 gramos de glucosa vía oral, también llamado prueba de tolerancia oral a la glucosa y por criterios de porcentaje de Hemoglobina glucosilada (HbA1c). Los criterios diagnósticos globales para el diagnóstico de la diabetes han sido ya armonizados entre la OMS, la Federación internacional de diabetes (FID) y la American Diabetes Association (ADA), los cuales se encuentran resumidos en el cuadro 1 (Standl et al., 2019).

Adicional a los criterios diagnósticos armonizados (Tabla 1), la guía de la ADA en su versión del año 2022, sugiere retomar el término “prediabetes” que es cuando se tienen niveles de HbA1c entre 39-47 mmol/mol (5.7-6.4%).

Tabla 1. Criterios armonizados de diagnóstico de prediabetes y diabetes de acuerdo a la Federación internacional de diabetes (FID), Organización Mundial de la Salud (OMS) y American diabetes association (ADA).

DIABETES diagnosticada si UNO O MÁS de los siguientes criterios están presentes.	debería ser	TOLERANCIA A LA GLUCOSA ALTERADA, debería ser diagnosticada si DOS de los siguientes criterios están presentes	GLUCOSA EN AYUNO ALTERADA debería ser diagnosticada si
Glucosa en ayuno ≥7.0 mmol/L (126 mg/dL)	O	Glucosa en ayuno <7.0 mmol/L (126 mg/dL)	Glucosa en ayuno 6.1-6.9 mmol/L (110-125 mg/dL).
Glucosa plasmática a 2 h. ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL) después de 75 g de glucosa vía oral.	O	Glucosa plasmática a 2 h. ≥7.8 y <11.1 mmol/L (140 – 200 mg/dL) después de 75 g de glucosa vía oral.	Y
Glucosa aleatoria >11.1 mmol/L (200 mg/dL) o HbA1c > 48 mmol/mol (>6.5%).	O	HbA1c entre 39 – 47 mmol/mol (5.7-6.4%).	Glucosa plasmática a 2 h. <7.8 mmol/L (140mg/dL) después de 75 g de glucosa vía oral.
			Glucosa en ayuno mayor a 8h 5.6-6.9 mmol/L (100-125 mg/dL)

HbA1c: Hemoglobina glucosilada

Tomado de: Standl et al., 2019.

2.4.- Epidemiología de la diabetes en el mundo.

Basado en la versión del 2021 del atlas publicado por la Federación internacional de diabetes, se estima que, 537 millones de adultos de entre 20 y 79 años (prevalencia del 10.5%) viven con diabetes, de los cuales, el 90% padece diabetes tipo 2. Alrededor de 783 millones de personas (prevalencia del 12.2%) padecerán diabetes para el año 2045, sin mencionar a los 240 millones de personas que viven con diabetes no diagnosticada alrededor del mundo, lo cual quiere decir que al menos 1 de cada 3 pacientes con diabetes, no sabe que tiene la enfermedad (International Diabetes Federation, 2021).

El grupo de edad con menor prevalencia de diabetes es el grupo de 20 a 24 años (2-2%) mientras que, el grupo con mayor prevalencia fue el de 55-59 años (>15%),

encontrando datos muy similares en el grupo de edad de 50-54 años, además, en población de entre 20-79 años de edad, la prevalencia de diabetes es ligeramente menor en hombres (10.2% vs 10.8%) respecto a mujeres (International Diabetes Federation, 2021). Para su mejor estudio, el mundo es dividido en 7 regiones: África, Europa, Este medio y norte de África, Norteamérica y el caribe, Suramérica y américa central, sureste de Asia y Pacífico occidental. De las 7, las 3 regiones con mayor prevalencia de diabetes en adultos de entre 20-79 años, reportada para el año 2021, son:

1. Este medio y norte de África (16.2%).
2. Norte América y El Caribe (14.0%).
3. Sureste de Asia (8.7%)

Según los datos, la proyección para el año 2045 indica que el sureste de Asia, será sustituido en la tercera posición por el Pacífico occidental (11.5%), los dos primeros lugares se mantendrán con 20.4% y 14.2%. Los países con mayor número de adultos (20-79 años) con diabetes en el año 2021, en millones de personas, son China (140.9), India (124.9) y Pakistán (62.2). Le siguen Estados Unidos de América (32.2), Indonesia (19.5), Brasil (15.7), México (14.1), Bangladesh (13.1), Japón (11.0) y Egipto (10.9) (International Diabetes Federation, 2021).

2.5.- Epidemiología de la diabetes en México.

México se encuentra en la región de Norte américa y El Caribe, región que se ubica en segundo lugar de las 7 regiones con mayor prevalencia de diabetes en el mundo (14.0%), además, se estima que el 94% del incremento en el número de personas con diabetes para el año 2045, ocurrirá en países de ingresos bajos y medios y específicamente en esta región del caribe, se tiene proyectado que, para el año 2045 la prevalencia de diabetes aumentará al 24%. En esta región, México ocupa el segundo puesto entre los países con mayor número de personas (20-79 años) con diabetes para el año 2021: Estados Unidos (32.2 millones), México (10.3 millones) y Canadá (2.7 millones), sin embargo, en el porcentaje de prevalencia,

México ocupa el 1er lugar con 16.9%, le siguen San Cristóbal y Nieves con 16.1%, Belice con 14.5%, Barbados 14.0% y Bermuda con 13.0% (International Diabetes Federation, 2021).

En México, la secretaría de salud, a través del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), llevan a cabo la Encuesta de Salud y Nutrición (ENSANUT) desde hace más de 25 años, para generar datos fidedignos y que permitieran conocer las condiciones de salud de la población mexicana y sus tendencias, así como el uso y percepción de los servicios de salud (<https://ensanut.insp.mx/>). De acuerdo a los datos de la edición más reciente, ENSANUT 2021 COVID 19 (Shamah-Levy et al., 2021) la prevalencia de diabetes diagnosticada es del 11.1% (IC95%=9.5-12.8), en un país donde la población era de 128.9 millones en 2020, indica que en ese año, existían 14.3 millones de Mexicanos con diabetes, es decir, que uno de cada 10 mexicanos tiene diabetes y la proporción de diabetes no diagnosticada, fue de 4.6%, es decir, el 30% de los adultos que tienen diabetes, no sabe que la tiene, por lo que en total, se puede estimar que en México existe una prevalencia de 15.7% de diabetes, en otras palabras, de 128.9 millones de mexicanos, un total de 20.23 millones de mexicanos padece diabetes y los datos indican que podría ser mayor, con una prevalencia de 17.6%, que indicaría a un total de 22.68 millones de mexicanos con diabetes, sin mencionar que, en México, solo el 19.9% de los pacientes con diabetes, se ha realizado al menos una medición de HbA1c en los últimos 12 meses, por lo que es posible que en México, exista un retraso en diagnóstico aún mayor que el 30% reportado en la ENSANUT 2020 COVID-19 (Shamah-Levy et al., 2020). En cuanto al control de HbA1c, la ENSANUT en su edición del 2012 (Gutiérrez et al., 2012), reporta una prevalencia de control de 24.9%, mientras que, en la edición del 2006 (Olaiz-Fernández et al., 2006), este porcentaje representaba apenas el 5.2%. Aunque en la ediciones como en la ENSANUT de medio camino de 2016 (Romero-Martínez et al., 2016) no se presenta un porcentaje de control de HbA1c, en la edición la ENSANUT 2020 COVID-19 a pesar de no reportar dicho dato, si es posible analizar la base de datos disponible en: <https://ensanut.insp.mx/>, donde se puede encontrar mediante conteo de frecuencias, que el porcentaje de control de HbA1c es del 88.4%, sin embargo, este

argumento está basado en una base de datos que incluye únicamente entre 14 y 290 observaciones por cada estado de la república mexicana, con un total de 2373 observaciones. Según los datos de la ENSANUT 2020 COVID 19, la mediana de HbA1c en la población mexicana es de 5.4 (5.1 – 5.7).

2.6.- Prediabetes.

Desde el año 2010, la guía de la ADA, propuso retomar el término prediabetes. El término prediabetes es aplicado especialmente a personas que reportan no padecer diabetes y que la persona tenga: (1) Niveles de glucosa en ayuno entre 100-125 mg/dL; (2) Hemoglobina glucosilada $>5.7\%$ y $<6.5\%$; o (3) cumplir el primer y segundo punto (International Diabetes Federation, 2021; Sentell et al., 2012). Ogura y cols., en 2017, estudiaron a 4800 personas habitantes de Brownsville, Texas, en la frontera entre Estados Unidos y México, de los cuales, el 58.2% eran mexicanos. Del total de pacientes estudiados sin diagnóstico de diabetes tipo 2 ($n=2220$), la prevalencia de prediabetes fue de 43.73% ($n=971$), encontrando que la mayor prevalencia de prediabetes se encontraba en personas de entre 40-64 años 44.3% [$n=528$; OR= 1.70, (IC95%: 1.22 – 2.22); $p<0.001$] aunque la medida de asociación más alta fue hallada para las personas de 65 años o más (OR=3.10, IC95%:1.91 – 5.10). Otras variables significativamente asociadas fueron: Ser hombre [OR=1.73, (IC95%:1.33 – 2.27); $p<0.001$], historia familiar de diabetes tipo 2 [OR=1.70, (IC95%: 1.30 – 2.21); $p=0.001$], el IMC para personas con obesidad fue [OR=3.03, (IC95%: 2.02 – 4.54); $p=0.001$], hipertensión [OR=2.03, (IC95%: 1.49 – 2.77); $p=0.001$], niveles alterados de LDL [OR=1.54, (IC95%: 1.18 – 2.02); $p=0.001$] y niveles anormales de triglicéridos [OR=1.61, (IC95%: 1.16 – 2.24); $p=0.004$]. Sentell y cols, estudiaron a 19,417 personas pertenecientes al National Health and Nutrition Examination survey, sin diagnóstico de diabetes y mayores de 20 años, donde reportaron que la prevalencia de prediabetes en personas mexico-americanas fue del 37.3%. Según la guía de la ADA 2022, la prediabetes no debería verse como una entidad clínica, sin embargo, constituye un importante factor de riesgo para la transición a diabetes tipo 2 con datos que sugieren que cada año, aproximadamente

en 5-10% de personas con prediabetes ocurre la transición a diabetes tipo 2 (Ogura et al., 2017).

2.7.- Diabetes tipo 2.

La diabetes tipo 2, antes conocida como diabetes no insulino dependiente o diabetes del adulto o de inicio en el adulto, representa el 90-95% de todos los casos de diabetes. Aunque la etiología específica no es conocida, la destrucción autoinmune de células β no ocurre y no todos los pacientes tienen alguna causa conocida de diabetes. Muchos, pero no todos los pacientes tienen sobrepeso u obesidad y es conocido que el exceso de peso en sí, causa algún grado de resistencia a la insulina (RI) (ADA, 2022). Rubin y cols., en 2008 estudiaron un grupo de 120 adolescentes (60 hombres y 60 mujeres), donde reportó correlación con la RI evaluada mediante la Evaluación del Modelo Homeostático de resistencia a insulina, por sus siglas en inglés HOMA-IR y algunas citocinas proinflamatorias. Se encontró correlación con los niveles de adiponectina ($r^2= 0.329$, $p<0.001$), resistina ($r^2= 0.152$, $p=0.001$) y TNF- α ($r^2= 0.141$, $p<0.002$), sin embargo, en los modelos múltiples, donde fueron incluidas estas variables junto con el estatus del peso (0= Peso normal y 1= Sobrepeso), se encontró que el peso fue la variable correlacionada a RI al evaluar junto con TNF- α ($\beta_{\text{TNF-}\alpha} =0.032$; $p=0.661$ vs $\beta_{\text{peso}}=0.765$; $p<0.001$), adiponectina ($\beta_{\text{adiponectina}} =-0.052$; $p=0.726$ vs $\beta_{\text{peso}}= 1.513$; $p= 0.003$) y resistina ($\beta_{\text{Resistina}} =-0.191$; $p=0.279$ vs $\beta_{\text{peso}}=0.765$; $p<0.001$), observando que cuando se añade el sobrepeso a los modelos múltiples, las variables adiponectina, resistina y TNF- α no se encontraron estadísticamente correlacionadas a RI medido por HOMA-IR, encontrando que un incremento en la adiposidad (sobrepeso), resulta ligada con la RI en adolescentes. Además, los pacientes que no tienen obesidad o sobrepeso por criterios tradicionales, suelen tener una acumulación de grasa abdominal.

El inicio de la diabetes tipo 2 suele ser incidental, ya que se presentan de forma espontánea algunas entidades clínicas como la cetoacidosis diabética o el estado hiperosmolar hiperglucémico, ambas son complicaciones agudas de la diabetes mellitus. La cetoacidosis diabética se observa sobre todo en personas con diabetes

tipo 1 (DM tipo 1) y el estado hiperosmolar hiperglucémico en personas con diabetes tipo 2 y ambas entidades clínicas se relacionan con la deficiencia absoluta o relativa de insulina, deficiencia de volumen y alteración del estado mental (Kassper, 2016).

2.7.1.- Complicaciones agudas de la diabetes.

Cetoacidosis diabética (CAD). Es debida a la deficiencia de insulina con aumento relativo o absoluto de glucagón y suele ser el resultado de la administración inadecuada de insulina, infección (neumonía, infección urinaria, gastroenteritis, sepsis etc.), infarto (cerebral, miocárdico, mesentérico, periférico etc.), intervención quirúrgica, uso de fármacos (corticoesteroides, antipsicóticos atípicos e inhibidores del cotransportador 2 de sodio-glucosa) y el embarazo (ADA 2022., Kassper, 2016).

Los síntomas incluyen anorexia, náusea, vómito, poliuria y sed, posteriormente aparece dolor abdominal, alteración del estado mental o coma. Algunos signos clásicos son la respiración de Kussmaul y aliento olor a acetona en el paciente. En las pruebas de laboratorio se encuentra hiperglucemia (250 -600 mg/dL), cetosis (β hidroxibutirato) y acidosis metabólica (pH: 6.8 – 7.3) con aumento de la brecha aniónica o anión GAP [$\text{Na} - (\text{Cl} + \text{HCO}_3)$]. La concentración de potasio puede ser normal un poco elevada e igualmente el fosfato. La concentración sérica de sodio está disminuida como consecuencia de la hiperglucemia en aproximadamente 1.6 mEq por cada 100 mg/dL de incremento de glucosa (Kassper, 2016).

Estado hiperosmolar hiperglucémico (EHH). Es el estado patológico resultante de la relativa deficiencia de insulina y el consumo insuficiente de líquidos. Como resultado de la hiperglucemia, se induce diuresis osmótica, que conduce a la deficiencia marcada de volumen intravascular. Las manifestaciones clínicas incluyen poliuria, polidipsia y alteración del estado mental, a diferencia de la CAD, en la EHH es notable la ausencia de síntomas como náusea, vómito, dolor abdominal o respiración de Kussmaul (Kassper, 2016).

Los datos de laboratorio muestran hiperglucemia (600-1200 mg/dL), osmolalidad (330 – 380 mosmol/mL), pH arterial elevado (>7.3), puede existir desequilibrio aniónico por la acidosis láctica, cetonuria por la inanición y azoemia prerrenal. El

sodio corregido se encuentra elevado [1.6 meq al sodio medido por cada 100 mg/dL de glucosa sérica) (Kassper, 2016).

Hipoglucemia. Por laboratorio, la hipoglucemia se define como una concentración plasmática de glucosa <50 mg/dL. Los síntomas de la hipoglucemia se presentan a diferentes niveles de glucosa y que varían entre un individuo y otro, por lo que, por clínica, para definir hipoglucemia es necesaria la presencia de la triada de Whipple: (i) Síntomas compatibles con hipoglucemia, (ii) Concentración disminuida de glucosa plasmática de laboratorio, (iii) Alivio de los síntomas después de la elevación de glucosa plasmática. Los síntomas de hipoglucemia pueden dividirse en autónomos (adrenérgicos: Palpitaciones, temblor, ansiedad; colinérgicos: Sudoración, hambre y parestesia) y por glucopenia neurológica (Cambios conductuales, confusión, fatiga, convulsiones, pérdida de la conciencia e incluso la muerte si es que la hipoglucemia es grave y prolongada). La etiología de la hipoglucemia se puede clasificar en 5 (Kassper, 2016):

- 1.- Fármacos: Insulina y secretagogos de insulina, alcohol, dosis altas de salicilatos, sulfonamidas, pentamidina, quinina, quinolonas etc.
- 2.- Enfermedad grave: Insuficiencia hepática, renal o cardíaca, sepsis, o inanición prolongada.
- 3.- Deficiencias hormonales: Insuficiencia suprarrenal e hipopituitarismo.
- 4.- Insulinoma: Tumor de células β pancreáticas, hiperplasia de células β .
- 5.- Otras: Causas de baja prevalencia como tumores no β como tumores mesenquimatosos o epiteliales que son productores de factor de crecimiento similar a la insulina tipo II, defectos hereditarios como la intolerancia a fructosa y galactosemia.

2.7.2.- Complicaciones crónicas de la diabetes.

La hiperglucemia produce un aumento de productos finales de glucosilación avanzada que afectan el colágeno tisular, favoreciendo la aparición de lesiones microvasculares con presencia de actividad proinflamatoria que incrementa la permeabilidad vascular además, el metabolismo del exceso de glucosa, la convierte parcialmente en sorbitol, que aumenta el estrés oxidativo, especialmente en nervios, retina y capilares, donde se produce un aumento de osmolaridad celular y una peroxidación de lípidos de membrana celular que conduce a isquemia e hipoxia (Jiménez et al., 2017). La hiperglucemia es un mecanismo por el cual los pacientes con diabetes mellitus desarrollan complicaciones a largo plazo, en cuyo desarrollo intervienen también otros factores de riesgo, como son la hipertensión arterial, dislipidemia y tabaquismo. Las complicaciones crónicas de la diabetes se clasifican en: Macrovasculares, microvasculares y pie diabético, este último como consecuencia de la neuropatía y/o afección vascular de origen microangiopático. En un estudio transversal realizado en Bangladesh, con 1253 personas con diabetes tipo 2, realizado por Afros et al., en 2019, se reportó que el 64% de los pacientes con diabetes tipo 2 tienen complicaciones de la diabetes, de los cuales 14.8% tuvo complicación macrovascular, 20.7% tuvo complicación microvascular y 27.9%. En otro estudio realizado en población española en pacientes con diabetes tipo 3, se encontró que la frecuencia de complicaciones crónicas de la diabetes fue de 67.8%, predominando las complicaciones macrovasculares, especialmente la vasculopatía de miembros inferiores (32% IC95%: 27 – 36) y cardiopatía isquémica con un 21.2% (IC95%: 17 – 25) y hasta un 30.6% presentó la complicación microvascular más frecuente que fue la retinopatía y las complicaciones menos frecuentes fueron con 8.9% la neuropatía y con 6.4% la nefropatía (Mezcua et al., 2000) aunque, estas mismas complicaciones tuvieron una prevalencia diferente en el estudio de Bangladesh, con 34% nefropatía diabética, 25.1% retinopatía y 5.7% neuropatía (Afroz et al., 2019).

2.7.2.1.- Complicaciones microvasculares de la diabetes.

Retinopatía diabética (RD). Es la afección de la microvascularización retiniana. La retina es la estructura ocular más afectada por la diabetes, aunque existen otros factores asociados al daño retiniano como la hipertensión arterial no controlada. Es la complicación crónica microvascular y crónica más frecuente que presentan las personas con diabetes. En México, de acuerdo a cifras del gobierno federal, la prevalencia de RD para el año 2018 fue de 31.5%. La evolución de la retinopatía se puede dividir en 3 fases; (i) De origen o no proliferativa que se caracteriza por la aparición de microaneurismas, hemorragias y exudados duros; (ii) Preproliferativa, caracterizada por exudados algodonosos, anomalías venosas (duplicaciones), arteriales (oclusión o estrechamiento) y capilares (dilataciones y tortuosidades). El edema macular es la principal causa de pérdida de la visión y puede presentarse en cualquier fase (M Bravo, 2001). En la edición más reciente del catálogo maestro de Guías de Práctica Clínica en México, se menciona que hasta un 20% de los pacientes con diabetes tipo 2 tienen lesiones de retinopatía al momento del diagnóstico y a 20 años de evolución, la prevalencia de RD en pacientes con DT2 aumenta al 60% (IMSS, 2014). De acuerdo a un estudio de asociación realizado en población española, el riesgo de retinopatía aumenta con la edad, ≥ 70 años [OR=1.8 (IC95%=1.22 – 2.63)], tiempo de evolución ≥ 20 años [OR=4.98 (IC95%=3.02 – 8.21)] y con la presencia de hipercolesterolemia [OR=1.37 (IC95%=1.00 – 1.83)] (Mezcua et al., 2000).

Nefropatía diabética (ND). Clásicamente la ND se define como un síndrome clínico caracterizado por albuminuria persistente ($>300\text{mg} / 24 \text{ h}$), disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular y presión arterial elevada (Fierro, 2009). El deterioro de la función renal es un proceso progresivo, habitualmente descrito como un camino descendente desde la normoalbuminuria hasta la insuficiencia renal terminal. El buen control de la glucemia, control de la presión arterial y la restricción proteica en la dieta suele ser el tratamiento preventivo para la ND (M Bravo, 2001).

Las características clínicas asociadas a la aparición de la nefropatía diabética son la edad ≥ 70 años [OR=5.98 (IC95%=1.63 – 18.24)] y el tiempo de evolución ≥ 20 años [OR=3.28 (IC95%=1.29 – 8.38)] (Mezcua et al., 2000).

Neuropatía diabética (NeD). La NeD es la complicación sintomática más frecuente en pacientes con diabetes, está presente en más del 10% de los pacientes al momento del diagnóstico y en hasta 50% tras 10 años de evolución de la enfermedad. Representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de úlceras, pie diabético y de amputación de miembro inferior, ya que más del 75% de las amputaciones de miembro inferior son precedidas por la aparición de lesiones. En la NeD se afectan dos tipos de fibras nerviosas: Las fibras gruesas que son las encargadas de la transmisión de la sensibilidad vibratoria, propioceptiva y los reflejos osteotendinosos y las fibras finas que son las encargadas de transmitir el dolor superficial, sensibilidad térmica y autonómica. La afectación de las fibras sensitivas en la NeD produce alteración en la sensibilidad térmica, algésica, vibratoria y propioceptiva, que el paciente no nota por la pérdida del reflejo osteotendinoso, siendo en la mayoría de los casos la aparición de una úlcera el primer síntoma de la NeD. Los factores clínicos asociados a la aparición de neuropatía son edad ≥ 70 años [OR=3.03 (IC95%=1.33 – 6.88)] y el tiempo de evolución ≥ 20 años [OR=5.81 (IC95%=2.71 – 12.46)] (Mezcua et al., 2000).

2.7.2.2.- Complicaciones macrovasculares de la diabetes.

La macroangiopatía es la afectación arterioesclerótica de los vasos de mediano y gran calibre. Las enfermedades cardiovasculares suponen la principal causa de morbilidad y mortalidad en personas con DT2, aproximadamente 70 a 80% de las personas con diabetes fallecen a consecuencia de enfermedades cardiovasculares (M Bravo, 2001).

Cardiopatía isquémica. Constituye un síndrome caracterizado por disminución del aporte de oxígeno al miocardio que, desde un punto de vista estructural, funcional o ambos, afecte el flujo de sangre de una o más arterias coronarias epicárdicas o de la circulación coronaria. El principal sustrato fisiopatológico lo constituye la aterosclerosis coronaria. La manifestación clínica más frecuente es la angina de pecho (angor pectoris), sin embargo, muchos pacientes permanecen asintomáticos durante largos periodos. Las formas clínicas pueden presentarse como infarto agudo al miocardio, cardiopatía isquémica silente e insuficiencia cardiaca (IMSS, 2009; M Bravo, 2001).

Enfermedad arterial periférica (EAP). Es un conjunto de cuadros sindrómicos, agudos o crónicos, derivados de la presencia de enfermedad arterial oclusiva que condiciona un insuficiente flujo a las extremidades. En la mayoría de las ocasiones, el proceso patológico subyacente es la enfermedad arterioesclerótica y afecta preferentemente la vascularización de las extremidades inferiores. La presencia de diabetes es un factor asociado a la presencia de EAP. Un metaanálisis reportó que, por cada aumento de 1% de HbA1c, se produce un incremento de riesgo de 28% de padecer EAP [RR=1.28 (IC95%= 1.18 – 1.39)] (Selvin et al., 2012). Además, en personas con diabetes, los factores asociados a la presencia de EAP son el tiempo de evolución de la diabetes ≥ 20 años [OR=2.36 (IC95%=1.67 – 3.31)] y padecer hipertensión arterial [OR=1.37 (IC95%=1.06 – 1.77)] (Mezcua et al., 2000).

Enfermedad cerebrovascular (ECV). La enfermedad cerebrovascular o ictus, se define como un trastorno circulatorio cerebral que altera de forma transitoria o definitiva el funcionamiento del encéfalo y es debido a una isquemia o hemorragia que involucra a uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados por un proceso patológico. La EVC se puede clasificar en dos tipos: Isquémica o hemorrágica. La EVC isquémica se subdivide a su vez en ataque isquémico transitorio y en infarto cerebral (IMSS, 2017). En personas con diabetes y que además tienen hipertensión, la mortalidad por EVC puede llegar hasta el 50% (M Bravo, 2001).

2.8.- Tratamiento para la diabetes tipo 2.

La hiperglucemia define diabetes y el control glucémico es fundamental para el manejo de la diabetes. En el estudio United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), se confirmó que el control de la glucemia, disminuyó significativamente la tasa de complicaciones en pacientes con diabetes tipo 2. Derivado de este estudio, se estableció que el objetivo de control glucémico en HbA1c <7% (53 mmol/mol) mostró reducción de complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, por lo que el manejo de los pacientes con diabetes tipo 2 debe ser multifactorial enfocado en el adecuado control de la hiperglucemia y otros factores de riesgo (ADA, 2022; IMSS, 2018).

La guía americana en la versión más reciente al momento de escribir esta tesis (ADA, 2022), en el apartado de *terapia farmacológica para adultos con diabetes tipo 2*, en la subsección *terapia inicial*, dice que la terapia de primera línea depende de las comorbilidades y debe ser individualizado, aunque generalmente este tratamiento inicial es metformina y cambios en el estilo de vida. La guía de la ADA 2022 menciona que los factores a considerar para individualizar la terapia son 6:

1. Comorbilidades.
2. Riesgo de hipoglucemia.
3. Efectos en el peso corporal.
4. Reacciones adversas.
5. Costo.
6. Preferencia del paciente.

La guía propone un algoritmo de tratamiento inicial (Figura 1) así como distintos tipos de terapia combinada, considerando los factores previamente mencionados. La metformina es la terapia de primera línea debido a que es efectiva, segura y barata, además, tiene efecto benéfico en reducción de la HbA1c y el peso, además, puede reducir el riesgo de eventos cardiovasculares y muerte (ADA, 2022).

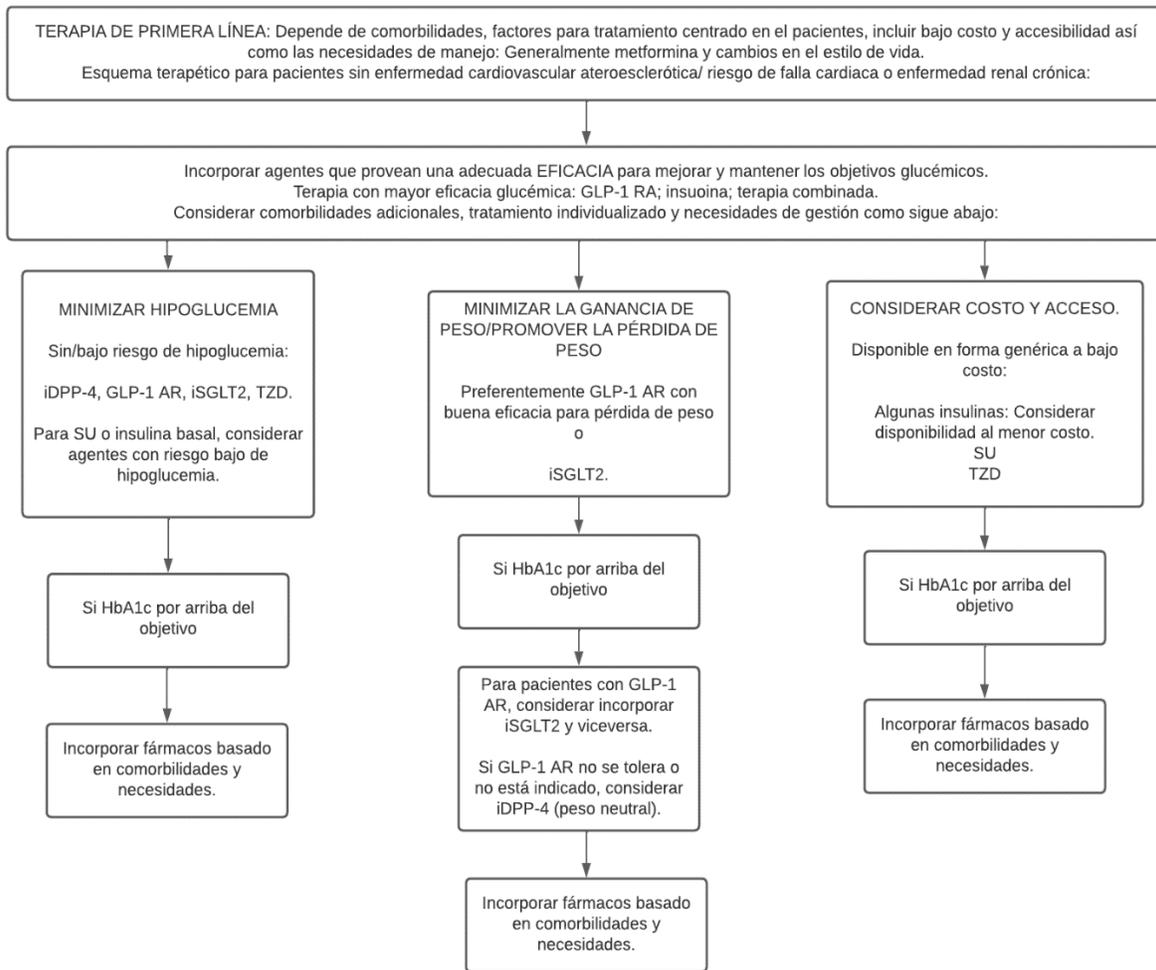


Figura 1. Tratamiento farmacológico para adultos con diabetes tipo 2 sin Enfermedad cardiovascular aterosclerótica, falla cardíaca o enfermedad renal crónica: iDPP-4: Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4., GLP-1 AR: Agonista del receptor tipo 1 del péptido parecido al glucagón, iSGLT2: Inhibidor del cotransportador sodio-glucosa; SU: Sulfonilurea; TZD: Tiazolidinediona.

Adaptado de: American Diabetes Association Professional Practice Committee: Standards of Medical Care in Diabetes—2022

Debido a que la diabetes tipo 2 es una enfermedad progresiva en muchos pacientes, mantener los objetivos glucémicos con la monoterapia es a menudo posible solo por algunos años, después, la terapia combinada será necesaria. La recomendación tradicional es usar la adición escalonada de fármacos a partir de la monoterapia con metformina para mantener los niveles de HbA1c (Figura 1). Esta recomendación tiene como ventaja proveer una evaluación clara de los efectos positivos y negativos

de cada opción terapéutica nueva o conocida y así, reducir potenciales reacciones adversas.

Existen diversas opciones para añadir a la monoterapia con metformina y establecer una terapia combinada (Tabla 2) y como se establece en la guía, cada paciente debe tener un tratamiento individualizado basado en las características mencionadas previamente (ADA, 2022).

Aunque existen terapias novedosas disponibles para el tratamiento de la diabetes tipo 2, en México, la terapia combinada más utilizada es metformina+glibenclamida, ya que, se ha reportado que la glibenclamida es el fármaco con mayor costo-beneficio para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en etapas tempranas (Samara Rodríguez-Rivera et al., 2017).

Tabla 2.- Fármacos y factores a considerar en la elección del tratamiento anti hiperglucémico en adultos con diabetes tipo 2.

Fármaco	Eficacia	Riesgo de hipoglucemia	Cambio en peso	Efectos cardiovasculares/renales.	Costo	Consideraciones adicionales	Mecanismo de acción
Biguanida.	Alta.	No.	Modesta pérdida.	EVAEC: Potencial beneficio. FC: Neutral. Progresión de ERC: Neutral. Consideración renal: Contraindicado con TFG<30 mL/min/1.73 m ² .	Bajo.	Efectos gastrointestinales comunes (Diarrea y náusea). Potencial deficiencia de vitamina B12.	Incremento de actividad de AMPK, estimulando oxidación de ácidos grasos, captación de glucosa y el metabolismo no oxidativo. Reduce la lipogénesis y la gluconeogénesis. Aumenta el almacenamiento de glucógeno en músculo estriado, disminuye la producción hepática de glucosa y aumenta la sensibilidad a insulina. Se ha demostrado inhibición del complejo I mitocondrial (Laurence L. Brunton et al., 2019).
Inhibidores SGLT2.	Intermedia.	No.	Pérdida.	EVAEC: Beneficio cardiovascular Empagliflozina [†] y canagliflozina [†] . FC: Beneficio empagliflozina [†] , canagliflozina, dapagliflozina [‡] y ertugliflozina. Progresión ERC: Benéfico canagliflozina [§] , empagliflozina y dapagliflozina [§] . El efecto de reducción de la glucosa es menor en pacientes disminución de la TFG.	Alto.	Debería ser discontinuado previo a una cirugía o riesgo de CAD. Riesgo de CAD. Riesgo de fracturas (Canagliflozina). Infecciones urinarias. Riesgo de depleción de volumen. ↑ Colesterol LDL. Riesgo de gangrena de Fournier.	Inhibición del cotransportador 2 de sodio-glucosa (SGLT2). SGLT2 se expresa en el túbulo renal proximal y su función de cotransporte al reabsorber glucosa mediante el intercambio de sodio. Al inhibir SGLT2 se causa glucosuria de entre 50 a 100 g/día. También provoca un efecto diurético leve (Laurence L. Brunton et al., 2019).

GLP-1 AR.	Alta.	No.	Pérdida.	<p>Benéfico: Dulaglutida[†], liraglutida[†], Semaglutida (SQ) [†].</p> <p>Neutral: Exenatida una vez a la semana y lixisenatida.</p> <p>FC: Neutral.</p> <p>Progresión en ERC: Efecto benéfico en ensayos clínicos, medido por albuminuria: Liraglutida, semaglutida y dulaglutida.</p> <p>No necesita ajuste de dosis renal: Dulaglutida, liraglutida y semaglutida.</p> <p>Precaución al incrementar dosis por riesgo de náusea, vómito, diarrea o deshidratación.</p>	Alto.	<p>FDA Black Box: Riesgo de tumores de células C en tiroides en roedores, en humanos la relevancia no ha sido determinada (liraglutida, dulaglutida, exenatida de liberación prolongada y semaglutida).</p> <p>Pancreatitis ha sido reportada en ensayos clínicos pero la causalidad no ha sido establecida.</p> <p>Descontinuar si se sospecha pancreatitis.</p>	<p>Las incretinas son hormonas gastrointestinales que se liberan después de la ingesta de alimentos y estimulan la liberación de insulina, las mejor conocidas con GLP-1 y GIP. Los receptores GLP-1 se expresan en las células β del páncreas, sistema nervioso central y periférico, corazón, vasos sanguíneos, riñón, pulmón e intestino. La unión de agonistas del receptor GLP-1 tiene como efectos la activación de la vía de cAMP-PKA, inicio de las señales de PKA y PI3K, resultando en incremento de la biosíntesis de insulina y excitosis dependiente de glucosa en las células β (Laurence L. Brunton et al., 2019).</p>
Inhibidores DPP-4.	Intermedia.	No.	Neutral.	<p>EVAEC: Neutral.</p> <p>FC: Potencial riesgo con Saxagliptina.</p> <p>Progresión de ERC: Neutral.</p> <p>Requiere ajuste de dosis: Sitagliptina, saxagliptina y alogliptina.</p> <p>No requiere ajuste renal: Linagliptina.</p>	Alto.	<p>Pancreatitis ha sido reportado en ensayos clínicos pero la causalidad no ha sido establecida.</p> <p>Descontinuar si se sospecha pancreatitis.</p> <p>Dolor articular.</p>	<p>DPP-4 es una serina proteasa que se expresa en la superficie de los linfocitos T y es decisiva para la desactivación de incretinas. Los inhibidores de la DPP-4 incrementan el área bajo la curva de GLP-1 y GIP cuando ocurre su secreción por alimentos (Laurence L. Brunton et al., 2019)</p>

Tiazolidinedionas.	Alto.	No.	Ganancia.	EVAEC: Potencial beneficio con pioglitazona. FC: Incremento de riesgo. Progresión ERC: Neutral. No se requiere ajuste renal. No se recomienda en enfermedad renal debido a la potencial retención de líquidos.	Bajo.	FDA Black Box: Falla cardíaca congestive (Pioglitazona y rosiglitazona). Retención de fluidos (edema y falla cardíaca). Beneficio en esteatosis hepática no alcohólica. Riesgo de fracturas óseas. Cáncer de vejiga (Pioglitazona). ↑ Colesterol LDL (Rosiglitazona).	Las tiazolidinedionas son ligandos del receptor activador de la proliferación del peroxisoma γ (PPAR γ), un grupo de receptores hormonales nucleares que participan en la regulación de los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y los lípidos. La principal respuesta de la activación de PPAR γ es la diferenciación de adipocitos, desplazando reservas de lípidos de tejidos extra adiposos al tejido adiposo, además, aumenta la sensibilidad de los tejidos a la insulina (Laurence L. Brunton et al., 2019).
Sulfonilureas de 2da generación.	Alta.	Si.	Ganancia.	EVAEC: Neutral. FC: Neutral. Progreso de ERC: Neutral. Generalmente la gliburida no se recomienda en ERC. Glipizida y glimepirida se inician conservativamente por el riesgo de hipoglucemia.	Bajo.	Especial riesgo de incremento de riesgo de mortalidad cardiovascular basado en estudios de una antigua sulfonilurea (Tolbutamida).	Estimula la liberación de insulina al unirse al receptor SUR (Sulfonilurea receptor) de la célula β . SUR es un receptor canal de potasio dependiente de ATP. La inhibición de SUR causa despolarización de la membrana celular que tiene como efecto la secreción de insulina (Laurence L. Brunton et al., 2019).

Insulina.	Insulina humana.	Alta.	Si	Ganancia	EVAEC: Neutral. FC: Neutral. Progresión ERC: Neutral. Se requiere disminución de dosis conforme a la disminución en la TFG.	Bajo (SQ).	Reacciones en sitio de inyección. Alto riesgo de hipoglucemia con insulina humana (NPH o formulaciones premezcladas) vs análogos.	La insulina inicia su acción por la unión al receptor a insulina localizado en la membrana celular. La unión de insulina a su receptor activa dos principales vías de transducción, (i) Vía del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y la (ii) Vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Ambas vías regulan las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo. A través de la vía PI3K, la insulina promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT 4 (Laurence L. Brunton et al., 2019).
	Análogos.					Alto.		

[†]Aprobado por la FDA para beneficio cardiovascular, [‡]Aprobado por la FDA para indicación en falla cardíaca. [§]Aprobado por la FDA para indicación en enfermedad renal crónica. FDA Black Box: Aviso de riesgo, alerta al público y personal de salud por proveer serias reacciones adversas como lesión o muerte. ERC: Enfermedad renal crónica. EVAEC: Enfermedad vascular aterosclerótica. FC: Falla cardíaca. SQ: Subcutáneo. TFG: Tasa de filtración glomerular.

Cuadro adaptado de: American Diabetes Association Professional Practice Committee: Standards of Medical Care in Diabetes—2022, tabla 9.2, Enfoque farmacológico para el tratamiento de la glicemia. S133.

2.8.1.- Metformina.

La metformina (1,1-dimetilbiguanida) se aisló por primera vez de la *Galega officinalis*, una planta que ha sido utilizada en medicina por siglos hasta la identificación de la guanidina que mostró efectos de disminución de la glucosa en conejos a mediados del siglo XIX. La metformina es un fármaco miembro de la clase de las biguanidas y es el único miembro de su clase que se encuentra disponible hoy en día, además, es ampliamente prescrito para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y es considerado un medicamento esencial por la OMS. El efecto antidiabético de la metformina es primariamente la inhibición hepática de la gluconeogénesis, sin embargo, su mecanismo de acción permanece a debate (Khan et al., 2021; Laurence L. Brunton et al., 2019).

2.8.1.1.- Farmacocinética de la metformina.

La metformina tiene una biodisponibilidad de 50 a 60% cuando se administra vía oral, después su absorción intestinal y entra a la circulación portal acumulándose en el hígado. A los pacientes con diabetes se les prescribe una dosis de entre 500 mg al día a 2550 gramos al día, alcanzando a una concentración plasmática de ~10 μM a 40 μM . Sin embargo, las concentraciones de metformina son notablemente discordantes en la literatura al comparar in vivo e in vitro. Aunque el consenso de la concentración plasmática de metformina en seres humanos tratados con metformina se ubica en el rango de entre 0.1 mg/L a 4mg/L (~10 μM a ~40 μM) (Khan et al., 2021). Después de la administración oral, la metformina se absorbe principalmente en el intestino delgado y no se une a proteínas plasmáticas y se excreta sin cambios en la orina. Tiene un $T_{1/2}$ de 2 horas y dado que la metformina es una molécula hidrofílica positivamente cargada, su transporte en el organismo es llevado a cabo principalmente por la familia transportadores de cationes orgánicos 1 a 3 (OCT1-3), el transportador equilibrante de nucleósidos (ENT4) y el transportador de extrusión de múltiples fármacos 1 y 2k (MATE 1 y MATE 2-k) (Khan et al., 2021; Staiger et al., 2015).

Una vez en la luz intestinal, la metformina es absorbida por los enterocitos vía ENT4 y OCT3 para posteriormente ser liberada al espacio intravascular vía OCT1, donde se distribuye en el cuerpo. Los hepatocitos captan a la metformina vía OCT1 y OCT3, excretándola vía biliar por MATE1, aunque, no es la única vía de eliminación ya que, las células tubulares renales captan a la metformina desde el espacio intravascular vía OCT2 y es excretada por la orina vía MATE1, MATE2-k y OCT1. (Staiger et al., 2015). Así, la distribución de la metformina es consistente con la expresión de estos transportadores en humanos, llevando acumulación de concentraciones más altas en hígado, riñón e intestino con relativamente baja captación de otros órganos periféricos (Khan et al., 2021).

2.8.1.2.- Farmacodinamia de la metformina.

La investigación sobre el mecanismo de acción de la metformina se encuentra en conflicto todavía, sin embargo, uno de los mecanismos de acción de la metformina más ampliamente estudiados es la inhibición de la gluconeogénesis hepática (Khan et al., 2021).

2.8.1.2.1.- Mecanismos propuestos mediante los cuales la metformina inhibe la gluconeogénesis hepática.

Inhibición del complejo I. La fosforilación oxidativa es un proceso de culminación metabólica productor de energía en donde todos los pasos oxidativos de la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos convergen en esta etapa final de respiración celular aeróbica, donde la energía de la oxidación impulsa la síntesis de ATP, donde el aceptor final de electrones y protones es el oxígeno. En eucariotas, la fosforilación oxidativa tiene lugar en las mitocondrias donde intervienen enormes complejos incrustados en la cresta mitocondriales: (i) Complejo I o NADH deshidrogenasa, (ii) complejo II o succinato deshidrogenasa, (iii) complejo 3 o

Ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa, (iv) complejo IV citocromo oxidasa y (v) complejo V, que es una ATP asa (David L. Nelson, 2019).

El balance energético de la fosforilación oxidativa es: Por cada NADH_2 , se sintetizan 3 moléculas de ATP y por cada FADH_2 , se producen 2 moléculas de ATP, ya que el complejo V produce ATP a partir de la fosforilación del ADP disponible (David L. Nelson, 2019).

Secundario a la inhibición del complejo I disminuye la producción mitocondrial de ATP y aumento de niveles de ADP y AMP que tienen un efecto inhibitor sobre la enzima reguladora de la gluconeogénesis: La enzima fructosa 1,6 bifosfatasa. Otro efecto colateral de la inhibición del complejo I es la acumulación de NADH_2 , propiciando una restricción de la conversión de lactato a piruvato, evitando que sirva como sustrato para la gluconeogénesis, recordando que la gluconeogénesis es la vía metabólica en que se forma glucosa a partir de metabolitos que no son carbohidratos (Morantes-Caballero, 2017; Ortega, 2021). Aunque este efecto puede ser también atribuido a la inhibición de la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa que cataliza la formación de glicerol fosfato a dihidroxiacetona fosfato, disminuyendo la concentración de NAD, aumentando la relación NADH_2/NAD (Morantes-Caballero, 2017)

La inhibición del complejo I es comúnmente adjudicado como mecanismo de acción de la metformina en su efecto anti hiperglucémico sin embargo también es importante la inhibición de la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa mediante el cual cambia el potencial redox. El complejo I es el sitio de contribución de NADH del gradiente de protones mitocondrial y dado el coste energético de la gluconeogénesis, su inhibición es ligada a la disminución hepática de glucosa (David L. Nelson, 2019; Khan et al., 2021; Morantes-Caballero, 2017; Ortega, 2021).

2.8.1.3.- Farmacogenética de la metformina.

Respecto a los factores biológicos, la eficacia y toxicidad de una medicación son determinados por el balance en su farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco) y su farmacodinamia (el efecto fisiológico del fármaco activo en el sitio biológico de acción. Variaciones genéticas inherentes contribuyen a esta variabilidad, ya que, múltiples genes codifican proteínas directamente involucradas en la farmacocinética y farmacodinamia de los fármacos (Huang & Florez, 2011).

2.8.1.3.1.- Transportadores de cationes orgánicos.

La difusión de iones y compuestos orgánicos a través de la membrana plasmática, es facilitada gracias a los transportadores de membrana. Este proceso es conocido como difusión facilitada que es un tipo de transporte dirigido por transportadores que no requiere aporte energético (Laurence L. Brunton et al., 2019). Los transportadores que se encuentran involucrados en la farmacocinética de la metformina, pertenecen a la familia SLC22 (aka solute carrier). En esta superfamilia se encuentran algunos grupos como los transportadores de cationes orgánicos (OCTs), los transportadores de cationes orgánicos/carnitina (OCTNs), los transportadores de aniones orgánicos (OATs) y el transportador de urato 1 (URAT1). Aunque los transportadores MATE1/SLC47A1 y MATE2-k/SLC47A2 también pertenecen a la familia SLC, tienen función de transportadores de eflujo localizados en la membrana apical de órganos barrera (Lai, 2013). De los transportadores mencionados anteriormente, son los del grupo de transportadores de cationes orgánicos (OCTs) los que tienen impacto directo sobre la farmacocinética de la metformina y cuyos polimorfismos han mostrado alterar la farmacocinética de la biguanida en cuestión y alterar su acción terapéutica (Khan et al., 2021).

2.8.1.3.1.1.- Transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1).

Los transportadores de la familia SLC son particularmente expresados en órganos secretores, como riñón, donde el órgano juega un rol importante en la eliminación de fármacos. En seres humanos, OCT1 es expresado en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y media el primer paso de entrada hacia los hepatocitos para muchos fármacos cationes orgánicos clínicamente relevantes como la metformina (Lai, 2013). El transportador OCT1 es una proteína de 554 aminoácidos y que tiene peso molecular de 61154 Da y es codificada por el gen *SLC22A1*, situado en el brazo largo del cromosoma 6 en la región 25.3 (6q25.3) y posee un total de 12 exones (NCBI, 2022b; Weizzman Institute of Science, 2022b) . Al igual que muchos miembros de la familia SLC22, tiene 12 hélices o dominios transmembranales (TMs); con un largo y extracelular anillo o loop entre el dominio 1 y 2 y un largo e intracelular anillo o loop entre los dominios 6 y 7 (Koepsell et al., 2007).

SLC22A1 es un gen altamente polimórfico y la presencia de polimorfismos en el gen, puede tener como resultado una función alterada de OCT1, repercutiendo en la farmacocinética de la metformina, así como la respuesta a la misma (Lai, 2013; Staiger et al., 2015). Aunque han sido identificados más de 23 variantes genéticas en *SLC22A1* o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), en este trabajo de tesis se estudia un polimorfismo exónico (por cambios directos en la proteína) y un polimorfismo intrónico (por la posibilidad de cambios en la traducción de la proteína). El polimorfismo exónico a estudiar es rs72552763 ya que, puede ser representativo de otros 3 polimorfismos que son el rs3567514, rs34305973 y rs35191146, que son polimorfismos ubicados en el exón 7 y que, en la proteína final, se encontrarían en el dominio transmembranal número 9 (Lai, 2013; Srijib, 2014). Otro polimorfismo de OCT1 a estudiar es rs622342, que es una variante intrónica con la posibilidad de tener repercusión en la disminución de la tasa de transcripción (Becker et al., 2010).

2.8.1.3.1.1.1.- OCT1 Met420 delección (p.M420del) (rs72552763).

La delección de OCT1 Met420del ocurre en el exón 7, con la delección de 3 bases (ATG) en el codón 420 (rs72552763). Es representativo de rs35167514, donde ocurre una delección de una adenina en el nucleótido 1258 (1258A>del), de rs34305973, donde ocurre una delección de una timina en la posición 1259 (1259T>del) y de rs35191146 donde ocurre una delección de una guanina en la posición 1260 (1260G>del) (Lai, 2013; Srijib, 2014). La presencia de la delección es relativamente común con una frecuencia de hasta 18.5% en caucásicos y de 5% en afroamericanos (Srijib, 2014). Se ha encontrado que la presencia de la delección, tiene como efecto una disminución de la captación de metformina por los hepatocitos de hasta 3.4 veces menor ($p < 0.001$) en las células con genotipo recesivo para la delección (del/del) comparado con el heterócigo y el homócigo dominante (GAT/GAT + GAT/del) (Shu, 2009). En un estudio realizado en población mexicana que incluyó 265 pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento con metformina o la combinación con sulfonilureas, se compararon los niveles de glucosa en ayuno (mg/dL) encontrando para el genotipo GAT/GAT glucosa en ayuno (mg/dL) de 142.0 (114.5 – 206.0), para el genotipo GAT/del 130.0 (96.0 – 190.0) y para el genotipo del/del 146.0 (99.0 – 254.5); $p = 0.368$ y al evaluar los niveles de %HbA1c se encontró para GAT/GAT= 8.0 (7.0 – 9.9), GAT/del= 7.5 (6.4 – 8.9) y del/del= 7.4 (6.4 – 10.6); $p = 0.181$, encontrando diferencia en la proporción de pacientes controlados según HbA1c, con una proporción de control/no control para pacientes con genotipo GAT/GAT= 33/107, GAT/del= 19/39 y del/del=16/16; $p = 0.011$ (Menjivar et al., 2020). En un estudio realizado en 103 voluntarios sanos de Alemania, se estudió el aclaramiento renal de metformina en sujetos con cero, uno y dos alelos de baja actividad, encontrando un aclaramiento renal de metformina (l/h) y error estándar a la media (SEM) para individuos con el genotipo GAT/GAT= 31.6 (0.8), GAT/del= 32.7 (1.1) y del/del= 36.6(4.9); $p = 0.23$ (Tzvetkov et al., 2009), sin embargo, en un estudio realizado en una cohorte de 371 pacientes daneses bajo tratamiento con metformina, se encontró que el número de reducción de alelos de función en OCT1 (incluyendo rs72552763) se asociaron con una

disminución del estado estacionario de la metformina y con un incremento en los niveles de HbA1c (Christensen et al., 2011). En otro estudio derivado de la base de datos de la auditoría de diabetes e investigación en Tayside Escocia, por sus siglas en inglés (DARTS), estudió un total de 1531 pacientes bajo tratamiento con metformina, encontrando que el polimorfismo rs72552763 no afectan los niveles de HbA1c inicial ($p=0.47$) ni la reducción de la misma ($p=0.92$) con resultados a 42 meses de seguimiento (K. Zhou et al., 2009).

2.8.1.3.1.1.2.- C1386A (rs622342).

El polimorfismo rs622342 (1386C>A) donde existe un cambio de una citocina por una adenina, es una variante intrónica localizada entre el intrón 8 y el exón 9 del gen *SLC22A1* (Umamaheswaran et al., 2011). Según un estudio realizado en 98 pacientes derivados de una cohorte de 7983 pacientes del estudio de Rotterdam que eran pacientes caucásicos de más de 55 años y usuarios incidentes de metformina, encontró que el efecto del polimorfismo de MATE1 rs2289669 en la disminución de la glucosa era mayor en pacientes que también eran portadores del genotipo CC para el polimorfismo rs622342, que fue un hallazgo reportado a partir de la disminución de HbA1c (-0.68; IC95%: -1.06 a -0.30; $p=0.005$). En contraparte, en el estudio realizado por (Christensen et al., 2011) no se encontró asociación entre el genotipo y la disminución en la HbA1c, obteniendo cambios en HbA1c a los 24 meses tomando como referencia al genotipo wild type (AA) en el genotipo heterocigoto: (0.2; IC95%: -0.3 – 0.7) y en el homocigoto recesivo CC: 0.5 (IC95%: -0.3 – 1.3); $p= 0.47$ con hallazgos similares a los 6 meses ($p= 0.33$), por lo que los hallazgos de Becker et al., 2010, no se reprodujeron en este último estudio. En un estudio realizado en 122 pacientes del Sur de India con DT2 de reciente diagnóstico, se encontró en un análisis de regresión logística mediante un análisis de modelo codominante, en el que se toma como premisa que a cada genotipo se le confiere un riesgo diferente y no aditivo (Flores-Alfaro et al., 2012), para la respuesta a metformina, que, comparado con el genotipo de referencia (AA) OR=1.0, los

pacientes con genotipo AC tenían [OR:3.5 (IC95%: 1.39 – 8.84); $p=0.011$] y portadores del genotipo CC tenían [OR: 5.6 (IC95%: 1.24 – 25.8); $p=0.033$].

En el modelo de regresión logística aplicando un modelo genotípico dominante, se encontró que portadores de los genotipos CC + AC tenían un riesgo de [OR:3.85 (IC95%: 1.61 – 9.19); $p=0.001$] para la falta de respuesta a metformina (Umamaheswaran et al., 2015). En otro estudio realizado en 300 pacientes del Norte de Jordania que contaban con diagnóstico de DT2, se compararon los niveles de HbA1c entre los diferentes genotipos de rs622342, encontrando que los niveles de HbA1c fueron de 8.14 ± 2.20 para portadores del genotipo AA, de 8.16 ± 2.17 para portadores del genotipo AC y de 8.10 ± 2.09 para portadores del genotipo CC; $p=0.277$ (Al-Eitan et al., 2019).

2.8.1.3.1.2.- Transportador de cationes orgánicos 2 (OCT2).

El transportador de cationes orgánicos 2 (OCT2), es el transportador que se expresa mayormente en la membrana basolateral de las células del túbulo renal y media la captación de cationes orgánicos desde el espacio intravascular a las células tubulares proximales. OCT2 es considerado un transportador específico-renal, para muchos fármacos y juega un rol importante en las propiedades farmacológicas, farmacocinéticas y toxicológicas de agentes terapéuticos como la metformina. Se expresa en otros tejidos como placenta, pulmón, cerebro e intestino delgado (Lai, 2013). El transportador OCT 2 es una proteína de 555 aminoácidos con una masa molecular de 62581 Da y es codificado por el gen *SLC22A2* (Weizzman Institute of Science, 2022c). El gen *SLC22A2* se encuentra en el cromosoma 6, brazo largo en la región 25.3 y cuenta con un total de 11 exones (NCBI, 2022c). Aunque se han identificado más de 11 polimorfismos en *SLC22A2* además de 134 inserciones, el polimorfismo que clínicamente tiene mayor relevancia en la farmacocinética de la metformina y la variante más común en *SLC22A2* es G808T (rs316019) (Islam et al., 2018; Lai, 2013).

2.8.1.3.1.2.1.- G808T (rs316019).

Este SNP involucra un cambio de una Guanina por una Timina en la cadena de ADN en la posición 808, lo cual resulta en la sustitución de una Alanina por una Serina en la posición 270 de la secuencia de OCT2 (Ala270Ser), siendo potencialmente influyente en la secreción renal de fármacos como la metformina (Frenzel et al., 2019). En un estudio realizado en 112 sujetos chinos voluntarios sanos, se encontró que la presencia del alelo menor de rs316019 estaba asociado con una reducción del aclaramiento renal de la metformina (Z. J. Wang et al., 2008), encontrando que el aclaramiento renal de metformina es menor ($6.32 \pm 0.954 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) en participantes portadores de T808T comparado con participantes portadores de G808G ($8.78 \pm 1.75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$; $p=0.037$).

Un hallazgo sumamente peculiar en estudios in vitro es el reportado por Leabman et al., 2002 quien encontró que los valores de $K_m \text{ h}^{-1}$ son diferentes entre la variante G808T: $K_m=20.8 \pm 8.1 \text{ h}^{-1}$ y el de la referencia $K_m= 11.8 \pm 1.3 \text{ h}^{-1}$ en el estudio de captación del catión orgánico prototípico: 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺).

En el estudio realizado en pacientes mexicanos publicado por (Menjivar et al., 2020) el polimorfismo se encontró en desequilibrio de Hardy Weinberg por lo que sus efectos en pacientes mexicanos con diabetes tipo 2 que reciben metformina, sulfonilureas o ambas, no fue estudiado.

2.8.1.3.1.3.- Transportador de cationes orgánicos 3 (OCT3).

El transportador de cationes orgánicos 3 (OCT3) es expresado en la membrana de los túbulos proximales renales, además, OCT3 ha sido identificado en músculo, glía y células cardiacas además de en algunos tumores (Lai, 2013). El transportador OCT3 es una proteína de 556 aminoácidos, tiene una masa molecular de 61280 Da y es codificado por gen *SLC22A3*, que se encuentra en el cromosoma 6, brazo largo región 25.3 y tiene un total de 15 exones (NCBI, 2022d; Weizzman Institute of Science, 2022d). Se han descrito poco más de cinco SNPs en *SLC22A3*, que han

mostrado asociación con reducción en la captación de histamina, sin embargo, la asociación con el efecto sobre el aclaramiento de la metformina es controversial (Lai, 2013).

2.8.1.3.1.3.1.- C698G (rs2076828).

El SNP rs2076828 es un polimorfismo del gen *SLC22A3* ubicado en 6q25.3 y la variante no provoca un transcrito codificante (Nasykhova et al., 2020). En un artículo publicado por Chen et al., 2015 se clonó la región 3'UTR de OCT3 y mediante vector se introdujo la variante C698G y se evaluó la actividad de la luciferasa que evalúa la transcripción del gen *SLC22A3*. Se encontró que la variante rs2076828 tuvo un efecto en la luciferasa, donde al alelo menor G exhibió significativamente una menor actividad comparado con el alelo de referencia C ($p < 0.01$). Concluyendo que el SNP tiene un efecto en la expresión de *SLC22A3* de forma cuantitativa. Chen et al., 2015 evaluaron el efecto de C698G en la respuesta a metformina en ratones sin enfermedades, encontrando que en aquellos portadores del alelo G tenían cambios significativamente menores en los niveles de glucosa (mg/dl) evaluado por área bajo la curva: CC: -88 ± 40 , CG: -34 ± 51 y GG: -41 ± 72 mg/dl; $p < 0.001$. Por lo que el alelo menor tiene un efecto significativo en una menor AUC de glucosa posterior a la administración de metformina. En tanto al análisis cuantitativo de expresión de *SLC22A3* con C698G insertado a través de vector en el *SLC22A3* clonado, la expresión cuantitativa del gen fue significativamente menor en los portadores del alelo menor G al medir los niveles de mRNA de OCT3 en tejido adiposo ($p < 0.01$).

2.8.1.3.2.- Generalidades de la superfamilia ATP binding cassette (ABC).

Los transportadores ABC se dividen en 7 subgrupos según la homología de su secuencia: ABCA (12 miembros), ABCB (11 miembros), ABCC (13 miembros), ABCD (cuatro miembros) y ABCG (cinco miembros). Los genes *ABC* de esta superfamilia, son esenciales para muchos procesos celulares y mutaciones en ellos contribuyen a la aparición de trastornos genéticos específicos además de conferir resistencia a múltiples fármacos (Laurence L. Brunton et al., 2019).

En particular MDR1 o proteína de resistencia a múltiples fármacos o también llamada P-glucoproteína (P-gp), es codificada por el gen *ABCB1* y participa en el eflujo de algunos fármacos, confiriendo resistencia a los mismos. Típicamente la P-gp es considerada una bomba de extrusión o transportador multiespecífico que puede reconocer a una gran variedad de sustratos con diversas estructuras químicas (D. Wang & Sadée, 2006). Uno de los fármacos que es transportado por esta ATP asa (MDR1) es la metformina, ya que se ha demostrado en células de placenta humana que la metformina es transportada en un $58 \pm 20\%$, lo cual indica que MDR1 puede tener un efecto de resistencia a la metformina (Hemauer S, L. Patrievka Svetrlana, 2010). Además, ha sido reportado que la metformina activa a la AMP cinasa (AMPK) y suprime la expresión de MDR1 mediante la inhibición del factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$) y la proteína de elemento de unión de respuesta-cAMP (CREB) (Kim et al., 2011).

Se han identificado numerosos SNPs en *ABCB1*, sin embargo, la frecuencia de muchos de estos SNPs es baja (<8%) a excepción de 3: en el exón 12 C1236T (rs1128503), en el exón 21 G2677T/A (rs2032582) y en el exón 26 C3435T (rs1045642) (D. Wang & Sadée, 2006).

2.8.1.3.2.1.- C1236T (rs1128503).

En el polimorfismo rs1128503 ocurre un cambio de una citocina por una timina en la posición 1236. (Llaudó et al., 2013). Ha sido reportado el efecto que tiene esta

variante en la actividad de la P-gp en pacientes con trasplante renal, encontrando que aquellos individuos portadores del genotipo 1236CC mostraron la más alta actividad de la P-gp comparado con el heterocigoto 1236CT y el homocigoto (CC: 46.11 ± 4.11 ; CT: 43.71 ± 2.68 y TT: 30.9 ± 3.33 ; $p= 0.02$) (Llaudó et al., 2013). En un estudio que incluyó a 1086 pacientes con DT2 y 1122 controles sanos de China, se analizaron las frecuencias entre las dos poblaciones genotipificando para rs1128503 para conocer si alguna variante del polimorfismo influía en la susceptibilidad a DT2. Se evaluó mediante comparación por genotipos, alelos y por modelos dominantes y recesivos, sin encontrar significancia estadística al comparar al grupo de pacientes con DT2 y el grupo control (Yan et al., 2020). El polimorfismo rs1128503 ha sido asociado previamente con carcinoma hepatocelular y cáncer de mama, pero en el estudio de casos y controles no se encontró asociación con DT2. El SNP rs1128503 es una variante intrónica de *ABCB1* y es posible que los intrones pierdan su función durante la evolución (Yan et al., 2020).

2.8.1.3.2.2.- G2677T/A (rs2032582).

En el polimorfismo G2677T/A, puede ocurrir un cambio de una Guanina por una Timina o una Adenina siendo definido como un polimorfismo trialélico (Tian et al., 2021). Se ha evaluado el efecto del polimorfismo en la actividad de la P-gp, encontrando que los portadores del alelo mayor G: GG y GT tenían una mayor actividad de a P-gp comparado con los homocigotos y portadores del alelo menor T (GG: 45.96 ± 3.79 ; GT: 45.71 ± 3.38 ; TT: 30.47 ± 4.52 ; $p=0.04$). (Llaudó et al., 2013). Ha sido reportado que la presencia del alelo menor en rs2032582 está asociado al daño hepático inducido por atorvastatina ($p<0.001$).

En un estudio realizado en pacientes chinos con DT2 se ha encontrado la más alta mutación de homocigotos para este polimorfismo ($n= 75$, 21.31%), resultados que reflejan que en población china con DT2 es un polimorfismo común en este tipo de pacientes (Tian et al., 2021).

2.8.1.3.2.3.- C3435T (rs1045642).

En el polimorfismo rs1045642 ocurre un cambio de una Citocina por una Timina en la posición 3435. En cuanto al efecto de rs1045642 sobre la actividad de la P-gp, se ha encontrado que los portadores de 3435CC y 3435CT poseen la más alta actividad de la P-gp comparado con los portadores de 3435TT (CC: 48.33 ± 4.69 ; CT: 45.9 ± 3.18 , TT: 31.62 ± 3.37 ; $p= 0.02$) (Llaudó et al., 2013). En un estudio que involucró a a 183 pacientes con DT2 y 150 controles (n= 333) de India, se analizó si rs1045642 estaba asociado con el riesgo de DT2. Al analizar las frecuencias por genotipo y por alelo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Rizvi et al., 2017).

2.8.2 Glibenclamida.

La glibenclamida pertenece a un grupo de fármacos denominados como moduladores de los conductos de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}) y todos los miembros de esta clase son considerados arilsulfonilureas sustituidas. Las diferencias entre estos fármacos son las situaciones de posición *para* en el anillo de benceno y un ácido de nitrógeno en la radical urea. Las sulfonilureas se dividen en dos grupos o generaciones de fármacos. Las sulfonilureas de primera generación (tolbutamida, tolazamida, y clorpropamida) rara vez se utilizan para el tratamiento de la DT2 y las sulfonilureas de segunda generación qué, son más potentes (glibenclamida o gliburida, glipizida y glimepirida) (Laurence L. Brunton et al., 2019).

2.8.2.1.- Farmacodinamia de la glibenclamida.

A diferencia de la metformina, la glibenclamida tiene un mecanismo de acción bien conocido y definido. Las sulfonilureas estimulan la liberación de insulina al unirse a un sitio específico de los canales de potasio dependientes de ATP que se encuentran en las células beta del páncreas, este sitio es conocido como receptor

de sulfonilureas o SUR. Al unirse a SUR, las sulfonilureas inhiben el K_{ATP} lo que ocasiona un cambio de potencial de membrana culminando en la despolarización de la membrana celular, estimulando la apertura de canales de Calcio, que ocasionan la exocitosis de gránulos de insulina (Laurence L. Brunton et al., 2019).

2.8.2.2.- Farmacocinética de la glibenclamida.

Las sulfonilureas se absorben en tubo digestivo y en plasma están unidas principalmente a proteínas plasmáticas entre un 90 a 99%, siendo la albúmina la proteína de mayor unión a sulfonilureas. El volumen de distribución se encuentre en 0.2 L/kg. Aunque el $T_{1/2}$ es corto (3 a 5 h) los efectos hipoglucemiantes son evidentes por 12 a 24 h (Laurence L. Brunton et al., 2019).

Las sulfonilureas son metabolizadas por el citocromo hepático P450, específicamente por CYP2C9, que biotransforma a la glibenclamida mediante hidroxilación del anillo aromático, en dos metabolitos: El 4 trans-hidroxi-glibenclamida (M1) y el 3 cis-hidroxi-glibenclamida (M2). Farmacológicamente estos metabolitos tienen potentes efectos hipoglucémicos, por eso la discrepancia entre el $T_{1/2}$ y los efectos hipoglucemiantes. Después de ser metabolizada, la glibenclamida y sus metabolitos son finalmente eliminados por la orina (Laurence L. Brunton et al., 2019; S. F. Zhou et al., 2010).

2.8.2.3.- Farmacogenética de la cinética de la glibenclamida.

CYP2C9 es la enzima más abundante de la subfamilia CYP2C en el hígado y el más importante contribuidor de esta subfamilia al metabolismo de fármacos, de hecho, CYP2C9 representa aproximadamente el 20% del total de las proteínas del citocromo hepático 450. Después de CYP3A4 y CYP2D6, CYP2C9 es el más importante en términos de número de agentes terapéuticos metabolizados. Así, la variabilidad interindividual en CYP2C9 puede impactar en la eficacia y seguridad de muchos fármacos como en el caso de la glibenclamida (Daly et al., 2018). CYP2C9

es una proteína de 490 aminoácidos con una masa molecular de 55628 Da, que es codificada por el gen *CYP2C9* localizado en el cromosoma 10, brazo largo región 23.33 (NCBI, 2022a; Weizzman Institute of Science, 2022a)

Evidencia de que la existencia de polimorfismos que afectan el metabolismo de las sulfonilureas data del año 1978. Los dos polimorfismos más ampliamente estudiados son C430T (rs1799853) y A1075C (rs1057910) que forman parte de los alelos *CYP2C9**2 y de *CYP2C9**3 respectivamente, además, no solo son clínicamente relevantes, sino que también son las variantes más comunes en grupos étnicos (Daly et al., 2018; Tornio & Backman, 2018; Yee et al., 2021).

Existe una clasificación de acuerdo al número de alelos en diplotipos y el fenotipo metabólico, en el que para *CYP2C9* se considera un metabolizador normal a aquellos pacientes con el diplotipo *1/*1, metabolizador intermedio a aquellos con el diplotipo *1/*2 y *1/*3, es decir, aquellos que mantienen una copia del wild type (*1) y como metabolizadores pobres a aquellos portadores de *2/*2, *2/*3 y *3/*3 (Surendiran et al., 2011; Tornio & Backman, 2018). Derivado de esto se conoce que los alelos *CYP2C9**2 y *CYP2C9**3 pueden marcadamente reducir el aclaramiento de las sulfonilureas e incluso hay estudios en el que se ha reportado que los portadores de las variantes de *CYP2C9* son más sensibles a efectos de hipoglucemia con las sulfonilureas (Daly et al., 2018; Tornio & Backman, 2018). En un estudio realizado en 80 pacientes con DT2 procedentes de Irán, tratados con glibenclamida o glicazida se compararon los niveles de glucosa en ayuno a 2.5 h después de la última dosis de glibenclamida y a 12 h después de la última dosis de glicazida, encontrando glucosa en ayuno de 185 mg/dl en pacientes portadores del diplotipo *1/*1, de 202 mg/dl en pacientes *1/*2, de 196 mg/dl en portadores *1/*3, de 109 mg/dl en pacientes portadores de *2/*2 y de 162 mg/dl en portadores de *2/*3 sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.666$), mismo caso al comparar los niveles de %HbA1c ($p=0.711$) (Saberri et al., 2020). En otro estudio de tipo longitudinal, realizado en 88 pacientes de Líbano con criterio de glicemia no controlada definida por glucosa en ayuno >126 mg/dl y por HbA1c $\geq 7.0\%$ a los cuales se les recetó metformina 500mg/glibenclamida 5mg. Se

siguieron a los pacientes durante 6 meses con toma de bioquímicos al inicio, a los 3 y a los 6 meses y se obtuvieron los genotipos para CYP2C9*1, *2 y *3. Se agruparon a los pacientes de acuerdo a la presencia de alelo menor de rs622342 y los alelos de CYP2C9 en cuatro grupos: (i) AA y AC, *1/*1 y *1/*2, (ii) AA y AC, *1/*3, (iii) CC, *1/*1 y *1/*2 y (iv) CC, *1/*3) comparando los niveles de HbA1c basales, a los 3 y 6 meses sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en el punto inicial ($p=0.062$) pero se observó una diferencia estadísticamente significativa a los 3 meses ($p= 0.004$) y a los 6 meses ($p<0.001$) donde el grupo mayormente beneficiado fue el de los pacientes portadores de AA, AC y *1/*3 a 3 ($p= 0.004$) y 6 meses ($p<0.001$) con media de HbA1c a los 3 meses de 7.53 ± 0.27 y a los 6 meses de 7.45 ± 0.52 (Naja et al., 2020).

En el análisis por separado, considerando únicamente a los polimorfismos rs1799853 y rs1057910 de CYP2C9, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al ser estratificados por fenotipo *1/*1 y *1/*2 versus *1/*3 ($p= 0.623$) (Naja et al., 2020). En un estudio realizado en 454 pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de DT2 de la Ciudad de México, se encontró asociación mediante una regresión logística en aquellos pacientes CYP2C9*3, tomando como referencia el genotipo AA de CYP2C9*3, con un OR: 2.747; IC95%: 1.194 – 6.324; $p=0.024$ para el genotipo AC y se obtuvo un OR: 2.779; IC95%: 1.142 – 6.763; $p=0.024$ para el modelo ajustado por edad, ejercicio, IMC, tiempo con la enfermedad y dosis de metformina y/o glibenclamida (Castelán-Martínez et al., 2018). Otro estudio realizado en pacientes mexicanos con DT2, mostró un análisis en el que agrupó a IVS8-109A>T (rs1934969) que es un variante intrónica, de acuerdo a sus genotipos en cada subgrupo de acuerdo al tipo de metabolizador según CYP2C9, donde se encontró que los pacientes *1/*1 y que son portadores -109TT, tienen mayores niveles de HbA1c 9.07 ($5.86 - 12.29$) comparado con los que son *1/*1 + AT con HbA1c de 8.11 ($5.68 - 10.55$) y *1/*1 + AA con HbA1c de 8.03 ($5.71 - 10.34$) ($p<0.05$) (Cuautle-Rodríguez et al., 2019).

En la tabla número 3, se resumen los hallazgos estadísticamente significativos en captación de metformina, concentración de metformina, análisis de distribución de genotipos entre población con diabetes y sujetos sanos, niveles de HbA1c, entre otros hallazgos, con la presencia de alelos o genotipos de los polimorfismos de los genes *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC22A3*, *ABCB1* y *CYP2C9*.

Tabla 3.- Resumen de hallazgos significativos de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) estudiados de los genes <i>SLC22A1</i> , <i>SLC22A2</i> , <i>SLC22A3</i> , <i>ABCB1</i> y <i>CYP2C9</i> .					
Gen	SNP ID	Población	Fármaco utilizado	Hallazgos	Referencia
<i>SLC22A1</i>	rs72552763	Hepatocitos de ratón.	Metformina.	Disminución de la captación de metformina en portadores del alelo menor (GAT/GAT vs del/GAT+del/del; $p < 0.001$).	(Shu, 2007)
		265 pacientes mexicanos con DT2.	Metformina + glibenclamida.	Diferencia en distribución genotípica entre pacientes controlados y no controlados ($p = 0.011$).	(Menjivar et al., 2020)
		371 pacientes daneses con DT2.	Metformina como monoterapia o combinada con: Insulina, rosiglitazona o placebo.	Disminución de las concentraciones del estado estacionario de metformina en portadores del alelo menor ($p = 0.027$).	(Christensen et al., 2011)
	rs622342	98 usuarios incidentes de metformina de Holanda.	Metformina	Reducción de HbA1c menor en portadores del alelo menor ($p = 0.005$). Se sugiere un efecto de una proteína menos efectiva para el transporte de metformina.	(Becker et al., 2010)
		308 pacientes mexicanos con DT2.	Metformina	Portadores del genotipo CC poseen mayores niveles de HbA1c a 12 meses de seguimiento ($p < 0.001$).	(Reséndiz-Abarca et al., 2019)
		122 pacientes de India con DT2.	Metformina	Pacientes portadores del alelo menor tienen mayor riesgo de no responder al tratamiento con metformina ($p = 0.011$ para AC y $p = 0.033$ para CC).	(Umamaheswaran et al., 2015)

		127 pacientes egipcios con DT2.	Metformina + glimepirida	Los pacientes portadores del genotipo AA fueron 2.7 veces más respondedores que los portadores del alelo C ($p= 0.025$).	(Ebid et al., 2019)
SLC22A2	rs316019	Estudio in vitro.	MPP+	Valores de $Km\ h^{-1}$ son mayores cuando está presente el polimorfismo.	(Leabman et al., 2002)
		112 sujetos sanos chinos.	Metformina	Aclaramiento renal de metformina es menor en sujetos portadores del genotipo TT comparado con portadores de GG ($p=0.037$).	(Z. J. Wang et al., 2008)
SLC22A3	rs2076828	Estudio in vitro y en ratones	Metformina	La presencia del alelo menor G exhibió una menor expresión de SLC22A3. Menor biodisponibilidad en portadores del alelo menor ($p<0.001$). Disminución del efecto de metformina en concentración plasmática de glucosa en portadores del alelo menor ($p<0.05$). Efecto de metformina en fosforilación de AMP y la expresión de GLUT4 ausentes en portadores del genotipo homócigo recesivo.	(Chen et al., 2015)
ABCB1	rs1128503	70 pacientes españoles que recibieron trasplante renal	Inmunosupresores como: Ciclosporina, tacrolimus y sirolimus.	Pacientes portadores del alelo menor T, poseen la actividad de P-gp más baja comparado con los portadores del genotipo CC ($p=0.02$).	(Llaudó et al., 2013)
	rs2032582	70 pacientes españoles que recibieron trasplante renal	Inmunosupresores como: Ciclosporina, tacrolimus y sirolimus.	Pacientes portadores del genotipo TT, poseen la menor actividad de P-gp al comparar con los portadores del alelo G ($p=0.04$).	(Llaudó et al., 2013)
		352 pacientes chinos con DT2	No especificado	La más alta frecuencia de mutación en homocigotos para el alelo A (21.31%, $n=75$).	(Tian et al., 2021)
	rs1045642	70 pacientes españoles que recibieron trasplante renal	Inmunosupresores como: Ciclosporina, tacrolimus y sirolimus.	Portadores del genotipo homocigotos recesivo TT poseen la menor actividad de P-gp comparado con portadores del alelo C ($p= 0.02$).	(Llaudó et al., 2013)

CYP2C9	rs1799853 (*2)	88 pacientes de Líbano con DT2	Metformina + glibenclamida	Pacientes portadores de los alelos AA, AC de rs622342 y *1*3, mostraron mayor beneficio en reducción de HbA1c a 3 y 6 meses.	(Naja et al., 2020)
	rs1057910 (*3)	400 pacientes mexicanos con DT2	Metformina + glibenclamida	La variante CYP2C9*3 se encontró asociada con un buen control glucémico ($p=0.024$).	(Castelán-Martínez et al., 2018)
	rs1934969	248 pacientes mexicanos con DT2	Metformina, glibenclamida o metformina + glibenclamida.	Pacientes con el genotipo TT y que son portadores de *1/*1 poseen mayores niveles de HbA1c comparados con los portadores del alelo mayor A.	(Cuautle-Rodríguez et al., 2019)

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El 75% de la población que vive con diabetes en México no se encuentra bajo criterios de control definido por HbA1c. Aunque la diabetes es una enfermedad multifactorial, existen antecedentes que logran asociar la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido de genes involucrados en la farmacocinética o farmacodinamia de los tratamientos para la DT2, con un mejor control glucémico en pacientes con DT2. En México el tratamiento de primera línea es metformina y la terapia combinada más utilizada es la combinación con sulfonilureas. Conocer si los factores genéticos de polimorfismos de un solo nucleótido están asociados a un buen control glucémico, puede contribuir a disminuir la prevalencia de no control glucémico en la población mexicana que vive con diabetes.

4.- JUSTIFICACIÓN.

Aunque existen terapias novedosas disponibles para el tratamiento de la diabetes tipo 2, en México la terapia combinada más utilizada es metformina+glibenclamida. Existen factores como las variaciones genéticas inherentes que pueden contribuir a la variabilidad de respuesta a fármacos, ya que, múltiples genes codifican proteínas directamente involucradas en la farmacocinética y farmacodinamia de los fármacos. Conocer los aspectos farmacogenéticos de los fármacos más comúnmente prescritos para tratar diabetes en población mexicana no solamente retroalimentaría un mejor conocimiento de la fisiopatología y terapéutica de la enfermedad, sino también puede contribuir al perfilamiento matemático de una población escasamente estudiada en México en lo que se conoce como medicina personalizada. Las herramientas analíticas de la bioestadística y la bioinformática, pueden ser aplicables en muchos campos incluido la medicina y específicamente en la terapéutica. La intervención y atención de las variables clínicas, bioquímicas y farmacogenéticas puede contribuir a la disminución de la prevalencia de pacientes mexicanos con diabetes tipo 2 con el estatus de no controlado, la proporción de pacientes que demanden atención médica y quirúrgica de las complicaciones asociadas a la diabetes, repercutiendo en la tasa de mortalidad, gasto en salud y ausentismo.

5.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe asociación con el control glucémico definido por HbA1c y alguna de las variantes alélicas de los polimorfismos de los genes *SLC22A1* (rs72552763 y rs622342), *SLC22A2* (rs316019), *SLC22A3* (rs2076828), *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 y rs1045642) y *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910 y rs1934969) en pacientes mestizos mexicanos con diabetes tipo 2 en tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas?

P: Pacientes mestizos mexicanos con diabetes tipo 2 en tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas).

I: NA.

C: Variantes alélicas de los polimorfismos de los genes *SLC22A1* (rs72552763 y rs622342), *SLC22A2* (rs316019), *SLC22A3* (rs2076828), *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 y rs1045642) y *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910 y rs1934969).

O: Control glucémico definido por HbA1c.

6.- PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.

H0: No existe asociación entre el control glucémico definido por HbA1c y alguna de las variantes alélicas de los polimorfismos de los genes *SLC22A1* (rs72552763 y rs622342), *SLC22A2* (rs316019), *SLC22A3* (rs2076828), *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 y rs1045642) y *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910 y rs1934969) en pacientes mestizos mexicanos con diabetes tipo 2 en tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas.

H1: Si existe asociación entre el control glucémico definido por HbA1c y alguna de las variantes alélicas de los polimorfismos de los genes *SLC22A1* (rs72552763 y rs622342), *SLC22A2* (rs316019), *SLC22A3* (rs2076828), *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 y rs1045642) y *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910 y rs1934969) en pacientes mestizos mexicanos con diabetes tipo 2 en tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas.

7.- OBJETIVOS.

Objetivo primario.

1. Determinar si existe asociación entre el control glucémico definido por HbA1c y alguna de las variantes alélicas de los polimorfismos de los genes *SLC22A1* (rs72552763 y rs622342), *SLC22A2* (rs316019), *SLC22A3* (rs2076828), *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 y rs1045642) y *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910 y rs1934969) en pacientes mestizos mexicanos con diabetes tipo 2 en tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas.

Objetivos secundarios.

1. Determinar las frecuencias alélicas de los polimorfismos de los genes *SLC22A1* (rs72552763 y rs622342), *SLC22A2* (rs316019), *SLC22A3* (rs2076828), *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 y rs1045642) y *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910 y rs1934969) en pacientes mestizos mexicanos con diabetes tipo 2 en tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas.
2. Agrupar a los pacientes mestizos mexicanos con diabetes tipo 2 de acuerdo al tratamiento que reciben, ya sea con metformina, glibenclamida o ambas.
3. Agrupar a los pacientes mestizos mexicanos con diabetes tipo 2 de acuerdo al genotipo de los polimorfismos de los genes *SLC22A1* (rs72552763 y rs622342), *SLC22A2* (rs316019), *SLC22A3* (rs2076828), *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 y rs1045642) y *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910 y rs1934969).

8.- MATERIAL Y MÉTODOS.

8.1.- Tipo y diseño del estudio.

Por intervención del investigador: Observacional.

Por el objetivo: Clínico, analítico y de asociación.

Por la temporalidad: Longitudinal.

Por la obtención de la información: Ambispectivo.

Por la direccionalidad: Ambispectivo.

Por el número de sedes: Unicéntrico

8.2.- Población.

Pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de diabetes tipo 2 que reciben tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas.

8.3.- Tamaño de la muestra.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó la fórmula para estimar una proporción en una población infinita:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \times p \times q}{\delta^2}$$

Donde

Z_{α}^2 : Es el valor de una variable aleatoria que tiene distribución normal estándar, en donde se acumula una probabilidad de $1-\alpha$, para cuando alfa tiene un valor de $0.05 = 1.96 \times 1.96$.

q: Es la proporción estimada del parámetro poblacional= 0.5.

p: Valor de $1-p= 0.5$

δ : Es el valor de la amplitud del intervalo de confianza= 0.06.

El valor de delta fue obtenido a partir de estudios previos como el de Menjivar et al, 2020, con una n= 265. Se utilizó la fórmula de cálculo del tamaño de la muestra para estimar una proporción en una población infinita y se despejó el valor de delta:

$$\delta = Z_{\frac{\alpha}{2}} * \sqrt{\frac{p * q}{n}}$$

$$\delta = 1.96 * \sqrt{\frac{0.5 * 0.5}{265}} = 1.96 * \sqrt{\frac{0.25}{265}} = 1.96 * \sqrt{0.00094} = 1.96 * 0.0307 = 0.06$$

Cálculo del tamaño de la muestra para una proporción no conocida (p= 0.50):

$$n = \frac{3.8416 * 0.5 * 0.5}{0.06^2} = \frac{0.9604}{0.0036} = 266.77 \text{ más } 20\% = 320$$

Cálculo del tamaño de la muestra para la frecuencia del alelo mayor y menor de rs72552763.

Considerando p= 0.76 y q= 0.24 reportado por Menjivar et al., 2020, previamente para rs72552763:

$$n = \frac{3.8416 * 0.76 * 0.24}{0.06^2} = \frac{0.7007}{0.0036} = 194.64 \text{ más } 20\% = 233.56$$

8.4.- Criterios de selección.

8.4.1.- Inclusión.

- Diagnóstico de diabetes según la ADA 2020/GPC 2015.
- Más de 18 años de edad.
- Derechohabientes del HRAEI.
- En tratamiento con metformina, glibenclamida o ambas por mínimo 3 meses.
- Pacientes que acepten firmar el consentimiento informado.

8.4.2.- Exclusión.

- Pacientes con complicaciones macro vasculares.
- Alcoholismo crónico.
- Patología pancreática previa.
- Uso de una medicación distinta a metformina, glibenclamida o ambas.
- Pacientes no derechohabientes del HRAEI.
- No apego al tratamiento.
- Mujeres en edad fértil en tratamiento anticonceptivo.
- Medicamentos para control de peso (p.ej. Esteroides, sibutramina).

8.4.3.- Eliminación.

- Retiro voluntario del paciente.
- No adherencia al tratamiento.

8.5.- Operacionalización de variables.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición	Tipo de variable
Sexo	Condición anatómica que distingue al hombre de la mujer	Obtenido a partir del expediente clínico del paciente	1.Femenino 2. Masculino	Cualitativa dicotómica
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento del individuo hasta el presente, medido en años	Dato obtenido a partir del expediente del paciente	Años	Cuantitativa continua
Edad corte	Punto de corte en la edad para estratificar individuos en el estudio	Media de la edad obtenida en los sujetos de estudio	0.- Menor de 55 años 1.- Mayor a 55 años	Cualitativa dicotómica
Tiempo de tratamiento	Tiempo transcurrido desde el inicio de tratamiento médico para diabetes tipo 2.	Dato obtenido de la historia clínica y notas	Años	Cuantitativa continua
Tiempo de corte.	Punto de corte en el tiempo de tratamiento.	Punto obtenido de la mediana del tiempo en los sujetos de investigación	0.- Menor a 4 años 1.- Mayor a 4 años	Cualitativa dicotómica
IMC.	Indicador de la densidad corporal determinado por la relación entre el peso corporal y la altura corporal.	Dato obtenido a partir del expediente o calculado mediante la división del peso corporal en kilogramos, entre la estatura en metros elevada al cuadrado	Kg/m ²	Cuantitativa continua
Diagnóstico por IMC.	Indicador de la clasificación del IMC.	Categorización a partir de la clasificación para obesidad de la OMS	0.- Bajo peso 1.- Normo peso 2.- Sobrepeso 3.- Obesidad I 4.- Obesidad II 5.- Obesidad mórbida	Cualitativa nominal

Variables bioquímicas y genéticas.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición	Tipo de variable
Glucosa en ayuno	Concentración de glucosa en sangre (sin haber comido ni bebido nada durante 8 horas antes de la prueba).	Dato obtenido a partir de los resultados de análisis de laboratorios a través del Sistema Integral de Laboratorios, determinado con un rango de referencia ideal de 70 - 99 mg/dl	mg/dl	Cuantitativa continua
Glucosa en ayuno controlada	Condición de laboratorio que diferencia entre el sujeto controlado y no controlado respecto a los niveles de glucosa en ayuno.	Dato obtenido a del último estudio de laboratorio previo a la toma de muestra para genotipificación. Definición de control en ayuno <126mg/dl	0.- Menor a 126mg/dl 1.- Mayor a 126mg/dl	Cualitativa dicotómica
%HbA1c	Porcentaje de hemoglobina unida a glucosa.	Dato obtenido del último estudio de laboratorio previo a la toma de muestra para genotipificación	Porcentaje	Cuantitativa continua
Control HbA1C	Condición de laboratorio que diferencia entre un sujeto controlado y no controlado a partir del porcentaje de HbA1c.	Definición de control por HbA1c: < 7 %	0.- Menor a 7 % 1.- Mayor a 7 %	Cualitativa dicotómica
Colesterol total	Cantidad total de colesterol en la sangre.	Dato obtenido a partir de los resultados de análisis de laboratorios a través	mg/dl	Cuantitativa continua

		del Sistema Integral de Laboratorios, determinado con un rango de referencia ideal de 125 a 200 mg/dL.		
Control colesterol.	Condición que define colesterol elevado y colesterol en rangos normales.	Dato obtenido a partir del perfil lipídico de los pacientes, tomando como control un punto de corte de 200mg/dl.	0.- Menor a 200mg/dl 1.- Mayor a 200mg/dl	Cualitativa dicotómica
Triglicéridos	Acilgliceroles unidos a tres moléculas de ácido graso de cadena larga, presente en membranas celulares y plasma sanguíneo Biomarcador de metabolismo lipídico.	Dato obtenido a partir de los resultados de análisis de laboratorios a través del Sistema Integral de Laboratorios, determinado con un rango de referencia ideal menor a 150 mg/dL	mg/dl	Cuantitativa continua
Control TAG.	Condición de laboratorio que define triglicéridos elevados o en rangos normales.	Dato obtenido a partir de lo reportado en los estudios de laboratorio. Punto de referencia: 150mg/dl	0.- Menor de 150mg/dl 1.- Mayor de 150mg/dl	Cuantitativa dicotómica
SLC22A1, Met420del (rs72552763).	Polimorfismo en el gen SLC22A1, en el exón 7, donde hay una deleción de 3 bases (ATG) en el codón 420.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- GAT/GAT. 2.- GAT/del. 3.- del/del.	Cualitativa nominal
SLC22A1; 1386 C>A; (rs622342).	Variante intrónica en la posición 1386 entre el intrón 8 y 9.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- Homocigoto A/A 2.- Heterocigoto A/C	Cualitativa nominal

			3.- Homocigoto C/C	
SLC22A2; p.Ala270Ser; (rs316019)	Polimorfismo del gen SLC22A2, donde hay un cambio de una alanina por una serina en la posición 270.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- Homocigoto C/C 2.- Heterocigoto C/A 3.- Homocigoto A/A	Cualitativa nominal
SLC22A3; c. C698G rs2076828	Polimorfismo del gen SLC22A3, donde hay un cambio de una citocina por una guanina en la posición 698.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- Homocigoto C/C 2.- Heterocigoto C/G 3.- Homocigoto G/G	Cualitativa nominal
ABCB1; g. C1236T; (rs1128503).	Polimorfismo en el gen ABCB1, localizado en la cadena de DNA, aminoácido 1236, donde hay un cambio de citocina por timina.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- Homocigoto C/C 2.- Heterocigoto C/T 3.- Homocigoto T/T	Cualitativa nominal
ABCB1; p. Ala893Thr; (rs2032582).	Polimorfismo del gen ABCB1, en el codón 89, donde hay un cambio de alanina por treonina.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- Homocigoto A/A 2.- Heterocigoto A/G 3.- Homocigoto G/G	Cualitativa nominal
CYP2C9; g. 430 C>T; p. Arg144Cys; (rs1799853).	Polimorfismo del gen CYP2C9, en aminoácido 430, donde hay un cambio de citosina por timina.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- Homocigoto *1/*1 2.- Heterocigoto *1/*2 3.- Homocigoto *2/*2	Cualitativa nominal
CYP2C9;	Polimorfismo del gen CYP2C9, en	Dato obtenido a partir genotipificación por	1.- Homocigoto *1/*1	Cualitativa nominal

g. 1075 A>C p.Ile359Leu (rs1057910).	aminoácido 1075, donde hay un cambio de una adenina por citosina.	discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	2.- Heterocigoto *1/*3 3.- Homocigoto *3/*3	
CYP2C9; g.818delA; p.Lys273Arg (rs9332131).	Polimorfismo en el gen CYP2C9, donde hay un cambio de lisina por arginina en el codón 273.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- Homocigoto *1/*1 2.- Heterocigoto *1/*6 3.- Homocigoto *6/*6	Cualitativa nominal
CYP2C9; IVS8-109 A>T (rs1934969)	Polimorfismo intrónico en el gen CYP2C9, localizado en la región 8-109, donde hay un cambio de adenina por timina.	Dato obtenido a partir genotipificación por discriminación alélica mediante de PCR en tiempo real.	1.- Homocigoto A/A 2.- Heterocigoto A/T 3.- Homocigoto T/T	Cualitativa nominal

8.6.- Procedimiento de obtención de la información.

8.6.1 Genotipificación.

EL ADN genómico (ADNg) fue obtenido a partir de muestras de sangre periférica obtenidas por flebotomía. La sangre fue recolectada en tubos con EDTA del cual se separó plasma (para mediciones metabólicas) y alícuotas de 1000 µl que fueron congeladas y almacenadas para su uso posterior. Se realizó la extracción de ADNg a partir de 200µl de sangre venosa usando reactivos de aislamiento UltraClean® BloodSpin® DNA (Mo Bio Laboratories; Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Para evaluar la integridad y concentración del material genético se utilizó electroforesis en agarosa 1% y espectrofotometría usando NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific, Wilmington DE, USA), respectivamente. Las determinaciones alélicas de los polimorfismos de los genes *CYP2C9*, *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC22A3* y *ABCB1*, fueron realizadas mediante discriminación alélica con sondas TaqMan® con PCR en tiempo real usando el equipo Fast7300, ambos de Applied Biosystems (Thermo

Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Las reacciones fueron realizadas en un volumen de reacción final de 10 µl, con 30 ng de ADN genómico templado, 1X TaqMan® Universal PCR Master mix system de Applied Biosystems, 1X de cada sonda evaluada (CYP2C9*1: C_160889442_10, CYP2C9*2: rs1799853, C_25625805_10; CYP2C9*3: rs1057910, C_27104892_10; CYP2C9*6: rs9332131, C_32287221_20; SLC22A1: rs12208357, C__30634096_10; SLC22A1: rs2282143, C__15877554_40; SLC22A1: rs594709, C__1898206_20; SLC22A1: rs622342, C__928527_30; SLC22A1: rs628031, C__8709275_60; SLC22A1: rs683369, C__928536_30; SLC22A1: rs72552763, C__34211613_10; SLC22A2: rs316019, C__3111809_20; SLC22A3: rs2076828, C__2763995_1_; SLC22A3: rs8187725, C_30633894_10; ABCB1: rs1045642, C__7586657_20; ABCB1: rs1128503, C__7586662_10; ABCB1: rs2032582, C_11711720D_40; ABCB1: rs2032582, C_11711720C_30; ABCB1: rs2032588, C__11711718_10).. Las condiciones de amplificación fueron previamente descritas (Cuautle-Rodríguez et al., 2019).

El polimorfismo intrónico *CYP2C9* IVS8-109A>T (rs1934969) fue analizado usando la combinación de PCR con fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCR/RFLP). El PCR punto final fue realizado utilizando el equipo Mastercycler® 384 (Eppendorf, Hamburg, Germany). Para identificación de los genotipos se realizó la digestión de los productos de amplificación con la enzima HinfI (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA; cat no. RO155S) y se observó el patrón de restricción obtenido para cada paciente mediante electroforesis en geles de agarosa 2%. La restricción del alelo *CYP2C9* IVS8-109T dio como resultado fragmentos de 468 y 154 pb, mientras una banda de 622pb correspondientes a fragmentos no cortados correspondió al alelo de *CYP2C9* IVS8-109A, la combinación de estos patrones denotó a los individuos heterocigotos. Las frecuencias alélicas y genotipadas de OCT1, OCT2, OCT3, *ABCB1* y *CYP2C9* fueron obtenidas por conteo directo.

8.6.2. Determinación plasmática de metformina.

De los 204 candidatos iniciales, 101 fueron excluidos de los análisis por las siguientes razones: 2 muestras de plasma fueron insuficientes, 14 fueron reportadas como no cuantificada y 29 fueron reportadas como no determinado (total 45), mientras que, 56 más fueron perdidos durante el seguimiento (41 por cambios en tratamiento y 15 por no tener registros de HbA1c) (Esquema 1). De los 103 pacientes incluidos, la concentración plasmática solo pudo ser determinada en 86, 9 habían sido registrado como no determinados y 8 más fueron no cuantificados (por suero hemolizado o suero lipémico). Las determinaciones fueron realizadas en la Unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM. La metodología fue validada de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA 1-2013, la cual establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable; los requerimientos mandatorios autorizados que terceros deben observar; que investigación o instituciones de asistencia sanitaria podrán realizar pruebas de biocomparabilidad; y procedimientos internos de validación. El estudio además adhiere requerimientos internacionales que aceptan parámetros que fueron establecidos en el Standard Operating Procedure SOP-UA-05-09 "Validation of analytical methodology on special and bioavailability and/or bioequivalence studies". El método analítico fue selectivo para la cuantificación de metformina y glibenclamida plasmática, sin interferencia de compuestos endógenos o exógenos. La metodología empleada logró ser selectiva, lineal, precisa y exacta sobre el rango de concentración evaluado.

Para el análisis de las muestras, se utilizó técnica de Cromatografía de líquidos acoplado a detección de MS/MS en modo MRM. El espectrómetro de masas fue un equipo Agilent Technologies G6490A. En la preparación de las curvas de calibración y controles para el análisis de las muestras fueron empleadas las siguientes sustancias como referencia: Clorhidrato de metformina (U.S.P batch R069H0, pureza 97%), glibenclamida (U.S.P lote R022S0, pureza 99.4%) y loratadina (U.S.P lote R052U0, pureza 99.8%). Para la cuantificación de metformina/glibenclamida

plasmática, se seleccionó la tasa de masa/carga de metformina 130.1/71.0, y para glibenclamida 494.0/369.0 y el estándar interno loratadina 383.1/337.1. Para la separación y determinación de analitos, se empleó una columna Phenomenex 2.0X100mm, 3.0 μ . La elución isocrática se llevó a cabo empleando como fase móvil un formato de amonio acidificado 10mM: A proporción de formiato (35%) y acetonitrilo (65%).

Los analitos fueron previamente extraídos a través de extracción/precipitación de proteínas: Una alícuota de 100 μ L fue extraída de la muestra del plasma y subsecuentemente depositada en un microtubo. Adicionamos una alícuota de 10 μ L de la solución del estándar interno de loratadina (30 μ g/mL). Para llevar a cabo la precipitación de proteínas, adicionamos una alícuota de 400 μ L de acetonitrilo grado HPLC. El tubo fue agitado en un vortex múltiple a velocidad máxima por 1 minuto. El tubo fue centrifugado a 13 000 rpm y a 4° C por 5 minutos. Recobramos 250 μ L del sobrenadante y lo transferimos a una laminilla de 96 pozos. El volumen de inyección en el sistema cromatográfico fue de 2.0 μ L. El método fue lineal en el rango de 20-10000 ng/mL para metformina y de 2 a 400 ng/mL para glibenclamida. Los coeficientes de variación intra e inter día fueron de menos del 15%. En el caso de metformina, un rango de recuperación de 89.676 a 90.731% y para glibenclamida un rango de recuperación de 95.571 a 96.697. La relación entre la respuesta cromatográfica y la concentración de cada curva de calibración fue ajustada a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados para metformina. Para cuantificar las muestras plasmáticas, la regresión fue realizada a través del software Mass Hunter B.08 Quantitative Analysis.

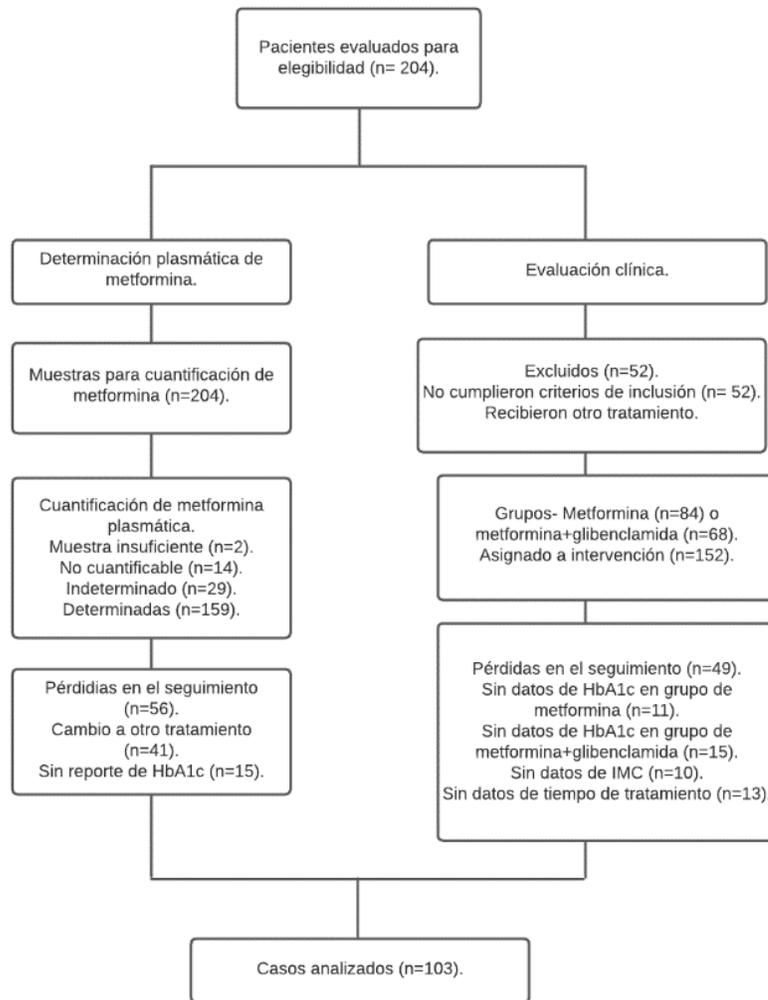
Los pacientes fueron citados por su respectivo médico tratante, teniendo un periodo de al menos 8 h de ayuno. Todas las muestras de sangre fueron tomadas dentro de un intervalo de 8 h después de la dosis diaria de metformina. Una muestra de sangre venosa periférica de 10 mL fue extraída usando tubos EDTA Vacutainer. La muestra fue centrifugada a 400x g por 5 minutos a 4°. Una vez que el plasma fue obtenido, las alícuotas se realizaron usando tubos Eppendorf y las muestras fueron

congeladas a -80°C hasta que la determinación del fármaco fuera realizada simultáneamente en todos los pacientes.

8.6.3. Evaluación clínica.

De los 204 pacientes inicialmente evaluados, 52 fueron eliminados debido a que no cumplían criterios de inclusión. De estos, 152 permanecieron en observación, 26 no tuvieron HbA1c reportada en sus expedientes y 23 no tenían reporte de concentración plasmática de metformina, así, solo 103 pacientes fueron aptos para el análisis del biomarcador (Esquema 1) (Ortega-Ayala et al., 2022).

Los pacientes fueron reclutados de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: (i) Pacientes que estuvieran bajo tratamiento con metformina o la terapia combinada metformina+glibenclamida, (ii) Los pacientes debían estar bajo un régimen de esquema terapéutico de por lo menos 3 meses; (iii) Que las características y antecedentes de los pacientes estuvieran accesibles en el expediente clínico correspondiente al centro, particularmente los datos de dosis de fármacos (incluyendo los agentes hipoglucemiantes) durante lo anteriormente mencionado, por 3 meses; (iv) Los expedientes clínicos debían contener parámetros antropométricos (WHO, 1995) y reportes de laboratorio clínico realizados en el Hospital Regional en un número de clave para variables bioquímicas (incluyendo HbA1c a través de HPLC, en un Variant II Turbo 2.0 Bio-Rad, Hercules CA, USA; glucosa en ayuno, colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos, creatinina por fotometría en un analizador químico AU480, Beckman Colter, Brea CA, USA). Una base de datos fue creada para recuperar y analizar la información de 103 pacientes incluidos en el estudio. La revisión de los expedientes fue realizada a través de un muestreo probabilístico aleatorio.



Esquema 1. Diagrama de flujo CONSORT de la muestra del estudio.

Tomado de: (Ortega-Ayala et al., 2022)

8.7.- Análisis estadístico.

La distribución de los datos fue evaluada a través de la prueba de Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov según fuera necesario. Las variables con distribución normal son mostradas con media y desviación estándar mientras que, las variables con libre distribución son mostradas con mediana y rangos intercuartilares. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a (i) Control o no control de HbA1c; (ii) Tipo de tratamiento; y (iii) polimorfismos de *SLC22A1* (OCT1), *SLC22A2* (OCT2), *SLC22A3* (OCT3), *ABCB1* y *CYP2C9*, donde %HbA1c y concentración plasmática de metformina fueron evaluados. Variables con distribución normal fueron comparadas con la prueba t de Student mientras que, variables con libre distribución fueron comparadas con la prueba U de Mann Whitney. Cuando se compararon variables con libre distribución entre 3 grupos, la prueba de Kruskal-Wallis fue empleada. Las variables cualitativas fueron comparadas usando la prueba Chi cuadrada de Pearson o la prueba exacta de Fisher cuando fuera necesario. Las variables ordinales fueron comparadas a través de la prueba U de Mann Whitney. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis fueron realizados usando SPSS versión 23 para Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

8.7.1. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas.

Las frecuencias alélicas fueron contadas y los valores esperados fueron calculados para cada genotipo. Un valor de $p > 0.05$ definió que las frecuencias se encontraban en Equilibrio de Hardy-Weinberg, calculado a través de la prueba Chi cuadrada de Pearson.

8.7.2. Regresión logística.

Nos enfocamos en los hallazgos estadísticamente significativos de HbA1c por genotipos de cada SNPs, dichos genotipos fueron rs72552763 y rs622342 en OCT1, rs1128503 y rs2032582 en *ABCB1* (tabla 7).

Un modelo codominante fue realizado para cada SNP, asumiendo que cada genotipo implicaba un riesgo diferente para la variable dependiente, la cual fue el no control definido como HbA1c $\geq 7\%$. Adicionalmente, cada SNP se le realizó un modelo de regresión logística simple o múltiple aplicando un modelo genotípico dominante. El modelo múltiple fue ajustado de acuerdo a edad, tiempo de tratamiento, tipo de tratamiento e IMC, los cuales muestran OR (IC95%) en cada caso. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Un segundo modelo de regresión logística múltiple fue realizado considerando rs72552763 y rs622342 en OCT1 y rs1128503 y rs2032582 en *ABCB1* como diplotipos. Los valores de referencia para las variables cualitativas fueron IMC de menos de 25 Kg/m², terapia con metformina, y para ambos polimorfismos fue el heterocigoto y el homocigoto recesivo en cada modelo de los polimorfismos analizados. La variable dependiente fue no control definido por HbA1c $\geq 7\%$. Las referencias fueron seleccionadas de esta forma para explorar el riesgo de no control para un paciente con un IMC ≥ 25 Kg/m², con terapia combinada y portador de los genotipos GAT/GATrs72552763 con A/Ars622342 en un primer modelo y C/Crs1128503 con G/Grs2032582 en un segundo modelo.

9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1 Características generales de los pacientes por agrupados por tipo de tratamiento.

Se agruparon a los pacientes de acuerdo al tipo de tratamiento recibido ya sea metformina (n= 59) o la terapia combinada metformina + glibenclamida (n=44) (Tabla 3). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso evaluado en kilogramos siendo más alto en los pacientes que toman la monoterapia con metformina ($p= 0.022$), caso similar para la evaluación del índice de masa corporal ($p= 0.020$) estos datos no concuerdan con una de las reacciones adversas más comúnmente adjudicadas a la metformina que es la pérdida de peso y por el contrario, en caso de la glibenclamida una ganancia discreta en el peso (Khan et al., 2021; Morantes-Caballero, 2017) sin embargo este hallazgo es similar al reportado por Menjivar et al., 2020. Una posible explicación de este hallazgo es el hecho de encontrar diferencias estadísticas en el tiempo de tratamiento en años, siendo de 3 (1.25 – 7.5) en pacientes que toman metformina y de 7.5 (3 – 14.5) en pacientes que toman la monoterapia. El síndrome metabólico y la presencia de diabetes están asociados, con una tasa de conversión anual a diabetes cercana al 10%, por lo que es posible que este hallazgo sea secundario al síndrome metabólico que dio origen a la DT2 (Ogura et al., 2017) y en el caso de un peso inferior en los pacientes con la terapia combinada, es posible al efecto de disminución de la metformina aunado a la sarcopenia que es resultado de un inadecuado control glucémico (Kassper, 2016) y es que, precisamente estos pacientes tienen mayores niveles de HbA1c comparado con los pacientes que toman la monoterapia ($p<0.001$) así como la prevalencia de no control que es de 88.6% en el grupo de la terapia combinada y de 27.5% en el grupo de la monoterapia ($p<0.001$). En cuanto a la prevalencia de no control, en nuestra muestra fue de 56.5%, resultado un tanto distinto al 11.6% nacional que se puede constatar en la base de datos de la ENSANUT 2020 COVID 19 y menor que la reportada en la ENSANUT 2012 que fue de 75% para el no control glucémico definido por HbA1c $\geq 7\%$ (ADA, 2022; IMSS, 2018).

Tabla 3. Datos antropométricos y de bioquímica clínica de pacientes con diabetes tipo 2 (DT2) agrupados por tipo de tratamiento.

Variable	Metformina n= 59 (57.3%)	Metformina + Glibenclamida n= 44 (42.7%)	p valor
Edad (años)	55.8 ±10.83	53.11 ±11.28	0.225 ^t
Peso (Kg)	78.83 ±16.73	71.72 ±13.39	0.022 ^{*t}
Sexo "n" (%)			
Femenino	42 (71.2%)	31 (70.5%)	0.936 ^{xi}
Masculino	17 (28.8 %)	13 (29.5%)	
Periodo de tratamiento (Años)	3 (1.25 – 7.5)	7.5 (3 – 14.5)	<0.001 ^{*U}
IMC (Kg/m ²)	31.92 ±6.29	29.23 ±4.81	0.020 ^{*t}
Peso normal	4 (6.8%)	7 (15.9%)	0.074 ^U
Sobrepeso	20 (33.9%)	19 (43.2%)	
Tipo de obesidad			
I	18(30.5%)	8 (18.2%)	
II	12 (20.3%)	8 (18.2%)	
III	5 (8.5%)	2 (4.5%)	
Concentración plasmática de metformina (ng/mL)	290.75 (107.69-815.02)	570.91 (170.58-1043.33)	0.203 ^U
Glucosa (mg/dL)	115.5 (102-157)	192.5 (139-238.5)	< 0.001 ^{*U}
HbA1c %	6.4 (5.9-7.3)	9.05 (7.55-10.9)	< 0.001 ^{*U}
Control	43 (72.9%)	5 (11.4%)	< 0.001 ^{*xi}
No control	16 (27.1%)	39 (88.6%)	
Colesterol total (mg/dL)	175.05 ±39.46	182.1 ±33.78	0.360 ^t
Control	41 (70.7%)	27 (67.5%)	0.736 ^{xi}
No control	17 (29.3%)	13 (32.5%)	
Colesterol LDL (mg/dL)	91.41 ±32.43	103.69 ±29.89	0.105 ^t
Colesterol HDL (mg/dL)	41 (34.55-45.75)	41.5 (36.8 -47.2)	0.806 ^U
Triglicéridos (mg/dL)	194 (131-223.5)	157 (131-252)	0.925 ^U
Control	16 (29.1%)	17 (44.7%)	0.121 ^{xi}
No control	39 (70.9%)	21 (55.3%)	
Tasa de filtración glomerular (MDRD- 4)	93.4 (87.81-115.16)	103.4 (89.23-131.7)	0.329 ^U
Dosis de metformina (mg/día)	1700 (850-1700)	2125 (1700-2550)	0.001 ^{*U}
Dosis diaria de metformina (mg/kg/día)	19.25 (11.92-25.84)	29.2 (21.55-34.21)	<0.001 ^{*U}

VARIABLES con distribución normal son presentadas con Media y ± desviación estandar, variables con libre distribución son presentadas con mediana y rangos intercuantiles 25-75%, ^t Prueba t de Student, ^U Prueba U de Mann Whitney, ^{xi} Prueba Chi cuadrada de Pearson, * Significancia estadística (p<0.05).

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con diabetes tipo 2 (n= 103).

Gen	SNP	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas			*P=		
		GAT/GAT	del/GAT	del/del	GAT	del				
SLC22A1 (OCT1)	rs72552763	0.427 (44)	0.447 (46)	0.126 (13)	0.650	0.349	0.984			
	rs622342	0.398 (41)	0.388 (40)	0.214 (22)	0.592	0.407	0.138			
SLC22A2 (OCT2)	rs316019	0.913 (94)	0.078 (8)	0.01 (1)	0.951	0.048	0.265			
	rs2076828	0.757 (78)	0.204 (21)	0.039 (4)	0.859	0.140	0.280			
SLC22A3 (OCT3)	rs1128503	0.262(27)	0.437 (45)	0.301 (31)	0.48	0.519	0.447			
	rs1045642	0.35 (36)	0.447 (46)	0.204 (21)	0.556	0.443	0.674			
ABCB1	rs2032582	0.330 (34)	0.417 (43)	0.165 (17)	0.019 (2)	0.058 (6)	0.573	0.387	0.039	0.879
	rs1799853 (*2)	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*3	*1	*2	*3		
CYP2C9	rs1057910 (*3)	0.825 (85)	0.097 (10)	0.068 (7)	0.01 (1)	0.907	0.053	0.038	0.848	
	rs1934969 (IVS8-109A>T)	0.661 (69)	0.328 (27)	0.041 (7)	0.81	0.19	0.197			

*P Para prueba de Chi cuadrada para prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.

9.2 Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg.

Analizamos las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes en la tabla 4. Hasta donde es de nuestro conocimiento, se reporta por primera vez las frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con diabetes tipo 2 de los polimorfismos más frecuentes del gen *ABCB1*: en el exón 12 C1236T (rs1128503), en el exón 21 G2677T/A (rs2032582) y en el exón 26 C3435T (rs1045642) (D. Wang & Sadée, 2006). Todos los polimorfismos de los genes analizados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p>0.05$).

9.3.- Frecuencias genotípicas de los pacientes agrupados según el criterio de control de HbA1c.

Como se muestra en la tabla 5, no encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias de pacientes con adecuado control glucémico versus inadecuado control definido por HbA1c. Nuestros resultados son diferentes a los hallazgos reportados por Menjivar et al., 2020 para el caso de las frecuencias en rs72552763 , en nuestro estudio, encontramos frecuencias de control y no control muy similares entre los genotipos GAT/GAT (47.9% vs 38.2%) a diferencia del estudio de Menjivar donde la diferencia en frecuencia es de hasta 4 veces más en los no controlados (33 vs 107; $p=0.011$) pudiendo considerar al genotipo GAT/GAT como un genotipo de riesgo para el no control glucémico. En este estudio tampoco encontraron diferencias en las frecuencias de rs622342 de *SLC22A1*. Nuestros hallazgos incluso encuentran una frecuencia de no control mayor en el heterocigoto y una menor proporción en el homocigoto recesivo del/del, que son resultados un poco más apegados a los hallazgos de (Shu, 2009). Sin embargo, nuestros hallazgos no son estadísticamente significativos.

Tabla 5. Eficacia terapéutica por SNP en pacientes con DT2 agrupados por criterio de control de %HbA1c.

Gene	SNP	Genotipo	Control (n= 48) HbA1c <7 (%)	No control (n=55) HbA1c ≥7 (%)	*p valor
SLC22A1 (OCT1)	rs72552763	GAT/GAT	23 (47.9%)	21 (38.2%)	0.392
		del/GAT	18 (37.5%)	28 (50.9%)	
		del/del	7 (14.6%)	6 (10.9%)	
	rs622342	A/A	22 (45.8%)	19 (34.5%)	0.324
		A/C	15 (31.3%)	25 (45.5%)	
		C/C	11 (22.9%)	11 (20%)	
SLC22A2 (OCT2)	rs316019	C/C	43 (89.6%)	51 (92.7%)	0.425
		A/C	5 (10.4%)	3 (5.5%)	
		A/A	0 (0%)	1 (1.8%)	
SLC22A3 (OCT3)	rs2076828	C/C	40 (83.3%)	38 (69.1%)	0.232
		C/G	7 (14.6%)	14 (25.5%)	
		G/G	1 (2.1%)	3 (5.5%)	
ABCB1	rs1128503	C/C	13 (27.1%)	14 (25.5%)	0.710
		C/T	19 (39.6%)	26 (47.3%)	
		T/T	16 (33.3%)	15 (27.3%)	
	rs2032582	G/G	17 (35.4%)	17 (31.5%)	0.662
		G/T	21 (43.8%)	22 (40.7%)	
		T/T	8 (16.7%)	9 (16.7%)	
		T/A	0 (0%)	2 (3.7%)	
	rs1045642	G/A	2 (4.2%)	4 (7.4%)	0.520
		C/C	15 (31.3%)	21 (38.2%)	
C/T		21 (43.8%)	25 (45.5%)		
CYP2C9	rs1799853	T/T	12 (25%)	9 (16.4%)	0.261
		*1/*1	39 (81.3%)	46 (83.6%)	
		*1/*2	7 (14.6%)	3 (5.5%)	
	rs1057910	*1/*3	2 (4.2%)	5 (9.1%)	0.643
		*2/*3	0	1 (1.8%)	
	rs1934969	A/A	30 (62.5%)	39 (70.9%)	0.643
A/T		14 (29.2%)	13 (23.6%)		
		T/T	4 (8.3%)	3 (5.5%)	

*p para prueba de Chi cuadrada.

9.4.- Concentración plasmática de metformina en pacientes agrupados según criterio de control por HbA1c y terapia recibida.

Un apartado importante en nuestro trabajo es que reportamos la concentración plasmática de metformina, teniendo una mediana de 290.75 ng/ml en el grupo que recibe metformina como monoterapia y de 570.91 ng/ml en el grupo que recibe la terapia combinada con resultados un tanto similares al consenso reportado como concentración plasmática de metformina normal en seres humanos 0.1 mg/L a 4mg/L (Khan et al., 2021). Aunque no evaluamos el aclaramiento renal, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de metformina para rs72552763 y posiblemente el aclaramiento renal de metformina sea semejante en ambas poblaciones al tener las mismas concentraciones plasmáticas ($p= 0.358$) en pacientes con HbA1c<7% y ($p=0.820$) en pacientes con HbA1c \geq 7%, un hallazgo que puede ser interpretado de manera similar a los hallazgos de (Tzvetkov et al., 2009). En cuanto al caso del polimorfismo rs316019 de OCT2 que es principalmente expresado en células tubulares renales, en teoría se esperaría encontrar diferencias en las concentraciones plasmáticas de metformina ya que, OCT2 tiene una función principalmente excretora (Lai, 2013) además, los hallazgos reportados por Leabman et al., 2002 donde se muestra que los valores de la Km (Constante de Michaelis Menten) son diferentes en el genotipo de referencia comparado con el genotipo de la variante, se pudo haber visto reflejado en las concentraciones plasmáticas de metformina de nuestros pacientes, sin embargo no se hallaron diferencias al comparar entre pacientes controlados y no controlados y tampoco entre genotipos de cada subgrupo (Tabla 6 y figura 2).

Hallamos diferencias estadísticas para las concentraciones plasmáticas de metformina en el polimorfismo rs1128503 para genotipo CT, sin embargo, este hallazgo no concuerda con lo reportado por (Llaudó et al., 2013) quien menciona que la mayor actividad de la P-gp está dada por 1236CC y no por 1236CT. La P-gp como bomba de eflujo debería dar como resultado una mayor concentración plasmática de metformina en el genotipo CC, luego en el CT y finalmente en el TT, pero no fue posible replicarlo en nuestros hallazgos, es posible que en un análisis

estratificado por dosis pudiera observarse este efecto. Para el caso de rs2032582, se encontró diferencia al comparar entre los pacientes controlados y no controlados en el genotipo G/T, en su trabajo, Llaudó et al., 2013 encuentra que la mayor actividad de P-gp está dada por el alelo GT, sin embargo, no solo encontramos diferencias en la concentración plasmática de metformina al comparar grupos de pacientes por estatus de control sino que, a pesar de no haber diferencias estadísticamente significativas, las concentraciones plasmáticas de metformina en el genotipo GT dentro del grupo no controlado y el grupo controlado, son de las más bajas de los genotipos de rs2032582 (Tabla 6). Otro Hallazgo estadísticamente significativo fue encontrado para el genotipo CT de rs1045642, al comparar entre estatus de control ($p= 0.002$) y al comparar por genotipo dentro del grupo de pacientes controlados ($p=0.014$) en este caso, lo que reporta Llaudó et al., 2013 es que la mayor actividad de la P-gp se observa para los genotipos CC y CT de rs1045642, sin embargo, nuestros hallazgos indican que las concentraciones de metformina son más bajas en el genotipo CT comparado con el genotipo CC y TT de rs1045642 (Tabla 6 y figura 3). No se encontró significancia estadística al evaluar las concentraciones plasmáticas de metformina con los diferentes diplotipos de CYP2C9 (Tabla 6 y figura 4). Hallazgos similares a los ya descritos y discutidos pueden ser observados en la tabla 7 al agrupar por tratamiento.

Tabla 6. Concentración plasmática de metformina en pacientes con DT2 agrupados por genotipo y por control de %HbA1c.

Gen	SNP	Genotipo	Control (ng/mL) mediana (RIC 25-75%) [n]	No control (ng/mL) mediana (RIC 25-75%) [n]	p
SLC22A1 (OCT1)	rs72552763	GAT/GAT	376.9 (133.4 – 763) [17]	481.7 (185.9 – 971) [17]	0.812
		del/GAT	137.1 (66.47 687.4) [14]	790.6 (228.8 – 1030.2) [27]	0.115
		del/del	139.1 (107.6 – 264.3) [6]	785.6 (70.2 – 1642.7) [5]	0.792
		p	0.358	0.820	
	rs622342	A/A	339.7 (129.8 – 700.9) [16]	526.3 (169 – 1000.9) [16]	0.616
		A/C	102.6 (57.2 – 737.7) [12]	725 (254.5 – 969) [23]	0.141
C/C		157.8 (132.1 – 687.4) [9]	795.4 (70.2 – 1642.7) [10]	0.604	
	p	0.381	0.821		
SLCA22A2 (OCT2)	rs316019	C/C	151.9 (105.2 – 687.4) [34]	648.2 (183.3 – 1030.9) [46]	0.098
		A/C	302.5 (283.4 – 589.5) [3]	804 (507.4 – 1025.8) [3]	0.827
		A/A	[0]	[0]	-
		p	0.373	0.646	
SLC22A3 (OCT3)	rs2076828	C/C	144.3 (105.2 – 763) [30]	685.7 (126.9 – 1030.2) [35]	0.286
		C/G	320.6 (157.8 – 618.8) [6]	611 (386.1 – 880.8) [11]	0.122
		G/G	1321.6 [1]	1030.9 (723.9 – 1336.8) [3]	-
		p	0.734	0.634	
ABCB1	rs1128503	C/C	763 (264.3 – 1321.6) [9]	526.3 (146 – 1004.7) [14]	0.450
		C/T	139.8 (90.3 – 649.7) [16]	844.7 (481.7 -1095.1) [22]	0.011*
		T/T	150.1 (113.9 – 402.6) [12]	219.8 (70.2 – 530.7) [13]	0.624
		p	0.233	0.066	
	rs2032582	G/G	496.5 (107.6 – 815) [13]	788.1 (146 – 1055.6) [16]	0.539
		G/T	181.1 (118.2 – 768.5) [17]	491.4 (185.9 – 884.2) [18]	0.041*
T/T		526.3 (142.5 – 752.7) [6]	210.8 (72.9 – 869.7) [9]	0.955	
	p	0.584	0.733		
CYP2C9	rs1045642	T/A	- [0]	2286 (1348.7 – 3223.2) [2]	-
		G/A	105.2 [1]	428.9 (199.6 – 1158.2) [3]	-
			p	0.014 ^k	0.692
	rs1799853 (*2)	C/C	700.9 (133.4 – 1321.6) [10]	785.6 (233.3 – 1017.8) [19]	0.891
		C/T	116.3 (85.7 – 157.8) [17] [‡]	530.7 (185.9 – 1095.1) [21]	0.002*
T/T		414.4 (264.3 – 876.5) [10]	290.5 (72.9 – 901.4) [9]	0.568	
rs1057910 (*3)	*1/*1	200.68 (111.5 – 815) [29]	725 (210.8 – 1030.9) [41]	0.222	
	*1/*2	278.9 (92.9 – 481.5) [7]	107.8 (89 – 126.9) [3]	0.425	
	*2/*2	- [0]	- [0]	-	
	p	0.753	0.077		
rs1934969	*1/*3	157.85 [1]	712.3 (376.7 – 2078.2) [4]	-	
	*2/*3	- [0]	1705.38 [1]	-	
	*3/*3	- [0]	- [0]	-	
		p	0.770	0.374	
	A/A	151.9 (106.4 – 649.7) [24]	530.7 (210.8 – 1088.9) [33]	0.051	
	A/T	451.6 (80.5 – 1321.3) [10]	785.6 (290.5 – 971) [13]	0.620	
	T/T	133.4 (122.5 – 474.2) [3]	22.817 (15.9 – 539.2) [3]	0.513	
	p	0.770	0.374		

*Prueba U de Mann Whitney <0.05. ^k P<0.05 Prueba de Kruskal Wallis. [‡] P<0.05 para pruebas posthoc entre genotipos.

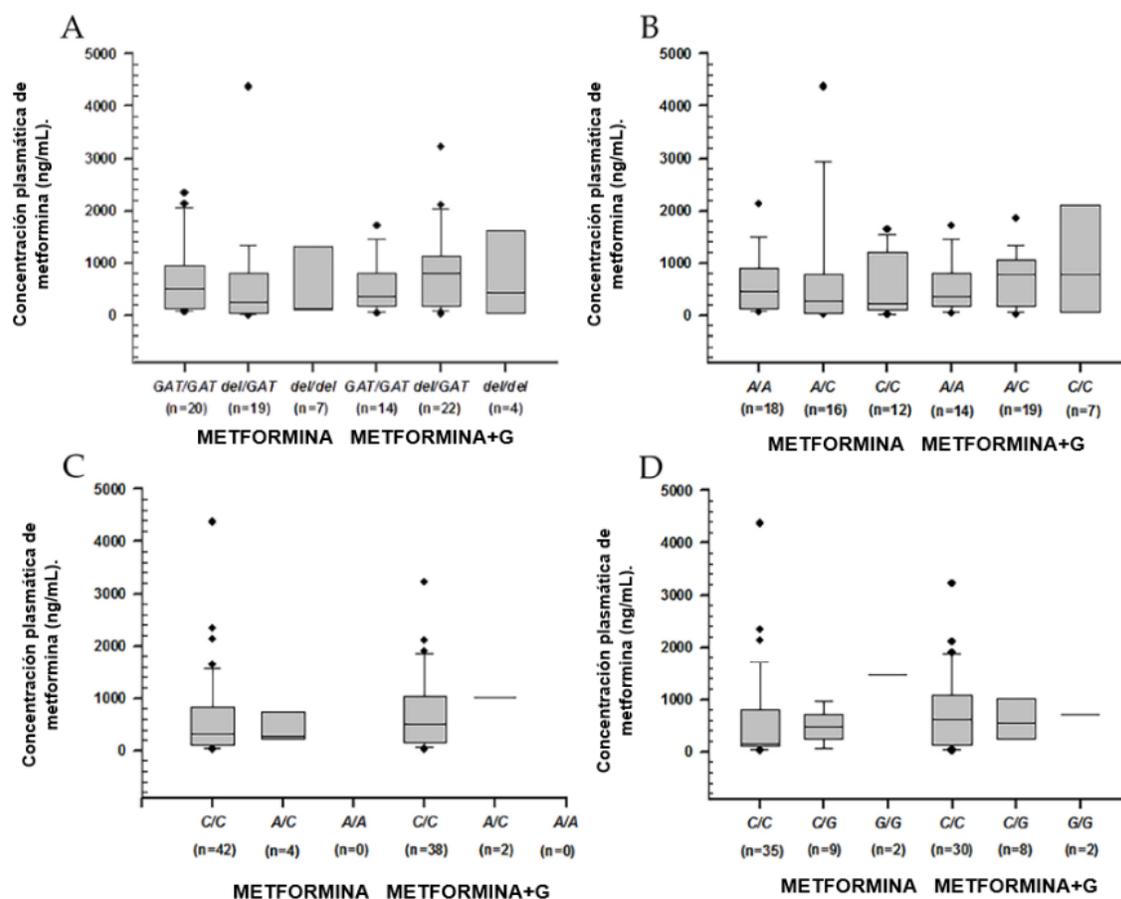


Figura 2. Gráfico de cajas de la concentración plasmática de metformina (ng/mL), incluyendo medianas, rangos intercuartiles y puntos atípicos (círculos negros). (A) rs72552763 (OCT1). (B) rs622342 (OCT1). (C) rs316019 (OCT2). (D) rs2076828 (OCT3). Los datos están agrupados de acuerdo a genotipo y tipo de tratamiento (metformina del lado izquierdo y metformina+glibenclamida del lado derecho). No se observan diferencias estadísticas.

En un análisis de regresión lineal (figura 5) realizado por subgrupos terapéuticos tomando como eje de las ordenadas las concentraciones plasmáticas de metformina y como eje de las abscisas la dosis de metformina mg/kg/día, se encontró correlación positiva en el genotipo CT en los pacientes que toman metformina $B= 26.202$, $p= 0.017$, $r^2= 0.252$, estos hallazgos son congruentes con lo que reporta (Llaudó et al., 2013) ya que, al estratificar por dosis utilizada en el grupo que solo recibe metformina, se puede observar que a mayor dosis, mayor concentración plasmática de metformina ($p=0.017$) lo que puede ser derivado de una mayor actividad de la P-gp como se ha reportado previamente.

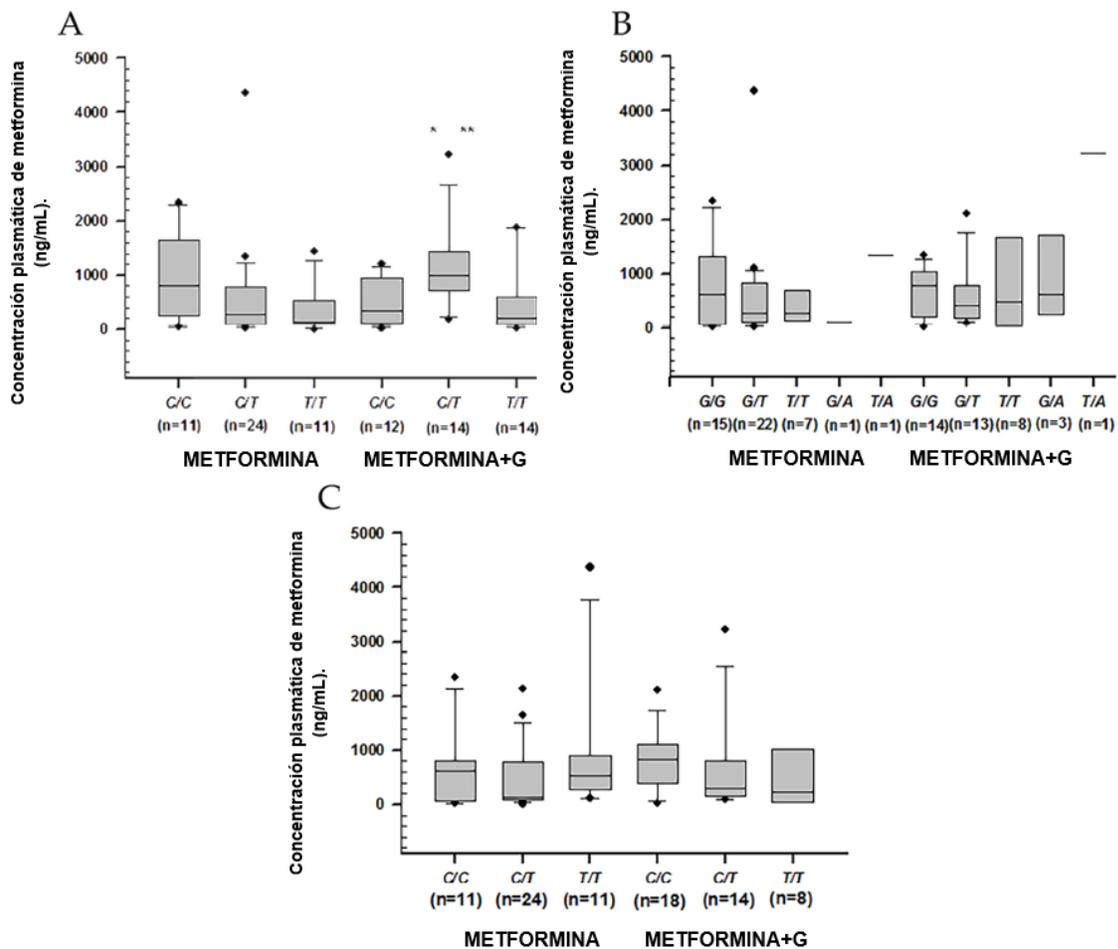


Figura 3. Gráfico de cajas de la concentración plasmática de metformina (ng/mL), incluyendo medianas, rangos intercuartiles y valores atípicos (círculos negros). (A) rs1128503. (B) rs2032582. (C) rs1045642. Todos de *ABCB1*. Metformina a la izquierda, metformina+glibenclamida a la derecha de acuerdo con genotipo. Solo el genotipo C/T de rs1128503 reporta diferencias estadísticas extragrupo (**p=0.002) e intragrupo (*p=0.007).

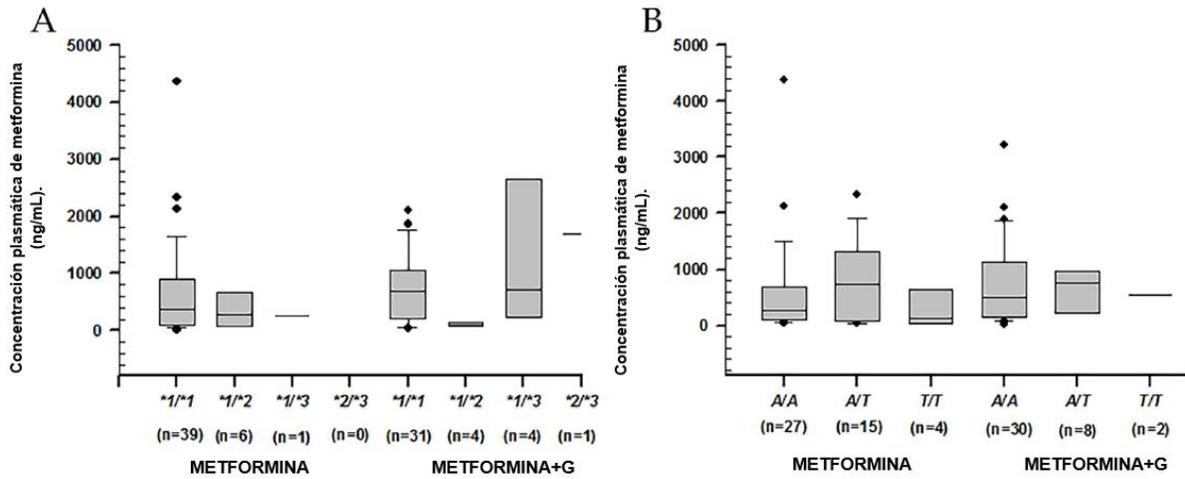


Figura 4. Gráfico de cajas de la concentración plasmática de metformina (ng/mL), incluyendo medianas, rangos intercuartiles y valores atípicos (círculos negros). (A) rs1799853 (*1/*2) y rs1057910 (*1/*3) en *CYP2C9*. (B) rs1934969 (IVS8-109 A/T) en *CYP2C9*. Metformina a la izquierda y metformina+glibenclamida a la derecha de acuerdo a genotipo. No se observaron diferencias estadísticas intra o extra grupo.

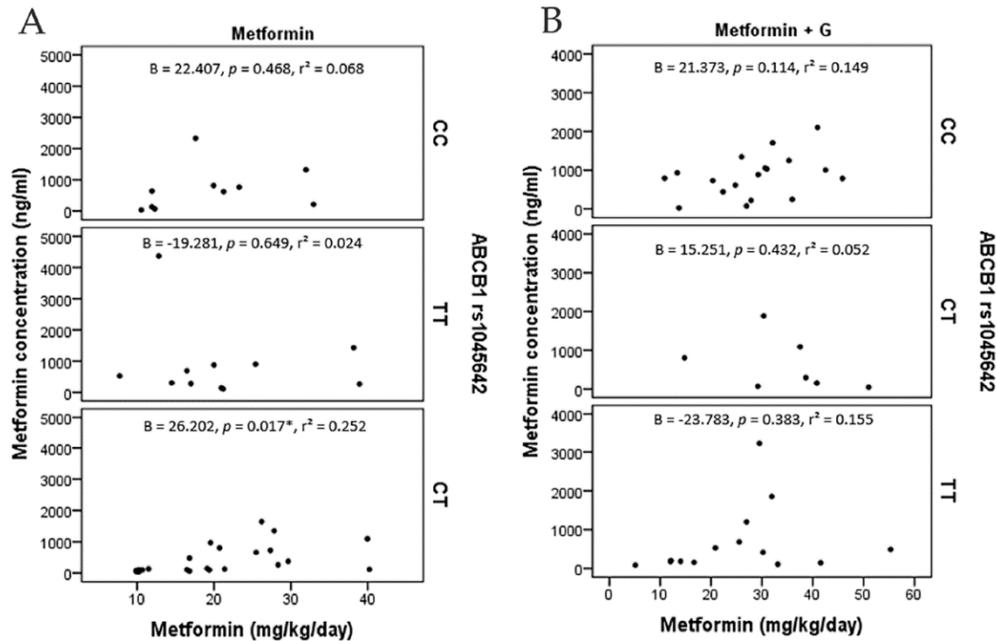


Figura 5. Gráfico de dispersión de concentración de metformina (ng/mL) y dosis de metformina (mg/Kg/día). Se muestra coeficiente angular de regresión con p valor y coeficiente de determinación. (A) Pacientes que reciben la monoterapia con metformina agrupados por genotipo de *ABCB1* rs1045642. (B) Pacientes que reciben metformina+glibenclamida agrupados por genotipo de *ABCB1* (rs1045642). El genotipo C/T presenta una correlación positiva entre pacientes que reciben la monoterapia con metformina (*: $p=0.017$).

Tabla 7. Concentración plasmática de metformina en pacientes con DT2 agrupados por tratamiento y genotipo.

Gene	SNP	Genotype	Metformin (ng/mL) median (IQR 25-75%) [n]	Metformin+Glibenclamide (ng/mL) median (IQR 25-75%) [n]	p
SLC22A1 (OCT1)	rs72552763	GAT/GAT	504 (129.8 – 923.7) [20]	366 (185.9 – 731) [14]	0.861
		del/GAT	262.1 (57.2 – 765.1) [19]	797.3 (183.3 – 1088.9) [22]	0.067
		del/del	146.1 (119.9 – 792.9) [7]	427.9 (46.2 – 1336.3) [4]	0.705
		<i>p</i>	0.463	0.459	
	rs622342	A/A	451.6 (126.1 – 876) [18]	366 (185.9 – 731) [14]	0.939
		A/C	270.5 (57.2 – 770) [16]	790.6 (215.1 – 1030.2) [19]	0.154
C/C		237.5 (119.9 – 1063.4) [12]	785.6 (114 – 1994.8) [7]	0.447	
	<i>p</i>	0.639	0.682		
SLCA22A2 (OCT2)	rs316019	C/C	327.9 (105.2 – 815) [42]	511 (157.8 – 1030.9) [38]	0.272
		A/C	283.4 (237 – 589.5) [4]	1025 (804 – 1247.5) [2]	0.165
		A/A	[0]	- [0]	-
		<i>p</i>	0.755	0.238	
SLC22A3 (OCT3)	rs2076828	C/C	146.1 (102.6 – 810.1) [35]	608.2 (146 – 1055.6) [30]	0.206
		C/G	481.7 (264.3 – 687.4) [9]	551.2 (268.7 – 939.7) [8]	0.564
		G/G	1482.2 (1321.6 – 1642.7) [2]	723.9 (416.8 – 1030.9) [2]	0.121
		<i>p</i>	0.120	0.878	
ABCB1	rs1128503	C/C	815 (441.5 – 1482.2) [11]	344.2 (126.9 – 897.6) [12]	0.124
		C/T	282.3 (98.9 – 765.1) [24]	994.5 (731 – 1344.1) [14] *	0.002*
		T/T	142.5 (113.9 – 402.6) [11]	210.2 (85.7 – 530.7) [14]	0.511
		<i>p</i>	0.075	0.007^k	
	rs2032582	G/G	618.8 (87 – 1068.3) [15]	788.1 (219.8 – 1030.9) [14]	0.513
		G/T	282.3 (100 – 805.3) [22]	416.8 (185.9 – 685.7) [13]	0.339
		T/T	278.9 (176.6 – 606.8) [7]	478 (58 – 1472.3) [8]	1.000
		T/A	1348.7 [1]	3223.2 [1]	-
		G/A	105.28 [1]	611 (428.9 – 1158.2) [3]	-
		<i>p</i>	0.884	0.442	
rs1045642	C/C	618.8 (99.9 – 789) [11]	837.4 (441.6 – 1055.6) [18]	0.164	
	C/T	139.1 (98.9 – 765.1) [24]	308.7 (157.8 – 685.7) [14]	0.204	
	T/T	526.3 (271.6 – 888.8) [11]	221.3 (58 – 946.5) [8]	0.322	
	<i>p</i>	0.258	0.175		
CYP2C9	rs1799853 (*2)	*1/*1	376.9 (109.6 – 888.8) [39]	685.7 (210.2 – 1043.3) [31]	0.244
		*1/*2	290.7 (100 – 660.5) [6]	96.8 (78 – 126.9) [4] *	0.201
		*2/*2	- [0]	- [0]	-
	rs1057910 (*3)	*1/*3	262.76 [1]	712.3 (324.6 – 2078.7) [4]	-
		*2/*3	- [0]	1705.3 [1]	-
		<i>p</i>	0.483	0.035^k	
	rs1934969	A/A	262.1 (112 – 673.9) [27]	511 (157.8 – 1088.9) [30]	0.190
A/T		725 (191.5 – 1146.3) [15]	758.3 (238.2 – 910.8) [8]	0.897	
T/T		122.5 (60.2 – 474.2) [4]	539.2 (22.8 – 1055.6) [2]	0.643	
	<i>p</i>	0.344	0.870		

*P<0.05 for Mann Whitney's U test . ^kP<0.05 for Kruskal Wallis test. * P<0.05 for post-hoc test between genotypes.

Tabla 8. Hemoglobina glicada (HbA1c) en pacientes con DT2 agrupados por tratamiento y genotipo.

Gen	SNP	Genotipo	Metformina (%HbA1c) mediana (RIC 25-75%) [n]	Metformina+Glibenclamida (%HbA1c) mediana (RIC 25-75%) [n]	p
SLC22A1 (OCT1)	rs72552763	GAT/GAT	6 (5.7- 6.8) [28] †	9.4 (8.5 – 11.2) [16]	<0.001*
		del/GAT	6.5 (6.2 – 9.2) [22]	8.3 (7.3 – 10.4) [24]	0.023*
		del/del	6.5 (6.4 – 6.8) [9]	10.1 (8.4- 11.3) [4]	0.045*
		p	0.022 †	0.221	
	rs622342	A/A	6 (5.8 – 6.5) [25]	9.4 (8.5 – 11.2) [16]	<0.001*
		A/C	6.4 (6.1 – 7.7) [19]	8.7 (7.5 – 10.9) [21]	0.001*
C/C		6.8 (6.4 – 9.3) [15] †	8.3 (7.1 – 9.8) [7]	0.397	
	p	0.009 †	0.332		
SLCA22A2 (OCT2)	rs316019	C/C	6.4 (5.9 – 7.2) [52]	9 (7.6 – 10.9) [42]	<0.001*
		A/C	6.2 (5.8 – 8.1) [6]	8.4 (7.3 – 9.5) [2]	0.180
		A/A	8.1 [1]	[0]	-
		p	0.818	0.573	
SLC22A3 (OCT3)	rs2076828	C/C	6.3 (5.9 – 6.9) [46]	8.9 (7.5 – 10.5) [32]	<0.001*
		C/G	6.4 (5.9 – 8.2) [11]	9.9 (7.7 – 12.2) [10]	0.022*
		G/G	8.6 (6.6 – 10.7) [2]	8.6 (7.3 – 9.9) [2]	1.000
		p	0.336	0.452	
ABCB1	rs1128503	C/C	6.1 (5.7 – 6.3) [15]	10.1 (9 – 11.8) [12]	<0.001*
		C/T	6.6 (6.2 – 8.4) [28] †	8.5 (7.5 -10.5) [17]	0.007*
		T/T	6.2 (5.9 – 6.7) [16]	8.5 (7.3 – 10.1) [15]	0.007*
		p	0.021 †	0.056	
	rs2032582	G/G	6.1 (5.7 – 6.3) [19]	9.9 (8.2 – 11.1) [15]	<0.001*
		G/T	6.8 (6.4 – 8.1) [27] †	8.6 (7 – 9.4) [16]	0.058
		T/T	6.2 (6 – 6.3) [9]	8.8 (7.4 – 10.1) [8]	0.002*
		T/A	14.9 [1]	8.3 [1]	-
		p	0.009 †	0.156	
	rs1045642	G/A	6.5 (6.2 – 7.4) [3]	11 (10.9 – 13.3) [3]	0.050
C/C		6.1 (5.9 – 6.6) [17]	9.9 (7.9 – 10.9) [19]	<0.001*	
C/T		6.5 (6.1 – 8.1) [29]	8.7 (7.3 – 9.4) [17]	0.024*	
	p	0.160	0.511		
CYP2C9	rs1799853 (*2)	*1/*1	6.4 (5.9 – 7.3) [50]	9.2 (7.5 – 10.7) [35]	<0.001*
		*1/*2	6.2 (5.5 – 6.5) [6]	8.8 (6.7 – 10.7) [4]	0.165
		*2/*2	- [0]	- [0]	-
	rs1057910 (*3)	*1/*3	8.3 (7.2 – 8.4) [3]	8.3 (7 – 10.6) [4]	1.000
		*2/*3	- [0]	11 [1]	-
		p	0.352	0.811	
	rs1934969	A/A	6.4 (6.1 – 7.6) [35]	8.7 (7.5 – 11) [34]	<0.001*
A/T		6.5 (5.9 – 7.3) [19]	9.4 (8 – 10.2) [8]	0.003*	
T/T		6.2 (6 – 6.2) [5]	10.4 (10.3 – 10.5) [2]	0.051	
	p	0.808	0.611		

*P<0.05 Para prueba U de Mann Whitney . † P<0.05 Para prueba de Kruskal Wallis. ‡ P<0.05 para prueba posthoc entre genotipos.

9.5.- Niveles de HbA1c en pacientes agrupados por tipo de tratamiento.

En la tabla 8, donde se agruparon a los pacientes por tipo de tratamiento, se evaluaron los niveles de HbA1c por genotipo y por tipo de tratamiento recibido. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en varios SNPs al comparar por tipo de tratamiento, sin embargo, estos hallazgos pueden ser explicados porque los pacientes que reciben la terapia combinada tienen un mayor tiempo de tratamiento 7.5 (3 – 15.4) comparado con los que reciben la monoterapia 3 (1.25 – 7.5) $p < 0.001$. Este hallazgo resalta aún más lo reportado desde la tabla 1, donde se muestra que los pacientes que recibe la terapia combinada tienen mayores niveles de HbA1c y glucosa en ayuno. Como se comentó anteriormente, este hallazgo puede ser secundario al tiempo de tratamiento de cada grupo. Kahn et al., 2006, reportó que la ocurrencia de falla terapéutica a la metformina se encontró dentro de los primeros 5 años en el 21% de los casos y en nuestra muestra, los pacientes que tienen la terapia combinada tenían una mediana de 7.5 años de tratamiento. Hallazgos clínicamente significativos fueron los que se encontró al analizar el subgrupo que recibe la monoterapia al comparar entre genotipos de rs72552763, donde se encontró que los niveles de HbA1c son diferentes entre genotipos ($p = 0.022$), identificando que el valor de HbA1c podía ser detectado en pacientes portadores del genotipo GAT/GAT ($p < 0.05$). Este hallazgo es congruente con lo reportado por Shu et al., 2009, donde demostró que la captación de metformina en pacientes con la delección era 3.4 veces menor comparado con aquellos portadores del genotipo GAT. Nuestros resultados no son similares a los reportados por Menjivar et al.; 2020, ya que, en su estudio, encontró que la mayor proporción de pacientes no controlados pertenecía a los portadores del genotipo GAT/GAT, la diferencia entre el estudio de Menjivar y el nuestro, fue que nosotros estratificamos a la población y estos hallazgos son encontrados en pacientes que solo toman metformina. Otro hallazgo relevante fue el que se reporta para los pacientes que toman la monoterapia con metformina, ya que los niveles de HbA1c son diferentes al comparar en este subgrupo por genotipos para el polimorfismo rs622342 ($p = 0.009$) determinando que el valor menor de HbA1c fue encontrado en los pacientes

portadores del genotipo AA comparado con los genotipos AC y CC ($p < 0.05$). Este hallazgo es discordante con lo reportado por (Umamaheswaran et al., 2011) donde se reportó que los individuos portadores del genotipo CC tenían una mayor disminución de glucosa en ayuno sin embargo nuestros hallazgos son concordantes con lo reportado en un estudio realizado por (Umamaheswaran et al., 2015), donde reportan mediante un modelo dominante que los portadores del alelo C tienen un mayor riesgo de falta de respuesta a metformina de [OR:3.85 (IC95%: 1.61 – 9.19); $p = 0.001$].

Otro análisis por genotipos donde obtuvimos hallazgos estadísticamente significativos fue para rs1128503, donde se encontró diferencias entre los niveles de HbA1c de los pacientes que reciben la monoterapia con metformina ($p = 0.021$), encontrando que los niveles más altos de HbA1c se encontraban en los portadores del genotipo C/T ($p < 0.05$). De los pocos estudios en pacientes con DT2 donde evalúan rs1128503, no se encontró asociación entre la variante y la susceptibilidad a diabetes, sin embargo, Llaudó et al., 2013, reportan que la mayor actividad de la P-gp se encuentra en los portadores del alelo C, lo cual pudiera explicar que al tener mayor función de bomba, la metformina se encontrará por más tiempo en el espacio intravascular, pudiendo ser aprovechada por los hepatocitos donde la metformina puede ejercer su acción sin embargo, si esta aseveración fuera correcta, hallazgos similares serían encontrado para portadores del genotipo CC, lo cual no pudimos demostrar. Un caso similar fue el encontrado para el polimorfismo rs2032582, donde los niveles de HbA1c fueron diferentes entre los genotipos de los pacientes que reciben la monoterapia con metformina ($p = 0.009$) encontrando los valores más altos de HbA1c para el genotipo GT. , Llaudó et al., 2013 reportan que los portadores del alelo mayor tienen mayor actividad de la P-gp, sin embargo, los niveles de HbA1c más elevados son solo encontrados en los pacientes con el genotipo GT y no para el GG, por lo que los hallazgos que encontramos, no pueden ser atribuidos a una mayor o menor actividad de la P-gp.

9.6.- Análisis de regresión logística entre SNPs estudiados y control según HbA1c.

Aquellos polimorfismos donde encontramos diferencias estadísticamente significativas, fueron utilizados para crear modelos genotípicos codominantes y dominantes (Tabla 9) sin embargo, no logramos encontrar asociación con ningún genotipo y la respuesta a fármacos, cabe mencionar que los análisis fueron realizados en los 103 pacientes, por lo que los modelos incluyeron a los pacientes que reciben la monoterapia y la terapia combinada.

Tabla 9. Regresión logística en modelos genotípicos de *ABCB1* y *OCT1* para el no control de HbA1c en la población total de pacientes con DT2 (n=103).

Gen (SNP)	Control	No control	OR (IC95%)	p-valor
<i>OCT1</i> (rs72552763)				
GAT/GAT	23	21	1.0 (ref)	
del/GAT	18	28	1.704 (0.738 – 3.935)	0.212
del/del	7	6	0.939 (0.272 – 3.246)	0.920
Modelo genotípico dominante				
Del/del + del/GAT vs GAT/GAT	25/23	34/21	1.490 (0.679 – 3.266)	0.320
^a Del/del + del/GAT vs GAT/GAT	25/23	34/21	1.207 (0.395 – 3.691)	0.741
<i>OCT1</i> (rs622342)				
AA	22	19	1.0 (ref.)	
AC	15	25	1.930 (0.795 – 4.685)	0.146
CC	11	11	1.158 (0.411 – 3.266)	0.782
Modelo genotípico dominante				
CC + AC vs AA	26/22	36/19	1.603 (0.724 – 3.549)	0.244
^a CC + AC vs AA	26/22	36/19	1.914 (0.603 – 6.080)	0.271
<i>ABCB1</i> (rs1128503)				
CC	13	14	1.0 (ref.)	
CT	19	26	1.271 (0.487 – 3.316)	0.624
TT	16	15	0.871 (0.310 – 2.445)	0.792
Modelo genotípico dominante				
TT + CT vs CC	35/13	41/14	1.088 (0.451 – 2.621)	0.851
^a TT + CT vs CC	35/13	41/14	1.817 (0.494 – 6.691)	0.369
<i>ABCB1</i> (rs2032582)				
GG	17	17	1.0 (ref.)	
GT	21	22	1.048 (0.426 – 2.576)	0.919
TT	8	9	1.125 (0.351 – 3.609)	0.843
TA	0	2	-	
GA	2	4	2 (0.322 – 12.414)	0.457
Modelo genotípico dominante				
GA + TA + TT+ GT vs GG	31/17	37/17	1.194 (0.523 – 2.722)	0.674
^a GA + TA + TT+ GT vs GG	31/17	37/17	1.933 (0.582 – 6.425)	0.282

^aAjustado para edad, periodo de tratamiento, tratamiento farmacológico e IMC.

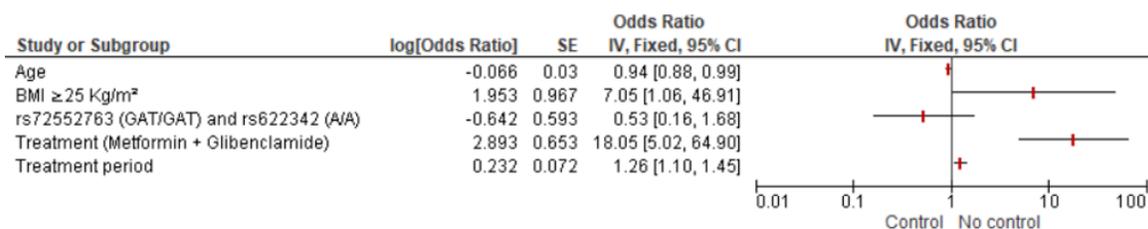
En un análisis exploratorio de regresión logística múltiple, encontramos asociación con la edad en años, el tiempo de tratamiento en años, el IMC mayor a 25 kg/m² y el tipo de tratamiento recibido, siendo este último en el que se encontró el OR mayor, tanto en el modelo que consideró los genotipos GAT/GAT + AA de rs72552763 y rs622342 respectivamente y el modelo que consideró CC + GG de rs1128503 y rs2032582 (Tabla 10 y figura 6).

Tabla 10. Regresión logística múltiple para el no control de HbA1c en pacientes con DT2 usando un modelo genotípico dominante para *SLC22A1* (rs72552763 y rs622342) y *ABCB1* (rs1128503 y rs2032582) (n=103).

OCT 1				
Variable	B	Error estándar	p-valor	O.R. (IC95%)
Edad (años)	-0.066	0.030	0.026*	0.936 (0.883 – 0.992)
Tiempo de tratamiento (Años)	0.232	0.072	0.001*	1.261 (1.094 – 1.452)
IMC ≥25Kg/m ²	1.953	0.967	0.043*	7.049 (1.059 – 46.895)
rs72552763 rs622342 GAT A	-0.642	0.593	0.279	0.526 (0.165 – 1.683)
Tratamiento (metformina + glibenclamida)	2.893	0.653	<0.001*	18.05 (5.015 – 64.969)
ABCB1				
Edad (años)	-0.072	0.030	0.017*	0.930 (0.877 – 0.987)
Tiempo de tratamiento (Años)	0.240	0.072	0.001*	1.271 (1.105 – 1.462)
IMC ≥25Kg/m ²	2.211	1.088	0.042*	9.128 (1.083 – 76.966)
rs1128503 rs2032582 C G	-1.026	0.738	0.164	0.358 (0.084 – 1.522)
Tratamiento (metformina + glibenclamida)	2.887	0.666	<0.001*	17.933 (4.858 – 66.205)

B: Coeficiente de regresión, O.R: Odds ratio, IC95%: Intervalo de confianza al 95%. * Significancia estadística (p<0.05).

A



B

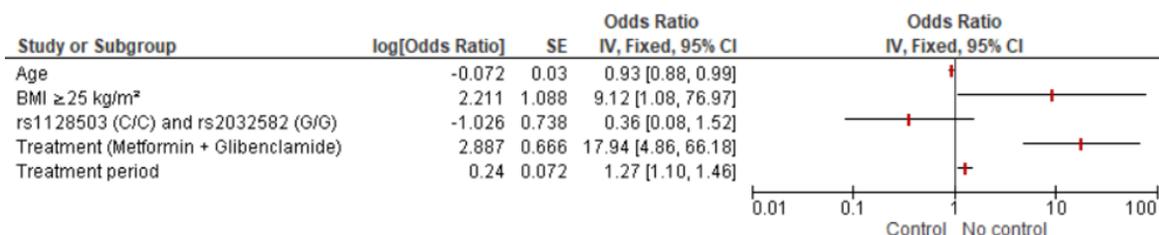


Figura 6. Forest plot de covariables asociadas al control glucémico definido por HbA1c. A) Covariables con los genotipos de OCT1 GAT/GAT + A/A de rs72552763 y rs622342 respectivamente. B) Covariables con los genotipos de ABCB1 C/C + G/G de rs1128503 y rs2032582 respectivamente.

9.7.- Análisis de la dosis de metformina por genotipo con los pacientes agrupados por tipo de tratamiento.

Además, realizamos comparaciones de la dosis diaria de metformina mg/kg/día agrupando por tipo de tratamiento y por genotipo de cada polimorfismo de *ABCB1* estudiado. Encontrando diferencias estadísticamente significativas para el genotipo CT de rs1128503, el genotipo GG de rs2032582 y los genotipos CC y TT de rs1045642 al comparar entre tratamientos, pero no encontramos diferencias al comparar entre genotipos. Estos hallazgos pueden ser secundarios a que los pacientes que reciben la terapia combinada suelen recibir dosis límite de metformina y existe la posibilidad de que el efecto de los genotipos de los polimorfismos de *ABCB1* no estén asociados la dosis necesaria de metformina para buscar el control en pacientes mexicanos con DT2.

Tabla 11. Dosis diaria de metformina mg/kg/día entre pacientes con DT2 agrupados por tratamiento y genotipo.

Gene	SNP	Genotype	Metformin (mg/kg/day) median (IQR 25-75%) [n]	Metformin+Glibenclamide (mg/kg/day) median (IQR 25-75%) [n]	p
ABCB1	rs1128503	C/C	18.78 (12.28 – 25.41) [14]	26.98 (18.19 – 34.53) [12]	0.057
		C/T	19.12 (11.92 – 26.08) [27]	29.27 (23.16 – 35.31) [17]	0.001*
		T/T	20 (11.78 – 24.42) [15]	29.7 (16.66 – 31.95) [14]	0.127
		p	0.969	0.971	
	rs2032582	G/G	16.48 (11.93 – 23.28) [17]	26.98 (21.35 – 32.04) [15]	0.011*
		G/T	19.78 (12.99 – 27.33) [26]	24.35 (15.34 – 32.83) [16]	0.170
		T/T	20 (16.48 – 21.19) [9]	31.95 (29.77 – 39.15) [7]	0.064
		T/A	27.82 [1]	29.51 [1]	-
		G/A	10.24 (10.02 – 10.85) [3]	32.11 (28.44 – 34.03) [3]	0.050
			p	0.118	0.356
	rs1045642	C/C	12.29 (11 – 22.65) [16]	27.86 (23.21 – 33.71) [19]	0.001*
		C/T	19.56 (12.93 – 27.39) [27]	25.55 (16.66 – 30.35) [17]	0.152
		T/T	20 (14.5 – 21.19) [13]	37.5 (29.77 – 39.71) [7]	0.019*
		p	0.298	0.156	

*P<0.05 for Mann Whitney's U test . ^κ P<0.05 for Kruskal Wallis test. [¥] P<0.05 for post-hoc test between genotypes.

10.- CONCLUSIONES.

- 1.- Todos los polimorfismos analizados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.
- 2.- Los polimorfismos de *OCT1*, *OCT2*, *OCT3*, *CYP2C9* y *ABCB1* no tienen asociación con el control glucémico definido por los niveles de glucosa en ayuno y HbA1c en pacientes que reciben tratamiento con metformina o metformina + glibenclamida.
- 3.- En el grupo que recibe la monoterapia con metformina, los pacientes con genotipo GAT/GAT (rs72552763) del gen *SLC22A1*, tienen los niveles de HbA1c más bajos ($p=0.022$).
- 4.- Los pacientes que toman la monoterapia con metformina y que son portadores del genotipo C/C (rs622342) del gen *SLC22A1*, tienen mayores niveles de HbA1c ($p=0.009$).
- 5.- Los pacientes que reciben la monoterapia con metformina y que son portadores del genotipo C/T (rs1128503) del gen *ABCB1*, tienen mayores niveles de HbA1c ($p=0.021$).
- 6.- Los pacientes que toman la monoterapia y que son portadores del genotipo G/T (rs2032582) del gen *ABCB1*, tienen mayores niveles de HbA1c ($p=0.009$).
- 7.- Un modelo de regresión logística múltiple, arrojó que existe asociación entre la edad en años, el IMC mayor a 25 Kg/m², el tiempo de tratamiento y el tipo de tratamiento y el no control definido por HbA1c.

10.1 Limitaciones.

1.- La reducción del tamaño de la muestra puede influir en la amplitud de los intervalos de confianza y, existe la posibilidad de caer en un error tipo II para variables cuantitativas.

2.- El estudio fue realizado bajo condiciones de la vida real, el apego terapéutico, dietético y de hábitos de ejercicio no ha sido específica o especialmente controlado.

3.- La diabetes es una enfermedad multifactorial, existen covariables que, es posible que no estemos estudiando, como, por ejemplo:

- Otros genes que influyen en farmacocinética y farmacodinamia de los fármacos estudiados.
- Genes que involucran síntesis y transporte de glucosa.
- Secreción de insulina.
- Actividad física.
- Tabaquismo.

4.- El uso actual de nuevas terapias para el control de la enfermedad, puede estar cambiando los hábitos de prescripción.

11.- ASPECTOS ÉTICOS.

Antes de la realización de las pruebas, cada paciente será informado verbalmente y por escrito, de los objetivos, protocolos y características de los estudios (ANEXO 1).

Los estudios serán realizados de acuerdo a las normas y objetivos de la Declaración de Helsinki, adoptada en la 18ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, Junio de 1964), revisada por la 29ª Asamblea Médica Mundial (Tokio, Japón, Octubre de 1975), por la 35ª Asamblea Médica Mundial (Venecia, Italia, Octubre de 1983) (World Medical Association) y la Declaración de Helsinki, Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, enmendada por la 59ª Asamblea General de la asociación médica mundial, Seúl, Corea, octubre 2008. Se apegan a todas las disposiciones que establece el capítulo I (De los aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos) y las del Capítulo II (De la investigación Farmacológica), del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, a la Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2002, Instalación y operación de la farmacovigilancia, Norma Oficial Mexicana NOM-166-SSA1-1997, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos, y a la Ley General de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.

12.- ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD.

No hay riesgos para bioseguridad.

13.- REFERENCIAS.

1. ADA. (2022). Professional Practice Committee: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(January), S3. <https://doi.org/10.2337/dc22-SPPC>
2. Afroz, A., Alam, K., Hossain, M. N., Biswas, A., Ali, L., Magliano, D. J., & Billah, B. (2019). Burden of macro- and micro-vascular complications of type 2 diabetes in Bangladesh. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(2), 1615–1622. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.03.001>
3. Al-Eitan, L. N., Almomani, B. A., Nassar, A. M., Elsaqa, B. Z., & Saadeh, N. A. (2019). Metformin pharmacogenetics: Effects of SLC22A1, SLC22A2, and SLC22A3 polymorphisms on glycemic control and HBA1c levels. *Journal of Personalized Medicine*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/jpm9010017>
4. Becker, M. L., Visser, L. E., Van Schaik, R. H. N., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., & Stricker, B. H. C. (2010). Interaction between polymorphisms in the OCT1 and MATE1 transporter and metformin response. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(1), 38–44. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328333bb11>
5. Castelán-Martínez, O. D., Hoyo-Vadillo, C., Bazán-Soto, T. B., Cruz, M., Tesoro-Cruz, E., & Valladares-Salgado, A. (2018). CYP2C9*3 gene variant contributes independently to glycaemic control in patients with type 2 diabetes treated with glibenclamide. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 43(6), 768–774. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12710>
6. Chen, E. C., Liang, X., Yee, S. W., Geier, E. G., Stocker, S. L., Chen, L., & Giacomini, K. M. (2015). Targeted disruption of organic cation transporter 3 attenuates the pharmacologic response to metformin. *Molecular Pharmacology*, 88(1), 75–83. <https://doi.org/10.1124/mol.114.096776>
7. Christensen, M. M. H., Brasch-Andersen, C., Green, H., Nielsen, F., Damkier, P., Beck-Nielsen, H., & Brosen, K. (2011). The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(12), 837–850. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32834c0010>
8. Cuautle-Rodríguez, P., Rodríguez-Rivera, N., DE ANDRÉS, F., Castillo-Nájera, F., Llerena, A., & Molina-Guarneros, J. A. (2019). 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*, 10(5), 283–295. <https://doi.org/10.3892/br.2019.1204>
9. Daly, A. K., Rettie, A. E., Fowler, D. M., & Miners, J. O. (2018). Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and clinical considerations. *Journal of Personalized Medicine*, 8(1), 1–31. <https://doi.org/10.3390/jpm8010001>
10. David L. Nelson, M. M. C. (2019). *Lehninger. Principios de bioquímica* (B. Omega (ed.); 7a

- ed.).
11. DOF. (2020). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. *DOF - Diario Oficial de La Federación*, 8. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013
 12. Ebid, A.-H. I. M., Ehab, M., Ismail, A., Soror, S., & Mahmoud, M. A. (2019). The influence of SLC22A1 rs622342 and ABCC8 rs757110 genetic variants on the efficacy of metformin and glimepiride combination therapy in Egyptian patients with type 2 diabetes. *Journal of Drug Assessment*, 8(1), 115–121. <https://doi.org/10.1080/21556660.2019.1619571>
 13. Fierro, A. (2009). Nefropatía Diabética: Progressing and Epidemiology. *Revista Medica Clinica Condesa*, 20(5), 7–8. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3544/1/56T00460UDCTFC.pdf>
 14. Flores-Alfaro, E., Burguete-García, A. I., & Salazar-Martínez, E. (2012). Temas de actualidad / Current topics Diseños de investigación en epidemiología genética. *Rev Panam Salud Publica*, 31(1), 88–94. <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v31n1/13.pdf>
 15. Frenzel, D., Köppen, C., Bauer, O. B., Karst, U., Schröter, R., Tzvetkov, M. V., & Ciarimboli, G. (2019). Effects of single nucleotide polymorphism Ala270ser (Rs316019) on the function and regulation of hOCT2. *Biomolecules*, 9(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom9100578>
 16. Gutiérrez, J., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., & Hernández-Ávila, M. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*. 722.
 17. Hemauer S, L. Patrievka Svetrlana, N. T. (2010). Role of human placental apical membrane transporters in the efflux of glyburide, rosiglitazone, and metformin. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.035>.Role
 18. Huang, C., & Florez, J. C. (2011). Pharmacogenetics in type 2 diabetes: Potential implications for clinical practice. *Genome Medicine*, 3(11). <https://doi.org/10.1186/gm292>
 19. IMSS. (2009). Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento de la Cardiopatía Isquémica Crónica. In *Instituto Mexicano del Seguro Social*. <https://bit.ly/3bgcbUy>
 20. IMSS. (2014). Retinopatía Diabética en Primer Nivel de Atención. *Catálogo Mestro De Guías De Práctica Clínica*.
 21. IMSS. (2017). Diagnóstico y Tratamiento de la Evidencias y Recomendaciones Enfermedad cerebrovascular. In *Gpc*. [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/Cat](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/Cathttp://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS-706-14-TxDermatitisatopica/706GER.pdf)<http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS-706-14-TxDermatitisatopica/706GER.pdf>
 22. IMSS. (2018). *Diagnóstico y Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en el Primer Nivel de Atención. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. México, Instituto Mexicano del Seguro Social*. 55. <http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc>
 23. International Diabetes Federation. (2021). International Diabetes Federation. In *Diabetes*

24. Islam, T., Rahman, M. S., Paul, N., Akhteruzzaman, S., & Sajib, A. A. (2018). Allele-Specific Detection of SLC22A2 rs316019 Variants Associated with Metformin Disposition through the Kidney. *Dubai Diabetes and Endocrinology Journal*, 24(1–4), 22–28. <https://doi.org/10.1159/000493584>
25. Jiménez, S. V., Fernández, I., & Martínez, D. V. (2017). *Actualización en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la neuropatía diabética periférica*. 69(3), 174–181.
26. Kahn, S. E., Haffner, S. M., Heise, M. A., Herman, W. H., Holman, R. R., Jones, N. P., Kravitz, B. G., Lachin, J. M., O'Neill, M. C., Zinman, B., & Viberti, G. (2006). Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy. *New England Journal of Medicine*, 355(23), 2427–2443. <https://doi.org/10.1056/nejmoa066224>
27. Kassper, D. L. (2016). *Manual Harrison: Principios de medicina interna* (Vol. 19, Issue December).
28. Khan, R., Patay, Z., Klimo, P., Huang, J., Kumar, R., Boop, F., Raches, D., Conklin, H. M., Sharma, R., Simmons, A., Sadighi, Z., Onar-Thomas, A., Gajjar, A., & Robinson, G. (2021). Cellular and molecular mechanisms of metformin action. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 0813(April), 1–11.
29. Kim, H. G., Hien, T. T., Han, E. H., Hwang, Y. P., Choi, J. H., Kang, K. W., Kwon, K. II, Kim, B. H., Kim, S. K., Song, G. Y., Jeong, T. C., & Jeong, H. G. (2011). Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- κ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *British Journal of Pharmacology*, 162(5), 1096–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01101.x>
30. Koepsell, H., Lips, K., & Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: Structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical Research*, 24(7), 1227–1251. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9254-z>
31. Lai, Y. (2013). Organic anion, organic cation and zwitterion transporters of the SLC22 and SLC47 superfamily (OATs, OCTs, OCTNs and MATEs). In *Transporters in Drug Discovery and Development*. <https://doi.org/10.1533/9781908818287.455>
32. Laurence L. Brunton et al. (2019). *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica*.
33. Leabman, M. K., Huang, C. C., Kawamoto, M., Johns, S. J., Stryke, D., Ferrin, T. E., DeYoung, J., Taylor, T., Clark, A. G., Herskowitz, I., & Giacomini, K. M. (2002). Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. *Pharmacogenetics*, 12(5), 395–405. <https://doi.org/10.1097/00008571-200207000-00007>
34. Llaudó, I., Colom, H., Giménez-Bonafé, P., Torras, J., Caldés, A., Sarrias, M., Cruzado, J. M., Oppenheimer, F., Sánchez-Plumed, J., Gentil, M. Á., Ekberg, H., Grinyó, J. M., & Lloberas, N. (2013). Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function

- influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transplant International*, 26(2), 177–186. <https://doi.org/10.1111/tri.12018>
35. M Bravo, J. (2001). Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. *Semergen*, 421–432.
 36. Menjivar, M., Sánchez-Pozos, K., Jaimes-Santoyo, J., Monroy-Escutia, J., Rivera- Santiago, C., de los Ángeles Granados-Silvestre, M., & Ortiz-López, M. G. (2020). Pharmacogenetic Evaluation of Metformin and Sulphonylurea Response in Mexican Mestizos with Type 2 Diabetes. *Current Drug Metabolism*, 21(4), 291–300. <https://doi.org/10.2174/1389200221666200514125443>
 37. Mezcuca, J. A. Z., Segovia, J. C. M., Ruiz, J. P. N., Alonso, M. J. C., & Martínez, I. F. (2000). Complicaciones crónicas en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 atendidos en un centro de salud. *Atencion Primaria / Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria*, 25(8), 529–535. [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(00\)78562-3](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(00)78562-3)
 38. Morantes-Caballero. (2017). Metformin: beyond the glycemic target. *Revista De Los Estudiantes De Medicina De La Universidad Industrial De Santander*, 30(1), 15. <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v30n1/0121-0319-muis-30-01-00057.pdf>
 39. Naja, K., Salami, A., & Shamieh, S. El. (2020). *Glycemic Response in Individuals with Type 2 Diabetes Mellitus Receiving Metformin / Sulfonylurea Combination Therapy: 6-Month Follow-Up Study*. 6–13.
 40. Nasykhova, Y. A., Tonyan, Z. N., Mikhailova, A. A., Danilova, M. M., & Glotov, A. S. (2020). Pharmacogenetics of type 2 diabetes—progress and prospects. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186842>
 41. NCBI. (2022a). *NCBI CYP2C9*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1559>
 42. NCBI. (2022b). *NCBI SLC22A1*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6580>
 43. NCBI. (2022c). *NCBI SLC22A2*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6582>
 44. NCBI. (2022d). *NCBI SLC22A3*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6581>
 45. Ogura, Y., Parsons, W. H., Kamat, S. S., & Cravatt, B. F. (2017). Sex and Age Differences in Prevalence and Risk Factors for Prediabetes in Mexican-Americans. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107950>
 46. Olaiz-Fernández, G., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Rojas, R., Villalpando-Hernández, S., Hernández-Avila, M., & Sepúlveda-Amor, J. (2006). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. *Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública*.
 47. Ortega-Ayala, A., Rodríguez-Rivera, N. S., de Andrés, F., Llerena, A., Pérez-Silva, E., Espinosa-Sánchez, A. G., & Molina-Guarneros, J. A. (2022). Pharmacogenetics of Metformin Transporters Suggests No Association with Therapeutic Inefficacy among Diabetes Type 2 Mexican Patients. *Pharmaceuticals*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/ph15070774>

48. Ortega, M. (2021). *Un vistazo a la morfología y dinámica de la mitocondria y los sitios de producción de las especies reactivas de oxígeno*. 40(Abril), 29–38.
49. Reséndiz-Abarca, C. A., Flores-Alfaro, E., Suárez-Sánchez, F., Cruz, M., Valladares-Salgado, A., del Carmen Alarcón-Romero, L., Vázquez-Moreno, M. A., Wachter-Rodarte, N. A., & Gómez-Zamudio, J. H. (2019). 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. *Journal of Clinical Pharmacology*, 59(10), 1384–1390. <https://doi.org/10.1002/jcph.1425>
50. Rizvi, S., Raza, S. T., Mehdi, S. R., Siddiqi, Z., Eba, A., & Mahdi, F. (2017). The relationship between Multidrug Resistance Protein 1(rs1045642) and Cholesterol 24-hydroxylase (rs754203) genes polymorphism with type 2 diabetes mellitus. *British Journal of Biomedical Science*, 74(1), 30–35. <https://doi.org/10.1080/09674845.2016.1264212>
51. Rodríguez-Rivera, N. S., Cuautle-Rodríguez, P., Castillo-Nájera, F., & Molina-Guarneros, J. A. (2017). Identification of genetic variants in pharmacogenetic genes associated with type 2 diabetes in a Mexican-Mestizo population. *Biomedical Reports*, 7(1), 21–28. <https://doi.org/10.3892/br.2017.921>
52. Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gómez-Humarán, I. M., Gaona-Pineda, E. B., Gómez-Acosta, L. M., Rivera-Dommarco, J. Á., & Hernández-Ávila, M. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Publica de Mexico*, 59(3), 299–305. <https://doi.org/10.21149/8593>
53. Rubin, D. A., McMurray, R. G., Harrell, J. S., Hackney, A. C., Thorpe, D. E., & Haqq, A. M. (2008). The association between insulin resistance and cytokines in adolescents: the role of weight status and exercise. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57(5), 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.01.005>
54. Saberi, M., Ramazani, Z., Rashidi, H., & Saberi, A. (2020). The effect of CYP2C9 genotype variants in type 2 diabetes on the pharmacological effectiveness of sulfonylureas, diabetic retinopathy, and nephropathy. *Vascular Health and Risk Management*, 16, 241–248. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S230639>
55. Samara Rodríguez-Rivera, N., Cuautle-Rodríguez, P., & Arcadio Molina-Guarneros, J. (2017). Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México. *Hospital de Juárez Mexico*, 84(4), 203–211. www.medigraphic.com/hospitaljuarezwww.medigraphic.org.mxwww.medigraphic.org.mx
56. Selvin, E., Marinopoulos, S., Berkenblit, G., Rami, T., & Brancati, F. L. (2012). *Meta-Analysis : Glycosylated Hemoglobin and Cardiovascular Disease in*.
57. Sentell, T. L., He, G., Gregg, E. W., & Schillinger, D. (2012). Racial/ethnic variation in prevalence estimates for United States prediabetes under alternative 2010 American diabetes association criteria: 1988-2008. *Ethnicity and Disease*, 22(4), 451–458.
58. Shamah-Levy, T., Romero-Martínez, M., Barrientos-Gutiérrez, T., Cuevas-Nasu, L., Bautista-

- Arredondo, S., Colchero, M., Gaona- Pineda, E., Lazcano-Ponce, E., Martínez-Barnetche, J., Alpuche-Arana, C., & Rivera-Dommarco, J. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020 sobre Covid-19. Resultados nacionales. *Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública*.
59. Shamah-Levy, T., Romero-Martínez, M., Barrientos-Gutiérrez, T., Cuevas-Nasu, L., Bautista-Arredondo, S., Colchero, M., Gaona-Pineda, E., Lazcano-Ponce, E., Martínez-Barnetche, J., Alpuche-Arana, C., & Rivera-Dommarco, J. (2021). *Encuesta Nacional De Salud Y Nutricion 2021 Sobre Covid-19*. 324.
60. Shu, Y. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 2 on the renal elimination of metformin. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(7), 497–504. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32832cc7e9>
61. Srijib, G. (2014). PharmGKB summary: very important pharmacogene information for SLC22A1. *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1097/FPC.000000000000048>. PharmGKB
62. Staiger, H., Schaeffeler, E., Schwab, M., & Häring, H. U. (2015). Pharmacogenetics: Implications for modern type 2 diabetes therapy. *Review of Diabetic Studies*, 12(3–4), 363–376. <https://doi.org/10.1900/RDS.2015.12.363>
63. Standl, E., Khunti, K., Hansen, T. B., & Schnell, O. (2019). The global epidemics of diabetes in the 21st century: Current situation and perspectives. *European Journal of Preventive Cardiology*, 26(2_suppl), 7–14. <https://doi.org/10.1177/2047487319881021>
64. Surendiran, A., Pradhan, S. C., Agrawal, A., Subrahmanyam, D. K. S., Rajan, S., Anichavezhi, D., & Adithan, C. (2011). Influence of CYP2C9 gene polymorphisms on response to glibenclamide in type 2 diabetes mellitus patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 67(8), 797–801. <https://doi.org/10.1007/s00228-011-1013-8>
65. Tian, Y., Wang, J., Liu, Y., Luo, X., Yao, Z., Wang, X., Zhang, Y., Xu, C., & Zhao, X. (2021). MassARRAY multigene screening combined with LDL-C and sdLDL-C detection for more favorable outcomes in type 2 diabetes mellitus therapy. *BMC Medical Genomics*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00937-8>
66. Tornio, A., & Backman, J. T. (2018). Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 83). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2018.04.007>
67. Tzvetkov, M. V., Vormfelde, S. V., Balen, D., Meineke, I., Schmidt, T., Sehrt, D., Sabolić, I., Koepsell, H., & Brockmüller, J. (2009). The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 86(3), 299–306. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.92>
68. Umamaheswaran, G., Praveen, R. G., Arunkumar, A. S., Das, A. K., Shewade, D. G., & Adithan, C. (2011). Genetic analysis of OCT1 gene polymorphisms in an Indian population. *Indian Journal of Human Genetics*, 17(3), 164–168. <https://doi.org/10.4103/0971->

6866.92094

69. Umamaheswaran, G., Praveen, R. G., Damodaran, S. E., Das, A. K., & Adithan, C. (2015). Influence of SLC22A1 rs622342 genetic polymorphism on metformin response in South Indian type 2 diabetes mellitus patients. *Clinical and Experimental Medicine*, 15(4), 511–517. <https://doi.org/10.1007/s10238-014-0322-5>
70. Wang, D., & Sadée, W. (2006). Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: Example ABCB1 (MDR1). *AAPS Journal*, 8(3). <https://doi.org/10.1208/aapsj080361>
71. Wang, Z. J., Yin, O. Q. P., Tomlinson, B., & Chow, M. S. S. (2008). OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: Studies with metformin and cimetidine. *Pharmacogenetics and Genomics*, 18(7), 637–645. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328302cd41>
72. Weizzman Institute of Science. (2022a). *Gene cards CYP2C9*. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2C9&keywords=cyp2c9>
73. Weizzman Institute of Science. (2022b). *Gene cards SLC22A1*. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC22A1>
74. Weizzman Institute of Science. (2022c). *Gene cards SLC22A2*. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC22A2&keywords=slc22a2>
75. Weizzman Institute of Science. (2022d). *Gene cards SLC22A3*. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC22A3&keywords=slc22a3>
76. Yan, R., Luo, J., He, X., & Li, S. (2020). Association between ABC family variants rs1800977, rs4149313, and rs1128503 and susceptibility to type 2 diabetes in a Chinese Han population. *Journal of International Medical Research*, 48(8). <https://doi.org/10.1177/0300060520941347>
77. Yee, J., Heo, Y., Kim, H., Yoon, H. Y., Song, G., & Gwak, H. S. (2021). Association Between the CYP2C9 Genotype and Hypoglycemia Among Patients With Type 2 Diabetes Receiving Sulfonylurea Treatment: A Meta-analysis. *Clinical Therapeutics*, 43(5), 836-843.e4. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.03.008>
78. Zhou, K., Donnelly, L. A., Kimber, C. H., Donnan, P. T., Doney, A. S. F., Leese, G., Hattersley, A. T., McCarthy, M. I., Morris, A. D., Palmer, C. N. A., & Pearson, E. R. (2009). Reduced-function SLC22A1 polymorphisms encoding organic cation transporter 1 and glycemic response to metformin: A GoDARTS study. *Diabetes*, 58(6), 1434–1439. <https://doi.org/10.2337/db08-0896>
79. Zhou, S. F., Zhou, Z. W., & Huang, M. (2010). Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. *Toxicology*, 278(2), 165–188. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.013>

14.- ANEXOS

14.1.- ANEXO 1: Aprobación del proyecto por las comisiones de investigación y ética de la FM.



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

OFICIO NO. FMED/CEI/MHU/017/2020

ASUNTO: Dictamen Proyecto FM/DI/055/2020

Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros
Profesor Titular "C" T.C.
Departamento de Farmacología
P r e s e n t e.

Estimado doctor Molina Guarneros:

Su proyecto FM/DI/055/2020 de título "Frecuencias de los polimorfismos de los genes SLC22A1/OCT1, SLC22A2/OCT2, SLC47A1/MATE1 Y SLC47A2/MATE2, SLC29A4/HENT4 (PMAT), ABCB1 (P-gp/MDR1) y CYP2C9 en pacientes diabéticos tipo 2 mestizos mexicanos y su posible asociación con la eficacia terapéutica" en su versión del 30 de julio de 2020 que incluye el Consentimiento Informado, ha sido APROBADO por el Comité de Ética de la Investigación, en sesión ordinaria de fecha 04 de agosto de 2020, teniendo en consideración el dictamen aprobatorio de la Comisión de Investigación.

- La vigencia del proyecto será de 3 años contados a partir de la fecha de la sesión.
- El proyecto deberá ejecutarse de acuerdo con lo especificado en la versión aprobada.
- Es necesario que envíe al correo de las Comisiones, un informe anual de avance en formato PDF. De lo contrario, se podrá cancelar la vigencia del proyecto.
- Deberá notificar cualquier modificación o enmienda al mismo y esperar la autorización correspondiente.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 06 de agosto de 2020.

LA PRESIDENTA

Marcia Hiriart U.

DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

*MHU/ETF.



14.2.- ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO.
INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

FRECUENCIAS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *SLC22A1/OCT1*, *SLC22A2/OCT2*, *SLC47A1/MATE1* Y *SLC47A2/MATE2*, *SLC29A4/HENT4* (PMAT), *ABCB1*(P-gp/MDR1) y *CYP2C9* EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 MESTIZOS MEXICANOS Y SU POSIBLE ASOCIACIÓN CON LA EFICACIA TERAPÉUTICA.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

SEDE DONDE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO. Hospital Regional de Alta Especialidad Ixtapaluca.

NOMBRE DEL PACIENTE:

Se le ha pedido que participe en este estudio porque hemos considerado que puede ser representativo de la población sana de su país. El propósito de este documento es explicarle en qué consiste el estudio para que le ayude a tomar una decisión sobre la invitación para participar en el mismo. Antes de decidirse a participar, por favor, tome todo el tiempo que necesite para hacer todas las preguntas necesarias. Asimismo, siéntase con la libertad de hablar con cualquier persona, su familia, amigos, médico de atención primaria o cualquier otro profesional de la salud.

Propósito del estudio

La herencia genética puede hacer que una persona responda de una forma distinta a los medicamentos. El estudio de la variabilidad individual de la respuesta a un medicamento debido a factores hereditarios tiene gran importancia médica. Mediante estos estudios, se intenta averiguar por qué algunas personas responden mejor que otras cuando reciben el mismo medicamento. En la población mexicana no se conoce la composición de los tipos de unidades de información hereditaria que determinan la respuesta a varios grupos de medicamentos empleados para el control de la diabetes del adulto (administrados únicamente por vía oral). Tampoco si esta composición influye de manera determinante en el control de esta enfermedad. Esta composición puede influir para que se presente un efecto menor o mayor de los medicamentos utilizados para el control de la diabetes del adulto, inclusive para provocar toxicidad. Por lo que conocer la composición y la frecuencia de su presencia en la población mexicana tiene gran importancia para determinar si un individuo debe recibir las dosis recomendadas de los medicamentos administrados por vía oral para el control de la diabetes del adulto, ó modificarlas para lograr el efecto terapéutico buscado.

Por lo que en una muestra de su sangre se estudiarán aquellas partes (material genético y otros componentes) que puedan afectar a su enfermedad y a la

respuesta al medicamento que emplea para controlar la diabetes del adulto, para lo que se solicitarán datos de sus antecedentes Clínicos.

Este tipo de investigación no tiene como finalidad determinar si otros miembros de su familia corren el riesgo de sufrir alguna enfermedad, ni obtener información relevante que le ayude a tomar la decisión sobre tener hijos o no.

Procedimientos

Si decide participar en el estudio, una persona con experiencia le extraerá una muestra de 10 ml de sangre. Es posible que se le pida una nueva muestra de sangre si durante el procesamiento de la primera hubiera algún problema que le impidiera su utilización. El término “muestra” en este documento, hace referencia tanto a la muestra de su sangre como a sus componentes, incluido el material genético a partir de ella.

Beneficios, riesgos y molestias

Usted no obtendrá ningún beneficio directo por participar en este estudio. Sin embargo, su participación en esta investigación puede ayudar al conocimiento de su capacidad de transformar medicamentos, para mejorar el tratamiento de otras personas con varios tipos de padecimientos.

Los riesgos y molestias físicas de la extracción de sangre para este estudio son los de cualquier extracción de una muestra de sangre de una vena. Puede sufrir un ligero dolor, enrojecimiento, irritación o raramente, infección.

La administración de cualquier fármaco puede causar una reacción alérgica grave, sin embargo es poco probable que esto ocurra. Debido a la baja dosis del medicamento administrada, No se espera que se produzcan efectos del fármaco administrado en esta investigación.

En el caso de que se encuentre algún tipo de enfermedad importante durante el examen clínico, ésta se hará del conocimiento del paciente.

Alternativas

Usted tiene como alternativas participar o no en este estudio.

Revisión de documentos originales, confidencialidad y protección de los datos personales

Información y muestras codificadas

Para proteger su confidencialidad, sus datos médicos, su muestra y sus resultados estarán identificados con una etiqueta en la que sólo aparecerá un código, pero no su nombre ni sus iniciales. A esto se le denomina “información codificada”. El

médico del estudio (y sus colaboradores) guardará un archivo confidencial con la vinculación de este código con su nombre.

Almacenamiento y análisis posteriores de las muestras

El laboratorio de inmunofarmacología almacenará su muestra junto a otras procedentes de éste estudio. y sus colaboradores utilizarán su muestra sólo para el propósito establecido en este documento. En todo momento las muestras se almacenarán en un lugar seguro. El laboratorio exigirá que las personas que trabajan con su muestra respeten la confidencialidad de toda su información y resultados. Realizados los análisis, la muestra será almacenada anonimizada, de tal manera que no podrá relacionarse con usted ni identificarse. En estas condiciones podría ser analizada en otros estudios o por otros investigadores con un Proyecto aprobado por un Comité de Ética e Investigación Clínica correspondiente, y siempre que se respeten los objetivos y principios establecidos en este documento.

Información personal y resultados

El mantenimiento de la confidencialidad es importante para su médico y por ello no incluirá en su historia clínica ninguna referencia a su participación en esta investigación. Sólo se accederá a la parte de la historia clínica cuyos datos sean relevantes para el estudio, y en cualquier caso, se guardará la más estricta confidencialidad de los mismos.

El consentimiento informado que firma para participar en esta investigación, se conservará en un archivo especial y seguro, separado de su historia clínica y que no forma parte de ella. Así, en su historia clínica no aparecerá ningún resultado derivado de esta investigación. Su nombre no aparecerá en ninguna publicación o informe acerca de esta investigación. Su médico controlará el acceso a los archivos que contengan su información médica y los resultados de esta investigación.

Su información médica y resultados de la investigación formarán parte de los medios que permitirá a su médico comprender la respuesta al medicamento, y servirá para desarrollar nuevos medicamentos o pruebas diagnósticas para predecir su respuesta. Su información y sus resultados se almacenarán en una base de datos electrónica de una computadora. Se seguirá la normativa internacional que regula la información almacenada en estas computadoras. Todas las previsiones legales sobre la confidencialidad y acceso a sus datos de carácter personal serán respetadas en este estudio y en los que de él se deriven.

Si su muestra es estudiada, su médico y colaboradores podrán tener acceso a sus resultados. De acuerdo con la legislación vigente, usted tiene derecho a solicitar los resultados de este estudio. Para ello deberá comunicarlo a su médico. El laboratorio

no entregará sus resultados individuales a nadie más a no ser que se le obligue por ley.

Sus resultados son únicamente para investigación y no deben ser utilizados para realizar diagnósticos clínicos o establecer un tratamiento.

Si decide participar en esta investigación, usted autoriza a que su información médica y sus resultados puedan ser revisados por determinadas personas para comprobar que la investigación se realizó correctamente. Estas personas incluyen el personal del laboratorio de inmunofarmacología, a los miembros del equipo investigador, y eventualmente al Comité Ético de Investigación Clínica y a representantes de las autoridades sanitarias.

Aspectos comerciales

Usted no recibirá ninguna ni tampoco se le pedirá una compensación económica por su participación en este estudio o derivada de sus resultados, registros o desarrollos de la investigación.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es voluntaria. Usted tiene las siguientes opciones: participar en este estudio, no participar en él desde el principio, y participar pero luego cambiar de opinión y retirarse en cualquier momento. Tanto si opta por no participar desde el principio como retirarse más adelante, no tiene que dar ninguna explicación al respecto.

Su negativa a participar desde el principio o su abandono una vez iniciado no será motivo de ningún cambio en el tratamiento médico que usted recibe ni en la relación con los investigadores del proyecto.

Si inicialmente decide participar en este estudio pero luego opta por retirarse del mismo, su muestra codificada será destruida y solo se guardará la información ya obtenida hasta ese momento. Sin embargo, una vez anonimizada no será posible identificar su muestra y por tanto destruirla.

Persona de contacto para el estudio

Si tiene preguntas acerca de esta investigación, sobre cualquier daño relacionado con la extracción de sangre o sobre su retirada del estudio, debe contactar en cualquier momento con el Investigador Principal del Proyecto Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros al número de teléfono 5611092747.

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Yo, (nombre y apellidos).....

He leído las hojas de información (3 páginas) que se me han entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio, y las realizadas han sido contestadas satisfactoriamente.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

He tenido tiempo suficiente para considerar de manera adecuada mi participación en el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto no repercute en mis cuidados médicos.

Al firmar este documento doy libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha: .../..... /.....

Fecha: .../..... /.....

Testigo:

Testigo:

.....

.....

Firma del participante:

Firma del Investigador:

(Manuscrita del participante.

.....

.....

Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

14.3.- ANEXO 3: ARTÍCULO EN REVISTA INDIZADA.



pharmaceuticals



Article

Pharmacogenetics of Metformin Transporters Suggests No Association with Therapeutic Inefficacy among Diabetes Type 2 Mexican Patients

Adiel Ortega-Ayala ^{1,2}, Nidia Samara Rodríguez-Rivera ², Fernando de Andrés ³, Adrián Llerena ³, Eliseo Pérez-Silva ⁴, Adriana Guadalupe Espinosa-Sánchez ¹ and Juan Arcadio Molina-Guarneros ^{2,*}

- ¹ Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM, Mexico City 14080, Mexico; ad.orteg@hotmail.com (A.O.-A.); adriana.espinosa9212@gmail.com (A.G.E.-S.)
- ² Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City 14080, Mexico; nidia.rodriguez@comunidad.unam.mx
- ³ INUBE Instituto Universitario de Investigación Biosanitaria de Extremadura, CICAB Clinical Research Centre, Hospital and Medical School of the Extremadura University, 06002 Badajoz, Spain; fandressegura@gmail.com (F.d.A.); allerena@unex.es (A.L.)
- ⁴ Servicio de Medicina Interna, Hospital Regional de Alta Especialidad Ixtapaluca, Secretaría de Salud, Ixtapaluca 56530, Mexico; eliseops99@yahoo.com
- * Correspondence: molina_ja2007@yahoo.com.mx; Tel.: +52-561-109-2747



Citation: Ortega-Ayala, A.; Rodríguez-Rivera, N.S.; Andrés, F.d.; Llerena, A.; Pérez-Silva, E.; Espinosa-Sánchez, A.G.; Molina-Guarneros, J.A. Pharmacogenetics of Metformin Transporters Suggests No Association with Therapeutic Inefficacy among Diabetes Type 2 Mexican Patients. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 774. <https://doi.org/10.3390/ph15070774>

Academic Editor:
Agnieszka Sliwinska

Received: 6 May 2022
Accepted: 16 June 2022
Published: 22 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Mexico has been under official epidemiological alert due to diabetes since 2016. This study presents new information on the frequency and variants of metformin transporters OCT1, OCT2, OCT3, *ABCB1*, and *CYP2C9* variants as well. It also reports the association with HbA1c control on 103 DMT2 patients. They were genotyped through real-time PCR (TaqMan assays) and grouped according to treatment: metformin and metformin + glibenclamide. Metformin plasmatic levels were determined through mass spectrometry. The analysis of HbA1c showed statistical significance across genotypes in polymorphisms rs72552763 ($p = 0.022$), rs622342 ($p = 0.009$), rs1128503 ($p = 0.021$), and rs2032582 ($p = 0.009$) within the monotherapy group. Bivariate analysis found no association between any polymorphism and HbA1c control. Two logistic regression models accounted for two diplotypes in OCT1 and *ABCB1*, including statistically significant covariates. The first model yielded significance in age ($p = 0.026$), treatment period [$p = 0.001$], $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p = 0.043$), and combined therapy ($p < 0.001$). There was no association with *GAT/GAT* of rs72552763 or *A/A* rs622342 in OCT1. The second model yielded significance in age ($p = 0.017$), treatment period ($p = 0.001$), $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p = 0.042$), and combined therapy ($p < 0.001$), finding no association with *C/C* of rs1128503 or *G/G* of rs2032582 in *ABCB1*. Our multinomial logistic regression results may benefit future predictive analyses in diabetic populations.

Keywords: pharmacogenetics; diabetes type 2; metformin; sulphonylureas; transporters; therapeutic inefficacy

1. Introduction

Diabetes mellitus type 2 (DMT2) is a highly prevalent multifactorial and chronic disease characterized by hyperglycemia, insulin resistance, and a decrease in β -cell levels and insulin secretion [1]. It may also give rise to micro- and macro-vascular and neuropathic complications, including nephropathy, coronary artery disease, stroke, peripheral vascular disease, retinopathy, and neuropathy [2]. Globally, DMT2 is one of the most notable premature mortality risk factors, and it currently represents one of the most frequent causes of mortality globally [3]. Mexico holds the sixth largest global DMT2 population, amounting to 8.7 million people. It is estimated that by 2035, this will rise to fifth place with a total of 15.7 million (20–79 years of age) [4]. According to the International Diabetes Federation (IDF), the adjusted prevalence was 13.1% between the 20–79-year-old group in 2017 [5].

On 14 November 2016, the Mexican Secretary of Health declared diabetes and obesity a national epidemiological emergency, a status that prevails today [6]. The Mexican Official Norm NOM-015-SSA2-1994 for diabetes prevention, treatment, and control indicates metformin as the first-choice drug, followed by a combination of metformin-sulphonylurea (SU) [7]. The passage of metformin across cell membranes is heavily dependent on its well-known transporters. The most common variant of *SLC22A2* (OCT2) is involved in cDNA change from G to T in position 808 (G808T), which provokes a change from alanine to serine in codon 270 (Ala270Ser) rs316019. This *SLC22A2* variant has been significantly associated with metformin renal clearance among healthy Chinese patients (18.7% vs. 48.2%, $p = 0.029$) [8]. Chen et al. [9] studied metformin's effect on glucose levels using mice, where variant rs2076828 in *SLC22A3* (OCT3) was associated with a reduced metformin response, because transporters carrying the G allele presented a more pronounced glucose decrease ($p < 0.05$).

Seitz et al. [10] studied 53 populations worldwide and reported that most individuals from Asia and Oceania present fully functional organic cation transporter 1 (OCT1), whereas up to 80% of Latin American ethnicities carry mutations involving OCT1 function loss (major and minor). They also characterized in vitro OCT1 variants on which 10 of its transported substrates were used, including metformin. Mato et al. [11] reported the assessment of rs72552763 (1258_1260del ATG) from the gene-encoding OCT1, *SLC22A1*, across five studies and its frequency variation between 18 and 28%. This report included the association of rs622342 (1386 A > C) with metformin response among three populations (South Indian, Danish, and Caucasian), with a variation of between 5 and 37%. There was no association with HbA1c levels in the Danish population, nor in the Caucasian groups [11]. A study on Caucasian individuals [12] identified a positive association between rs622342 and HbA1c levels ($p = 0.005$) where an average reduction of 0.28% was observed. In contrast, the major A allele of rs622342 from *SLC22A1* displayed a larger probability of responding to metformin treatment in a South Indian population [13].

ABCB1, also known as multi-drug resistance protein 1 (MDRP1), is one of 49 putative members in the superfamily of human adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporters, which encode transporter and channel proteins that function as efflux pumps. Hemauer [14] determined the role of some transporters in the bioavailability of oral hypoglycemics using placental brush border membrane inside-out vesicles (IOVs) and metformin marked with ^{14}C - (specific activity, 50 mCi/mmol). Apparent K_t and V_{max} values in metformin transport regulated by P-glycoprotein 1 (P-gp1) ($100 \pm 85 \text{ nM}$ and $34 \pm 10 \text{ pmol/mg protein X minute}$) highlighted metformin as a high-affinity substrate of placental P-gp used in both monotherapy and combined treatment of gestational diabetes.

Hyung Gyun Kim et al. [15] reported that metformin significantly inhibits the expression of MDR1 by blocking its transcription as it also significantly increases the intracellular accumulation of the fluorescent substrate P-gp-rhodamine-123. Metformin treatment reduces the activity of nuclear factor- κB (NF- κB) and the degradation level of I κB kinase (I κB). Methods employing small interference RNA confirm that a reduction in AMP-activated protein kinase (AMPK) levels mitigates the inhibition of MDR1 activation associated with metformin exposure. AMPK plays an important role in regulating the metformin-induced expression of MDR1.

We recently described the frequencies and clinical implications of *CYP2C9* polymorphisms in DMT2 Mexican-Mestizo patients from Mexico City and we also compared them with reported frequencies from different worldwide analogue populations [16]. Menjivar et al. [17] also reported the polymorphism frequencies of this gene in Mexico City. The majority of Mexican patients with diabetes mellitus type 2 (DMT2) (67.9–85.0%) are prescribed sulphonylureas (SUs), which are metabolized by cytochrome P450 2C9 (abbreviated as *CYP2C9*). SUs are a type of oral anti-diabetic compound that inhibit ATP-sensitive potassium channels, thus inducing glucose-independent insulin release by the β -pancreatic cells. The wide variability reported in SU responses has been attributed to the polymorphisms of *CYP2C9*. The frequency of *CYP2C9**1/*2 is 50% lower among patients with DMT2 compared

with healthy individuals [16]. Considering the widely heterogeneous ethnic background of Mexican populations (which comprise > 65 groups) [18], it is important to further persist in studying the pharmacogenetics of its patients, widening our studies towards OCT1, OCT2, OCT3, and other transporters like *ABCB1* that may be involved, as well as polymorphisms of glibenclamide metabolizing enzymes (*CYP2C9*) in view of its widespread prescription in Mexico.

The aim of the present study is to determine the possible association of polymorphisms OCT1, OCT2, OCT3, *ABCB1*, and *CYP2C9* with HbA1c glyceic control within a sample of DMT2 Mexican-Mestizo patients undergoing metformin or metformin + glibenclamide treatment, as well as identifying those factors associated with glyceic control failure.

2. Results

General Traits of Patient Groups According to Treatment

Biochemical and anthropometric parameters were compared across 103 patients grouped according to treatment type (metformin/metformin + glibenclamide). Statistical significance was found regarding weight, treatment type, and BMI. Fasting glucose levels were 115.5 (102–157) (mg/100 mL) in the monotherapy group and 192.5 (139–238.5) (mg/100 mL) in the combined therapy group ($p < 0.001$). HbA1c levels were 6.4 (5.9–7.3) vs. 9.05 (7.5–10.9) ($p < 0.001$), respectively, for monotherapy and combined therapy. Control proportion defined by %HbA1c was 72.9% in the monotherapy group and 11.4% in combined therapy ($p < 0.001$). This result may be ascribed to the disease's shorter evolution period, as was reported in the patient follow-up, which indicates that residual insulin secretory capacity, having decreased by 50% at the time of diagnosis, had further decreases of 15% six years later [19]. Metformin dosage in the monotherapy group was 1700 (850–1700) mg/day and 2125 (1700–2550) mg/day in combined therapy ($p = 0.001$). Metformin dosage expressed in terms of mg/kg/day was 19.25 (11.9–25.8) vs. 29.2 (21.5–34.2) ($p < 0.001$), respectively, when comparing monotherapy against combined therapy (Table 1).

Table 1. Anthropometric traits and clinical biochemistry of DMT2 patients.

Variable	Metformin <i>n</i> = 59 (57.3%)	Metformin + Glibenclamide <i>n</i> = 44 (42.7%)	<i>p</i> =
Age (years)	55.8 ± 10.83	53.11 ± 11.28	0.225 ^t
Weight (Kg)	78.83 ± 16.73	71.72 ± 13.39	0.022 ^{*,t}
Sex "n" (%)			
Female	42 (71.2%)	31 (70.5%)	0.936 ^{Xi}
Male	17 (28.8%)	13 (29.5%)	
Treatment period (years)	3 (1.25–7.5)	7.5 (3–14.5)	<0.001 ^{*,U}
BMI	31.92 ± 6.29	29.23 ± 4.81	0.020 ^{*,t}
Normal weight	4 (6.8%)	7 (15.9%)	0.074 ^U
Overweight	20 (33.9%)	19 (43.2%)	
Obesity type			
I	18 (30.5%)	8 (18.2%)	
II	12 (20.3%)	8 (18.2%)	
III	5 (8.5%)	2 (4.5%)	
Metformin plasmatic concentration ng/mL	290.75 (107.69–815.02)	570.91 (170.58–1043.33)	0.203 ^U
Glucose mg/dL	115.5 (102–157)	192.5 (139–238.5)	<0.001 ^{*,U}
HbA1c %	6.4 (5.9–7.3)	9.05 (7.55–10.9)	<0.001 ^{*,U}
control	43 (72.9%)	5 (11.4%)	<0.001 ^{*,Xi}
non-control	16 (27.1%)	39 (88.6%)	

Table 1. Cont.

Variable	Metformin n = 59 (57.3%)	Metformin + Glibenclamide n = 44 (42.7%)	p =
Total cholesterol mg/dL	175.05 ± 39.46	182.1 ± 33.78	0.360 ^t
control	41 (70.7%)	27 (67.5%)	
non-control	17 (29.3%)	13 (32.5%)	0.736 ^{Xi}
LDL cholesterol mg/dL	91.41 ± 32.43	103.69 ± 29.89	0.105 ^t
HDL cholesterol mg/dL	41 (34.55–45.75)	41.5 (36.8–47.2)	0.806 ^U
Triglycerides mg/dL	194 (131–223.5)	157 (131–252)	0.925 ^U
control	16 (29.1%)	17 (44.7%)	
non-control	39 (70.9%)	21 (55.3%)	0.121 ^{Xi}
Glomerular filtration rate (MDRD-4)	93.4 (87.81–115.16)	103.4 (89.23–131.7)	0.329 ^U
Metformin dose mg/day	1700 (850–1700)	2125 (1700–2550)	0.001 ^{*,U}
Daily metformin dose mg/kg/day	19.25 (11.92–25.84)	29.2 (21.55–34.21)	<0.001 ^{*,U}

Variables with normal distribution are presented as mean ± standard deviation; variables with non-normal distribution are presented as median; interquartile range 25–75%; ^t Student's "t" test; ^U Mann Whitney's U test; ^{Xi} Pearson's Chi-square test; * statistical significance ($p < 0.05$).

We obtained allelic and genotypic frequencies of rs72552763 and rs622342 in OCT1 (*SLC22A1*); rs316019 in OCT2 (*SLC22A2*); rs2076828 in OCT3 (*SLC22A3*); and rs1128503, rs1045642, and rs2032582 in *ABCB1*, and alleles *1, *2 rs1799853, *3, and *CYP2C9**6 were unsuccessfully tracked within the 204 available samples of Mexican patients with DM2T. Allele *6 is a deletion of a pair of bases in position 818, which produces a premature stop codon and codifies an inactive truncate protein. Its frequency is low among the majority of populations [20] carrying with rs1057910 and rs1934969 (*IVS8-109A > T*) in *CYP2C9*. Every analyzed polymorphism was in Hardy–Weinberg equilibrium (Table 2). We also found no significant differences when comparing frequencies of rs1128503, rs1045642, and rs2032582 in *ABCB1* from our sample with data from a healthy Mexican-Mestizo sample reported by Ortega [21]. When we compared the observed frequencies from our sample with data from the 1000 Genome Project (Clarke) [22], we only found significant differences with respect to African and Asian populations in variants rs2032582 and rs1045642, whereas variant rs1128503 showed frequency differences with respect to most reported populations (unpublished).

Table 2. Genotypic and allelic frequencies among DM2T patients (n = 103).

Gen	SNP	Genotype Frequencies			Allelic Frequencies		
<i>SLC22A1</i> (OCT1)	rs72552763	GAT/GAT 0.427 (44)	del/GAT 0.447 (46)	del/del 0.126 (13)	GAT 0.650	del 0.349	* p = 0.984
	rs622342	AA 0.398 (41)	AC 0.388 (40)	CC 0.214 (22)	A 0.592	C 0.407	0.138
<i>SLC22A2</i> (OCT2)	rs316019	C/C 0.913 (94)	C/A 0.078 (8)	A/A 0.01 (1)	C 0.951	A 0.048	0.265
<i>SLC22A3</i> (OCT3)	rs2076828	C/C 0.757 (78)	C/G 0.204 (21)	G/G 0.039 (4)	C 0.859	G 0.140	0.280

Table 2. Cont.

Gen	SNP	Genotype Frequencies				Allelic Frequencies			
ABCB1	rs1128503	CC	CT	TT	C	T	0.447		
		0.262(27)	0.437 (45)	0.301 (31)	0.48	0.519			
	rs1045642	CC	CT	TT	C	T	0.674		
CYP2C9	rs2032582	GG	GT	TT	TA	GA	G	T	A
		0.330 (34)	0.417 (43)	0.165 (17)	0.019 (2)	0.058 (6)	0.573	0.387	0.039
	rs1799853 (*2)	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*3	*1	*2	*3	
rs1057910 (*3)	0.825 (85)	0.097 (10)	0.068 (7)	0.01 (1)	0.907	0.053	0.038	0.848	
(IVS8-109A > T)	rs1934969	A/T	A/T	T/T	A	T			
		0.661 (69)	0.328 (27)	0.041 (7)	0.81	0.19	0.197		

* *p* for Hardy–Weinberg equilibrium; Chi square test.

As shown in Table 3, genotypic frequencies of the studied polymorphisms were no different when comparing controlled (HbA1c < 7%) and uncontrolled patients (HbA1c ≥ 7%).

Table 3. Therapeutic efficacy by studying SNP and DMT2 patients' genotype.

Gene	SNP	Genotype	Control (<i>n</i> = 48) HbA1c < 7 (%)	Non-Control (<i>n</i> = 55) HbA1c > 7 (%)	* <i>p</i> =
SLC22A1 (OCT1)	rs72552763	GAT/GAT	23 (47.9%)	21 (38.2%)	0.392
		del/GAT	18 (37.5%)	28 (50.9%)	
		del/del	7 (14.6%)	6 (10.9%)	
SLC22A2 (OCT2)	rs622342	A/A	22 (45.8%)	19 (34.5%)	0.324
		A/C	15 (31.3%)	25 (45.5%)	
		C/C	11 (22.9%)	11 (20%)	
SLC22A3 (OCT3)	rs316019	C/C	43 (89.6%)	51 (92.7%)	0.425
		A/C	5 (10.4%)	3 (5.5%)	
		A/A	0 (0%)	1 (1.8%)	
ABCB1	rs2076828	C/C	40 (83.3%)	38 (69.1%)	0.232
		C/G	7 (14.6%)	14 (25.5%)	
		G/G	1 (2.1%)	3 (5.5%)	
CYP2C9	rs1128503	C/C	13 (27.1%)	14 (25.5%)	0.710
		C/T	19 (39.6%)	26 (47.3%)	
		T/T	16 (33.3%)	15 (27.3%)	
	rs2032582	G/G	17 (35.4%)	17 (31.5%)	0.662
		G/T	21 (43.8%)	22 (40.7%)	
		T/T	8 (16.7%)	9 (16.7%)	
rs1045642	T/A	0 (0%)	2 (3.7%)	0.520	
	G/A	2 (4.2%)	4 (7.4%)		
	C/C	15 (31.3%)	21 (38.2%)		
CYP2C9	rs1799853	C/T	21 (43.8%)	25 (45.5%)	0.261
		T/T	12 (25%)	9 (16.4%)	
		*1/*1	39 (81.3%)	46 (83.6%)	
	rs1057910	*1/*2	7 (14.6%)	3 (5.5%)	
	*1/*3	2 (4.2%)	5 (9.1%)		
*2/*3	0	1 (1.8%)			
rs1934969	A/A	30 (62.5%)	39 (70.9%)	0.643	
	A/T	14 (29.2%)	13 (23.6%)		
	T/T	4 (8.3%)	3 (5.5%)		

* *p* for Chi square test.

We analyzed metformin plasmatic concentrations according to control (defined by %HbA1c) and genotype (Table 4). We observed no significance regarding rs72552763 and rs622342 in OCT1, rs316019 in OCT2, or rs2076828 in OCT3 (Figure 1)

Table 4. Metformin plasmatic concentrations among DMT2 patients grouped by SNP and genotype.

Gene	SNP	Genotype	Control (ng/mL) Median (IQR 25–75%) (n)	Non-Control (ng/mL) Median (IQR 25–75%) (n)	* p =
SLC22A1 (OCT1)	rs72552763	GAT/GAT	376.9 (133.4–763) (17)	481.7 (185.9–971) (17)	0.812
		del/GAT	137.1 (66.47–687.4) (14)	790.6 (228.8–1030.2) (27)	0.115
		del/del	139.1 (107.6–264.3) (6)	785.6 (70.2–1642.7) (5)	0.792
		* p =	0.358	0.820	
	rs622342	A/A	339.7 (129.8–700.9) (16)	526.3 (169–1000.9) (16)	0.616
		A/C	102.6 (57.2–737.7) (12)	725 (254.5–969) (23)	0.141
C/C		157.8 (132.1–687.4) (9)	795.4 (70.2–1642.7) (10)	0.604	
	* p =	0.381	0.821		
SLCA22A2 (OCT2)	rs316019	C/C	151.9 (105.2–687.4) (34)	648.2 (183.3–1030.9) (46)	0.098
		A/C	302.5 (283.4–589.5) (3)	804 (507.4–1025.8) (3)	0.827
		A/A	(0)	(0)	-
		* p =	0.373	0.646	
SLC22A3 (OCT3)	rs2076828	C/C	144.3 (105.2–763) (30)	685.7 (126.9–1030.2) (35)	0.286
		C/G	320.6 (157.8–618.8) (6)	611 (386.1–880.8) (11)	0.122
		G/G	1321.6 (1)	1030.9 (723.9–1336.8) (3)	-
		* p =	0.734	0.634	
ABCB1	rs1128503	C/C	763 (264.3–1321.6) (9)	526.3 (146–1004.7) (14)	0.450
		C/T	139.8 (90.3–649.7) (16)	844.7 (481.7–1095.1) (22)	0.011 *
		T/T	150.1 (113.9–402.6) (12)	219.8 (70.2–530.7) (13)	0.624
		* p =	0.233	0.066	
	rs2032582	G/G	496.5 (107.6–815) (13)	788.1 (146–1055.6) (16)	0.539
		G/T	181.1 (118.2–768.5) (17)	491.4 (185.9–884.2) (18)	0.041 *
		T/T	526.3 (142.5–752.7) (6)	210.8 (72.9–869.7) (9)	0.955
		T/A	(0)	2286 (1348.7–3223.2) (2)	-
		G/A	105.2 (1)	428.9 (199.6–1158.2) (3)	-
		* p =	0.584	0.733	
rs1045642	C/C	700.9 (133.4–1321.6) (10)	785.6 (233.3–1017.8) (19)	0.891	
	C/T	116.3 (85.7–157.8) (17) ^Y	530.7 (185.9–1095.1) (21)	0.002 *	
	T/T	414.4 (264.3–876.5) (10)	290.5 (72.9–901.4) (9)	0.568	
	* p =	0.014 ^K	0.692		
CYP2C9	rs1799853 (*2) rs1057910 (*3)	*1/*1	200.68 (111.5–815) (29)	725 (210.8–1030.9) (41)	0.222
		*1/*2	278.9 (92.9–481.5) (7)	107.8 (89–126.9) (3)	0.425
		*2/*2	(0)	(0)	-
		*1/*3	157.85 (1)	712.3 (376.7–2078.2) (4)	-
		*2/*3	(0)	1705.38 (1)	-
		*3/*3	(0)	(0)	-
		* p =	0.753	0.077	
	rs1934969	A/A	151.9 (106.4–649.7) (24)	530.7 (210.8–1088.9) (33)	0.051
		A/T	451.6 (80.5–1321.3) (10)	785.6 (290.5–971) (13)	0.620
		T/T	133.4 (122.5–474.2) (3)	22.817 (15.9–539.2) (3)	0.513
	* p =	0.770	0.374		

* Mann-Whitney U-test < 0.05. ^K p < 0.05 for Kruskal–Wallis test. ^Y p < 0.05 for post-hoc test between genotypes.

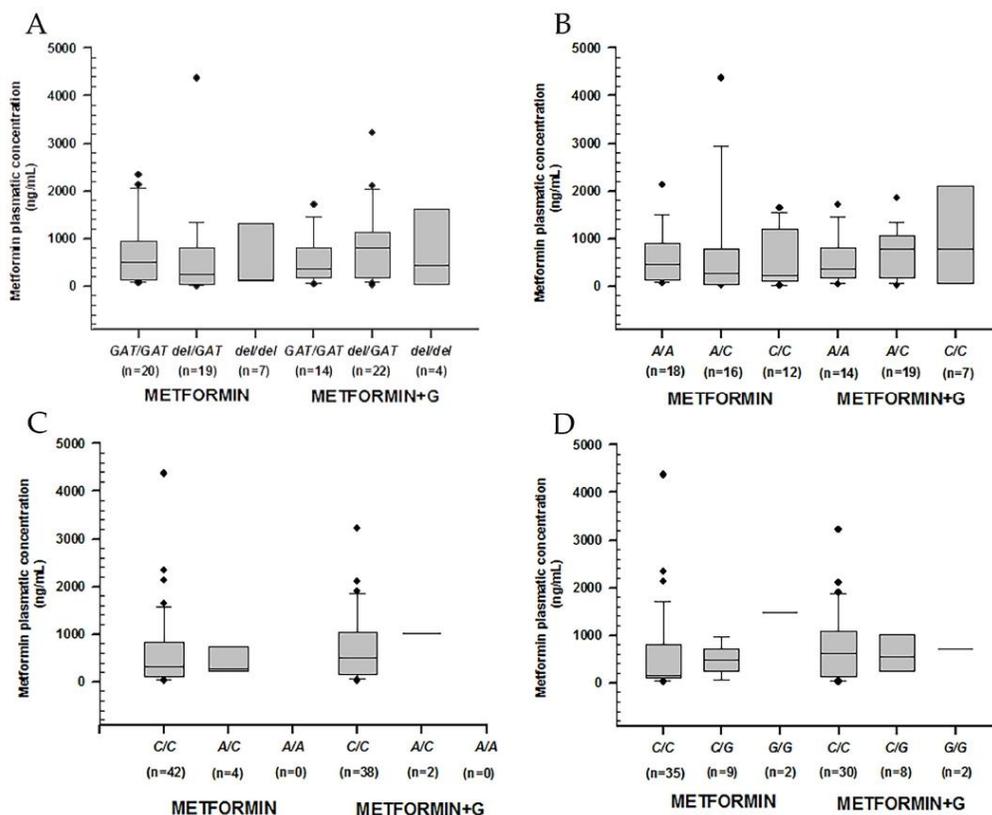


Figure 1. Metformin plasmatic concentration boxplots (ng/mL), including medians, interquartile ranges, and outliers (filled circles). (A) rs72552763 (OCT1). (B) rs622342 (OCT1). (C) rs316019 (OCT2). (D) rs2076828 (OCT3). Data are sorted according to genotype and treatment type (metformin to the left, metformin + glibenclamide to the right). No statistical difference was found.

Higher metformin concentrations were observed among non-controlled patients carrying rs1128503 in C/T ($p = 0.011$), rs2032582 in G/T ($p = 0.041$), and rs1045642 in C/T ($p = 0.002$). Among controlled patients, we found the lowest metformin concentration by rs1045642 in C/T ($p = 0.014$) (Table 4) (Figure 2).

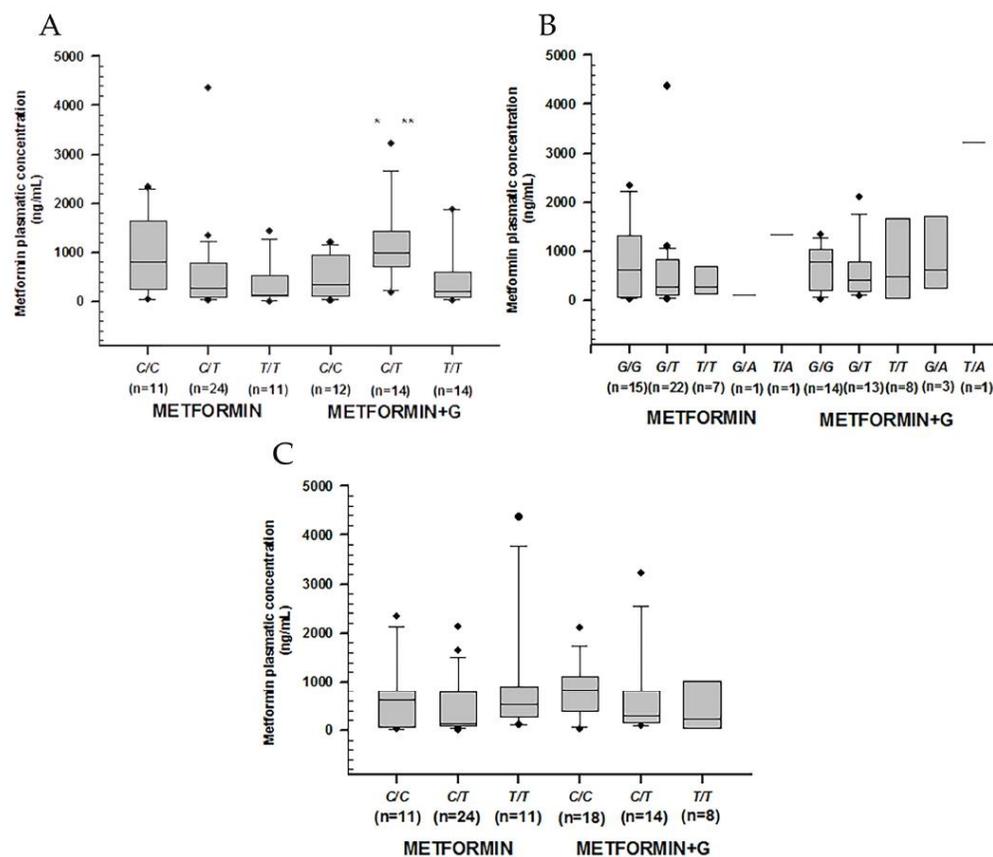


Figure 2. Metformin plasmatic concentration boxplots (ng/mL), including medians, interquartile ranges, and outliers (filled circles). (A) rs1128503 (*ABCBI*). (B) rs2032582 (*ABCBI*). (C) rs1045642 (*ABCBI*). Metformin to the left, metformin + glibenclamide to the right according to genotype. Only C/T of rs1128503 reported both extra-group (metformin + glibenclamide) (** $p = 0.002$) and intra-group (metformin) statistical difference (* $p = 0.007$).

The comparison of rs 1799853, rs1057910, and rs1934969 in *CYP2C9*, showed no statistical significance in plasmatic concentrations across either intra-group or extra-group treatments (Figure 3).

On the other hand, logistic regressions accounting for adjusted dose in terms of kg/weight/day and metformin plasmatic concentration across the three polymorphisms in *ABCBI* found a correlation only with C/T of rs1045642 ($p = 0.017$) (Figure 4).

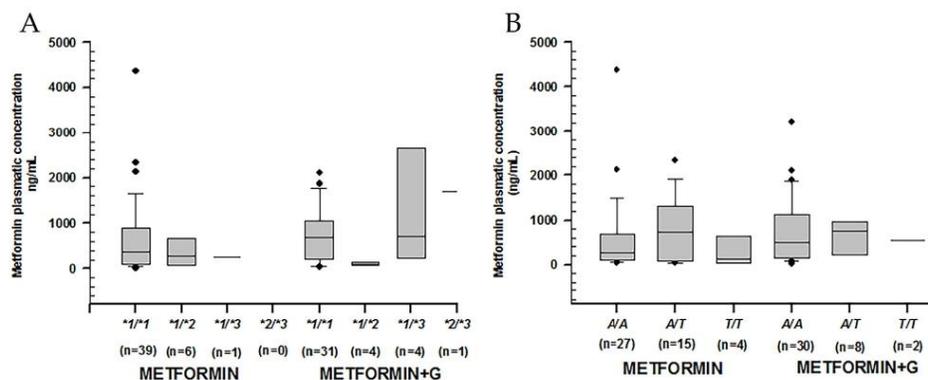


Figure 3. Metformin plasmatic concentration boxplots (ng/mL), including medians, interquartile ranges, and outliers (filled circles). (A) rs1799853 (*1/*2) and rs1057910 (*1/*3) in CYP2C9. (B) rs1934969 (*IVS8 109 A/T*) in CYP2C9. Metformin to the left, metformin + glibenclamide to the right according to genotype. No statistical difference was found either intra-group or extra-group.

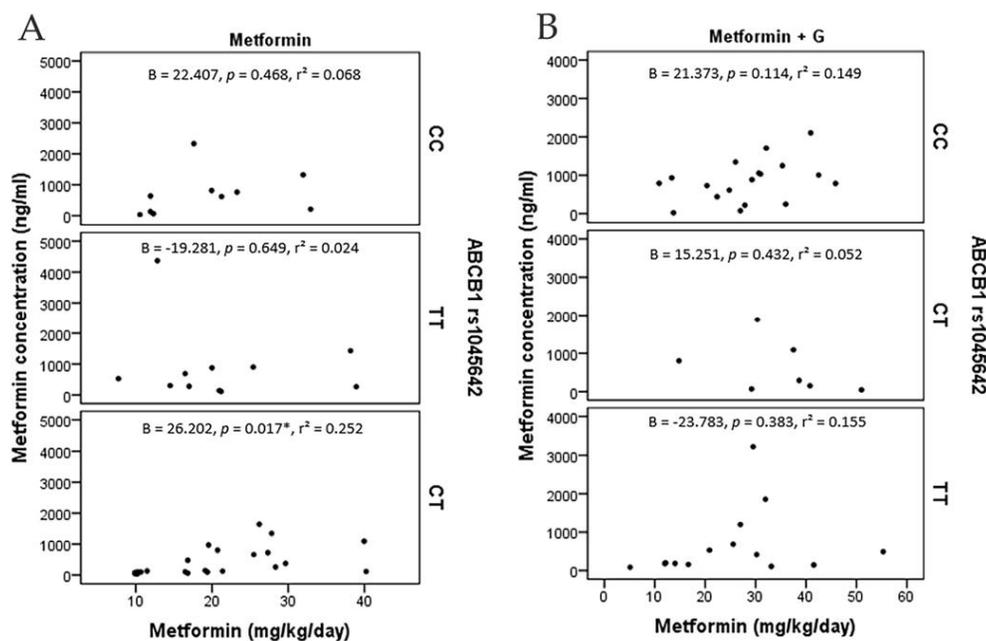


Figure 4. Metformin concentration points (ng/ml) and metformin dosage (mg/Kg/day), including angular regression coefficient with *p* value and determination coefficient. (A) metformin monotherapy patients grouped by *ABCB1* (rs1045642). (B) metformin+glibenclamide patients grouped by *ABCB1* (rs1045642). C/T presents a positive correlation among metformin monotherapy (*: *p* = 0.017).

Table 5 shows that patients undergoing combined treatment presented significantly higher %HbA1c ($p < 0.05$), except for OCT1 (rs622342) in C/C, OCT2 (rs316019) in A/C, OCT3 (rs2076828) in G/G, ABCB1 (rs2032582) in G/T, and G/A, CYP2C9 *1/*2, CP2C9 *1/*3, and CP2C9 IVS-8 in T/T. In the monotherapy group, OCT1 (rs72552763) in GAT/GAT reported a significantly lower %HbA1c ($p = 0.022$) with respect to other genotypes. Significantly higher HbA1c levels were found by OCT1 (rs622342) in C/C ($p = 0.009$), as well as ABCB1 polymorphisms rs1128503 in C/T ($p = 0.021$) and rs2032582 in G/T ($p = 0.009$).

Table 5. Glycated hemoglobin (HbA1c) among DMT2 patients grouped by treatment and genotype.

Gene	SNP	Genotype	Metformin (%HbA1c) Median (IQR 25–75%) (n)	Metformin + Glibenclamide (%HbA1c) Median (IQR 25–75%) (n)	* $p =$
SLC22A1 (OCT1)	rs72552763	GAT/GAT	6 (5.7–6.8) (28) [‡]	9.4 (8.5–11.2) (16)	<0.001 *
		del/GAT	6.5 (6.2–9.2) (22)	8.3 (7.3–10.4) (24)	0.023 *
		del/del	6.5 (6.4–6.8) (9)	10.1 (8.4–11.3) (4)	0.045 *
		$p =$	0.022 ^κ	0.221	
	rs622342	A/A	6 (5.8–6.5) (25)	9.4 (8.5–11.2) (16)	<0.001 *
		A/C	6.4 (6.1–7.7) (19)	8.7 (7.5–10.9) (21)	0.001 *
C/C		6.8 (6.4–9.3) (15) [‡]	8.3 (7.1–9.8) (7)	0.397	
	$p =$	0.009 ^κ	0.332		
SLCA22A2 (OCT2)	rs316019	C/C	6.4 (5.9–7.2) (52)	9 (7.6–10.9) (42)	<0.001 *
		A/C	6.2 (5.8–8.1) (6)	8.4 (7.3–9.5) (2)	0.180
		A/A	8.1 (1)	(0)	-
		$p =$	0.818	0.573	
SLC22A3 (OCT3)	rs2076828	C/C	6.3 (5.9–6.9) (46)	8.9 (7.5–10.5) (32)	<0.001 *
		C/G	6.4 (5.9–8.2) (11)	9.9 (7.7–12.2) (10)	0.022 *
		G/G	8.6 (6.6–10.7) (2)	8.6 (7.3–9.9) (2)	1.000
		$p =$	0.336	0.452	
ABCB1	rs1128503	C/C	6.1 (5.7–6.3) (15)	10.1 (9–11.8) (12)	<0.001 *
		C/T	6.6 (6.2–8.4) (28) [‡]	8.5 (7.5–10.5) (17)	0.007 *
		T/T	6.2 (5.9–6.7) (16)	8.5 (7.3–10.1) (15)	0.007 *
		* $p =$	0.021 ^κ	0.056	
	rs2032582	G/G	6.1 (5.7–6.3) (19)	9.9 (8.2–11.1) (15)	<0.001 *
		G/T	6.8 (6.4–8.1) (27) [‡]	8.6 (7–9.4) (16)	0.058
		T/T	6.2 (6–6.3) (9)	8.8 (7.4–10.1) (8)	0.002 *
		T/A	14.9 (1)	8.3 (1)	-
		G/A	6.5 (6.2–7.4) (3)	11 (10.9–13.3) (3)	0.050
		* $p =$	0.009 ^κ	0.156	
rs1045642	C/C	6.1 (5.9–6.6) (17)	9.9 (7.9–10.9) (19)	<0.001 *	
	C/T	6.5 (6.1–8.1) (29)	8.7 (7.3–9.4) (17)	0.024 *	
	T/T	6.2 (6.1–6.4) (13)	8.8 (8–10.1) (8)	0.001 *	
	* $p =$	0.160	0.511		
CYP2C9	rs1799853 (*2) rs1057910 (*3)	*1/*1	6.4 (5.9–7.3) (50)	9.2 (7.5–10.7) (35)	<0.001 *
		*1/*2	6.2 (5.5–6.5) (6)	8.8 (6.7–10.7) (4)	0.165
		*2/*2	(0)	(0)	-
		*1/*3	8.3 (7.2–8.4) (3)	8.3 (7–10.6) (4)	1.000
		*2/*3	(0)	11 (1)	-
	* $p =$	0.352	0.811		
	rs1934969	A/A	6.4 (6.1–7.6) (35)	8.7 (7.5–11) (34)	<0.001 *
A/T	6.5 (5.9–7.3) (19)	9.4 (8–10.2) (8)	0.003 *		
T/T	6.2 (6–6.2) (5)	10.4 (10.3–10.5) (2)	0.051		
	* $p =$	0.808	0.611		

* $p < 0.05$ for Mann–Whitney U-test. ^κ $p < 0.05$ for Kruskal–Wallis test. [‡] $p < 0.05$ for post-hoc test between genotypes.

Each polymorphism was examined by way of three multiple logistic regression models that revealed statistical significances when HbA1c levels were evaluated across genotypes: rs72552763 and rs622342 in OCT1, and rs1128503 and rs2032582 in ABCB1. There was no significant association in codominance models regarding the evaluated polymorphisms (Table 6). Moreover, there was no association with no-control according to the simple model adjusted by age, treatment period, treatment type, and BMI apropos of any studied polymorphism, as evidenced by the forest plots (Figure S1.8.1 in Supplementary Material).

Table 6. Logistic regression on genotypic models in OCT1 and ABCB1 across uncontrolled patients. ($n = 103$).

Gene (SNP)	Control	No Control	OR (IC95%)	p-Value
OCT1 (rs72552763)				
GAT/GAT	23	21	1.0 (ref)	
del/GAT	18	28	1.704 (0.738–3.935)	0.212
del/del	7	6	0.939 (0.272–3.246)	0.920
Dominant genotype model				
Del/del + del/GAT vs. GAT/GAT	25/23	34/21	1.490 (0.679–3.266)	0.320
^a Del/del + del/GAT vs. GAT/GAT	25/23	34/21	1.207 (0.395–3.691)	0.741
OCT1 (rs622342)				
AA	22	19	1.0 (ref.)	
AC	15	25	1.930 (0.795–4.685)	0.146
CC	11	11	1.158 (0.411–3.266)	0.782
Dominant genotype model				
CC + AC vs. AA	26/22	36/19	1.603 (0.724–3.549)	0.244
^a CC + AC vs. AA	26/22	36/19	1.914 (0.603–6.080)	0.271
ABCB1 (rs1128503)				
Genotype				
CC	13	14	1.0 (ref.)	
CT	19	26	1.271 (0.487–3.316)	0.624
TT	16	15	0.871 (0.310–2.445)	0.792
Dominant genotype model				
TT + CT vs. CC	35/13	41/14	1.088 (0.451–2.621)	0.851
^a TT + CT vs. CC	35/13	41/14	1.817 (0.494–6.691)	0.369
ABCB1 (rs2032582)				
GG	17	17	1.0 (ref.)	
GT	21	22	1.048 (0.426–2.576)	0.919
TT	8	9	1.125 (0.351–3.609)	0.843
TA	0	2	-	
GA	2	4	2 (0.322–12.414)	0.457
Dominant genotype model				
GA + TA + TT+ GT vs. GG	31/17	37/17	1.194 (0.523–2.722)	0.674
^a GA + TA + TT+ GT vs. GG	31/17	37/17	1.933 (0.582–6.425)	0.282

^a Adjusted by age, treatment period, drug therapy, and BMI.

Two multiple logistic regression models surveyed diplotypes in OCT1 and *ABCB1*, displaying statistically significant covariates. Through the first model, we found significance in age (OR = 0.936 (0.883–0.992); $p = 0.026$), treatment period (OR = 1.261 (1.094–1.452); $p = 0.001$), BMI ≥ 25 kg/m² (OR = 7.049 (1.059–46.895); $p = 0.043$), and combined therapy (OR = 18.05 (5.015–64.969); $p < 0.001$). There was no association with diplotype *GAT/GAT* of rs72552763 or *A/A* rs622342, both in OCT1. The second model revealed significance in age (OR = 0.930 (0.877–0.987); $p = 0.017$), treatment period (OR = 1.271 (1.105–1.462); $p = 0.001$), BMI ≥ 25 kg/m² (OR = 9.128 (1.083–76.966); $p = 0.042$), and combined therapy (OR = 17.933 (4.858–66.205); $p < 0.001$). In this model, there was no association with diplotype *C/C* of rs1128503 or *G/G* of rs2032582, both in *ABCB1* (Table 7).

Table 7. Multiple logistic regression on HbA1c no-control using a dominant genotype model for *SLC22A1* and *ABCB1* ($n = 103$).

OCT 1		B	Standard Error	p-Value	OR (IC95%)
Age (years)		−0.066	0.030	0.026 *	0.936 (0.883–0.992)
BMI ≥ 25 Kg/m ²		1.953	0.967	0.043 *	7.049 (1.059–46.895)
rs72552763 <i>GAT</i>	rs622342 <i>A</i>	−0.642	0.593	0.279	0.526 (0.165–1.683)
Treatment (metformin + glibenclamide)		2.893	0.653	<0.001 *	18.05 (5.015–64.969)
Treatment period (years)		0.232	0.072	0.001 *	1.261 (1.094–1.452)
<i>ABCB1</i>					
Age (years)		−0.072	0.030	0.017 *	0.930 (0.877–0.987)
BMI ≥ 25 Kg/m ²		2.211	1.088	0.042 *	9.128 (1.083–76.966)
rs1128503 <i>C</i>	rs2032582 <i>G</i>	−1.026	0.738	0.164	0.358 (0.084–1.522)
Treatment (metformin + glibenclamide)		2.887	0.666	<0.001 *	17.933 (4.858–66.205)
Treatment period (years)		0.240	0.072	0.001 *	1.271 (1.105–1.462)

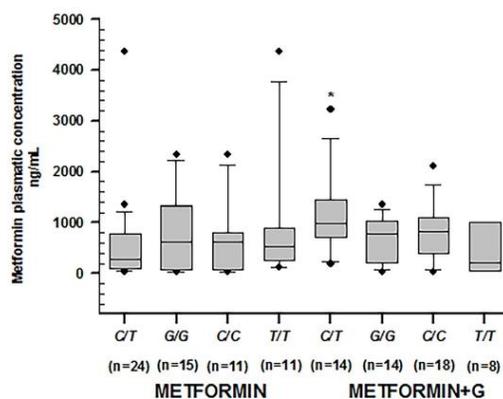
B: Regression coefficient; OR: odds ratio; IC95%: 95% confidence interval. * Statistical significance ($p < 0.05$).

When comparing dose/mg/kg (Table 8) across *C/T* of rs1128503 in *ABCB1*, we found statistical differences in combined therapy patients as opposed to monotherapy ($p = 0.001$), as well as in *G/G* of rs2032582 ($p = 0.011$) and *C/C* and *T/T* of rs1045642 ($p = 0.001$ and 0.019, respectively). However, metformin plasmatic concentrations across these genotypes presented significant differences only by *C/T* of rs1128503 in *ABCB1*, where they were higher in the combined therapy group ($p = 0.002$) (Figure 5).

Table 8. Daily metformin dose mg/kg/day according to treatment and genotype.

Gene	SNP	Genotype	Metformin (mg/kg/day) Median (IQR 25–75%) (n)	Metformin + Glibenclamide (mg/kg/day) Median (IQR 25–75%) (n)	p =	
ABCB1	rs1128503	C/C	18.78 (12.28–25.41) (14)	26.98 (18.19–34.53) (12)	0.057	
		C/T	19.12 (11.92–26.08) (27)	29.27 (23.16–35.31) (17)	0.001 *	
		T/T	20 (11.78–24.42) (15)	29.7 (16.66–31.95) (14)	0.127	
			p =	0.969	0.971	
	rs2032582	G/G	16.48 (11.93–23.28) (17)	26.98 (21.35–32.04) (15)	0.011 *	
		G/T	19.78 (12.99–27.33) (26)	24.35 (15.34–32.83) (16)	0.170	
		T/T	20 (16.48–21.19) (9)	31.95 (29.77–29.15) (7)	0.064	
		T/A	27.82 (1)	29.51 (1)	-	
		G/A	10.24 (10.02–10.85) (3)	32.11 (28.44–34.03) (3)	0.050	
			p =	0.118	0.356	
	rs1045642	C/C	12.29 (11–22.65) (16)	27.86 (23.21–33.71) (19)	0.001 *	
		C/T	19.56 (12.93–27.39) (27)	25.55 (16.66–30.35) (17)	0.152	
T/T		20 (14.5–21.19) (13)	37.5 (29.77–39.71) (7)	0.019 *		
		p =	0.298	0.156		

* p < 0.05 for Mann–Whitney U-test

**Figure 5.** Metformin plasmatic concentration boxplots (ng/mL), including medians, interquartile ranges, and outliers (filled circles). From left to right: C/T of rs1128503; G/G of rs2032582; C/C of rs1045642; T/T of rs1045642, treated with metformin. The following boxplots correspond to the same genotypes under combined therapy. Only C/T of rs1128503 reported significant differences in both groups (* p = 0.002).

3. Discussion

We have reported anthropometric data and biomarkers of a Mexican-Mestizo DMT2 patient sample, which was predominantly female (70.8%) with an average age of 54.45 years, and the treatment period percentage, as reported in Table 1, was 60% lower in the monotherapy group with respect to combined therapy patients. Such results were previously reported in Kahan's seminal studies in a randomized multicenter, double-blind controlled clinical trial called "A Diabetes Outcome Progression Trial" (ADOPT), designed to evaluate the durability of glycemic control in patients undergoing monotherapy with different hypoglycemics [23], as well as in AL-Eitan's work [24]. According to its HbA1c markers, the studied sample we hereby discuss presented low control rates (53.39%) and no renal damage according to its glomerular filtration rate (MDRD-4). There were statistical differences between the prescribed treatments regarding dosage mg/day (1700 (850–1700)

in monotherapy vs. 2125 (1700–2550) in combined therapy, $p = 0.001$ and dose/weight adjustment in terms of mg/kg/day (19.25 (11.92–25.84) vs. 29.2 (21.55–34.21) ($p < 0.001$)). Therefore, we analyzed whether this was reflected in metformin plasmatic concentrations. Every studied polymorphism within the population of this sample was found in Hardy–Weinberg equilibrium. This particular study produced data on the three polymorphisms in *ABCB1* and its genotypes among a population of Mexican DMT2 whose frequencies were previously unknown; the analysis found no statistical difference across genotypic frequencies between these populations and healthy Mexican-Mestizo volunteers [21].

When sorting drug plasmatic concentrations according to treatment type and genotype, we found a statistically significant difference only by *C/T* of rs1128503 in *ABCB1* among the combined therapy group. Metformin is transported into hepatocytes principally by the product of *SLC22A1* (OCT1), as well as *SLC22A2* (OCT2) and *SLC22A3* (OCT3). It is also a substrate of all three polymorphic products of *ABCB1* (P-gp 1); rs1128503, rs2032582, and rs1045642 [14]. All of these genotypes are likely to impact metformin's pharmacokinetics. Ruicheng [25] found no association between the genotypes of rs1128503 in *ABCB1* and diabetes risk in the Chinese Han population, adducing its intronic nature and introns' characteristic function loss during evolution. Llaudó [26] described the effect of Pgp activity decrease in PMBC through Rho123 efflux among patients with transplanted kidneys receiving immunosuppressants, who were carriers of allele T/T of rs1045642, and therefore called them “low pumpers,” as opposed to *C/C* and *C/T* of rs1045642, the “high pumpers”. As for rs72552763 in OCT1, Menjivar [17] reported an association with no-control in a Mexican population, specifically, with *GAT/GAT*, who amounted to 66% of uncontrolled patients ($p = 0.011$). In our study, no-control frequency was 38.2% by *GAT/GAT* of rs72552763, which was even higher by *del/GAT* at 50.9%, although these results accounted for no statistical difference ($p = 0.392$). We attribute these dissimilarities to our country's ethnic diversity. In the Rotterdam study, which included Caucasian patients above 55 years of age undergoing occasional metformin intake, Becker [12] reported the decreasing effect on HbA1c levels by rs2289669, which codifies efflux transporter MATE1; these patients also carried *CC* of rs622342, and they presented a significant association with HbA1c changes (-0.68 ; 95% CI: -1.06 to -0.30 ; $p = 0.005$). Abdel-Hameed [27] reported that variant rs622342 of *SLC22A1*(OCT1) is associated with the therapeutic response to the metformin + glibenclamide combined treatment, where allele *AA* responded 2.7 times more to metformin with respect to allele *C*, as shown in a recessive model (recessive model, odds ratio 2.718, $p = 0.025$, 95% CI 1.112–6.385). In that particular study, disease duration reported was an average of 2.6 years among non-responders and 2.3 years in the responder group. More recently, in a Mexican sample, Resendiz-Abarca [28] identified genotypes *CC*-rs622342, *AA*-rs62803, and *GG*-rs594709, associated with increased HbA1c levels after a 12-month metformin treatment. In her study on a Mexican-Mestizo population, Menjivar [17] found no association between no-control and any genotypes of rs622342 in OCT1 ($p = 0.066$). Our study coincides with these data since we did not observe an association between no-control and rs622342 either ($p = 0.324$). We found no significant differences through the analysis of either control or no-control frequencies regarding any polymorphism of those genes expressing OCT1 (rs72552763 and rs622342), OCT2 (rs316019), OCT3 (rs2076828), *ABCB1* (rs1128503; rs2032582; rs1045642), or *CYP2C9* (rs1799853; rs1057910; rs1934969). After sorting each polymorphism according to HbA1c levels and treatment type, we found several statistical differences across every genotype of rs72552763, rs622342 (except for *C/C*), *C/C* of rs316019, *C/C* and *C/G* of rs2076828; every genotype of rs1128503 in *ABCB1*, and *G/G* and *T/T* of rs2032582; every genotype of rs1045642; the genotype **1/*1* of *CYP2C9*; and *A/A* and *A/T* of rs1934969. This proves that combined therapy does not reduce HbA1c levels, but rather quite the opposite—it preserves higher levels with respect to monotherapy. This may also be ascribable to treatment period differences. Kahan [23] reported the occurrence of metformin monotherapy failure within 5 years in 21% of cases; in our sample, combined therapy patients already reported 7.5 years with the disease. In logistic regression models performed on HbA1c no-control, where the dominant genotypic

model was adjusted by age, treatment period, treatment type, and BMI, we found no association with no-control in genotypes of OCT1 (rs72552763), OCT1 (rs622342), *ABCB1* (rs1128503), and *ABCB1* (rs2032582), as shown by an adjusted simple/multiple logistic regression model adjusted in accordance with the aforementioned covariates.

The literature is contrasting regarding possible associations between polymorphisms and HbA1c levels. Ethnicity, treatment type, and treatment period affect results heterogeneously, whereas clinical trial design is complicated compared to observational studies such as ours. At this point, it would seem reckless to advance a conclusive statement about our results. Further analysis of metformin plasmatic concentrations is necessary, and if possible, associations with the chosen polymorphisms are to be determined. By researching the probable association between these and the HbA1c control, our study marks the first evaluation of metformin plasmatic concentrations among DMT2 Mexican-Mestizo carriers of these particular polymorphisms, whether they were undergoing metformin monotherapy or the metformin + glibenclamide combination (Table 4). P-gp's probable role in this disease was not considered either, although metformin is a known substrate of this efflux pump. We are not aware of any other similar study. For this analysis of *ABCB1* polymorphisms, we grouped patients by HbA1c percentage, whether they were controlled or not. In *C/T* of rs1128503, patients with HbA1c < 7% presented metformin plasmatic concentrations (ng/mL) lower than HbA1c ≥ 7% (139.8 (90.3–649.7) vs. 844.7 (481.7–1095.1); $p = 0.011$). This genotype received a higher metformin + glibenclamide dose (mg/kg/day) than metformin monotherapy ($p = 0.011$), which may explain the observed effect. Likewise, patients carrying *G/T* of rs2032582 with HbA1c < 7% reported lower metformin plasmatic concentrations (ng/mL) than HbA1c ≥ 7% 181.1 (118.2–768.5) vs. 491.4 (185.9–884.2) ($p = 0.041$). However, this genotype did not receive a higher metformin + glibenclamide dose than monotherapy ($p = 0.170$); hence, we consider that this therapeutic effect cannot be ascribed to a wider metformin bioavailability. In *C/T* of rs1045642, patients with HbA1c < 7% reported lower metformin plasmatic concentrations (ng/mL) than HbA1c ≥ 7% [116.8 (85.7–157.8)] vs. (530.7 (185.9–1095.1); $p = 0.002$). In this last polymorphism of rs1045642, we also observed statistical differences within groups across those genotypes in monotherapy treatment ($p = 0.014$). This last group undergoing combined therapy did not receive higher dosages mg/kg/day than monotherapy ($p = 0.152$), just like *G/T* of rs2032582. The therapeutic effect cannot be ascribed to a larger metformin bioavailability, but it could be related to P-gp 1 high pumpers, as described by Llaudó [26]. Recently, AL-Eitan [24] genotyped 21 polymorphisms of OCT1, OCT2, and OCT3 among DMT2 patients from Northern Jordan: seven polymorphisms of OCT1, 10 of OCT2, and four of OCT3. AL-Eitan reported no statistical difference regarding glycemic control OCT (according to the ADA's criteria). Their conclusions reported that rs12194182 in *SLC22A3* (OCT3) was associated with better HbA1c levels. Genotypes of the studied SNPs in *SLC22A1*, *SLC22A2*, and *SLC22A3* were significantly associated with BMI, age at the time of diagnosis, and glycemic control as established through multinomial logistic regression ($p < 0.05$). Treatment period was not considered. Finally, there was no relation between SNPs and glycemic control after age adjustment ($p > 0.05$).

We performed a logistic regression analysis using a dominant genotypic model including rs72552763 and rs622342 in OCT1, as well as rs1128503 and rs2032582 in *ABCB1*. Since we found no significant difference, we conducted a second multiple logistic regression analysis to confirm whether rs72552763 *GAT/GAT* and rs622342 *A/A* in OCT1, as well as rs1128503 *C/C* and rs2032582 *G/G* in *ABCB1*, showed a significant glycemic control p -value; we found none, unlike about other covariates such as age, BMI, combined treatment, and treatment period. All of the latter reported statistical significance in both models, where the highest no-control ORs were OR = 18.05 by OCT1 and OR = 17.93 by *ABCB1* in combined therapy. This became patent in the forest plot we present (Supplementary Material Figure S1.8.1). To summarize, none of the polymorphisms we studied reported glycemic control association with any of their genotypes, as opposed to some covariates that were indeed associated with no-control. In our sample, low therapeutic efficacy cannot be attributed to

metformin but rather to its covariates. The evidence of such covariates' significant role in uncontrolled HbA1c levels (the golden standard biomarker) may benefit Mexican DMT2 patients in the form of a personalized prescription, favoring a more adequate therapeutic intervention and lifestyle changes in order to prevent micro and macrovascular complications hauled by the disease.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design and Sample Description (DMT2 Patients)

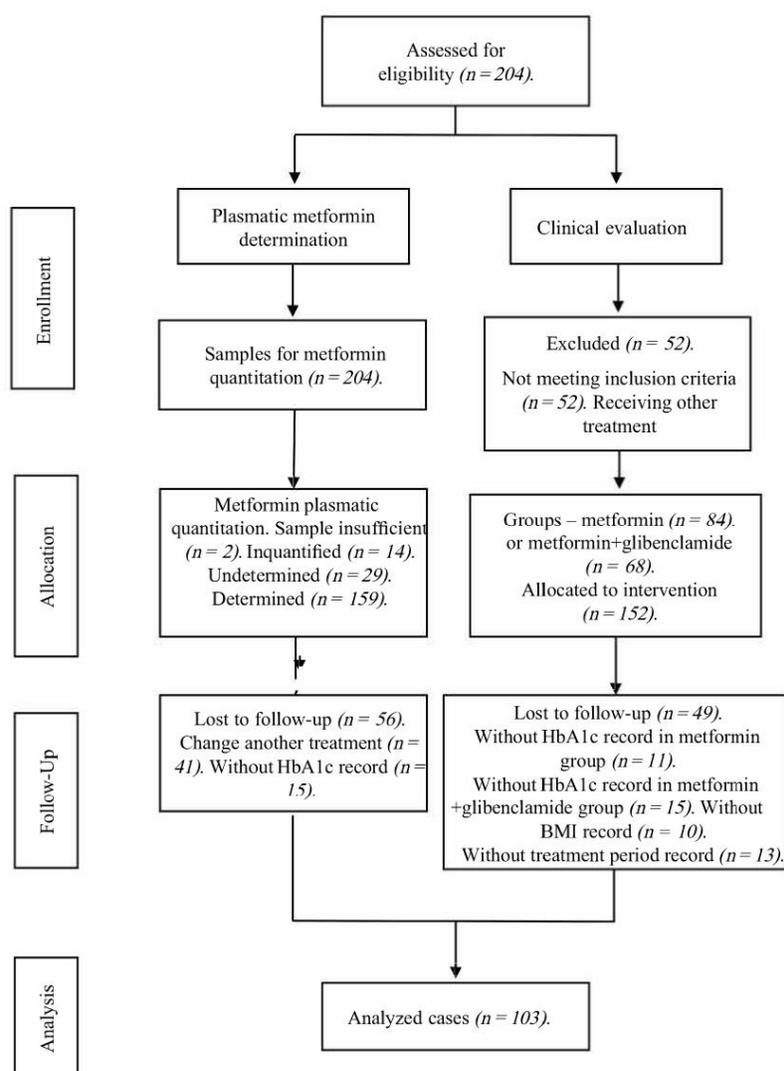
This observational study recruited participants previously diagnosed with DMT2 according to the World Health Organization and American Diabetes Association standards (ADA) [29]. All of them were legal adults (18 years or older) with at least three generations of Mexican ancestry (assessed through a questionnaire) and no kinship between them. Sample collection and clinical record reviewing was accomplished within a cohort of 103 patients with DMT2 undergoing medical treatment and monitored at a third-level public healthcare center in Ixtapaluca, Mexico, between May 2018 and December 2019. All participants provided written informed consent. The research protocol was ethically approved by a Research and Ethics Commission of the National Autonomous University of Mexico (Faculty of Medicine) 001/SR/2016, and the study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and the 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013, on ethical principles for medical research involving human subjects. A database of the collected clinical and biochemical data, including each patient's file, was compiled. Files were thoroughly reviewed in accordance with the study's inclusion and exclusion criteria. Patients were subsequently grouped in accordance with the designated hypoglycemic agent used for treatment: metformin monotherapy and glibenclamide + metformin.

Inclusion criteria required at least 3 months of pharmacological treatment in order to report stationary plasmatic levels. HbA1c values were used to estimate plasmatic glucose levels during the whole trimester prior to their determination. The present study focused on a third-level center where patients' files spanning anywhere from a semester to multiple years could be revised. Determining previous measurements would not have been achievable and the present study was only interested in verifying control over the last trimester.

4.2. Clinical Evaluation

Out of the 204 initially evaluated profiles, 52 were eliminated due to not meeting inclusion criteria. Of these remaining 152 allocated for observation, 26 had no HbA1c record and 23 had no plasmatic metformin record; thus, only 103 were fit for biomarker analysis (Scheme 1).

Patients were recruited according to the following inclusion criteria: (i) The patient was undergoing either metformin treatment, or a combination of metformin + glibenclamide; (ii) the patient had undergone a treatment schedule comprising a stable dose of these drugs for at least 3 months; (iii) the precedents and treatment characteristics of each individual were accessible via their medical record at the corresponding healthcare center, particularly data concerning drug dosage (including hypoglycemic agents) during the aforementioned 3-month period; (iv) the medical file comprised anthropometric parameters [30] and clinical laboratory reports performed at the Hospital Regional on a number of key biochemical variables (including HbA1c through HPLC, in a Variant II Turbo 2.0, Bio-Rad, Hercules CA, USA; fasting glucose levels, total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, creatinine by photometry in an AU480 Chemistry Analyzer, Beckman Coulter, Brea CA, USA). Individuals who reported chronic alcoholism, previous pancreatic pathology, renal failure, hypoglycemic treatment with insulin or insulin analogs, insufficient medical records, DMT1, or voluntary withdrawal were excluded. A database was created to retrieve and analyze the information on the 103 patients included in the study. File revision was performed through random probabilistic sampling.



Scheme 1. CONSORT flow diagram of the trial sample.

4.3. Genotyping Procedure

A peripheral 10 mL blood sample was collected from all participants in EDTA tubes, and genomic DNA was extracted from 200 μ L of each patient's venous peripheral blood using UltraClean[®] BloodSpin[®] DNA isolation reagents (Mo Bio Laboratories; Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA), evaluated for integrity and concentration through 1% agarose electrophoresis and spectrophotometry using NanoDrop[™] 2000/2000c (Thermo Scientific, Wilmington DE, USA), respectively. For *CYP2C9*, *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC22A3*, and *ABCB1* allele determinations, different allelic variants were analyzed by RT-PCR tech-

nology using fluorescence-based TaqMan[®] assays on a Fast 7300 Real-Time PCR System, both from Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Reactions were performed in a final reaction volume of 10 μ L, with 30 ng genomic DNA template, 1X TaqMan[®] Universal PCR Master mix system from Applied Biosystems, 1X each probe assessed (CYP2C9*1: C_160889442_10, CYP2C9*2: rs1799853, C_25625805_10; CYP2C9*3: rs1057910, C_27104892_10; CYP2C9*6: rs9332131, C_32287221_20; SLC22A1: rs12208357, C_30634096_10; SLC22A1: rs2282143, C_15877554_40; SLC22A1: rs594709, C_1898206_20; SLC22A1: rs622342, C_928527_30; SLC22A1: rs628031, C_8709275_60; SLC22A1: rs683369, C_928536_30; SLC22A1: rs72552763, C_34211613_10; SLC22A2: rs316019, C_3111809_20; SLC22A3: rs2076828, C_2763995_1_; SLC22A3: rs8187725, C_30633894_10; ABCB1: rs1045642, C_7586657_20; ABCB1: rs1128503, C_7586662_10; ABCB1: rs2032582, C_11711720D_40; ABCB1: rs2032582, C_11711720C_30; ABCB1: rs2032588, C_11711718_10), and water. Thermocycling conditions and allelic discrimination to identify the genotypes using allelic discrimination software (Applied Biosystems, Bedford, MA, USA) were previously described [16]. The intronic polymorphism CYP2C9 IVS8 109A > T (rs1934969) was analyzed using the PCR amplifying enzymatic restriction fragment long polymorphism (PCR/RFLP) method. PCR was performed on a Mastercycler[®] 384 (Eppendorf, Hamburg, Germany) to identify its presence by following the procedure detailed in Cuautle et al. (2019) [16]. Fragments of 468 and 154 bp cut by HinfI restriction enzyme (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA; cat no. R0155S) were observed for CYP2C9 IVS8 109T, whereas a band of 622bp corresponding to uncut fragments was matched to the CYP2C9 IVS8 109A > T allele. SNP allelic and genotypic frequencies of OCT1, OCT2, OCT3, ABCB1, and CYP2C9 were carried out through direct counting.

4.4. Plasmatic Metformin Determination

Out of the initial 204 candidates, 101 were excluded from the analyses for the following reasons: 2 plasmatic samples were insufficient, 14 were reported as unquantified, and 29 were reported as undetermined (total 45), whereas 56 more were lost during follow-up (41 changed treatment and 15 had no HbA1c record) (Scheme 1). Out of the remaining 103 included patients, plasmatic concentrations could only be determined in 86, since 9 had been registered as undetermined and 8 more were not quantified (either hemolyzed or measured through lipemic serum). Determinations were carried out in the Clinical Pharmacology Unit of UNAM's Faculty of Medicine. The methodology was validated in accordance with the Mexican Official Normativity NOM-177-SSA 1-2013 [31], which establishes tests and procedures to demonstrate a drug's interchangeability; the mandatory requirements authorized third parties must observe; which research or healthcare institutions may perform biocompatibility tests; and the internal procedure of analytical methodology validation. The study also adhered to additional international requirements, whose acceptance parameters were established in the Standard Operating Procedure SOP-UA-05-09 "Validation of analytical methodology on special and bioavailability and/or bioequivalence studies". To analyze biological samples, we employed the method described in the analytical methodology index card FMA-018/B, which had been previously validated according to Mexican Official Normativity NOM-177-SSA1-2013. The analytical method was selective over the quantification of both plasmatic metformin and glibenclamide, without the interference of either endogenous or exogenous compounds. The employed methodology proved to be selective, linear, precise, and exact over the assessed concentration range.

For sample analysis, we employed UHPLC-MS/MS in MRM mode using an Agilent Technologies G6490A mass spectrometer. In the preparation of calibration curves and controls for sample analysis we employed the following reference substances: metformin hydrochloride (U.S.P. batch R069H0, purity 99.7%), glibenclamide (U.S.P. batch R022S0, purity 99.4%), and loratadine (U.S.P. R052U0, purity 99.8%). To quantify plasmatic metformin/glibenclamide, we employed the mass/charge ratio of metformin 130.1/71.0, glibenclamide 494.0/369.0, and the internal standard loratadine 383.1/337.1. A Luna PFF

analytical column (2.0X100 mm, 3.0 μm) from Phenomenex was used for analyte separation and determination. The isocratic elution of samples was carried out by using acidified ammonium formate 10 mM (A): acetonitrile 100% (B), as mobile phase. Analytes were previously extracted through protein extraction/precipitation: A 100 μL aliquot was extracted from a plasma sample and subsequently deposited into a microtube. We added a 10 μL aliquot from the loratadine internal standard solution (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). To carry out protein precipitation, we added a 400 μL aliquot of HPLC-grade acetonitrile. The tube was shaken on a multiple vortex at maximum speed for 1 min. The tube was centrifuged at 13,000 rpm and 4 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. We recovered 250 μL of the supernatant and transferred it to a 96-well plate. The injection volume on the chromatographic system was 2.0 μL . The method was linear in the range of 20–10,000 ng/mL. Intra-day and inter-day variation coefficients were less than 15%. In the case of metformin, recovery ranged from 89.676 to 90.731%. The relationship between chromatographic response and concentration on every calibration curve was adjusted through linear least squares regression for metformin. To quantify the plasmatic samples, the regression was performed through Mass Hunter B.08 Quantitative Analysis software.

Patients were summoned by their respective treating physician having observed a fasting period of at least 8 h. All of the blood samples were taken within an interval of 8 h after the evening's metformin dose. A 10 mL peripheral venous blood sample was extracted using EDTA vacutainer tubes. The sample was centrifuged at $400\times g$ for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. Once the plasma was obtained, aliquots were carried out using Eppendorf tubes and the samples were frozen at -80°C until drug determination assays were simultaneously performed across all of them.

4.5. Statistical Analyses

Data distribution was assessed through Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests. Normal distribution variables are displayed as median and standard deviation, whereas free distribution variables are displayed as median and interquartile ranges. Patients were grouped according to (i) HbA1c control, no-control; (ii) treatment type; and (iii) polymorphisms of *SLC22A1*(OCT1), *SLC22A2*(OCT2), *SLC22A3*(OCT3), *ABCB1*, and *CYP2C9*, where %HbA1c and metformin plasmatic concentration were evaluated. Normal distribution quantitative variables were compared through Student's *t*-test, whereas free distribution variables were compared using Mann–Whitney's U-test. When comparing free distribution quantitative variables across 3 groups, the Kruskal–Wallis test was employed. Qualitative variables were compared using Pearson's Chi square test or Fisher's exact test if necessary. Ordinal variables were compared through the Mann–Whitney U-test. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using SPSS version 23.0 for Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

4.6. Genotypic and Allelic Frequency Analysis

Allelic frequencies were counted, and respective expected values were calculated for each genotype. A *p* value > 0.05 defined the frequencies in Hardy–Weinberg equilibrium as calculated through Pearson's Chi square test.

4.7. Logistic Regression

We focused on statistically significant HbA1c SNPs, whose genotypes were rs72552763 and rs622342 in OCT1, and rs1128503 and 2032582 in *ABCB1* (Table 6). A codominance model was elaborated for each SNP, assuming every genotype implied a different risk for the dependent variable, which was no-control defined as HbA1c $\geq 7\%$. Additionally, each SNP had its own simple and multiple logistic regression model observing genotypic dominance. The multiple model was adjusted according to age, treatment period, treatment type, and BMI, which showed OR (IC95%) in every case. Statistical significance was *p*-value < 0.05.

A second multiple logistic regression model was conducted considering rs72552763 and rs622342 in OCT1, and rs1128503 and 2032582 in *ABCB1* as diplotypes. Reference values for qualitative variables were BMI under 25 kg/m², metformin therapy, and both heterozygous and recessive genotype in every model of the analyzed polymorphisms. The dependent variable was no-control defined as HbA1c \geq 7%. References were selected this way to explore no-control risk for a patient with a BMI over 25 kg/m² undergoing combined therapy and carrying genotypes rs72552763 *GAT/GAT* with rs622342 *A/A* in a first model and rs1128503 *C/C* with rs2032582 *G/G* in a second model.

5. Conclusions

This study's results seem adequate to become part of a predictive algorithm for glycemic control, considering variables like age, BMI, treatment, and disease period. This would be quite helpful in clinical interventions specifically aimed towards populations mathematically predisposed to non-control risk. Such an instrument could diminish comorbidities and complications associated with diabetes. Study limitations: This is essentially an observational study based on a small sample. We were able to quantify metformin plasmatic concentrations only once. Patient records were often missing data, and it was quite difficult to properly follow up with them.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph15070774/s1>, File S1: Pharmacogenetics of Metformin Transporters Suggests No Association with Therapeutic Inefficacy Among Mexican Diabetes Type 2 Patients.

Author Contributions: A.O.-A., N.S.R.-R., F.d.A., A.L., A.G.E.-S., E.P.-S. and J.A.M.-G. provided substantial contributions to the conception and design of this work. They contributed to the acquisition, analysis, and interpretation of data and revised the paper critically for important intellectual content. J.A.M.-G. had primary responsibility for communication with the journal during the manuscript submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Project No. IN203418 and IN205121) of the Dirección General de Apoyo a Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. The present study was also supported by the Junta de Extremadura, Agencia Extremeña de Cooperación Internacional para el desarrollo, Spain (Grant No. PATLI 18IA003) to RIBEF/SIFF (Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica, <https://www.emagister.com/red-iberoamericana-farmacogenetica-farmacogenomica-cursos-85603-centrodetalles.htm> (accessed on 15 June 2022). Adiel Ortega-Ayala was supported by grant No. 780213 of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Protocol NR-004-2016 was approved by the Research and Ethics Commissions of the Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, the Secretary of Health, and the Research Division of UNAM's Faculty of Medicine 001/SR/2016.

Informed Consent Statement: All patients who agreed to voluntarily be involved in the present study provided written informed consent. No identifying information, including names, initials, date of birth or hospital numbers, images, or statements are included in the manuscript.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request via the corresponding author. These data are not publicly available because the patients and researchers are bound to an agreement establishing that only the head of the study and Mexican health authorities shall have access to them, in accordance with the presidential decree of 16 April 2015, sanctioning the General Law on Transparency and Access to Public Information.

Acknowledgments: The present study was conducted as part of the Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, PhD Postgraduate Academic Program.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Loganadan, N.K.; Huri, H.Z.; Vethakkan, S.R.; Hussein, Z. Genetic markers predicting sulphonylurea treatment outcomes in type 2 diabetes patients: Current evidence and challenges for clinical implementation. *Pharmacogenom. J.* **2016**, *16*, 209–219. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/26810132/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef] [PubMed]
- Fowler, M.J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clin. Diabetes* **2008**, *26*, 77–82. Available online: <https://diabetesjournals.org/clinical/article/26/2/77/1823/Microvascular-and-Macrovascular-Complications-of> (accessed on 12 July 2021). [CrossRef]
- WHO. *The Top 10 Causes of Death*; WHO: Geneva, Switzerland, 2020. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 2 May 2022).
- Guariguata, L.; Whiting, D.R.; Hambleton, I.; Beagley, J.; Linnenkamp, U.; Shaw, J.E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2014**, *103*, 137–149. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/24630390/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef] [PubMed]
- IDF. *IDF Diabetes Atlas*, 8th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2017.
- CENAPRESE. Declaratorias de Emergencia. 2018. Available online: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/emergencias/declaratorias_emergencia.html (accessed on 2 May 2022).
- Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la Prevención, Tratamiento y Control de la Diabetes Mellitus. DOF2010. Available online: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4215/salud/salud.htm> (accessed on 2 May 2022).
- Wang, Z.J.; Yin, O.Q.P.; Tomlinson, B.; Chow, M.S.S. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: Studies with metformin and cimetidine. *Pharmacogenet. Genom.* **2008**, *18*, 637–645. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/18551044/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef] [PubMed]
- Chen, E.C.; Liang, X.; Yee, S.W.; Geier, E.G.; Stocker, S.; Chen, L.; Giacomini, K.M. Targeted Disruption of Organic Cation Transporter 3 Attenuates the Pharmacologic Response to Metformin. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *88*, 75–83. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/25920679/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
- Seitz, T.; Stalmann, R.; Dalila, N.; Chen, J.; Pojar, S.; Pereira, J.N.D.S.; Krätzner, R.; Brockmöller, J.; Tzvetkov, M.V. Global genetic analyses reveal strong inter-ethnic variability in the loss of activity of the organic cation transporter OCT1. *Genome Med.* **2015**, *7*, 1–23. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/26157489/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
- Mato, E.P.M.; Guewo-Fokeng, M.; Essop, M.F.; Owira, P.M.O. Genetic polymorphisms of organic cation transporter 1 (OCT1) and responses to metformin therapy in individuals with type 2 diabetes: A systematic review. *Medicine* **2018**, *97*, e11349. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/29979413/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
- Becker, M.L.; Visser, L.E.; van Schaik, R.H.N.; Hofman, A.; Uitterlinden, A.G.; Stricker, B.H.C. Interaction between polymorphisms in the OCT1 and MATE1 transporter and metformin response. *Pharmacogenet. Genom.* **2010**, *20*, 38–44. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/19898263/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
- Umamaheswaran, G.; Praveen, R.G.; Damodaran, S.E.; Das, A.K.; Adithan, C. Influence of SLC22A1 rs622342 genetic polymorphism on metformin response in South Indian type 2 diabetes mellitus patients. *Clin. Exp. Med.* **2014**, *15*, 511–517. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/25492374/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
- Hemauer, S.J.; Patrikeeva, S.L.; Nanovskaya, T.N.; Hankins, G.D.; Ahmed, M.S. Role of human placental apical membrane transporters in the efflux of glyburide, rosiglitazone, and metformin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2010**, *202*, 383.e1–383.e7. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/20350646/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
- Kim, H.G.; Hien, T.T.; Han, E.H.; Hwang, Y.P.; Choi, J.H.; Kang, K.W.; Kwon, K.; Kim, B.-H.; Kim, S.K.; Song, G.Y.; et al. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- κ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 1096–1108. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/21054339/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef] [PubMed]
- Cuautle-Rodríguez, P.; Rodríguez-Rivera, N.; de Andrés, F.; Castillo-Nájera, F.; Llerena, A.; Molina-Guarneros, J.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. *Biomed. Rep.* **2019**, *10*, 283–295. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/31086662/> (accessed on 2 May 2022). [PubMed]
- Marta, M.; Sánchez-Pozos, K.; Jaimes-Santoyo, J.; Monroy-Escutia, J.; Rivera-Santiago, C.; de los Ángeles Granados-Silvestre, M.; Ortiz-López, M.G. Pharmacogenetic Evaluation of Metformin and Sulphonylurea Response in Mexican Mestizos with Type 2 Diabetes. *Curr. Drug Metab.* **2020**, *21*, 291–300. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/32407269/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef] [PubMed]
- Jimenez-Sanchez, G. Developing a platform for genomic medicine in Mexico. *Science* **2003**, *300*, 295–296. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/12690190/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
- Guillausseau, P.-J.; Meas, T.; Virally, M.; Laloi-Michelin, M.; Médeau, V.; Kevorkian, J.-P. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* **2008**, *34*, S43–S48. [CrossRef]
- Hatta, F.H.; Teh, L.K.; Helldén, A.; Hellgren, K.E.; Roh, H.K.; Salleh, M.Z.; Aklillu, E.; Bertilsson, L. Search for the molecular basis of ultra-rapid CYP2C9-catalysed metabolism: Relationship between SNP IVS8-109A>T and the losartan metabolism phenotype in Swedes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *68*, 1033–1042. [CrossRef]

21. Ortega-Vázquez, A.; Dorado, P.; Fricke-Galindo, I.; Jung-Cook, H.; Monroy-Jaramillo, N.; E Martínez-Juárez, I.; Familiar-López, L.; Peñas-Lledó, E.; Llerena, A.; López-López, M. CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 genetic polymorphisms and phenytoin plasma concentrations in Mexican-Mestizo patients with epilepsy. *Pharmacogenom. J.* **2015**, *16*, 286–292. Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/26122019/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
22. Clarke, L.; Fairley, S.; Zheng-Bradley, X.; Streeter, I.; Perry, E.; Lowy, E.; Tassé, A.-M.; Flicek, P. The international Genome sample resource (IGSR): A worldwide collection of genome variation incorporating the 1000 Genomes Project data. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *45*, D854–D859. Available online: <https://academic.oup.com/nar/article/45/D1/D854/2770649> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
23. Kahn, S.E.; Haffner, S.M.; Heise, M.A.; Herman, W.H.; Holman, R.R.; Jones, N.P.; Kravitz, B.G.; Lachin, J.M.; O'Neill, M.C.; Zinman, B.; et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 2427–2443. Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/17145742/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
24. Al-Eitan, L.N.; Almomani, B.A.; Nassar, A.M.; Elsaqa, B.Z.; Saadeh, N.A. Metformin Pharmacogenetics: Effects of SLC22A1, SLC22A2, and SLC22A3 Polymorphisms on Glycemic Control and HbA1c Levels. *J. Pers. Med.* **2019**, *9*, 17. Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/30934600/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef]
25. Yan, R.; Luo, J.; He, X.; Li, S. Association between ABC family variants rs1800977, rs4149313, and rs1128503 and susceptibility to type 2 diabetes in a Chinese Han population. *J. Int. Med. Res.* **2020**, *48*, 0300060520941347. Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/32762489/> (accessed on 2 May 2022).
26. Llaudó, I.; Colom, H.; Giménez-Bonafé, P.; Torras, J.; Caldés, A.; Sarrias, M.; Cruzado, J.M.; Oppenheimer, F.; Sánchez-Plumed, J.; Gentil, M.; et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transpl. Int.* **2012**, *26*, 177–186. Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/23216707/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef] [PubMed]
27. Ebid, A.H.I.M.; Ehab, M.; Ismail, A.; Soror, S.; Mahmoud, M.A. The influence of SLC22A1 rs622342 and ABCC8 rs757110 genetic variants on the efficacy of metformin and glimepiride combination therapy in Egyptian patients with type 2 diabetes. *J. Drug Assess.* **2019**, *8*, 115–121. Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/31231590/> (accessed on 2 May 2022). [CrossRef] [PubMed]
28. Msc, C.A.R.; Flores-Alfaro, E.; Suárez-Sánchez, F.; Cruz, M.; Valladares-Salgado, A.; Alarcón-Romero, L.D.C.; Msc, M.A.V.; Wachter-Rodarte, N.A.; Gómez-Zamudio, J.H. 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. *J. Clin. Pharmacol.* **2019**, *59*, 1384–1390. Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/31012983/> (accessed on 2 May 2022).
29. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* **2020**, *43*, S14–S31. Available online: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/31862745/> (accessed on 12 July 2021). [CrossRef] [PubMed]
30. WHO. Physical Status: The Use of and Interpretation of Anthropometry, Report of a WHO Expert Committee. 1995. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37003> (accessed on 12 July 2021).
31. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 [Internet]. DOF2013. Available online: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013 (accessed on 12 July 2021).