



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

ESTUDIO DE VARIANTES ALÉLICAS EN LOS GENES *KCNJ11* Y *ABCC8* DEL CANAL DE POTASIO DEPENDIENTE DE ATP EN PACIENTES DIABÉTICOS QUE RECIBEN TRATAMIENTO CON SULFONILUREAS, BIGUANIDAS O AMBAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

RODRÍGUEZ RIVERA NIDIA SAMARA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. NOVIEMBRE, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de agosto de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **RODRÍGUEZ RIVERA NIDIA SAMARA** con número de cuenta **401014752**, con la tesis titulada **"ESTUDIO DE VARIANTES ALÉLICAS EN LOS GENES *KCNJ11* Y *ABCC8* DEL CANAL DE POTASIO DEPENDIENTE DE ATP EN PACIENTES DIABÉTICOS QUE RECIBEN TRATAMIENTO CON SULFONILUREAS, BIGUANIDAS O AMBAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS**:

Presidente: DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
Vocal: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
Secretario: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO
Suplente: DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 03 de octubre de 2017

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas por la formación, recursos y apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Este proyecto fue realizado con el apoyo de DGAPA-UNAM mediante el proyecto PAPIIT IN218216. Bajo la tutoría del Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros, la Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta y el Dr. Abraham Landa Piedra, de quienes agradezco enormemente la tutoría y apoyo para la realización del mismo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El principal agradecimiento a mi familia que está y siempre ha estado a mi lado, respetando y apoyando todas mis decisiones de vida, tendría que escribir otra tesis para poder nombrarlos a todos, pues no sólo se trata de mi familia biológica, también de todos aquellos que se han ido integrando a mi familia de amor.

Ezequiel, gracias por ser mi compañero de vida y por ser justamente lo que debe ser una pareja, con tu apoyo a todos mis proyectos, por ser amigo, amante, padre, saco de box (infinitamente gracias por aguantar). Tristan, eres aún pequeño para entender todo lo que mamá “trabaja en un laboratorio”, espero algún día hacerte sentir orgulloso igual que tu me enorgulleces día a día.

Al padre/madre creador/a que cada día me muestran más de lo que puedo ser, que esta es sólo una parte de mí, importante pero efímera y por lo mucho más que falta por aprender y trascender.

ÍNDICE

Lista de Figuras	i
Lista de Tablas	i
Resumen.....	1
Abstract	4
Introducción	6
Planteamiento del problema	14
Justificación	15
Objetivos	17
Objetivos particulares	17
Metodología	18
<i>Selección de los pacientes y diseño del estudio</i>	18
<i>Toma de datos clínicos y diseño de la base de datos</i>	18
<i>Criterios de inclusión</i>	19
<i>Criterios de exclusión</i>	20
<i>Criterios de eliminación</i>	20
<i>Obtención y procesamiento de muestras biológicas</i>	20
<i>Obtención de ADN genómico</i>	21
<i>Genotipificación</i>	24
<i>Análisis estadístico</i>	25
Resultados.....	26
<i>Características de la muestra</i>	26
<i>Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas con otras poblaciones</i>	28
<i>Análisis de asociación de los polimorfismos con la respuesta al tratamiento</i>	31
Discusión.....	37
Conclusiones.....	41
Literatura citada.....	43
ANEXO I: Artículo requisito.....	52
ANEXO II: Artículo de Revisión.....	61
ANEXO III: Consentimiento informado y revocación del consentimiento.....	74
ANEXO IV: Autorización del Comité de Ética e Investigación FMUNAM.....	80
ANEXO V: Prórroga de Vigencia de Proyecto.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	19
Figura 2.....	22
Figura 3	23

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	8
Tabla 2	24
Tabla 3	24
Tabla 4	26
Tabla 5	27
Tabla 6	29
Tabla 7	30
Tabla 8	31
Tabla 9	32
Tabla 10.....	32
Tabla 11.....	33
Tabla 12.....	33
Tabla 13.....	34
Tabla 14	36
Tabla 15	36

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una de las patologías crónicas con mayor prevalencia a nivel mundial. En países en vías de desarrollo, como México, su prevalencia representa un serio problema de salud pública y por lo tanto es un tema de estudio importante. Los factores determinantes para el desarrollo de esta enfermedad son tanto genéticos como ambientales. Mantener una dieta adecuada, el peso adecuado y hacer actividad física son las primeras medidas recomendadas para mejorar la calidad de vida e incrementar la expectativa de vida de los pacientes, el tratamiento farmacológico es usualmente el siguiente paso. Dentro de cada población existen variaciones en la respuesta interindividual a los fármacos que pueden ser debidas a variaciones genéticas. Uno de los tratamientos farmacológicos más comunes en México es el uso de sulfonilureas, solas o en combinación con metformina. Las sulfonilureas bloquean los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) para permitir la liberación de insulina. Variaciones de un solo nucleótido en los genes que codifican a los K_{ATP} : *KCNJ11* y *ABCC8* se han asociado con la variabilidad en la respuesta a sulfonilureas. A la fecha existe muy poca información acerca de estas variaciones dentro de poblaciones mexicanas. En el presente estudio se describe la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de 3 polimorfismos: *KCNJ11* rs5219 (E23K), *ABCC8* rs757110 (S1369A) y rs1799854 (-3C/T) en una muestra de 247 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de mestizos mexicanos (MM) de la jurisdicción sanitaria de Benito Juárez, Ciudad de México; y se compararon con las frecuencias de individuos sanos y con diabetes de diferentes grupos poblacionales listados en la base de datos del Proyecto de los 1000 genomas y la literatura científica. No se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas o genotípicas de *KCNJ11* rs5219 y *ABCC8* rs757110 entre los MM con la mayoría de los grupos comparados excepto por individuos sanos africanos y colombianos. En contraste, las frecuencias alélicas y genotípicas de *ABCC8* rs1799854 en los MM fueron significativamente

diferentes a las reportadas por el proyecto de los 1000 genomas y a las de individuos con diabetes tipo 2 de origen europeo, asiático y latinoamericano [T=0.704, G=0.296; CC=0.506, CT=0.397, TT=0.097; 95% intervalo de confianza; P 0.05]; excepto por individuos sanos del sur de Asia y europeos ibéricos, que pueden estar reflejando la historia de mestizaje de la población mexicana actual. Esta similaridad genética no se observó en otros grupos latinoamericanos analizados. Este es el primer reporte de frecuencias de *ABCC8* rs757110 y rs1799854 en población mexicana y específicamente en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Se analizó también la posible asociación de las variantes genéticas estudiadas con la respuesta al tratamiento con sulfonilureas utilizando como biomarcadores hemoglobina glucosilada (Hb1Ac) y glucosa preprandial (GP) en una sub muestra de 183 pacientes: 113 que recibían glibenclamida, ya sea sola o en combinación con metformina y 70 que recibían únicamente metformina. Los genotipos GG y GA de rs5219, AA y AC de rs757110 y CC CT de rs1799854 presentaron niveles significativamente mayores de HbA1c y GP en los pacientes que recibían glibenclamida, con respecto a los pacientes que sólo recibían metformina. Para el polimorfismo rs5919 (E23K) los genotipos GG y GA presentan un riesgo ligeramente mayor a presentar descontrol que los pacientes que reciben únicamente metformina (OR 1.184 IC (1.02-1.37) y OR 1.087 IC (1.01-1.17), respectivamente), lo mismo se observa en el caso de rs757110 (E33) para los genotipos AA y AC (OR 1.246 (IC 1.05-1.48) y OR1.082 (IC 1.01-1.16), respectivamente). En el caso de rs1799854 (E16) la asociación es menos clara, se observa una tendencia de mayor riesgo en los 3 genotipos, pero únicamente es significativa en CC (OR 1.108 CI 1.03-1.20).

Se observó también la asociación entre el tiempo de diagnóstico y la respuesta al tratamiento de manera diferencial a los genotipos en los pacientes tratados con glibenclamida, con respecto a los tratados únicamente con metformina. Para el polimorfismo rs5919 (E23K) los genotipos GG y

GA tienen un riesgo ligeramente mayor a presentar descontrol que los pacientes que reciben únicamente metformina (OR 1.184 IC (1.02-1.37) y OR 1.087 IC (1.01-1.17), respectivamente), al igual que en rs757110 (E33) para AA y AC (OR 1.246 (IC 1.05-1.48) y OR1.082 (IC 1.01-1.16), respectivamente). En el caso de rs1799854 (E16) la asociación es menos clara, se observa una tendencia de mayor riesgo en los 3 genotipos, pero únicamente es significativa en CC (OR 1.108 CI 1.03-1.20). Se sugiere que los alelos G-rs5219, A-rs757110 y C-rs1799854 representan un mayor riesgo para pacientes tratados con glibenclamida y que este riesgo se incrementa con la progresión de la patología.

Es posible que la interacción de múltiples genes pueda explicar de forma más certera los efectos marginales observados por polimorfismos aislados. Es por tanto necesaria la generación de modelos de interacción para poder brindar respuestas más certeras.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is one of the most prevalent chronic pathologies in the world. In developing countries, such as Mexico, its prevalence represents an important public health and research issue. Determining factors triggering T2DM are environmental and genetic; while diet, exercise and proper weight control are the first measures recommended to improve the quality of life and life expectancy of patients, pharmacological treatment is usually the next step. Within every population there are variations in interindividual drug response, which may be due to genetic background. Some of the most frequent first line T2DM treatments in developing countries are sulfonylureas (SU), whose targets are ATP-sensitive potassium channels (KATP). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the KATP coding genes, potassium voltage-gated channel subfamily J member 11 (*KCNJ11*), and ATP binding cassette subfamily C member 8 (*ABCC8*) have been associated with SU response variability. To date, there is little information regarding the mechanism by which these SNPs work within Mexican populations. The present study describes the distribution of three SNPs [*KCNJ11* rs5219 (E23K), *ABCC8* rs757110 (S1369A) and rs1799854 (-3C/T)] among Mexican Mestizo (MM) T2DM patients, and compares it with published data on various healthy subjects and T2DM populations. Through this comparison, no difference in the *KCNJ11* rs5219 and *ABCC8* rs757110 allelic and genotypic frequencies in MM were observed compared with most of the reported populations of healthy and diabetic individuals among other ethnic groups; except for African and Colombian individuals. By contrast, *ABCC8* rs1799854 genomic and allelic frequencies among MM were observed to be significantly different from those reported by the 1000 Genomes Project, and from diabetic patients within other populations reported in the literature, such as the European, Asian and Latin-American individuals [T=0.704, G=0.296; CC=0.506, CT=0.397, TT=0.097; 95% confidence interval (CI); P 0.05]; except for South Asian and Iberian populations, which may reflect the admixture origins of the

present Mexican population. This genetic similarity has not been observed in the other Latin-American groups. To the best of our knowledge, this is the first study of ABCC8 rs757110 and rs1799854 SNP frequencies in any Mexican population and, specifically with diabetic Mexicans.

It was also analyzed the association between SNP and treatment response through glycated hemoglobin 1Ac (HbA1c) and fasting plasma glucose (FPG) as biomarkers in a sub group of 183 patients: 113 receiving glibenclamide only or glibenclamide + metformin treatment and 70 receiving only metformin. GG and GA from rs5219, AA and AC from rs757110, and CC, CT from rs1799854 genotypes had a significant high level of HbA1c and FPG in patients treated with glibenclamide compared to those treated with metformin only. For rs5219 (E23K) GG and GA represent a slightly higher risk of glibenclamide failure (OR 1.184 CI (1.02-1.37) y OR 1.087 CI (1.01-1.17), respectively), the same is observed for rs757110 (E33) AA y AC (OR 1.246 (CI 1.05-1.48) y OR 1.082 (CI 1.01-1.16), respectively). For rs1799854 (E16) the association is less clear yet it is observed a tendency for increasing risk which is only significant for CC (OR 1.108 CI 1.03-1.20).

We suggest that G-rs5219, A-rs757110 y C-rs1799854 represent risk alleles associated to therapeutic failure of glibenclamide. It is known that interindividual responses to SU are affected by clinical factors, such as baseline glucose levels, disease duration, β -cell function and insulin resistance levels (51). However, multiple gene interaction may explain the marginal impact of each individual SNP, indicating, the necessity to construct an interaction model.

INTRODUCCIÓN

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por deficiencias en la secreción y/o liberación de insulina [1]. El tipo más prevalente es la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) que es la principal causa de morbilidad a nivel global y la tercera causa de muerte prematura [2].

En México la DMT2 ha encabezado los índices de morbilidad desde 2005 y representa la primera causa de muerte nacional [3, 4] con una prevalencia de 11.8% [5]. Los costos anuales asociados al tratamiento médico de la DMT2 son de cerca de 450 millones de dólares [6], mientras que cerca del 75% de los individuos diagnosticados y en tratamiento, no presentan un adecuado control glucémico. La combinación de estos factores hace que la DMT2 sea un padecimiento de gran importancia tanto para la salud pública como la investigación en México.

Los factores determinantes que desencadenan la DMT2 son tanto ambientales como genéticos. Los factores genéticos asociados a la predisposición o inicio de la DMT2 aún no están suficientemente definidos, pero son objeto de estudio intensivo actualmente. Muchos genes que han sido relacionados con la DMT2 presentan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's por sus siglas en inglés), cuyas frecuencias pueden variar en diferentes poblaciones. Los polimorfismos relacionados con blancos farmacológicos o su metabolismo son de especial interés en cuanto a que pueden darnos pautas para entender por qué existen diferencias entre poblaciones o entre individuos de la misma población, en las respuestas a un mismo fármaco o tratamiento [7].

El tratamiento farmacológico inicial para la DMT2 es mediante el uso de hipoglucemiantes orales, existen 5 grupos principales de fármacos que se utilizan para el control de la DMT2 (Tabla 1):

- Las biguanidas incrementan la sensibilidad celular a la insulina, la metformina es una de las más utilizadas en este grupo. Disminuye la producción de glucosa endógena y reduce la resistencia periférica a insulina.
- Las Tiazolidinedionas, sensibilizadoras a la insulina, son agonistas selectivos del receptor peroxisoma-proliferador-activado gamma ($PPAR\gamma$), disminuyen la resistencia a insulina y aumentan la respuesta a insulina endógena, aunque se han asociado con alto riesgo cardiovascular.
- Inhibidores de α -glucosidasa, inhiben la degradación enzimática de carbohidratos complejos en el intestino delgado.
- Las glinidas o metglitinidas secretagogos de insulina, se acoplan con un receptor diferente al de las sulfonilureas, pero también estimulan la secreción de insulina por el páncreas.
- Las sulfonilureas son secretagogos de insulina, inhiben los canales de potasio sensibles a ATP (K^+ATP). Las sulfonilureas de primera generación (por ejemplo, tolbutamida, tolazamida, clorpropamida) son fármacos con baja afinidad por los K^+ATP y, por lo tanto, requieren de altas dosis para ser eficaces. Las sulfonilureas de segunda generación (por ej. glibenclamida, glipicida, glicazida y glimepirida) poseen afinidad mayor (aprox. 100 veces), una acción más rápida y prolongada, además de una vida media en plasma más corta, por lo que son actualmente más utilizadas [8]. Generalmente las sulfonilureas se administran con metformina, lo cual incrementa la efectividad terapéutica [9].

Tabla 1. Hipoglucemiantes orales más comunes de acuerdo con su mecanismo de acción

Insulina	Secretatogos	Sulfonilureas	Tolbutamida, Clorporamida, Glibenclamida, Glipizida
		Glinidas	Nateglinida, Repaglinida
	Sensibilizadores	Biguanidas	Metformina, Buformina, Fenformina
		Tiazolidinedionas	Pioglitazona, Rosiglitazona
Otros	Inhibidores de -glucosidasa	Acarbosa, miglitol	

(Modificado de Zárte *et. al.* 2010)

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes establece que, en el tratamiento farmacológico de la DMT2, los medicamentos que pueden utilizarse para el control de la diabetes son sulfonilureas, biguanidas, insulinas o las combinaciones de estos medicamentos. Asimismo, se podrán utilizar los inhibidores de la -glucosidasa, tiazolidinedionas y otros que en su momento apruebe la Secretaría de Salud. En pacientes no obesos las sulfonilureas son los fármacos de primera línea, cuando no se logran las metas del tratamiento con manejo no farmacológico. En el caso de pacientes obesos las biguanidas, esencialmente metformina, son los fármacos de primera línea. Cuando no se alcanzan las metas del tratamiento con la metformina después de llegar a aplicar dosis máximas, se puede combinar con sulfonilureas, o bien sulfonilureas más inhibidores de la -glucosidasa [10].

En México el esquema terapéutico con sulfonilureas incluye varias sulfonilureas, no obstante, en el primer nivel de atención en sistema público se utiliza casi exclusivamente Glibenclamida

(tabletas de 5 mg), con una dosis inicial de 2.5 a 5.0 mg, ajustándose de acuerdo con la respuesta, sin exceder de 20 mg al día.

Las sulfonilureas son fármacos que inhiben los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) y tienen un amplio uso clínico para estimular la secreción de insulina [11]. Los K_{ATP} , están muy relacionados con enfermedades de manejo de glucosa y desórdenes de la secreción de insulina [12], se encuentran presentes en la mayoría de las células de mamíferos y son componentes clave que empatan el metabolismo de la glucosa, la actividad eléctrica de la membrana y la liberación de insulina [13]. Estos canales, poseen una estructura octamérica [14], constituida por 4 subunidades de la proteína Kir 6.1 o Kir 6.2 y 4 subunidades regulatorias del receptor a sulfonilureas (SUR 1 o SUR 2). Kir 6.2 se expresa en músculo cardiaco, esquelético y células β -pancreáticas [15]; SUR 1 se expresa principalmente en neuronas y células β -pancreáticas [16]. Los K_{ATP} se cierran en respuesta a sulfonilureas y son activados por diazoxida [17, 18]. Proveen la conductancia de K^+ dominante en reposo y determinan el potencial de membrana en las células β -pancreáticas y otros tipos celulares [12].

En condiciones fisiológicas, en las células β -pancreáticas la glucosa es transportada al citosol por el transportador de glucosa 2 (GLUT-2) y su metabolismo promueve la producción de ATP y disminuye el ADP. Kir 6.2 es bloqueado no cooperativamente por ATP; la asociación de Kir 6.2 con SUR 1 disminuye la media concentración inhibitoria media (IC_{50}) en un orden de magnitud [19]; por otro lado SUR 1 es activado por ADP/Mg^{2+} en el sitio de unión a nucleótidos 2 (NBD2 por sus siglas en inglés) [20]. El aumento en el ATP citósólico disminuye entonces la actividad de los K_{ATP} , lo que ocasiona que la membrana se despolarice, desencadenando un potencial de acción que activa canales de calcio de tipo L dependientes de voltaje ($L-Ca^{2+}$) y provocando un influjo de Ca^{2+} que desencadena la exocitosis de gránulos transportadores de insulina/Zn [12].

Los genes que codifican para las subunidades del K_{ATP} en células β -pancreáticas, *KCNJ11* (Kir 6.1) y *ABCC8* (SUR1) se encuentran en el mismo cromosoma en humanos (11p15.1), a una distancia de 4.5 kb. *KCNJ11* contiene un solo exón que codifica para una proteína de 390 aminoácidos que consiste en 2 regiones transmembranales y una subunidad formadora del poro. Se han reportado varias isoformas de esta proteína, resultado de empalme alternativo [21]. *ABCC8* contiene un sólo marco de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés), con 39 exones y una longitud de más de 100 kb de ADN genómico. Presenta empalme alternativo en el exón 17 lo que da como resultado dos formas de la proteína, una con 1581 aminoácidos y otra con 1582 que es la más abundante en páncreas y otros tejidos, aunque ambas formas se encuentran en todos los tejidos que expresan estos canales [12, 21].

Existen diferentes polimorfismos descritos en ambos genes, algunos de los cuales se han relacionado con patologías como hipo e hiperinsulinemia infantil [3] y con la susceptibilidad a DMT2 o su respuesta a fármacos [8, 22].

Las mutaciones en *ABCC8* (SUR1) son la causa más frecuente de hiperinsulinemia de la infancia. Estas mutaciones pueden dividirse en dos tipos funcionales: las mutaciones de clase I reducen el número de canales de potasio en la membrana plasmática por la interrupción de algún paso en la biogénesis del complejo del canal (síntesis, dirección, tráfico), mientras que las mutaciones de clase II reducen la posibilidad de apertura correcta del canal localizado y formado abrogando la activación por MgADP [12]. Las mutaciones en *KCNJ11* (Kir 6.2) son la causa menos frecuente de hiperinsulinemia de la infancia, también resultan en una actividad baja del canal. Las sulfonilureas pueden actuar como chaperonas químicas y corrigen deficiencias de tráfico de mutantes de SUR 1 [23]. Las mutaciones de ganancia de función tienden a mantener los canales abiertos, a las células β -hiperpolarizadas y reducen la secreción de insulina.

Existen indicios de SNP's en los genes que codifican para K_{ATP} que están asociados con mayor susceptibilidad a DMT2. En el caso de *KCNJ11* que codifica para Kir 6.1 uno de los polimorfismos más ampliamente estudiados es E23K, donde la sustitución de una adenina por una guanina en la posición 23 del gen ocasiona el cambio de aminoácido. Se ha encontrado que la presencia de este polimorfismo puede predisponer al desarrollo de DMT2 en varias poblaciones, sobre todo de origen europeo y asiático [24-29]. Los estudios funcionales han revelado que K23 aumenta la probabilidad de apertura, llevando a una susceptibilidad reducida a la inhibición por ATP [30, 31]. Aunque otros estudios sugieren un efecto protector del fenotipo K en el desarrollo de la enfermedad [27].

Para el caso de *ABCC8* que codifica para SUR1 existe mayor cantidad de polimorfismos reportados, y con amplia prevalencia en diferentes poblaciones. Varios de estos polimorfismos se han asociado con mayor predisposición a presentar DMT2 [22], o bien a una respuesta diferencial de los fármacos de tratamiento, como las sulfonilureas o repaglinina [25, 32, 33].

Dentro de las sulfonilureas, la glibenclamida es la más ampliamente usada en nuestro país, no obstante, su monoterapia se ha asociado con incremento en cardiotoxicidad debido a que es también ligando para SUR2 [34, 35]. La glicazida selectivamente inhibe a los K_{ATP} que contienen la isoforma SUR1. Algunos estudios indican que las variantes K de E23K (*KCNJ11*) y A de S1369A (*ABCC8*) se encuentran asociadas y aumentan la sensibilidad a glicazida de 3.5 veces [31]. Estos hallazgos son los primeros que demuestran sensibilidades alteradas de las variantes de *KCNJ11* y *ABCC8* y proveen el mecanismo molecular del incremento en la eficacia clínica de la glicazida en sujetos con DMT2, quienes son homocigotos para la variante del alelo A 1369 y proporciona la primera evidencia que la variante *ABCC8* S1369A altera las propiedades del canal de potasio sensible a ATP y puede contribuir al riesgo aumentado de diabetes tipo 2.

Existen pocos estudios de asociación de polimorfismos relacionados con la diabetes en población mexicana mestiza o nativa americana, por ejemplo: para el gen *TCF7L2* se encontró asociación de los polimorfismos rs12255372, rs7903146 y el microsatélite DG10S478 con diabetes Mellitus tipo 2 (OR 1.78, 1.39 y 1.62, respectivamente) en una población mestiza de la Ciudad de México [36]. En otro trabajo se identificó la variante R230C, rs9282541 del transportador de colesterol *ABCA1*, como exclusiva del linaje amerindio, donde el alelo C230 fue asociado con niveles bajos de HDL-C y con alto índice de masa corporal [37]; este mismo grupo encontró asociación de las variantes rs7903146 del gen *TCF7L2*, rs7480010 del gen *LOC387761* y rs1111875 del gen *HHEX/IDE* con DMT2, los individuos con diabetes analizados tuvieron aumento en el índice de masa corporal (IMC), triglicéridos, colesterol y glucosa, respectivamente con respecto a los controles [38]. Un estudio reciente analiza la asociación de 24 diferentes polimorfismos identificados como marcadores de DMT2 en otras poblaciones, para una población mexicana de pacientes con diabetes y controles utilizando estudios de asociación de genomas extensos (GWAS), encontrando asociación con DMT2 para: rs13266634 (*SLC30A8*), rs7923837 (*HHEX*), rs10811661 (*CDKN2A/2B*), rs4402960 (*IGF2BP2*), rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*) y rs2237892 (*KCNQ1*). Adicionalmente, rs7754840 (*CDKAL1*) se vio relacionado con DMT2 en pacientes no obesos, y para rs7903146 (*TCF7L2*) la asociación se observó en etapas tempranas de la enfermedad [39]. No obstante, ninguno de estos estudios aborda el problema desde el punto de vista farmacológico.

En México en el caso de los polimorfismos que afectan a los genes que integran al K_{ATP} , en un estudio previo [40] se evaluaron los polimorfismos T759T de SUR1 y de EK23 del gen *KCNJ11* en 504 pacientes de Unidades de Medicina Familiar del IMSS de cuatro estados. En su tesis presentó los primeros datos en población mexicana acerca de las frecuencias del polimorfismo E23K del gen *KCNJ11* (G/G: 86.31%, G/C: 5.36% y C/C: 8.33%) y T759T del exón

18 de *ABCC8* (C/C:97.22, C/T:2.58% y T/T:0.2%), en el caso de E23K las frecuencias para los tipos silvestres (G/G) que encontró este grupo son casi el doble que las reportadas para otras poblaciones, como la caucásica y asiática [25, 31, 41, 42]; mientras que las frecuencias encontradas para T759T resultaron muy similares a las reportadas en caucásicos [43, 44]. Sin embargo, en ese trabajo no encontraron ninguna asociación de estos polimorfismos con parámetros determinantes de la DMT2 como niveles de glucosa, HbA1c, colesterol o triglicéridos, ni con el tratamiento con sulfonilureas [40].

Si bien su cálculo de factor de riesgo u “Odds Ratios” en el caso de la asociación colesterol y triglicéridos con T759T no fueron significativas, presentan ORs de 1.55 y 1.77 para T/T, respectivamente y en el caso de E23K una OR de 1.23 para G/C en asociación con colesterol y OR de 1.24 en el caso de triglicéridos para C/C; sin embargo, no se discutieron las implicaciones de estos resultados en una enfermedad de claro origen poligénico y multifactorial como la diabetes.

No existen reportes en población mexicana de las frecuencias de los polimorfismos exón 16 (-3C/T) y exón 33 (S1369A) de *ABCC8* que pretendemos estudiar, ni de su asociación con la DMT2, pero en otras poblaciones se ha reportado que estas variantes alélicas pueden modificar parámetros bioquímicos como la HbA1c o los niveles de lípidos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe evidencia de que los polimorfismos en los genes que codifican para el canal de potasio sensible a ATP pueden conducir a la modulación de la respuesta a la terapia con sulfonilureas, en la glucemia preprandial y postprandial, así como en la hemoglobina glicosilada (HbA1c) [31, 33]. Por lo que resulta de gran importancia estudiar, en pacientes que tienen diabetes mellitus tipo 2 de nuestra población, la frecuencia de estas variantes alélicas, dado que hay poca información acerca de la arquitectura genética mexicana en cuanto a estos polimorfismos; por otro lado, estudiar si existe asociación entre diferentes genotipos y respuestas diferenciales al tratamiento con sulfonilureas (glibenclamida), puede proporcionar información útil para determinar si el tratamiento a los pacientes es el adecuado, determinar si las dosis suministradas deben modificarse en casos específicos para prevenir posibles riesgos de incremento en la sensibilidad o resistencia y también decidir cuándo debe emplearse una diferente combinación de fármacos para optimizar el tratamiento de su enfermedad.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En México, la diabetes mellitus tipo 2 se ha convertido en una epidemia creciente encabezando la lista de mortalidad general desde 2005, con niveles crecientes de pacientes y defunciones. La tasa de mortalidad por diabetes mellitus con base en las estadísticas oficiales de la Secretaría de Salud, va en aumento, de 59.0% en 2004 a 70.8% en 2008 [3], siendo la primera causa de muerte a nivel nacional y la segunda en la Ciudad de México [4]. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 la prevalencia es de 11.8%, que además presenta, en su mayoría, mal control glicémico [5]. De acuerdo con la información de la ENSANUT 2012, cerca del 75% de los pacientes esta descontrolado aun recibiendo tratamiento médico [45]. Por tal motivo es necesario replantear el esquema de tratamiento que actualmente se lleva a cabo en nuestros sistemas de salud, para asegurar una mejor calidad de vida a los pacientes que presentan este padecimiento.

Los factores genéticos que predisponen a la DMT2 y a la respuesta a fármacos para su tratamiento comienzan a ser comprendidos, pero su presencia en diferentes poblaciones no es homogénea. En nuestra población prácticamente no hay estudios respecto a la frecuencia de estos factores y su relación con la eficacia de los tratamientos utilizados. Dada la alta prevalencia de DMT2 en nuestra población, es de gran utilidad conocer la frecuencia de los polimorfismos que se han asociado a diferencias en la respuesta farmacológica de las sulfonilureas, variaciones que pueden ayudarnos a brindar un tratamiento más eficaz para los pacientes o incluso modificar los esquemas de tratamientos y brindarles mejor calidad de vida.

Las sulfonilureas son agentes hipoglucemiantes utilizados para promover la secreción de insulina en la diabetes *mellitus* tipo 2. Se unen al receptor de sulfonilureas tipo 1 (SUR-1), el cual es una subunidad funcional del canal de potasio sensible-ATP. El otro componente del canal de

potasio es Kir6.2 codificado por el gen *KCNJ11*. Existe evidencia de que los polimorfismos en estos genes pueden conducir a la modulación de la respuesta a la terapia con sulfonilureas, en la glicemia preprandial y postprandial, así como en la Hemoglobina glicosilada (HbA1c) [31, 33]. Por lo que es importante estudiar en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de nuestra población la frecuencia de estas variantes alélicas de riesgo, ya que proporcionarán información útil para determinar si estos pacientes deberán continuar con terapias que involucren sulfonilureas, emplearse una diferente combinación de fármacos para optimizar el tratamiento oral de su enfermedad, o modificar las dosis suministradas para prevenir posibles riesgos de cardiotoxicidad, sensibilidad o resistencia.

OBJETIVOS

Describir las frecuencias de los polimorfismos rs5219 (E23K) del gen *KCNJ11* y rs1799854 (-3C/T) y rs757110 (S1369A) del gen *ABCC8* que codifican para el canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}), en pacientes con diabetes tipo 2 mexicanos, que reciben tratamiento con sulfonilureas, biguanidas o ambas. Comparar la distribución genotípica y alélica de nuestra muestra con las de otras poblaciones ya reportadas de individuos con y sin diabetes. Y analizar la posible asociación entre estos polimorfismos y la respuesta al tratamiento utilizando el nivel de glucosa preprandial y la HbA1c, como marcadores de la eficacia del tratamiento farmacológico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos de *ABCC8* (SUR1): rs1799854 del exón 16 (-3C/T) y rs757110 del exón 33 (S1369A), en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que reciben tratamiento con sulfonilureas, biguanidas o ambos.
2. Identificar la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo de *KCNJ11* (Kir 6.2) rs5219 (E23K), en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que reciben tratamiento con sulfonilureas, biguanidas o ambos.
3. Determinar si existen diferencias en la distribución de los polimorfismos por sexo, grupo de edad o tratamiento y con otras poblaciones reportadas.
4. Determinar parámetros bioquímicos clínicos en estos pacientes: glicemia preprandial, HbA1c, triglicéridos y colesterol total; e identificar si existe alguna asociación entre estos parámetros y las variantes alélicas presentadas en el grupo de pacientes con DMT2, como marcadores de la eficacia del tratamiento farmacológico.

METODOLOGÍA

Selección de los pacientes y diseño del estudio

Este estudio transversal observacional, incluyó un total de 247 pacientes con DMT2 que fueron reclutados entre julio de 2014 a octubre de 2016 en los Centros de Salud Mixcoac y Portales de la Jurisdicción Sanitaria de Benito Juárez, Ciudad de México.

Se reclutaron 145 pacientes en Centro de Salud Portales y 102 en Centro de Salud Mixcoac. Del grupo total tuvimos 165 mujeres y 82 hombres, a todos ellos se explicó la finalidad del estudio y se pidió firmaran consentimiento informado (ANEXO III).

La muestra total fue genotipificada para los tres polimorfismos de estudio para realizar un primer análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas, posteriormente se tamizó esta misma muestra para conservar a los individuos que mantuvieron el uso de hipoglucemiantes orales, únicamente glibenclamida y/o metformina, además fueron eliminados aquellos con registros clínicos incompletos, con lo que quedamos con una muestra final de 183 individuos que a su vez se subdividieron de acuerdo al tratamiento farmacológico recibido (Figura 1).

Toma de datos clínicos y diseño de la base de datos

La colecta de datos antropométricos, clínicos y bioquímicos se realizó a partir de los expedientes de cada centro de salud entre las fechas de octubre de 2015 a febrero de 2016.

Se generó una base de datos para vaciado de información en el programa Excel de Microsoft Office que contiene los datos de identificación de las muestras y de los pacientes en los centros de salud (número de expediente); para cada paciente participante en el estudio se tomaron

entradas de datos de diferentes fechas en retrospectiva, desde la última fecha de consulta y hasta un año anterior, dependiendo la disponibilidad de la información. Se hizo un análisis posterior a la toma de datos para identificar los puntos temporales que cumplían con nuestros criterios de inclusión y que serían utilizados para el análisis de los datos.

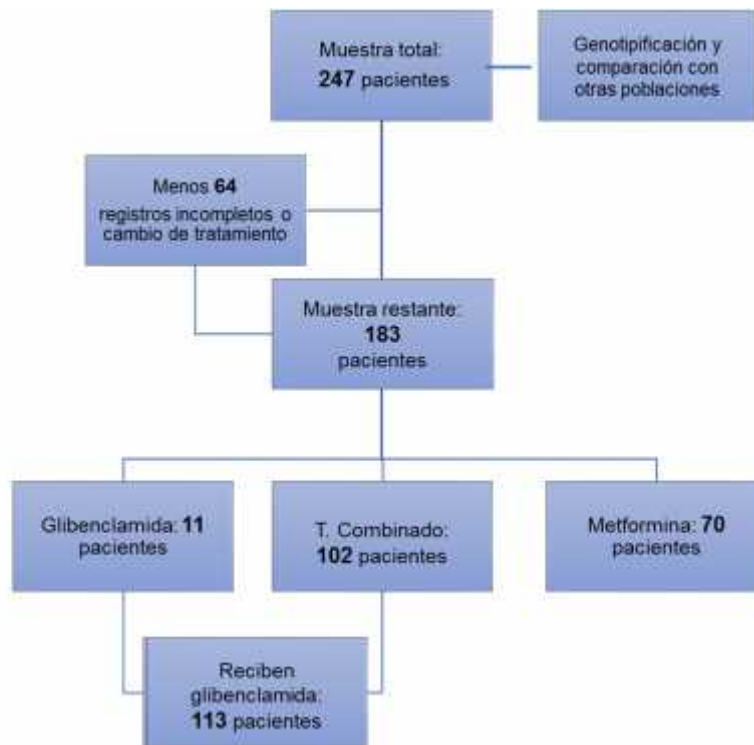


Figura 1. Diagrama de flujo del muestreo y segmentación de la muestra de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Para el manejo estadístico de los datos se diseñó una base de datos en el programa IBM SPSS 23, donde se decodificaron las variables y se vaciaron solamente los datos de los puntos seleccionados por paciente.

Criterios de Inclusión

Los criterios de selección de los pacientes fueron: adultos entre 18 y 90 años, mexicanos mestizos autoproclamados de al menos 3 generaciones, diagnosticados con DMT2 de acuerdo con los

criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) [1], los que reciben hipoglucemiantes orales: glibenclamida, metformina o una combinación de ambas con la misma dosificación por al menos 3 meses.

Criterios de Exclusión

Pacientes con diabetes mellitus tipo 1, gestacional o infantiles. Pacientes femeninas gestantes, o en periodo de lactancia. Pacientes con insuficiencia renal diagnosticada y problemas coronarios severos. Pacientes que recibían insulina u otro tratamiento para diabetes diferente a glibenclamida y/o metformina. Pacientes emparentados consanguíneamente.

Criterios de eliminación

Inicio de tratamiento con insulina u otro hipoglucemiante oral diferente a glibenclamida y/o metformina. Falta de información clínica relevante o datos bioquímicos en los expedientes clínicos. No demostrar la ancestría mexicana. Falla en la obtención de los datos genéticos. La solicitud del participante de retirarse del estudio voluntariamente.

Obtención y procesamiento de muestras biológicas

Para la obtención de los ácidos nucleicos de cada paciente se extrajo mediante flebotomía 6ml de sangre total en tubos de vidrio con EDTA (Vacutainer®; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Los pacientes se encontraban en ayuno al momento de la toma de muestra y las muestras fueron tomadas por el personal del laboratorio de cada centro de salud y fueron conservadas en refrigeración.

Se hicieron alícuotas de 1ml en tubos de 1.5 ml para cada muestra que fueron etiquetadas y almacenadas en congelación hasta su uso.

Obtención de ADN genómico

Para la extracción de ácido desoxirribonucleico genómico (ADNg) se utilizó el método de extracción en columnas de UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA). El protocolo ajustado se detalla a continuación: En micro tubos de 2ml se tomaron 200µl de sangre total y se agregaron 10µl de proteinasa K y 200µl de solución de lisis (B1), se mezcló con agitador durante 15 segundos para homogenizar, se añadieron 200µl de etanol 100% (B2), se homogenizó durante 15 segundos. El lisado fue transferido a las columnas de sílica del paquete de extracción y se centrifugó por 1 minuto a 13 000 x g para la unión del ADNg y elusión de proteínas. Se eliminó el componente eluido y la columna fue colocada en un nuevo tubo de colección, se agregaron 500 µl de solución salina de lavado (B3) y se centrifugó por 1 min a 30 000 x g, se eliminó el flujo colectado y se agregaron 500 µl de solución de lavado B4 (etanol 70%), se centrifugó por 1 min a 30 000 x g, se eliminó el flujo colectado y se centrifugó 1 min más a 30 000 x g para eliminar los restos de etanol de la columna. Para eluir el ADNg se colocó la columna en un tubo de colección nuevo y se agregaron 100µl de amortiguador B5 (TE: 10mM Tris, 1mM EDTA) o de agua inyectable, se incubó la columna 10 min. A 65°C y se centrifugó a 30 000 x g x 1 min. Se hicieron pruebas con muestras de ADNg solubilizadas tanto en TE como en agua inyectable para determinar si había diferencias en cuanto a estabilidad a largo plazo, concentración obtenida y eficiencia de las reacciones de amplificación y no se encontró diferencias en el periodo de trabajo; sin embargo, la relación de absorbancia 260/280 nm para determinar la pureza de las muestras si se observó menos estable en las muestras diluidas en agua inyectable, por lo que los eluidos de las columnas de sílica se solubilizaron en

amortiguador TE para la determinación de concentración y pureza y para su conservación a largo plazo en congelación a -15°C.

Se determinó la concentración de cada extracción mediante espectrofotometría por absorbancia a 260 nm y la relación de absorbancia 260/280 nm para determinar la pureza, el equipo utilizado fue un espectrofotómetro Jenway 7305 (Cole-Parmer Ltd., Staffordshire, UK).

En la Figura 2 se muestra un diagrama del protocolo utilizado en la extracción.

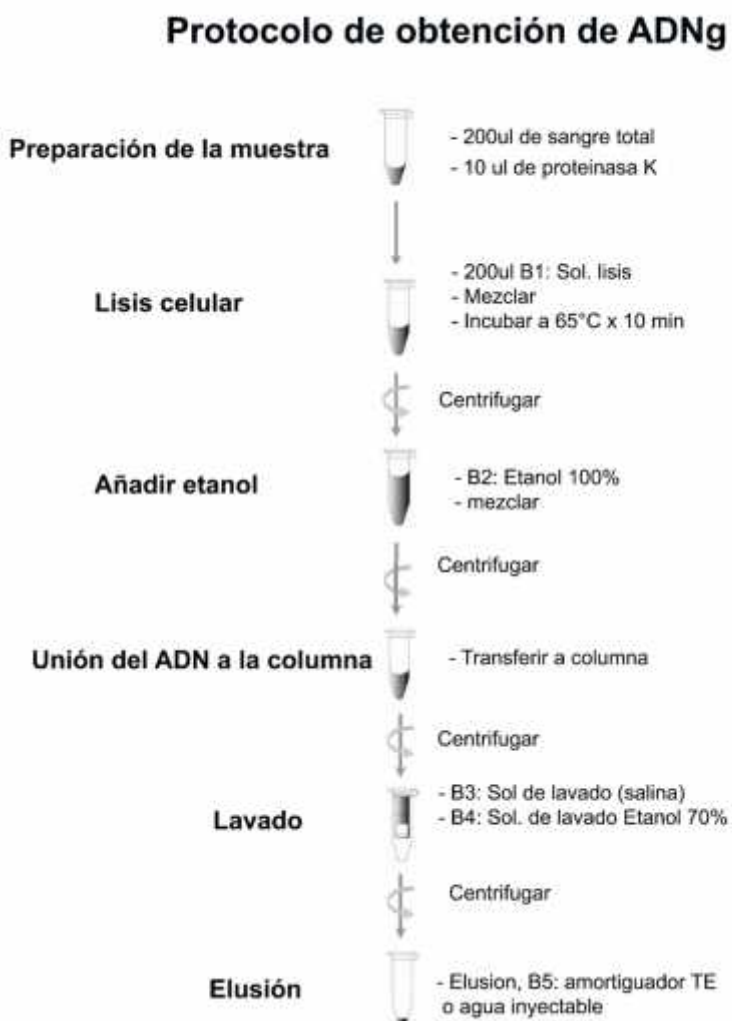


Figura 2. Representación esquemática del protocolo utilizado para la extracción de ADNg a partir de sangre total, de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tratados con glibenclamida, metformina o ambos. (UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation Kit; Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA).

Para verificar la integridad del ADNg, se corrieron 5µl de cada extracción en geles de agarosa al 1% con amortiguador TAE 1X (40mM Tris, 20mM ácido acético y 1mM EDTA) en electroforesis horizontal a 100 V durante 50 min (Figura 3 panel izquierdo).

Posteriormente se prepararon alícuotas de trabajo 50 y 100 µl para cada muestra a una concentración final de 20ng/µl, la concentración final fue corroborada por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 1X (Figura 3 panel derecho). Todas las muestras y alícuotas de ADNg fueron etiquetadas con el mismo código que nos fue dado por cada centro de salud y conservadas a -15°C hasta su uso y posterior a él.

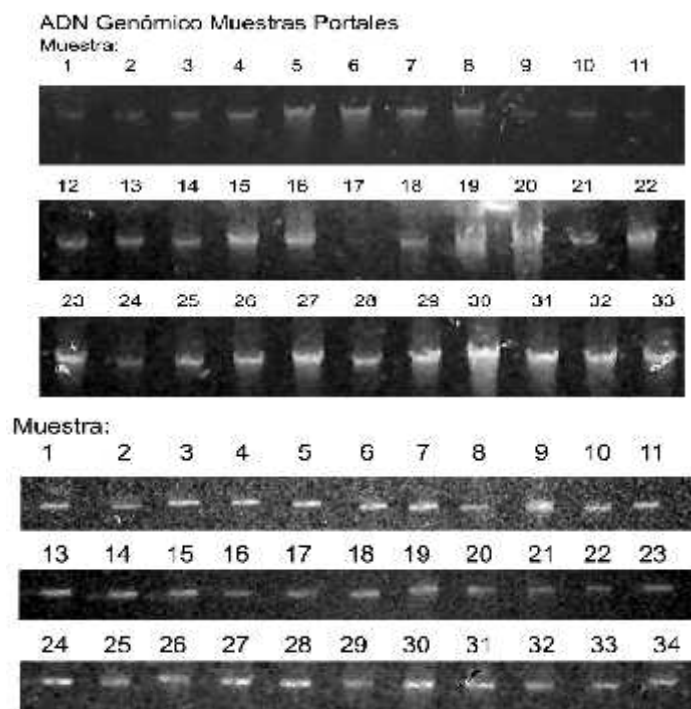


Figura 3. Extracción y cuantificación de ADN genómico de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 del Centro de Salud Portales. En el panel superior se muestran ejemplos de los geles de integridad de ADNg realizados después de la extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre total. En el panel inferior se observa un ejemplo de las alícuotas de trabajo de ADNg que fueron diluidas a una concentración final de 20 ng/µl. Se cargaron 5µl de cada alícuota en cada caso y se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X.

Genotipificación

Para la genotipificación de los polimorfismos de estudio se realizó discriminación alélica utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real, en un equipo ViiA™ 7 Real-Time PCR system, utilizando sondas TaqMan® (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA). En la Tabla 2 se detallan los datos de las sondas utilizadas.

Tabla 2. Sondas utilizadas en la genotipificación de pacientes con diabetes mellitus tipo 2

No. de catálogo	Polimorfismo	Concentración
C_11654065_10	rs5219 (<i>KCNJ11</i> E23K)	40X
C__9686360_20	rs1799854 (<i>ABCC8</i> -3C/T)	40X
C___600632_20	rs757110 (<i>ABCC8</i> S1369A)	20X

Las reacciones para genotipificación fueron preparadas en 25µL de volumen final en micro placas de 96 pozos (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), con las siguientes condiciones: 95°C por 10 min de desnaturalización inicial, posteriormente 40 ciclos de 95°C por 15 seg. y 60°C por 1 min de alineación/extensión con una fase final de 60°C po 30 seg. El detalle de la composición de cada reacción se detalla en la Tabla 3.

Se repitieron varias muestras al azar para corroborar la confiabilidad de los resultados obtenidos en cada genotipificación.

Tabla 3. Composición de las reacciones de genotipificación

Componente	rs5219 (E23K)	rs1799854 (-3C/T)	rs757110 (S1369A)
	Volumen (Concentración final)		
TaqMan® Genotyping Master Mix 2X	10 µl (0.8X)	10 µl (0.8X)	10 µl (0.8X)
Sonda	0.3 µl (0.5X)	0.3 µl (0.5X)	0.5 µl (0.4X)
ADNg	1 µl (20ng)	1 µl (20ng)	1 µl (20ng)
Agua ultrapura	13.7 µl	13.7 µl	13.5 µl

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genómicas de KCNJ11 rs5219, ABCC8 rs757110, y rs1799854 se determinaron por conteo directo y el resto de los análisis se realizaron utilizando el software estadístico SPSS 23.0 para Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Las frecuencias de los polimorfismos de los pacientes de ambos centros de salud y de la muestra total con otras poblaciones reportadas fueron comparadas mediante prueba de independencia de χ^2 . Para la comparación de los datos bioquímicos y antropométricos se realizó ANOVA de dos vías cuando las variables muestran distribución normal y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para las variables con distribución diferente a la normal. Se calculó la razón de momios (OR) para medir la asociación de los biomarcadores, HbA1C y Glucosa Preprandial mediante un modelo de análisis multivariado jerarquizado por edad y tiempo de diagnóstico. Se consideró $P < 0.05$ con un intervalo de confianza de 95% para indicar diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Características de la muestra

La muestra inicial estaba compuesta por 247 pacientes con DMT2 de los Centros de Salud Portales y Mixcoac pertenecientes a la Jurisdicción sanitaria de Benito Juárez Ciudad de México, 145 pacientes en Centro de Salud Portales y 102 en Centro de Salud Mixcoac. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los datos bioquímicos y antropométricos entre las muestras de ambos centros de salud. La muestra total se compuso de 165 mujeres y 82 varones con un promedio de 60.05 (± 0.91) y 61.24 (± 1.34) años, respectivamente; 61.5% de los pacientes tenían sobre peso (55.7% mujeres, 73.8% hombres) y cerca del 25% del total con obesidad grado I (27.9% mujeres, 20.0% hombres). El tiempo medio de duración de la enfermedad (años desde primer diagnóstico) fue de 10 ± 0.61 años. El porcentaje medio de HbA1c fue de 7.55 ± 0.15 y la media de glucosa preprandial 141.86 ± 4.06 (Tabla 4).

Tabla 4. Características demográficas de la muestra total.

Parámetro	Total (n=247)	Mujeres (n=165)	Hombres (n=82)
Edad (años)	61.00 (68.00-53.00)	60.00 (68.00-52.00)	61.00 (69.00-56.00)
Peso (kg)	67.75 (78.28-60.00)	66.90 (76.40-58.65)	70.50 (83.50-63.65)
IMC (kg/m²)	28.35 (32.89-25.25)	29.13 (33.33-26.13)	26.87 (30.67-24.54)
T. D. (años)	8.00 (15.00-4.00)	8.00 (13.25-4.00)	8.50 (17.5-4.75)
HbA1c (%)	7.00 (8.40-6.30)	7.00 (8.40-6.21)	7.00 (8.53-6.30)
G. P (mg/dl)	129.00 (160.36-107.04)	130.00 (161.16-109.00)	125.00 (156.34-106.50)
Trg. (mg/dl)	181.93 (229.50-130.00)	185.50 (225.97-139.27)	163.00 (239.25-112.50)
Col. (mg/dl)	191.92 (216.75-130.00)	192.71 (219.35-172.20)	185.00 (210.26-166.88)

Mediana (rango inter-cuartil). IMC: índice de masa corporal; T.D: tiempo de diagnóstico; Hb1Ac: hemoglobina glicosilada; G.P.: glucosa preprandial; Trg: triglicéridos; Col: colesterol total.

Se genotipificó la muestra total para los tres polimorfismos de estudio, las frecuencias genotípicas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los casos (Tabla 5). Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas se compararon con las reportadas para otras poblaciones (población abierta, sin diabetes) utilizando la base de datos del Proyecto de los 1000 Genomas [46] y también con otras poblaciones de pacientes con DMT2 de trabajos reportados. Se incluyeron estudios (para la comparación con individuos con DMT2) que fueran comparables con nuestra muestra de acuerdo a las características de la población y criterios de inclusión y exclusión (Tablas 6-8).

Tabla 5. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos analizados.

rs5219 (E23K)	Frecuencia	%	pχ^2
GG	93	37.7	0.69
GA	112	45.3	
AA	42	17.0	
Total	247	100.0	
rs1799854 (-3C/T)	Frecuencia	%	pχ^2
CC	125	50.6	0.55
CT	98	39.7	
TT	24	9.7	
Total	247	100.0	
rs757110 (S1369A)	Frecuencia	%	pχ^2
AA	75	30.4	1.63
AC	131	53.0	
CC	41	16.6	
Total	247	100.0	

p χ^2 < 5.99 95% de Intervalo de Confianza. Prueba de χ^2 para equilibrio de Hardy-Weinberg

Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas con otras poblaciones

Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs5219 en nuestra muestra de mestizos mexicanos (MM) no fueron diferentes al resto de los pacientes con DMT2 comparados, de origen predominantemente caucásico y asiático [25, 33, 47-54] y tampoco se encontraron diferencias significativas con las frecuencias genotípicas de otras muestras de individuos mexicanos reportadas en la literatura [55, 56]. En el caso de los datos del Proyecto de los 1000 genomas las muestras de MM sólo tuvieron diferencias estadísticamente significativas con africanos ($p=2.17E-12$ y $p=2.31E-19$ para las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente) y mestizos colombianos de Medellín ($p=0.002$ y $p=7.20E-05$ para las frecuencias alélicas y genotípicas respectivamente), los resultados pueden observarse en la Tabla 6.

Las frecuencias de los MM para ABCC8 rs757110 (S1369A) se comportan de forma similar a las de rs5219, en la comparación con los datos del Proyecto de los 1000 Genomas, las únicas diferencias significativas se observaron en las frecuencias de africanos ($p=1.45E-13$ y $p=1.72E-23$ para las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente) y mestizos colombianos de Medellín ($p=6.13E-04$ y $p=2.52E-06$ para las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente). No se observan diferencias con las frecuencias de pacientes con DMT2 de otras poblaciones [33, 47, 52, 54, 57]. A la fecha, hasta donde tenemos conocimiento, no existen estudios que reporten las frecuencias alélicas o genotípicas de este polimorfismo en poblaciones mexicanas. Los resultados se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 6. *KCNJ11* rs5219 (E23K) Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas

Proyecto de los 1000 genomas	C (E)	N	T (K)	n	p \neq	CC (EE)	N	CT (EK)	N	TT (KK)	n	p \neq
MM	0.603	298	0.397	196		0.377	93	0.453	112	0.170	42	
AFR	0.977	1291	0.023	31	2.17E-12	0.956	632	0.047	27	0.003	2	2.31E-19
EAS	0.662	667	0.338	341	0.387	0.429	216	0.466	235	0.105	53	0.386
SAS	0.604	591	0.396	387	0.988	0.380	186	0.448	219	0.172	84	0.997
EUR	0.647	651	0.353	355	0.520	0.400	201	0.495	249	0.105	53	0.406
EUR IBS	0.617	132	0.383	82	0.839	0.374	40	0.486	52	0.140	15	0.815
AMR	0.707	491	0.293	203	0.121	0.496	172	0.424	147	0.081	28	0.084
AMR CLM	0.803	151	0.197	37	0.002	0.638	60	0.330	31	0.032	3	7.20E-05
AMR MXL	0.594	76	0.406	52	0.897	0.328	21	0.531	34	0.141	9	0.54
AMR PEL	0.682	116	0.318	54	0.243	0.435	37	0.494	42	0.071	6	0.092
AMR PUR	0.712	148	0.288	60	0.104	0.519	54	0.385	40	0.096	10	0.086

DMT2	C	N	T	n	p \neq	CC	n	CT	N	TT	n	p \neq
MM	0.603	298	0.397	196		0.377	93	0.453	112	0.170	42	
AMR YCN	0.633	164	0.367	95	0.662							
AMR MYN	0.654	75	0.346	40	0.449							
EAS (China)	0.620	124	0.380	76	0.805	0.350	35	0.540	54	0.110	11	0.340
EAS (Japón)	0.614	1954	0.386	1226	0.873	0.384	610	0.462	734	0.155	246	0.959
EUR (Alemania)	0.604	116	0.396	76	0.988	0.385	37	0.437	42	0.177	17	0.975
EUR (Reino Unido)	0.593	427	0.407	293	0.885	0.369	133	0.447	161	0.183	66	0.97
EUR (Italia)	0.642	674	0.358	376	0.569	0.385	202	0.514	270	0.101	53	0.338
EUR (Grecia)	0.668	235	0.332	117	0.339	0.455	80	0.426	75	0.119	21	0.423
EUR (Eslovaquia)	0.599	121	0.401	81	0.954	0.366	37	0.465	47	0.168	17	0.984
EUR (Eslovenia)	0.622	194	0.378	118	0.783	0.378	59	0.487	76	0.135	21	0.76
EUR (Croacia)	0.607	277	0.393	179	0.954	0.382	87	0.452	103	0.167	38	0.997
EUR (Rusia)	0.496	128	0.504	130	0.128	0.217	28	0.558	72	0.225	29	0.045
WAS (Este Rusia)	0.649	1926	0.351	1042	0.501	0.428	635	0.442	656	0.130	193	0.647

MM: mestizos mexicanos con DMT2 tipo 2; AFR: todos los individuos africanos del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; EAS: todos los individuos de Asia del este del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; SAS: todos los individuos de Asia del sureste del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; EUR: todos los individuos europeos del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; IBS: población ibérica en España; AMR: Mestizos americanos; CLM: Colombianos de Medellín, Colombia; MXL: mexico-americanos de los ángeles, USA; PEL: Peruanos de Lima, Perú; PUR: puertorriqueños, Puerto Rico; (proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega) YCN: mestizos con DMT2 de Yucatán; MYN: Mayas con DMT2; p \neq prueba de independencia de Chi cuadrada. Los resultados en **negrita** representan diferencias significativamente estadísticas (p < 0.05 I.C. 95%).

Tabla 7 ABCC8 rs757110 (S1369A) Comparación de frecuencias alélicas y fenotípicas.

Proyecto de los 1000 genomas	T	N	G	n	p \neq	TT	n	TG	n	GG	n	p \neq
MM	0.569	281	0.431	213		0.304	75	0.530	131	0.166	41	
AFR	0.975	1289	0.025	33	1.45E-13	0.953	630	0.044	29	0.003	2	1.72E-23
EAS	0.639	644	0.361	364	0.195	0.395	199	0.488	246	0.117	59	0.331
SAS	0.585	572	0.415	406	0.819	0.354	173	0.462	226	0.184	90	0.652
EUR	0.648	652	0.352	354	0.252	0.404	203	0.489	246	0.107	54	0.238
IBS	0.617	132	0.383	82	0.490	0.374	40	0.486	52	0.140	15	0.567
AMR	0.693	481	0.307	213	0.069	0.470	163	0.447	155	0.084	29	0.030
CLM	0.793	149	0.207	39	6.13E-04	0.606	57	0.372	35	0.021	2	2.52E-06
MXL	0.586	75	0.414	53	0.808	0.328	21	0.516	33	0.156	10	0.932
PEL	0.682	116	0.318	54	0.098	0.435	37	0.494	42	0.071	6	0.041
PUR	0.678	141	0.322	67	0.111	0.462	48	0.433	45	0.106	11	0.061

T2DM	T	N	G	n	p \neq	TT	n	TG	n	GG	n	p \neq
MM	0.569	281	0.431	213		0.304	75	0.530	131	0.166	41	
EAS (China)	0.565	130	0.435	100	0.954	0.330	38	0.470	54	0.200	23	0.676
EAS (Japón)	0.592	1884	0.408	1296	0.742	0.358	570	0.468	744	0.174	276	0.655
EUR (Eslovenia)	0.619	193	0.381	119	0.471	0.378	59	0.481	75	0.141	22	0.536
EUR (Croacia)	0.607	277	0.393	179	0.585	0.395	90	0.425	97	0.180	41	0.301
Este Rusia (Asia del este)	0.623	1763	0.377	1065	0.436	0.393	556	0.460	651	0.146	207	0.414

MM: mestizos mexicanos con DMT2; AFR: todos los individuos africanos del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega EAS: todos los individuos de Asia del este del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; SAS: todos los individuos de Asia del sureste del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; EUR: todos los individuos europeos del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; IBS: población ibérica en España; AMR: Mestizos americanos; CLM: Colombianos de Medellín, Colombia; MXL: México-americanos de los ángeles, USA; PEL: Peruanos de Lima, Perú; PUR: puertorriqueños, Puerto Rico; (proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega) YCN: mestizos con DMT2 de Yucatán; MYN: Mayas cond DMT2; p \neq prueba de independencia de Chi cuadrada. Los resultados en **negrita** representan diferencias significativamente estadísticas (p < 0.05 I.C. 95%).

En el caso del polimorfismo ABCC8 rs1799854 (-3C/T) las frecuencias alélicas y genotípicas de los MM fueron significativamente diferentes todas las poblaciones de T2DM comparadas, que son de origen europeo y asiático, principalmente [25, 33, 47, 48, 58, 59]. Al comparar con los individuos de población abierta del Proyecto de los 1000 genomas, las frecuencias tanto alélicas como fenotípicas de los MM fueron diferentes a la mayoría de los grupos comparados, excepto por los europeos Ibéricos (EUR IBR) y del sur de Asia (SAS). A la fecha no tenemos conocimiento de reportes de la genotipificación de este polimorfismo en otro grupo de individuos con DMT2 o sanos mexicanos (Tabla 8).

Tabla 8. ABCC8 rs1799854 (-3C/T) Comparación de frecuencia alélicas y genotípicas

Proyecto de los 1000 genomas	C	n	T	n	p \neq	CC	n	CT	n	TT	N	p \neq
MM	0.704	348	0.296	146		0.506	125	0.397	98	0.097	24	
AFR	0.862	1139	0.138	183	0.006	0.741	490	0.241	159	0.018	12	7.96E-04
EAS	0.449	453	0.551	555	2.41E-04	0.198	100	0.502	253	0.300	151	2.20E-06
SAS	0.681	666	0.319	312	0.724	0.481	235	0.401	196	0.119	58	0.865
EUR	0.580	583	0.420	423	0.067	0.330	166	0.499	251	0.171	86	0.031
EUR IBS	0.612	131	0.388	83	0.170	0.393	42	0.439	47	0.168	18	0.169
AMR	0.464	322	0.536	372	5.35E-04	0.225	78	0.478	166	0.297	103	1.30E-05
AMR CLM	0.516	97	0.484	91	0.006	0.266	25	0.500	47	0.234	22	0.001
AMR MXL	0.422	54	0.578	74	5.10E-05	0.172	11	0.500	32	0.328	21	1.35E-07
AMR PEL	0.312	53	0.688	117	1.91E-08	0.071	6	0.482	41	0.447	38	3.15E-14
AMR PUR	0.567	118	0.433	90	0.044	0.346	36	0.442	46	0.212	22	0.022

DMT2	C	n	T	n	p \neq	CC	n	CT	n	TT	n	p \neq
MM	0.704	348	0.296	146		0.506	125	0.397	98	0.097	24	
EAS (China)	0.410	82	0.590	118	2.50E-05	0.140	14	0.540	54	0.320	32	1.03E-08
EAS (Japón)	0.474	1507	0.526	1673	8.91E-04	0.233	371	0.481	765	0.286	454	2.90E-05
SAS (India)	0.568	227	0.433	173	0.044	0.405	81	0.325	65	0.270	54	0.006
EUR (Reino Unido)	0.464	412	0.536	476	5.35E-04	0.191	85	0.545	242	0.264	117	3.50E-06
EUR (Croacia)	0.489	223	0.511	233	0.002	0.197	45	0.583	133	0.219	50	1.30E-05
EUR (Polonia)	0.450	36	0.550	44	2.54E-04	0.250	10	0.400	16	0.350	14	6.00E-06

MM: mestizos mexicanos con DMT2; AFR: todos los individuos africanos del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega EAS: todos los individuos de Asia del este del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; SAS: todos los individuos de Asia del sureste del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; EUR: todos los individuos europeos del proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega; IBS: población ibérica en España; AMR: Mestizos americanos; CLM: Colombianos de Medellín, Colombia; MXL: México-americanos de los ángeles, USA; PEL: Peruanos de Lima, Perú; PUR: puertorriqueños, Puerto Rico; (proyecto de los 1000 genomas 3rd entrega) YCN: mestizos con DMT2 de Yucatán; MYN: Mayas con DMT2; p \neq prueba de independencia de Chi cuadrada. Los resultados en **negrita** representan diferencias significativamente estadísticas (p < 0.05 I.C. 95%).

Análisis de asociación de los polimorfismos con la respuesta al tratamiento.

De la muestra total de 274 pacientes con DMT2 que fueron genotipificados, se eliminaron 64 pacientes que no contaban con registros completos en sus expedientes clínicos o bien iniciaron tratamiento con insulina posterior a la toma de muestra para genotipificación, con lo que la siguiente parte del análisis se realizó con una muestra total de 183 individuos de los cuales 11 recibían tratamiento con glibenclamida, 70 con metformina y 102 tratamiento combinado; es decir en este grupo tenemos 113 pacientes que reciben glibenclamida y 70 que no la reciben, que

fueron tratados como grupo control. Para efectos de los análisis posteriores se compararon estos dos grupos: glibenclamida (incluyendo monoterapia y terapia combinada) y pacientes tratados con monoterapia de metformina.

Se analizaron las frecuencias genotípicas de los pacientes por tratamiento recibido para cada polimorfismo, en los tres casos las frecuencias se encontraron en equilibrio (Tablas 9 a 11), al igual que en la muestra total.

Tabla 9. Frecuencias alélicas de rs5219 (E23K) por tipo de tratamiento.

Tratamiento		Frecuencia	Porcentaje	p*
Glibenclamida	H1	48	42.5	0.0063
	He	51	45.1	
	H2	14	12.4	
	Total	113		
Metformina	H1	20	28.6	0.092
	He	36	51.4	
	H2	14	20.0	
	Total	71		

p* = $\chi^2 < 5.99$ (I.C. 95%) para equilibrio de Hardy-Weinberg

Tabla 10. Frecuencias alélicas de rs757110 (A1369A) por tipo de tratamiento.

Tratamiento		Frecuencia	Porcentaje	p*
Glibenclamida	H1	42	37.2	0.088
	He	55	48.7	
	H2	16	14.2	
	Total	113		
Metformina	H1	19	27.1	1.013
	He	39	55.7	
	H2	12	17.1	
	Total	70		

p* = $\chi^2 < 5.99$ (I.C. 95%) para equilibrio de Hardy-Weinberg

Tabla 11. Frecuencias alélicas de rs1799854 (-3C/T) por tipo de tratamiento.

Tratamiento 2		Frecuencia	Porcentaje	p*
Glibenclamida	H1	52	46.0	0.0082
	He	49	43.6	
	H2	12	10.6	
	Total	113		
Metformina	H1	41	58.6	2.202
	He	22	31.4	
	H2	7	10.0	
	Total	70		

p* = $\chi^2 < 5.99$ (I.C. 95%) para equilibrio de Hardy-Weinberg

Las características clínicas y bioquímicas de los pacientes por tipo de tratamiento pueden observarse en la Tabla 12. No se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de hombres y mujeres y la media de las edades por grupo y con la muestra total. De forma global, tampoco se observan diferencias significativas al comparar los parámetros bioquímicos entre grupo de tratamiento.

Tabla 12. Descripción clínica y bioquímica por tipo de tratamiento.

Tratamiento2	Mínimo	Máximo	Media	S.D.	
Glibenclamida	Edad	33	89	60.35	10.50
	T. D. (años)	1	45	12.09	8.36
	T. Tx (meses)	3	19	6.21	3.70
	Glib (mg/Kg)	0.029	0.940	0.183	0.109
	IMC	20.18	47.55	28.76	5.03
	Hb1Ac (%)	3.20	14.50	7.94	2.17
	G.P. (mg/dL)	51.11	379.31	153.84	59.72
	Trg (mg/dL)	80.00	895.00	203.67	113.39
	Col (mg/dL)	120.00	340.00	195.38	39.06
Metformina	Edad	22	83	61.51	11.37
	T. Diag. (años)	0.08	32	7.43	5.84
	T. Tx (meses)	1	18	6.87	3.69
	Met mg/kg	4.62	283.33	25.82	33.01
	IMC	19.56	45.56	31.01	5.74
	Hb1Ac (%)	4.50	17.87	6.96	1.92
	G.P. (mg/dL)	0.92	293.71	123.75	44.70
	Trg (mg/dL)	55.65	659.50	196.52	108.35
	Col (mg/dL)	112.82	273.00	195.74	34.55

T.D: tiempo de diagnóstico; T. Tx: tiempo de tratamiento; Glib: glibenclamida; Met: metformina; IMC: índice de masa corporal; Hb1Ac: hemoglobina glicosilada G.P.: glucosa preprandial; Trg: triglicéridos; Col: colesterol total.

Para determinar si existían diferencias entre los niveles de glucosa preprandial y Hb1Ac entre los diferentes genotipos en pacientes que reciben tratamiento con glibenclamida o únicamente metformina, se realizó una comparación mediante la prueba de Kruskal-Wallis (genotipo vs biomarcador por tratamiento) y de Mann-Whitney (tratamiento vs biomarcador por genotipo). Estas comparaciones pueden observarse en la Tabla 13.

En la primera parte del análisis se encontró que no hay diferencias significativas entre los niveles de glucosa preprandial o HbA1c en pacientes que reciben glibenclamida o únicamente metformina entre los tres genotipos, para ninguno de los polimorfismos.

Tabla 13. Diferencias en las concentraciones de glucosa preprandial y HbA1c de acuerdo al genotipo y tratamiento recibido

	Glucosa Preprandial				p ^b	HbA1c				p ^b	
	Glibenclamida		Metformina			Glibenclamida		Metformina			
rs5219 (E23K)	GG	151	(185.00-121.00)	122.43	(148.41-102.22)	0.035	7.2	(9.0-6.3)	6.45	(8.7-5.9)	0.011
	GA	137.97	(161.47-117.25)	111.34	(134.80-102.10)	0.007	7.35	(8.8-6.5)	6.53	(7.3-6.0)	0.002
	AA	120.5	(202.15-101.35)	120	(135.97-105.50)	0.519	7.24	(10.6-6.1)	6.9	(7.2-6.6)	0.317
	p ^a	0.310		0.548			0.911		0.344		
rs757110 (S1369A)	AA	151	(188.24-123.25)	119.71	(142.85-97.50)	0.025	7.2	(9.1-6.2)	6.6	(6.8-5.9)	0.044
	AC	142	(161.94-115.50)	117	(136.47-104.85)	0.011	7.2	(8.7-6.7)	6.56	(7.3-6.2)	0.001
	CC	126.19	(177.00-105.60)	119.73	(127.00-102.00)	0.212	7.3	(10.9-6.3)	6.9	(7.3-5.8)	0.109
	p ^a	0.450		0.938			0.747		0.588		
Rs1799854 (-3 C/T)	CC	145	(172.00-120.00)	118.94	(138.21-102.99)	0.003	7.46	(9.1-6.4)	6.56	(7.0-5.9)	<0.000
	CT	143.5	(173.88-115.00)	116.02	(129.19-84.98)	0.011	7.2	(8.9-6.6)	6.59	(7.3-6.1)	0.031
	TT	151.23	(184.24-99.60)	113.5	(148.36-99.75)	0.291	8	(8.6-6.2)	6.7	(7.7-6.6)	1.000
	p ^a	0.939		0.669			0.807		0.377		

Mediana (rango inter-cuartil). p^a prueba de Kruskal-Wallis y p^b prueba de Mann-Whitney con significancia de 0.05.

Al comparar los niveles de estos biomarcadores por genotipo entre tratamientos encontramos que: para rs5219 E23K los niveles de glucosa preprandial y HbA1c son significativamente más altos en los pacientes con genotipos GG y GA que reciben glibenclamida contra los que reciben únicamente metformina; no se observaron diferencias significativas en los pacientes con genotipo AA.

Para rs757110 (S1369A) los niveles de glucosa preprandial y HbA1c son significativamente más altos en los pacientes con genotipos AA y AC que reciben glibenclamida contra los que reciben únicamente metformina; no se observaron diferencias significativas en los pacientes con genotipo CC.

Y para rs1799854 (-3C/T) los niveles de glucosa preprandial y HbA1c son significativamente más altos en los pacientes con genotipos CC y CT que reciben glibenclamida contra los que reciben únicamente metformina; no se observaron diferencias significativas en los pacientes con genotipo TT.

Para determinar la posible asociación entre el genotipo y la respuesta al tratamiento con glibenclamida, medida a través de los biomarcadores glucosa preprandial y Hb1ac, se realizó un modelo de regresión logística binaria para determinar la razón de ventajas o de momios (OR) ajustado por tiempo de diagnóstico (Tabla 14), donde encontramos que la única asociación significativa se da entre el genotipo GG de *KCNJ11* E23K (predominante en la mayoría de las poblaciones) con el biomarcador HbA1c, es decir, los pacientes tratados con glibenclamida presentan un riesgo significativamente mayor de descontrol, medido mediante HbA1c, con respecto a los pacientes que reciben únicamente metformina (OR: 3.066, IC: 1.01-9.35).

Un aspecto interesante, es que pudimos detectar asociación entre el tiempo de diagnóstico y la respuesta al tratamiento de manera diferencial en los genotipos en los pacientes tratados con

glibenclamida, con respecto a los tratados únicamente con metformina (Tabla 15). Para el polimorfismo rs5919 (E23K) los genotipos GG y GA presentan un riesgo ligeramente mayor a presentar descontrol que los pacientes que reciben únicamente metformina (OR 1.184 IC (1.02-1.37) y OR 1.087 IC (1.01-1.17), respectivamente), lo mismo se observa en el caso de rs757110 (E33) para los genotipos AA y AC (OR 1.246 (IC 1.05-1.48) y OR1.082 (IC 1.01-1.16), respectivamente). En el caso de rs1799854 (E16) la asociación es menos clara, se observa una tendencia de mayor riesgo en los 3 genotipos, pero únicamente es significativa en CC (OR 1.108 CI 1.03-1.20).

Tabla 14. Análisis de asociación de los genotipos con la respuesta al tratamiento

		N	HbA1c			Glucosa preprandial		
			OR	IC	p	OR	IC	P
rs5219 (E23K)	GG	29	3.066	(1.01-9.35)	0.049	0.966	(0.94-0.99)	0.040
	GA	36	1.048	(0.59-1.85)	0.871	1.004	(0.99-1.01)	0.512
	AA	14	0.745	(0.11-5.07)	0.764	1.030	(0.98-1.08)	0.236
rs757110 (E33)	AA	24	1.161	(0.87-1.54)	0.307	0.987	(0.97-1.01)	0.216
	AC	43	1.248	(0.71-2.19)	0.441	0.998	(0.99-1.01)	0.410
	CC	12	0.803	(0.09-6.92)	0.842	1.044	(0.97-1.12)	0.234
rs1799854 E16	CC	41	1.658	(0.95-2.88)	0.073	0.986	(0.97-1.00)	0.107
	CT	32	1.065	(0.49-2.28)	0.073	1.004	(0.99-1.01)	0.487
	TT	6		NR			NR	

OR: Razón de ventajas o momios, IC: intervalo de confianza

Tabla 15. Análisis de asociación de los genotipos con el tiempo de tratamiento

		n	OR	IC	p
rs5219 (E23K)	GG	56	1.184	(1.02-1.37)	0.026
	GA	73	1.087	(1.01-1.17)	0.025
	AA	23	1.286	(0.98-1.69)	0.071
rs757110 (E33)	AA	49	1.246	(1.05-1.48)	0.012
	AC	81	1.082	(1.01-1.16)	0.025
	CC	22	1.372	(0.89-2.12)	0.152
rs1799854 E16	CC	80	1.108	(1.03-1.20)	0.010
	CT	57	1.118	(0.99-1.26)	0.071
	TT	15	1.232	(0.97-1.57)	0.092

OR: Razón de ventajas o momios, IC: intervalo de confianza

DISCUSIÓN

En la primera parte del análisis, no se encontraron diferencias significativas para los polimorfismos rs5219 (E23K) y rs757110 (S1369A) al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas de los MM con otras poblaciones con DMT2 y población abierta, excepto para los grupos de africanos y colombianos (Tablas 6 y 7), al parecer la distribución de estos polimorfismos prevalece en la mayoría de las poblaciones, mientras que el alelo ancestral es más frecuente en los africanos. El resultado del grupo de Colombia podría reflejar la historia de mestizaje del país y la región particular donde esos datos fueron muestreados: las regiones del Pacífico y Caribe, donde el componente africano está ampliamente distribuido [60-62].

De los polimorfismos que reportamos en este trabajo, rs5219 (E23K) de *KCNJ11* es el único que se ha reportado en otras poblaciones de origen mexicano [55, 56]; no se encontraron diferencias significativas entre los alelos de los 3 grupos comparados, aun cuando las características étnicas y geográficas eran muy diferentes entre ellos: Mestizos de la región sureste del país (YCN), mayas con ancestría amerindia (MYN) y mestizos de la región central del país (MM).

El presente estudio es el primer reporte de las distribuciones alélicas y genotípicas de rs757110 (S1369A) y rs1799854 (-3C/T) del gen *ABCC8* en población mexicana y más específicamente en pacientes con DMT2 mexicanos. Las frecuencias alélicas y genotípicas de rs757110 (s1369A) tampoco fueron diferentes en ninguna población comparada, a excepción de africanos y colombianos (Tabla 7), lo que era de esperarse pues ya está bien establecido que ambos genotipos forman un haplotipo.

Por otro lado, las frecuencias de rs1799854 (-3C/T) resultaron totalmente diferentes a las reportadas por el Proyecto de los 1000 Genomas y las poblaciones con DMT2 reportadas excepto por las poblaciones de individuos sanos del sur de Asia (SAS) y europeos de la península Ibérica

(IBR; Tabla 8). De hecho, la proporción de individuos ibéricos puede estar afectando el resultado total del grupo de europeos (EUR), pues es una sub-muestra que está incluida en él. Esto fue consistente con el hecho de que otras poblaciones europeas con DMT2, de distinto origen étnico, fueron estadísticamente diferentes al ser comparadas con el grupo de MM (Reino Unido, Croacia y Polonia). Estos resultados pueden estar reflejando la historia de mestizaje español (ibérico) que data del Virreinato; sin embargo, es interesante e inesperado, que esto no se observó en otras poblaciones latinoamericanas reportadas en los datos del Proyecto de los 1000 genomas.

Sería interesante observar si las frecuencias de estos polimorfismos, en especial -3C/T, tienen el mismo patrón en individuos mexicanos no sin diabetes de la misma región geográfica y de otros orígenes étnicos para establecer si nuestros resultados son consistentes

Se observó diferencia en los niveles de HbA1c y glucosa preprandial entre individuos de acuerdo al genotipo y tratamiento (Tabla 13). Los alelos menos frecuentes de los tres polimorfismos fueron los únicos en los que no se observó diferencia significativa, en los dos biomarcadores en pacientes con y sin tratamiento con glibenclamida. Mientras que, en los demás genotipos, los pacientes que recibieron tratamiento con glibenclamida tuvieron glucemia preprandial y HbA1c significativamente más altos, lo cual es consistente con el incremento en el riesgo observado para estos genotipos al hacer un análisis de asociación ajustado por el tiempo de tratamiento (Tabla 14). De hecho, es interesante que al analizar los datos en busca de variables confusoras, el tiempo de diagnóstico fue una de las variables con más peso en cuanto a la respuesta al tratamiento, algo esperable en términos de la misma etiología de la enfermedad; no obstante, se observó que el efecto de la pérdida de eficacia del tratamiento con respecto a la progresión de la enfermedad era diferencial para los diferentes genotipos y específico en pacientes tratados con

glibenclamida (Tabla 15). Por lo que podemos establecer de forma más clara factores de riesgo genéticos relacionados con el tratamiento de glibenclamida.

Por lo tanto, se sugiere que los alelos de riesgo asociados a la falla terapéutica de glibenclamida son G-E23K, A-S1369A y C para-3C/T.

Los polimorfismos E23K y S1369A forman un haplotipo donde K23/A1369 (K es el aminoácido codificado por el cambio de base a G para E23K) ha sido identificado como haplotipo de riesgo [54, 63, 64]. Mientras que en estudios electrofisiológicos se ha demostrado que canales K_{ATP} que contienen K23 y K23/A1369, son menos sensibles a la inhibición por ATP [31, 65]. La respuesta a sulfonilureas de estos canales polimórficos parece ser diferencial al tipo de sulfonilurea, por ejemplo: se ha visto que canales con las variantes K23/A1369 son más sensibles a inactivación por glicazida; mientras que lo son menos a tolbutamida y glimepirida y glibenclamida no había mostrado ninguna diferencia significativa en la inhibición con ningún haplotipo [31, 66]. En otro estudio, los individuos con DMT2 portadores del alelo K presentaron falla secundaria al tratamiento que fue significativamente mayor que los homocigotos para E [49] tratados con sulfonilureas y metformina. Sin embargo, aún algunos reportes son contradictorios pues Dawed *et. al.* proponen que la falla secundaria en pacientes tratados con la combinación de sulfonilureas y metformina que expresan el alelo K de E23K está más relacionada con la progresión de la diabetes que la respuesta a sulfonilureas [67]. Al respecto de esta discusión, nuestros datos apuntan más a que el efecto de falla en el tratamiento está más relacionado con los alelos K23/A1369 que a la progresión de la enfermedad, puesto que la distribución de la variable tiempo de diagnóstico (años) fue homogénea entre los 3 genotipos de E23K y S1369A, tanto en los pacientes que recibían glibenclamida (en monoterapia o combinada) como en los que no la

recibían y esta falla secundaria no se observa en los individuos con genotipo E23/S1369. No obstante, aún queda por aclarar la posible participación del polimorfismo -3C/T de *ABCC8*.

El polimorfismo rs1799854 (-3C/T) también ha sido asociado como factor de predisposición a DMT2 [47, 68, 69]. En términos de farmacogenética, algunos estudios han encontrado que el genotipo TT puede estar asociado con el incremento en HbA1c y triglicéridos en pacientes tratados con sulfonilureas [33, 70]. Mientras que los heterocigotos podrían estar asociados de forma parcial con hiperglicemia e incremento del riesgo cardiovascular [59]. Sin embargo, otros autores reportan que no existen diferencias significativas al asociar los genotipos de este polimorfismo con glucosa preprandial e IMC [48, 71]. Aun cuando los resultados reportados con respecto a este polimorfismo son contradictorios las diferencias de las frecuencias genotípicas y alélicas observadas en nuestra muestra, en comparación con la mayoría de los casos reportados, y la diferencia significativa en los niveles de HbA1c y glucosa preprandial en los genotipos CC y C/T en pacientes tratados con glibenclamida, indica la importancia de evaluar su implicación en la respuesta al tratamiento de la diabetes en mestizos mexicanos.

De acuerdo con los resultados de la pasada Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT 2012), el diagnóstico de la DMT2 y la atención médica en los primeros niveles han mejorado de forma considerable [5]; no obstante, el porcentaje de pacientes en tratamiento que conservan adecuado control glicémico aún es pobre. Si esta falta de control tiene un factor genético asociado, por lo menos de forma parcial, las diferencias observadas podrían contribuir a explicar de forma significativa la falla en el tratamiento.

Una propuesta para esclarecer una relación más clara es agrandar la muestra y estrechar los criterios de inclusión, pues sabemos que existen factores que afectan de forma directa el patrón de los biomarcadores, por ejemplo: consumo de alcohol, deficiencias en hierro o vitamina B12, la

interacción con otros medicamentos, falla renal, hemoglobinopatologías, entre otras, que se sabe por ejemplo afectan de forma directa los niveles de HbA1c de forma independiente al tratamiento [72].

CONCLUSIONES

Las frecuencias de los polimorfismos rs5219 (E23K) y rs757110 (S1369A) parecen estar bien conservadas en la mayoría de las poblaciones, incluyendo los mexicanos, no se ha establecido aún una clara asociación entre estos y los efectos farmacológicos. En este estudio observamos incremento significativo en los niveles de HbA1c y glucosa preprandial en los pacientes con genotipo K23 /A1369 homocigotos y heterocigotos, con incremento significativo de la falla terapéutica (indicado por el OR), medida por el incremento en HbA1c. Estos mismos genotipos tienen incremento en el riesgo de falla terapéutica debida a la progresión de la enfermedad.

Las frecuencias encontradas en la muestra de MM para el polimorfismo rs1799854 (-3C/T) resultaron muy diferentes a la mayoría de las poblaciones con DMT2 y de individuos sanos comparadas. También se observó que los pacientes con genotipos CC y CT, que reciben glibenclamida en monoterapia o terapia combinada tienen glucosa preprandial y HbA1c significativamente más altos que los pacientes que reciben únicamente glibenclamida y una tendencia a tener mayor riesgo a falla terapéutica al recibir tratamiento con glibenclamida que se incrementa con la progresión de la enfermedad.

Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer trabajo en reportar las frecuencias alélicas y genotípicas de ABCC8 rs757110 y rs1799854 en una población de origen mexicano.

La DMT2 es un problema de gran importancia en México y el tratamiento farmacológico actual se considera insuficiente, como lo muestra la última encuesta nacional de salud. Por lo tanto, entender la estructura genética de nuestra población y sus características es una prioridad para generar hipótesis que mejoren nuestra comprensión sobre esta patología. Se sabe que las respuestas interindividuales al tratamiento, en específico a sulfonilureas son afectados por factores clínicos como los niveles basales de glucosa, la progresión de la enfermedad, la función de las células- β y los niveles de resistencia a insulina [73]. Es posible que la interacción de múltiples genes pueda explicar de forma más certera los efectos marginales observados por polimorfismos aislados. Es, por tanto, necesaria la generación de modelos de interacción para poder brindar respuestas más certeras.

LITERATURA CITADA

1. ADA, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2014. **37 Suppl 1**: p. S81-90.
2. World Health Organization, *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*, 2009: Geneva, Switzerland. p. 70.
3. Hernandez, A.M., *PROYECTO de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes; para quedar como Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-015-SSA2-2007, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.*, S.d. Gobernación, Editor 2008.
4. Navarro Robles, A.G., et al., *Agenda Estadística 2010*, D.G.d.P.y.C.S. Secretaria de Salud del Distrito Federal, Dirección de Información en Salud, Editor 2010, INEGI/SSDF (Dirección de Información en Salud): Ciudad de México. p. 171.
5. Jimenez-Corona, A., et al., *[Type 2 diabetes and frequency of prevention and control measures]*. Salud Publica Mex, 2013. **55 Suppl 2**: p. S137-43.
6. Bolaños, R.D.R., et al., *Direct costs of medical care for patients with type 2 diabetes mellitus in Mexico: micro-costing analysis*. Revista Panamericana De Salud Publica-Pan American Journal of Public Health, 2010. **28**(6): p. 412-420.
7. Singh, S., K. Usman, and M. Banerjee, *Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus*. World J Diabetes, 2016. **7**(15): p. 302-15.
8. Glamoclija, U. and A. Jevric-Causevic, *Genetic polymorphisms in diabetes: influence on therapy with oral antidiabetics*. Acta Pharm, 2010. **60**(4): p. 387-406.
9. Zarate, A., et al., *Guía para seleccionar el tratamiento farmacológico en diabetes 2*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 2010. **3**(48): p. 293-296.

10. Hernandez, A.M., *NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-015-SSA2-2010, "PARA LA PREVENCIÓN, TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS EN LA ATENCIÓN PRIMARIA"*. Secretaria de Salud, 2010.
11. Bryan, J., et al., *Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels*. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(21): p. 2699-716.
12. Gloyn, A.L., J. Siddiqui, and S. Ellard, *Mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism*. *Hum Mutat*, 2006. **27**(3): p. 220-31.
13. Ashcroft, F.M., D.E. Harrison, and S.J. Ashcroft, *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells*. *Nature*, 1984. **312**(5993): p. 446-8.
14. Park, S. and A. Terzic, *Quaternary structure of KATP channel SUR2A nucleotide binding domains resolved by synchrotron radiation X-ray scattering*. *J Struct Biol*, 2010. **169**(2): p. 243-51.
15. Li, L., et al., *Single nucleotide polymorphisms in K(ATP) channels: muscular impact on type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(5): p. 1592-7.
16. Saito, S., et al., *Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/MRP/CFTR)*. *J Hum Genet*, 2002. **47**(4): p. 147-71.
17. Gribble, F.M., et al., *Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K(ATP) channels*. *Diabetes*, 1998. **47**(9): p. 1412-8.
18. D'Hahan, N., et al., *Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(21): p. 12162-7.

19. Dabrowski, M., A. Tarasov, and F.M. Ashcroft, *Mapping the architecture of the ATP-binding site of the KATP channel subunit Kir6.2*. J Physiol, 2004. **557**(Pt 2): p. 347-54.
20. Ueda, K., N. Inagaki, and S. Seino, *MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 22983-6.
21. Flanagan, S.E., et al., *Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K(ATP) channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism*. Hum Mutat, 2009. **30**(2): p. 170-80.
22. Tarasov, A.I., et al., *A rare mutation in ABCC8/SUR1 leading to altered ATP-sensitive K⁺ channel activity and beta-cell glucose sensing is associated with type 2 diabetes in adults*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1595-604.
23. Nestorowicz, A., et al., *Mutations in the sulfonylurea receptor gene are associated with familial hyperinsulinism in Ashkenazi Jews*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(11): p. 1813-22.
24. Laukkanen, O., et al., *Polymorphisms of the SUR1 (ABCC8) and Kir6.2 (KCNJ11) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. The Finnish Diabetes Prevention Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(12): p. 6286-90.
25. He, Y.Y., et al., *Association of KCNJ11 and ABCC8 genetic polymorphisms with response to repaglinide in Chinese diabetic patients*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**(8): p. 983-9.
26. Alsmadi, O., et al., *Genetic study of Saudi diabetes (GSSD): significant association of the KCNJ11 E23K polymorphism with type 2 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 2008. **24**(2): p. 137-40.
27. Florez, J.C., et al., *Type 2 diabetes-associated missense polymorphisms KCNJ11 E23K and ABCC8 A1369S influence progression to diabetes and response to interventions in the Diabetes Prevention Program*. Diabetes, 2007. **56**(2): p. 531-6.

28. Zhou, K., et al., *Pharmacogenomics in diabetes mellitus: insights into drug action and drug discovery*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(6): p. 337-46.
29. Koo, B.K., et al., *Polymorphisms of KCNJ11 (Kir6.2 gene) are associated with Type 2 diabetes and hypertension in the Korean population*. Diabet Med, 2007. **24**(2): p. 178-86.
30. Schwanstecher, C., et al., *The common single nucleotide polymorphism E23K in K(IR)6.2 sensitizes pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels toward activation through nucleoside diphosphates*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S363-7.
31. Hamming, K.S., et al., *Coexpression of the type 2 diabetes susceptibility gene variants KCNJ11 E23K and ABCC8 S1369A alter the ATP and sulfonylurea sensitivities of the ATP-sensitive K(+) channel*. Diabetes, 2009. **58**(10): p. 2419-24.
32. Yu, M., et al., *KCNJ11 Lys23Glu and TCF7L2 rs290487(C/T) polymorphisms affect therapeutic efficacy of repaglinide in Chinese patients with type 2 diabetes*. Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(3): p. 330-5.
33. Nikolac, N., et al., *Metabolic control in type 2 diabetes is associated with sulfonylurea receptor-1 (SUR-1) but not with KCNJ11 polymorphisms*. Arch Med Res, 2009. **40**(5): p. 387-92.
34. McAlister, F.A., et al., *The risk of heart failure in patients with type 2 diabetes treated with oral agent monotherapy*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(7): p. 703-8.
35. Evans, J.M., et al., *Risk of mortality and adverse cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: a comparison of patients treated with sulfonylureas and metformin*. Diabetologia, 2006. **49**(5): p. 930-6.
36. Parra, E.J., et al., *Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City*. Clin Genet, 2007. **71**(4): p. 359-66.

37. Acuna-Alonzo, V., et al., *A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(14): p. 2877-85.
38. Gutiérrez-Vidal, R.G., *Estudio de asociación de polimorfismos de los genes TCF7L2, SLC30A8, HHEX, LOC387761 y EXT2 en pacientes pcn Diabetes Tipo 2*, in Facultad de Química, UNAM2009, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 85.
39. Gamboa-Melendez, M.A., et al., *Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population*. Diabetes, 2012. **61**(12): p. 3314-21.
40. Aguilar-Juárez, M., *Caracterización de los polimorfismos T259T del gen Sur-1 y E23K del gen Kir 6.2 en pacientes Mexicanos con DMT2 en tratamiento con sulfonilureas*, in Escuela Superior de Medicina2009, Instituto Politécnico Nacional: Ciudad de México. p. 117.
41. Hansen, S.K., et al., *Analysis of separate and combined effects of common variation in KCNJ11 and PPARG on risk of type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3629-37.
42. Li, H., et al., *Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression*. PLoS Genet, 2008. **4**(11): p. e1000254.
43. van Dam, R.M., et al., *Common variants in the ATP-sensitive K⁺ channel genes KCNJ11 (Kir6.2) and ABCC8 (SUR1) in relation to glucose intolerance: population-based studies and meta-analyses*. Diabet Med, 2005. **22**(5): p. 590-8.
44. Gloyn, A.L. and M.I. McCarthy, *Genetics: how the UKPDS contributed to determining the genetic landscape of Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2008. **25 Suppl 2**: p. 35-40.
45. Hernandez-Avila, M., J.P. Gutierrez, and N. Reynoso-Noveron, *[Diabetes mellitus in Mexico. Status of the epidemic]*. Salud Publica Mex, 2013. **55 Suppl 2**: p. S129-36.

46. Auton, A., et al., *A global reference for human genetic variation*. Nature, 2015. **526**(7571): p. 68-74.
47. Yokoi, N., et al., *Association studies of variants in the genes involved in pancreatic beta-cell function in type 2 diabetes in Japanese subjects*. Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2379-86.
48. Gloyn, A.L., et al., *Association studies of variants in promoter and coding regions of beta-cell ATP-sensitive K-channel genes SUR1 and Kir6.2 with Type 2 diabetes mellitus (UKPDS 53)*. Diabet Med, 2001. **18**(3): p. 206-12.
49. Sesti, G., et al., *The E23K variant of KCNJ11 encoding the pancreatic beta-cell adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel subunit Kir6.2 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(6): p. 2334-9.
50. Ragia, G., et al., *Association of KCNJ11 E23K gene polymorphism with hypoglycemia in sulfonylurea-treated type 2 diabetic patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **98**(1): p. 119-24.
51. Javorsky, M., et al., *KCNJ11 gene E23K variant and therapeutic response to sulfonylureas*. Eur J Intern Med, 2012. **23**(3): p. 245-9.
52. Klen, J., V. Dolzan, and A. Janez, *CYP2C9, KCNJ11 and ABCC8 polymorphisms and the response to sulphonylurea treatment in type 2 diabetes patients*. Eur J Clin Pharmacol, 2014. **70**(4): p. 421-8.
53. Chistiakov, D.A., et al., *Genetic variations in the pancreatic ATP-sensitive potassium channel, beta-cell dysfunction, and susceptibility to type 2 diabetes*. Acta Diabetol, 2009. **46**(1): p. 43-9.

54. Sokolova, E.A., et al., *Replication of KCNJ11 (p.E23K) and ABCC8 (p.S1369A) Association in Russian Diabetes Mellitus 2 Type Cohort and Meta-Analysis*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0124662.
55. Hernandez-Escalante, V.M., et al., *Replication of obesity and diabetes-related SNP associations in individuals from Yucatan, Mexico*. Front Genet, 2014. **5**: p. 380.
56. Lara-Riegos, J.C., et al., *Diabetes susceptibility in Mayas: Evidence for the involvement of polymorphisms in HHEX, HNF4alpha, KCNJ11, PPARgamma, CDKN2A/2B, SLC30A8, CDC123/CAMK1D, TCF7L2, ABCA1 and SLC16A11 genes*. Gene, 2015. **565**(1): p. 68-75.
57. Zhang, H., et al., *Association of sulfonylurea receptor 1 genotype with therapeutic response to gliclazide in type 2 diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77**(1): p. 58-61.
58. Matharoo, K., P. Arora, and A.J. Bhanwer, *Association of adiponectin (AdipoQ) and sulphonylurea receptor (ABCC8) gene polymorphisms with Type 2 Diabetes in North Indian population of Punjab*. Gene, 2013. **527**(1): p. 228-34.
59. Dworacka, M., H. Winiarska, and P.P. Jagodzinski, *Impact of the sulfonylurea receptor 1 (SUR1) exon 16-3c/t polymorphism on acute hyperglycaemia in type 2 diabetic patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77**(2): p. 258-62.
60. Rojas, W., et al., *Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers*. Am J Phys Anthropol, 2010. **143**(1): p. 13-20.
61. Ossa, H., et al., *Outlining the Ancestry Landscape of Colombian Admixed Populations*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164414.
62. Homburger, J.R., et al., *Genomic Insights into the Ancestry and Demographic History of South America*. PLoS Genet, 2015. **11**(12): p. e1005602.

63. Florez, J.C., et al., *Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region*. *Diabetes*, 2004. **53**(5): p. 1360-8.
64. Gloyn, A.L., et al., *Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(2): p. 568-72.
65. Schwanstecher, C., U. Meyer, and M. Schwanstecher, *K(IR)6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels*. *Diabetes*, 2002. **51**(3): p. 875-9.
66. Lang, V.Y., M. Fatehi, and P.E. Light, *Pharmacogenomic analysis of ATP-sensitive potassium channels coexpressing the common type 2 diabetes risk variants E23K and S1369A*. *Pharmacogenet Genomics*, 2012. **22**(3): p. 206-14.
67. Gloyn, A.L. and M.I. McCarthy, *The genetics of type 2 diabetes*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2001. **15**(3): p. 293-308.
68. Inoue, H., et al., *Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians*. *Diabetes*, 1996. **45**(6): p. 825-31.
69. Hart, L.M., et al., *Variants in the sulphonylurea receptor gene: association of the exon 16-3t variant with Type II diabetes mellitus in Dutch Caucasians*. *Diabetologia*, 1999. **42**(5): p. 617-20.
70. Meirhaeghe, A., et al., *Impact of sulfonylurea receptor 1 genetic variability on non-insulin-dependent diabetes mellitus prevalence and treatment: a population study*. *Am J Med Genet*, 2001. **101**(1): p. 4-8.

71. Zychma, M.J., et al., *Sulfonylurea receptor gene 16-3 polymorphism - association with sulfonylurea or insulin treatment in type 2 diabetic subjects*. *Med Sci Monit*, 2002. **8**(7): p. CR512-5.
72. Organization, W.H., *Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus*, W.H. Organization, Editor 2011, WHO: Switzerland. p. 25.
73. Dawed, A.Y., et al., *CYP2C8 and SLCO1B1 Variants and Therapeutic Response to Thiazolidinediones in Patients With Type 2 Diabetes*. *Diabetes Care*, 2016.

ANEXO I
ARTÍCULO REQUISITO

Identification of genetic variants in pharmacogenetic genes associated with type 2 diabetes in a Mexican-Mestizo population

NIDIA SAMARA RODRÍGUEZ-RIVERA^{1,2}, PATRICIA CUAUTLE-RODRÍGUEZ^{2,3},
FERNANDO CASTILLO-NÁJERA⁴ and JUAN ARCADIO MOLINA-GUARNEROS¹

¹Department of Pharmacology, Medicine Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510;
²Posgrado en Ciencias Biológicas; ³Research Division, Medicine Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico City 04510; ⁴Centro de Salud Portales, Mexico City 03660, México

Received February 3, 2017; Accepted May 16, 2017

DOI: 10.3892/br.2017.921

Abstract. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is one of the most prevalent chronic pathologies in the world. In developing countries, such as Mexico, its prevalence represents an important public health and research issue. Determining factors triggering T2DM are environmental and genetic. While diet, exercise and proper weight control are the first measures recommended to improve the quality of life and life expectancy of patients, pharmacological treatment is usually the next step. Within every population there are variations in interindividual drug response, which may be due to genetic background. Some of the most frequent first line T2DM treatments in developing countries are sulfonylureas (SU), whose targets are ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the K_{ATP} coding genes, potassium voltage-gated channel subfamily J member 11 (*KCNJ11*) and ATP binding cassette subfamily C member 8 (*ABCC8*) have been associated with SU response variability. To date, there is little information regarding the mechanism by which these SNPs work within Mexican populations. The present study describes the distribution of three SNPs [*KCNJ11* rs5219 (E23K), *ABCC8* rs757110 (S1369A) and rs1799854 (-3C/T)] among Mestizo Mexican (MM) T2DM patients, and compares it with published data on various healthy subjects and T2DM populations. Through this comparison, no difference in

the *KCNJ11* rs5219 and *ABCC8* rs757110 allelic and genotypic frequencies in MM were observed compared with the majority of the reported populations of healthy and diabetic individuals among other ethnic groups; except for African and Colombian individuals. By contrast, *ABCC8* rs1799854 genomic and allelic frequencies among MM were observed to be significantly different from those reported by the 1000 Genomes Project, and from diabetic patients within other populations reported in the literature, such as the European, Asian and Latin-American individuals [T=0.704, G=0.296; CC=0.506, CT=0.397, TT=0.097; 95% confidence interval (CI); P≤0.05]; except for South Asian and Iberian populations, which may reflect the admixture origins of the present Mexican population. This genetic similarity has not been observed in the other Latin-American groups. To the best of our knowledge, this is the first study of *ABCC8* rs757110 and rs1799854 SNP frequencies in any Mexican population and, specifically with diabetic Mexicans. Knowledge of the genetic structure of different populations is key to understanding the interindividual responses to drugs, such as SU and whether genotypic differences affect clinical outcome.

Introduction

Diabetes is a type of metabolic disease characterized by hyperglycemia resulting from either defective insulin secretion, insulin action or the two (1). The most prevalent type of diabetes is type 2 diabetes mellitus (T2DM), which is one of the leading causes of morbidity globally, as well as the third-highest risk factor for premature mortality (2).

In Mexico, T2DM has led mortality rates since 2005 and today it represents the leading cause of death in the country (3,4) with a prevalence of 11.8% (5). Costs associated with medical treatment of T2DM are ~450 million dollars annually (6), while ~75% of diagnosed patients do not observe adequate glycemic control even with medical assistance. These factors make T2DM a critical concern for the Mexican State's public health and research systems.

While genetic factors causing T2DM have not yet been sufficiently defined, they are currently under extensive study. Numerous T2DM-associated genes present as single nucleotide polymorphisms (SNPs) whose frequencies vary among

Correspondence to: Dr Juan Arcadio Molina-Guarneros, Department of Pharmacology, Medicine Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México, 3000 Mexico Avenue, Mexico City 04510, Mexico
E-mail: molina_ja2007@yahoo.com.mx

Abbreviations: MM, Mestizo Mexican; T2DM, type 2 diabetes mellitus; SNP, single nucleotide polymorphism; SU, sulfonylurea; K_{ATP} , ATP-sensitive potassium channel; ME, metformin

Key words: diabetes, pharmacogenetics, potassium voltage-gated channel subfamily J member 11, ATP binding cassette subfamily C member 8, Mestizo Mexican

different populations. Genetic variations associated with either pharmacological targets or drug metabolism are of particular interest, as different responses to pharmacological treatments may be explained by the presence of a genetic mutation or the combination of various genotypes (7).

The initial pharmacological treatments for T2DM are oral hypoglycemics (OH), with sulfonylureas (SU) and metformin (ME) being the two most commonly administered in developing countries. SU are a type of oral OHs, which inhibit ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}), thus inducing glucose-independent insulin release by the β -pancreatic cells (8). However, not all T2DM patients respond to the anti-diabetic action of SU (primary failure) and those who initially respond adequately may experience a decrease in its efficacy following the years (as variable as 1-2 to 10 or more years) of treatment (secondary failure) (9,10). SUs are frequently combined with ME, a drug which reduces hepatic glucose production and insulin resistance (11). It has been observed that the short-term reduction of glycated hemoglobin A1c (HbA1c) is similar in SU and ME monotherapies (12), and that this drug combination reduces HbA1c more efficiently than SU alone (13). When compared, observations on the adjuvant effects of SU/ME-based treatments are inconclusive; while certain authors have associated hypoglycemic events of different severity and weight increase to SUs, either alone or in combination with ME (14), others have reported no effect on body weight when combining SUs with ME (15). However, due to their low cost and accessibility, SUs (alone or combined with ME) remain the most frequent first-line T2DM treatment in the world, particularly in developing countries, such as Mexico (16,17). The UK Prospective Diabetes Study demonstrated that only 25% of patients achieved glycemic control of <7% in HbA1c over a nine-year follow-up period of monotherapy on either SU or ME (10).

Of the genetic polymorphisms that have already been reviewed extensively and whose clinical implications have already been analyzed (18,19), there are a number, which appear to be well suited for pharmacogenetic studies. Various SNPs have been reported among K_{ATP} -channel encoding genes [potassium voltage-gated channel subfamily J member 11 (*KCNJ11*) and ATP binding cassette subfamily C member 8 (*ABCC8*)] as the therapeutic target of SU (20). Many of these genes are associated with T2DM predisposition or progression, as well as with SU response variability. A specific SNP frequency may vary between different populations; therefore, it is important to evaluate and compare its distribution among different human populations, in order to better understand whether there is an association between drug response variability, patients' glycemic control and genetic architecture.

In the present study, the frequencies of three pharmacologically important SNPs are described in a Mestizo Mexican (MM) population and, in order to compare these with other reported populations, the distribution of *KCNJ11* rs5219 (E23K), *ABCC8* rs757110 (S1369A) and rs1799854 (-3C/T) is presented in MM T2DM patients. The aim of the present study is to increase the understanding of the genetic characteristics of specific populations. This may facilitate with elucidating the causes of therapeutic failure and the findings may also be extrapolated and/or compared to other populations in order to improve treatment options and patient management.

Materials and methods

Patient selection and study design. This study was observational and included 247 T2DM patients recruited from July 2014 to October 2016 from two health centers: 145 from Centro de Salud Portales and 102 T2DM patients from Centro de Salud Mixcoac, both located in Mexico City's Benito Juárez Health Jurisdiction (Mexico). Out of the total adult patient population, 165 were females while 82 were males. Patient eligibility criteria were as follows: Self-proclaimed MM ancestry of at least three generations; age between 18 and 90 years; individuals diagnosed with T2DM according to the American Association of Diabetes criteria (1); individuals taking OHs, the SU glibenclamide alone or combined with ME, for at least 3 months. All participants were enrolled in their health centers after providing written informed consent. Patient clinical history, anthropometrics and biochemical characteristics were obtained from their clinical records (a summary of this data is presented in Table I).

Genotyping. Genomic DNA was obtained by taking 6 ml peripheral blood through arm phlebotomy in glass EDTA-tubes (Vacutainer[®]; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) from each patient. Patients were fasted at the time of blood sampling. Genomic DNA was isolated from 200 μ l total blood, using the UltraClean[®] BloodSpin[®] DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA), and the DNA-extraction protocol was performed according to the manufacturer's instructions. DNA quality was achieved by electrophoresis in Invitrogen 1% agarose gels (UltraPure[™] Agarose; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), at 100 V over 50 min. DNA concentration was measured by spectrophotometry (Jenway 7305; Cole-Parmer Ltd., Staffordshire, UK). The *KCNJ11* rs5219 (E23K), *ABCC8* rs757110 (S1369A) and rs1799854 (-3C/T) polymorphisms were determined using 20 ng total genomic DNA per reaction, by allelic discrimination via quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using a ViiA[™] 7 Real-Time PCR system and TaqMan[®] SNP assays (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA) using the standard cycling conditions as follows: An initial denaturation stage 95°C for 10 min, 40 cycles of denaturation 95°C for 15 sec, and annealing at 60°C for 1 min, and post read stage or final extension at 60°C for 30 sec.

Statistical analysis. The SNP frequencies of *KCNJ11* rs5219, *ABCC8* rs757110 and rs1799854 were determined through direct counting, the remaining analyses were performed using SPSS 23.0 for Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The SNP frequencies of the patients from both health centers were compared by performing χ^2 test of independence. In addition, biochemical and anthropometric data were compared using two-way analysis of variance (ANOVA). The total frequencies for each SNP were compared with those of other populations using the χ^2 test of independence. $P < 0.05$ with 95% CI was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Mexican-Mestizo sample characteristics. No statistically significant differences were identified after comparing

Table I. Demographic baseline disease characteristics.

Parameter	Total (n=247)	Female (n=165)	Male (n=82)
Age (years)	60.43±0.75	60.05 ±0.91	61.24±1.34
Weight (kg)	70.87±1.06	69.25±1.23	74.40±1.98
Body mass index (kg/m ²)	29.51±0.37	30.26±0.45	27.89±0.62
Diabetes diagnosis (years)	10.27±0.61	9.57±0.64	11.92±1.34
Triglycerides (mg/dl)	199.06±8.02	199.59±9.44	197.90±15.24
Glycated hemoglobin A1c (%)	7.55±0.15	7.53±0.19	7.60±0.26
Fasting plasma glucose (mg/dl)	141.86±4.06	144.55±5.22	135.76±5.99
Cholesterol (mg/dl)	194.82±2.71	197.24±3.45	189.39±4.12

Values are presented as means ± standard error of the mean.

biochemical and anthropometric data from the individuals from the two health centers (data not shown). Within the whole sample, there were approximately twice as many females as there were males (162 females and 83 males); 61.5% of the patients were overweight (55.7% of females and 73.8% of males); ~25% of the subjects presented with grade I obesity (27.9% in females and 20.0% in males). The mean period since the first T2DM diagnosis was 10 years, with a mean of 7.55±0.15% for HbA1c and 141.86±4.06 mg/dl for fasting plasma glucose (FPG). A summary of anthropometrics and biochemical characteristics of our subjects is presented in Table I.

No significant differences were observed in genotypic and allelic frequency distribution between the two health centers (data not shown). The genotyping frequencies of the three SNPs in the whole sample were in Hardy-Weinberg equilibrium (Table II). The obtained allelic and genotypic frequencies were compared with those reported for other non-diabetic populations using data from the 1000 Genomes Project (21) and from literature on T2DM patients; the comparative of each SNP is presented in Tables III-V (22-38). For the present study, studies were included that involved populations of T2DM subjects that were comparable with the current sample.

SNP comparison with other populations. *KCNJ11* rs5219 (E23K) allelic and genotypic frequencies in MM individuals were not identified to be different between all of the T2DM populations that were compared [predominantly European (EUR) and Asian]. To the best of our knowledge, there were only two other studies from Mexican rs5219 allelic frequencies, which demonstrated no difference compared with the MM population: T2DM Mestizo from Yucatan and T2DM Mayans. In the 1000 Genomes Project populations, MM frequencies were only statistically different from African individuals (P=2.17E-12 and P=2.31E-19 for allelic and genotypic frequencies, respectively) and admixed American-Colombians

Table II. Genotypic frequencies of the analyzed polymorphisms.

SNP	Frequency	%	P-value
E23K			0.69
GG	93	37.7	
GA	112	45.3	
AA	42	17.0	
Total	247	100.0	
-3C/T			0.55
CC	125	50.6	
CT	98	39.7	
TT	24	9.7	
Total	247	100.0	
S1369A			1.63
AA	75	30.4	
AC	131	53.0	
CC	41	16.6	
Total	247	100.0	

P<3.84 using the χ^2 test for Hardy-Weinberg equilibrium.

from Medellin (P=0.002 and P=7.20E-05 for allelic and genotypic frequencies, respectively; Table III).

MM *ABCC8* rs757110 (S1369A) allelic and genotypic frequencies behave similarly to rs5219. The only statistical differences were observed when compared with African individuals (P=1.45E-13 and P=1.72E-23 for allelic and genotypic frequencies, respectively) and American-Colombians from Medellin (P=6.13E-04 and P=2.52E-06 for allelic and genotypic frequencies, respectively). Currently, to the best of our knowledge, there are no other studies regarding allelic or genotypic frequencies of this SNP in a Mexican population (Table IV).

ABCC8 rs1799854 (-3C/T) SNP allelic and genotypic frequencies from MM were significantly different from all of the compared T2DM populations (primarily European and Asian). In comparison to non-diabetic populations from the 1000 Genomes Project, MM allelic and genotypic frequencies were significantly different from African individuals, East Asians, the majority of EUR individuals, and other admixed Americans from Colombia, Peru, Puerto Rico and individuals of Mexican ancestry from Los Angeles. Only in Iberic EUR and South Asian individuals did the 1000 Genomes Project report non-significant differences in allelic and genotypic frequencies compared with MM (Table V). Currently, to the best of our knowledge, there are no other studies on the frequencies of these SNPs among Mexican populations of non-diabetic or diabetic individuals.

Discussion

In the present study, in the MM from Mexico City, rs5219 allelic and genotypic frequencies were not different from the majority of the reported populations of healthy and diabetic individuals among other ethnic groups, except for the African and Colombian subjects; the same observation applies to

Table III. Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11 rs5219 (E23K) allelic and genotypic frequency comparison.

Author (year)	Population	T	n	G	N	p χ^2	TT	n	TG	n	GG	n	p χ^2	Refs.
1000 Genomes Project														
Auton <i>et al</i> (2015)	MM	0.603	298	0.397	196	-	0.377	93	0.453	112	0.17	42		(21)
	AFR	0.977	1291	0.023	31	2.17E-12 ^a	0.956	632	0.047	27	0.003	2	2.31E-19 ^a	
	EAS	0.662	667	0.338	341	0.387	0.429	216	0.466	235	0.105	53	0.386	
	SAS	0.604	591	0.396	387	0.988	0.38	186	0.448	219	0.172	84	0.997	
	EUR	0.647	651	0.353	355	0.52	0.4	201	0.495	249	0.105	53	0.406	
	EUR IBS	0.617	132	0.383	82	0.839	0.374	40	0.486	52	0.14	15	0.815	
	AMR	0.707	491	0.293	203	0.121	0.496	172	0.424	147	0.081	28	0.084	
	AMR CLM	0.803	151	0.197	37	0.002 ^a	0.638	60	0.33	31	0.032	3	7.20E-05 ^a	
	AMR MXL	0.594	76	0.406	52	0.897	0.328	21	0.531	34	0.141	9	0.54	
	AMR PEL	0.682	116	0.318	54	0.243	0.435	37	0.494	42	0.071	6	0.092	
	AMR PUR	0.712	148	0.288	60	0.104	0.519	54	0.385	40	0.096	10	0.086	
Type 2 diabetic														
Hernandez- Escalante <i>et al</i> (2014)	AMR YCN	0.633	164	0.367	95	0.662	-	-	-	-	-	-	-	(22)
Lara-Riegos <i>et al</i> (2015)	AMR MYN	0.654	75	0.346	40	0.449	-	-	-	-	-	-	-	(23)
He <i>et al</i> (2008)	EAS (China)	0.62	124	0.38	76	0.805	0.35	35	0.54	54	0.11	11	0.34	(24)
Yokoi <i>et al</i> (2006)	EAS (Japan)	0.614	1954	0.386	1226	0.873	0.384	610	0.462	734	0.155	246	0.959	(25)
Holstein <i>et al</i> (2009)	EUR (Germany)	0.604	116	0.396	76	0.988	0.385	37	0.437	42	0.177	17	0.975	(27)
Gloyn <i>et al</i> (2001)	EUR (UK)	0.593	427	0.407	293	0.885	0.369	133	0.447	161	0.183	66	0.97	(28)
Sesti <i>et al</i> (2009)	EUR (Italy)	0.642	674	0.358	376	0.569	0.385	202	0.514	270	0.101	53	0.338	(29)
Ragia <i>et al</i> (2012)	EUR (Grece)	0.668	235	0.332	117	0.339	0.455	80	0.426	75	0.119	21	0.423	(30)
Javorsky <i>et al</i> (2012)	EUR (Slovakia)	0.599	121	0.401	81	0.954	0.366	37	0.465	47	0.168	17	0.984	(31)
Klen <i>et al</i> (2014)	EUR (Slovenia)	0.622	194	0.378	118	0.783	0.378	59	0.487	76	0.135	21	0.76	(32)
Nicolac <i>et al</i> (2009)	EUR (Croatia)	0.607	277	0.393	179	0.954	0.382	87	0.452	103	0.167	38	0.997	(33)
Chistiakov <i>et al</i> (2009)	EUR (Russia)	0.496	128	0.504	130	0.128	0.217	28	0.558	72	0.225	29	0.045 ^a	(34)
Sokolova <i>et al</i> (2015)	WAS (East Russia)	0.649	1926	0.351	1042	0.501	0.428	635	0.442	656	0.13	193	0.647	(35)

^aP<0.05 (95% confidence interval); p χ^2 , χ^2 test of independence; MM, type 2 diabetic Mestizo Mexican (1000 Genomes Project third release); AFR, African individuals (1000 Genomes Project third release); EAS, East Asian individuals (1000 Genomes Project third release); SAS, East South Asian individuals (1000 Genomes Project third release); EUR, European individuals (1000 Genomes Project third release); IBS, Iberian population in Spain; AMR, Admixed American; CLM, Colombians from Medellin, Colombia; MXL, Mexican ancestry from Los Angeles, USA; PEL, Peruvians from Lima, Peru; PUR, Puerto Ricans from Puerto Rico (1000 Genomes Project third release); YCN, type 2 diabetic from Mestizo Yucatan; MYN, T2D Mayan.

rs757110 (Tables III and IV). It appears that the distribution of these polymorphisms prevails among the majority of populations, while the ancestral allele is most frequent among African individuals. The results from the Colombian population may reflect the ancestral admixture history of the country, where the African component is widely spread across the Pacific and Caribbean regions (39-41).

In Mexican populations, rs5219 is the only SNP reported for K_{ATP} -coding genes, exhibiting no differences between the

alleles of healthy and T2DM subjects, even when the geographical and ethnic profile of the three Mexican samples were markedly different: The healthy volunteers were Mestizo from the South East (22), the T2DM group had Mayan Amerindian ancestry (23) and our group (MM) was formed by Mestizo individuals, primarily from the central area of Mexico.

To the best of our knowledge, this is the first report of *ABCC8* rs757110 and rs1799854 SNPs in Mexican populations, and more specifically, in diabetic Mexican patients.

Table IV. ATP binding cassette subfamily C member 8 S1369A allelic and genotypic frequency comparison.

Author (year)	Population	T	n	G	n	p χ^2	TT	n	TG	n	GG	n	p χ^2	Refs.
1000 Genomes Project														
Auton <i>et al</i> (2015)	MM	0.569	281	0.431	213		0.304	75	0.53	131	0.166	41		(21)
	AFR	0.975	1289	0.025	33	1.45E-13 ^a	0.953	630	0.044	29	0.003	2	1.72E-23 ^a	
	EAS	0.639	644	0.361	364	0.195	0.395	199	0.488	246	0.117	59	0.331	
	SAS	0.585	572	0.415	406	0.819	0.354	173	0.462	226	0.184	90	0.652	
	EUR	0.648	652	0.352	354	0.252	0.404	203	0.489	246	0.107	54	0.238	
	IBS	0.617	132	0.383	82	0.49	0.374	40	0.486	52	0.14	15	0.567	
	AMR	0.693	481	0.307	213	0.069	0.47	163	0.447	155	0.084	29	0.030 ^a	
	CLM	0.793	149	0.207	39	6.13E-04 ^a	0.606	57	0.372	35	0.021	2	2.52E-06 ^a	
	MXL	0.586	75	0.414	53	0.808	0.328	21	0.516	33	0.156	10	0.932	
	PEL	0.682	116	0.318	54	0.098	0.435	37	0.494	42	0.071	6	0.041	
PUR	0.678	141	0.322	67	0.111	0.462	48	0.433	45	0.106	11	0.061		
Type 2 diabetics														
Zhang <i>et al</i> (2007)	EAS (China)	0.565	130	0.435	100	0.954	0.33	38	0.47	54	0.2	23	0.676	(38)
Yokoi <i>et al</i> (2006)	EAS (Japan)	0.592	1884	0.408	1296	0.742	0.358	570	0.468	744	0.174	276	0.655	(25)
Klen <i>et al</i> (2014)	EUR (Slovenia)	0.619	193	0.381	119	0.471	0.378	59	0.481	75	0.141	22	0.536	(32)
Nicolac <i>et al</i> (2009)	EUR (Croatia)	0.607	277	0.393	179	0.585	0.395	90	0.425	97	0.18	41	0.301	(33)
Sokolova <i>et al</i> (2015)	East Russia (West Asia)	0.623	1763	0.377	1065	0.436	0.393	556	0.46	651	0.146	207	0.414	(35)

^aP<0.05 (95% confidence interval); p χ^2 , χ^2 test of independence; CDMX, type 2 diabetics from Mestizo Mexico City (all of the following are 1000 Genomes Project third release): AFR, African; EAS, East Asian; SAS, South Asian; EUR, European; IBS, Iberian population in Spain; AMR, Admixed American; CLM, Colombians from Medellin, Colombia; MXL, Mexican ancestry from Los Angeles, USA; PER, Peruvians from Lima, Peru; PUR, Puerto Ricans from Puerto Rico.

rs757110 allelic and genotypic frequencies behaved similarly to rs5219 SNP, which was to be expected as it is well known that these SNPs form a haplotype. Yet, rs1799854 SNP frequencies seem extremely different to those reported by the 1000 Genomes Project and the literature on various diabetic populations (Table V). A comparison between allelic and genotypic frequencies in the investigated group and those populations reported by the 1000 Genomes Project, demonstrated differences between all but three samples: South Asian, European and Iberic. The Iberic population may have affected the comparison result of the EUR sample, as it was included in the EUR group in the 1000 Genome Project data. This was consistent with the fact that other EUR diabetic populations from different ethnic origins were statistically different when compared with the MM group (UK, Croatia and Poland). These results may reflect the Hispanic admixture dating from Mexico's colonial past; however, it is interesting and unexpected that this was not observed in the other Latin-American populations reported. It was demonstrated by the results of the previous Mexican health and nutrition national survey (ENSANUT 2012) that diabetes diagnosis and first level medical attention have improved considerably in Mexico (5), yet the percentage of treated patients actually maintaining adequate glycemic control remains poor. If this lack of control is genetic, at least partially, the differences observed in Mexican genetic SNP frequencies may significantly contribute to explaining treatment failure. This first screening may facilitate with understanding where focus and investigations

are required to establish whether genetic structure and pharmacological failure are associated.

It would be interesting to observe whether a healthy control group of MM individuals from central Mexico behaves the same as diabetic subjects, and to analyze groups of different ethnicity within the country to establish whether those results are consistent with or different from the present study.

The SNPs, rs5219 (E23K) and rs757110 (S1369A) form a haplotype, where K23/A1369 has been identified as a risk genotype (35,42,43). While electrophysiological studies have demonstrated that channels containing the K allele and K23/A1369 are less sensitive to ATP inhibition (44,45), the SU response of these polymorphic channels appears to be different depending on the drug. For example, it has been shown that K23/A1369 channels are more sensitive to SU gliclazide, yet these same channels are less sensitive to inhibition by SUs, such as tolbutamide and glimepiride, while glibenclamide demonstrated no significant inhibition difference in any haplotype (45,46). In another study, K allele carriers exhibited significantly higher secondary treatment failure than E allele homozygous (29) treated with SU and ME; however, Dawed *et al* (19) demonstrated that secondary failure on patients treated with a combination of SU and ME, carrying the K allele polymorphism of rs5219 may be more involved with diabetes progression than with SU response (19).

In Mexico, the most common first level treatment for T2DM combines ME with glibenclamide administration (5).

Table V. ATP binding cassette subfamily C member 8 -3C/T Allelic and genotypic frequency comparison.

Authors (year)	Population	C	n	T	n	p χ^2	CC	n	CT	n	TT	n	p χ^2	Refs.
1000 Genomes Project														
Auton <i>et al</i> (2015)	MM	0.704	348	0.296	146	-	0.506	125	0.397	98	0.097	24	-	(21)
	AFR	0.862	1139	0.138	183	0.006 ^a	0.741	490	0.241	159	0.018	12	7.96E-04 ^a	
	EAS	0.449	453	0.551	555	2.41E-04 ^a	0.198	100	0.502	253	0.3	151	2.20E-06 ^a	
	SAS	0.681	666	0.319	312	0.724	0.481	235	0.401	196	0.119	58	0.865	
	EUR	0.58	583	0.42	423	0.067	0.33	166	0.499	251	0.171	86	0.031 ^a	
	EUR IBS	0.612	131	0.388	83	0.17	0.393	42	0.439	47	0.168	18	0.169	
	AMR	0.464	322	0.536	372	5.35E-04 ^a	0.225	78	0.478	166	0.297	103	1.30E-05 ^a	
	AMR CLM	0.516	97	0.484	91	0.006 ^a	0.266	25	0.5	47	0.234	22	0.001 ^a	
	AMR MXL	0.422	54	0.578	74	5.10E-05 ^a	0.172	11	0.5	32	0.328	21	1.35E-07 ^a	
	AMR PEL	0.312	53	0.688	117	1.91E-08 ^a	0.071	6	0.482	41	0.447	38	3.15E-14 ^a	
AMR PUR	0.567	118	0.433	90	0.044 ^a	0.346	36	0.442	46	0.212	22	0.022 ^a		
Type 2 diabetics														
He <i>et al</i> (2008)	EAS (China)	0.41	82	0.59	118	2.50E-05 ^a	0.14	14	0.54	54	0.32	32	1.03E-08 ^a	(24)
Yokoi <i>et al</i> (2006)	EAS (Japan)	0.474	1507	0.526	1673	8.91E-04 ^a	0.233	371	0.481	765	0.286	454	2.90E-05 ^a	(25)
Matharoo <i>et al</i> (2013)	SAS (India)	0.568	227	0.433	173	0.044 ^a	0.405	81	0.325	65	0.27	54	0.006 ^a	(36)
Gloyn <i>et al</i> (2001)	EUR (UK)	0.464	412	0.536	476	5.35E-04 ^a	0.191	85	0.545	242	0.264	117	3.50E-06 ^a	(28)
Nicolac <i>et al</i> (2009)	EUR (Croatia)	0.489	223	0.511	233	0.002 ^a	0.197	45	0.583	133	0.219	50	1.30E-05 ^a	(33)
Dworacka <i>et al</i> (2007)	EUR (Poland)	0.45	36	0.55	44	2.54E-04 ^a	0.25	10	0.4	16	0.35	14	6.00E-06 ^a	(37)

^aP<0.05 (95% confidence interval); p χ^2 , χ^2 test of independence; CDMX, type 2 diabetics from Mestizo Mexico City (all of the following are 1000 Genomes Project third release): AFR, African; EAS, East Asian; SAS, South Asian; EUR, European; IBS, Iberian population in Spain; AMR, Admixed American; CLM, Colombians from Medellin, Colombia; MXL, Mexican ancestry from Los Angeles, USA; PER, Peruvians from Lima, Peru; PUR, Puerto Ricans from Puerto Rico.

In this first analysis, whose objective was mainly SNP frequency description, the authors included patients receiving glibenclamide or ME either as a mono- or combined therapy, as the SNP distribution is not affected by treatment. In future studies, the aim will be to investigate clinical implications of using ME-only treated patients as a control group to distinguish the ME effect.

The *ABCC8* rs1799854 polymorphism has been associated with a predisposition for diabetes (25,47,48). In terms of pharmacogenetics, certain studies have found that the TT genotype may be associated with an increase in HbA1c and triglyceride levels in SU-treated diabetics (33,49), and deemed partially determinant of hyperglycemia-cardiovascular risk factor in rs1799854 heterozygotes (37). However, other authors report no significant associations when analyzing FPG and BMI (28,50). Even when results in the case of this SNP are contradictory, the difference in the allelic and genotypic frequencies observed in our sample in comparison with the majority of reported cases, indicates a considerable requirement to evaluate their implications in diabetes progression and drug response in the MM population.

The SNP frequencies of rs5219 and rs757110 polymorphisms appear to be well conserved among the majority of populations, including Mexicans, there is not yet a clear association between them and the pharmacological effects.

The present results may contribute to future studies to clarify whether there is a real association.

The aim of the present study was to describe the genetic architecture of three pharmacogenetically important SNPs of *ABCC8* and *KCNJ11* within an MM population. To the best of our knowledge, this study is the first to report allelic and genotypic frequencies of *ABCC8* rs757110 and rs1799854 SNPs in an MM population. Diabetes is a major concern in Mexico, and current pharmacological treatment is considered insufficient, as shown by the latest national health survey. Therefore, understanding the characteristics of our population is a priority for elucidating a viable hypothesis to improve our knowledge of this complex pathology. It is known that interindividual responses to SU are affected by clinical factors, such as baseline glucose levels, disease duration, β -cell function and insulin resistance levels (51). However, multiple gene interaction may explain the marginal impact of each individual SNP, indicating, the necessity to construct an interaction model.

Acknowledgements

The present study was conducted as part of the Universidad Nacional Autónoma de México (National Autonomous University of Mexico-UNAM) Biological Sciences PhD post-graduate academic program fulfillment, and it was supported

by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Support Program for Research and Technological Innovation Projects-PAPIIT) as the IN218216 Dirección General de Apoyo a Personal Académico (General Directorate for Academic Personnel Support-DGAPA)-UNAM project. The authors would like to thank María de los Ángeles Granados-Silvestre for her technical assistance and training in the use of the qPCR equipment and sample processing; Professor Marta Menjivar-Hiraeta for the access granted to her facility and equipment to perform qPCR experiments. To Dr Isaac González Romero (Centro de Salud Portales), Dr Mario Alberto Tinoco Centeno and Mr. José Antonio Rojas (Centro de Salud Mixcoac) for providing his technical expertise for sample collection.

References

- American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 (Suppl 1): S81-S90, 2014.
- World Health Organization: Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva, 2009.
- Hernandez AM: PROYECTO de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes; para quedar como Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-015-SSA2-2007, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Diario Oficial de la Federación, Mexico. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa2/ssa2015-09pm.pdf>. Accessed Oct 20, 2009.
- Navarro Robles AG, astañeda Vargas JC, Alam Mittilo B, *et al*: Agenda Estadística 2010. *Journal* 171: 2010, 2011.
- Jiménez-Corona A, Aguilar-Salinas CA, Rojas-Martínez R and Hernández-Ávila M: Type 2 diabetes and frequency of prevention and control measures. *Salud Publica Mex* 55 (Suppl 2): S137-S143, 2013 (In Spanish).
- Rodríguez Bolaños RdeL, Reynales Shigematsu LM, Jiménez Ruíz JA, Juárez Márquez SA and Hernández Ávila M: Direct costs of medical care for patients with type 2 diabetes mellitus in Mexico micro-costing analysis. *Rev Panam Salud Publica* 28: 412-420, 2010 (In Spanish).
- Singh S, Usman K and Banerjee M: Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 7: 302-315, 2016.
- Glamočlija U and Jevrić-Čaušević A: Genetic polymorphisms in diabetes: influence on therapy with oral antidiabetics. *Acta Pharm* 60: 387-406, 2010.
- Kota SK, Meher LK, Jammula S, Kota SK and Modi KD: Genetics of type 2 diabetes mellitus and other specific types of diabetes; its role in treatment modalities. *Diabetes Metab Syndr* 6: 54-58, 2012.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 837-853, 1998.
- Kirpichnikov D, McFarlane SI and Sowers JR: Metformin: An update. *Ann Intern Med* 137: 25-33, 2002.
- Bennett WL, Maruthur NM, Singh S, Segal JB, Wilson LM, Chatterjee R, Marinopoulos SS, Puhon MA, Ranasinghe P, Block L, *et al*: Comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes: An update including new drugs and 2-drug combinations. *Ann Intern Med* 154: 602-613, 2011.
- Maruthur NM, Tseng E, Hutffless S, Wilson LM, Suarez-Cuervo C, Berger Z, Chu Y, Iyoha E, Segal JB and Bolen S: Diabetes medications as monotherapy or metformin-based combination therapy for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 164: 740-751, 2016.
- Klein-Schwartz W, Stassinis GL and Isbister GK: Treatment of sulfonylurea and insulin overdose. *Br J Clin Pharmacol* 81: 496-504, 2016.
- Lim PC and Chong CP: What's next after metformin? focus on sulphonylurea: Add-on or combination therapy. *Pharm Pract (Granada)* 13: 606, 2015.
- Altagracia-Martínez M, Kravzov J, Moreno Md R, *et al*: Diabetes Mellitus Tipo2: Ventas de los Hipoglucemiantes Orales y Costos de los Tratamientos Farmacológicos en México. *Rev Mex Cienc Farm* 38: 23-33, 2007.
- Díaz de León-Castañeda C, Altagracia-Martínez M, Kravzov-Jinich J, Cárdenas-Elizalde MdelR, Moreno-Bonett C and Martínez-Núñez JM: Cost-effectiveness study of oral hypoglycemic agents in the treatment of outpatients with type 2 diabetes attending a public primary care clinic in Mexico City. *Clinicoecon Outcomes Res* 4: 57-65, 2012.
- Loganadan NK, Huri HZ, Vethakkan SR and Hussein Z: Genetic markers predicting sulphonylurea treatment outcomes in type 2 diabetes patients: Current evidence and challenges for clinical implementation. *Pharmacogenomics J* 16: 209-219, 2016.
- Dawed AY, Zhou K and Pearson ER: Pharmacogenetics in type 2 diabetes: Influence on response to oral hypoglycemic agents. *Pharmacogenomics Pers Med* 9: 17-29, 2016.
- Gloyn AL and McCarthy MI: The genetics of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15: 293-308, 2001.
- Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA and Abecasis GR; 1000 Genomes Project Consortium: A global reference for human genetic variation. *Nature* 526: 68-74, 2015.
- Hernandez-Escalante VM, Nava-Gonzalez EJ, Voruganti VS, Kent JW, Haack K, Laviada-Molina HA, Molina-Segui F, Gallegos-Cabriales EC, Lopez-Alvarenga JC, Cole SA, *et al*: Replication of obesity and diabetes-related SNP associations in individuals from Yucatán, México. *Front Genet* 5: 380, 2014.
- Lara-Riegos JC, Ortiz-López MG, Peña-Espinoza BI, Montúfar-Robles I, Peña-Rico MA, Sánchez-Pozos K, Granados-Silvestre MA and Menjivar M: Diabetes susceptibility in Mayas: Evidence for the involvement of polymorphisms in HHEX, HNF4a, KCNJ11, PPARγ, CDKN2A/2B, SLC30A8, CDC123/CAMK1D, TCF7L2, ABCA1 and SLC16A11 genes. *Gene* 565: 68-75, 2015.
- He YY, Zhang R, Shao XY, Hu C, Wang CR, Lu JX, Bao YQ, Jia WP and Xiang KS: Association of KCNJ11 and ABCC8 genetic polymorphisms with response to repaglinide in Chinese diabetic patients. *Acta Pharmacol Sin* 29: 983-989, 2008.
- Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, *et al*: Association studies of variants in the genes involved in pancreatic beta-cell function in type 2 diabetes in Japanese subjects. *Diabetes* 55: 2379-2386, 2006.
- Rastegari A, Rabbani M, Sadeghi HM, Imani EF, Hasanzadeh A and Moazen F: Association of KCNJ11 (E23K) gene polymorphism with susceptibility to type 2 diabetes in Iranian patients. *Adv Biomed Res* 4: 1, 2015.
- Holstein A, Hahn M, Stumvoll M and Kovacs P: The E23K variant of KCNJ11 and the risk for severe sulfonylurea-induced hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 41: 387-390, 2009.
- Gloyn AL, Hashim Y, Ashcroft SJ, Ashfield R, Wiltshire S and Turner RC; UK Prospective Diabetes Study (UKPDS 53): Association studies of variants in promoter and coding regions of beta-cell ATP-sensitive K-channel genes SUR1 and Kir6.2 with type 2 diabetes mellitus (UKPDS 53). *Diabet Med* 18: 206-212, 2001.
- Sesti G, Laratta E, Cardellini M, Andreozzi F, Del Guerra S, Irace C, Gnasso A, Grupillo M, Lauro R, Hribal ML, *et al*: The E23K variant of KCNJ11 encoding the pancreatic beta-cell adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel subunit Kir6.2 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2334-2339, 2006.
- Ragia G, Tavridou A, Petridis I and Manolopoulos VG: Association of KCNJ11 E23K gene polymorphism with hypoglycemia in sulfonylurea-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 98: 119-124, 2012.
- Javorsky M, Klimcakova L, Schroner Z, Zidzik J, Babjakova E, Fabianova M, Kozarova M, Tkacova R, Salagovic J and Tkac I: KCNJ11 gene E23K variant and therapeutic response to sulfonylureas. *Eur J Intern Med* 23: 245-249, 2012.
- Klen J, Dolžan V and Janež A: CYP2C9, KCNJ11 and ABCC8 polymorphisms and the response to sulphonylurea treatment in type 2 diabetes patients. *Eur J Clin Pharmacol* 70: 421-428, 2014.
- Nikolac N, Simundic AM, Katalinic D, Topic E, Cipak A and Zjacic Rotkvic V: Metabolic control in type 2 diabetes is associated with sulfonylurea receptor-1 (SUR-1) but not with KCNJ11 polymorphisms. *Arch Med Res* 40: 387-392, 2009.
- Chistiakov DA, Potapov VA, Khodirev DC, Shamkhalova MS, Shestakova MV and Nosikov VV: Genetic variations in the pancreatic ATP-sensitive potassium channel, beta-cell dysfunction, and susceptibility to type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 46: 43-49, 2009.

35. Sokolova EA, Bondar IA, Shabelnikova OY, Pyankova OV and Filipenko ML: Replication of KCNJ11 (p.E23K) and ABCC8 (p.S1369A) association in Russian diabetes mellitus 2 type cohort and meta-analysis. *PLoS One* 10: e0124662, 2015.
36. Matharoo K, Arora P and Bhanwer AJ: Association of adiponectin (AdipoQ) and sulphonylurea receptor (ABCC8) gene polymorphisms with type 2 diabetes in North Indian population of Punjab. *Gene* 527: 228-234, 2013.
37. Dworacka M, Winiarska H and Jagodziński PP: Impact of the sulphonylurea receptor 1 (SUR1) exon 16-3c/t polymorphism on acute hyperglycaemia in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 77: 258-262, 2007.
38. Zhang H, Liu X, Kuang H, Yi R and Xing H: Association of sulphonylurea receptor 1 genotype with therapeutic response to gliclazide in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 77: 58-61, 2007.
39. Rojas W, Parra MV, Campo O, Caro MA, Lopera JG, Arias W, Duque C, Naranjo A, García J, Vergara C, *et al*: Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *Am J Phys Anthropol* 143: 13-20, 2010.
40. Ossa H, Aquino J, Pereira R, Ibarra A, Ossa RH, Pérez LA, Granda JD, Lattig MC, Groot H, Fagundes de Carvalho E, *et al*: Outlining the ancestry landscape of Colombian admixed populations. *PLoS One* 11: e0164414, 2016.
41. Homburger JR, Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Nelson D, Sanchez E, Ortiz-Tello P, Pons-Estel BA, Acevedo-Vasquez E, Miranda P, Langefeld CD, *et al*: Genomic insights into the ancestry and demographic history of South America. *PLoS Genet* 11: e1005602, 2015.
42. Florez JC, Burt N, de Bakker PI, Almgren P, Tuomi T, Holmkvist J, Gaudet D, Hudson TJ, Schaffner SF, Daly MJ, *et al*: Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulphonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes* 53: 1360-1368, 2004.
43. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, *et al*: Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 568-572, 2003.
44. Schwanstecher C, Meyer U and Schwanstecher M: K(IR)6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels. *Diabetes* 51: 875-879, 2002.
45. Hamming KS, Soliman D, Matemisz LC, Niazi O, Lang Y, Gloyn AL and Light PE: Coexpression of the type 2 diabetes susceptibility gene variants KCNJ11 E23K and ABCC8 S1369A alter the ATP and sulphonylurea sensitivities of the ATP-sensitive K(+) channel. *Diabetes* 58: 2419-2424, 2009.
46. Lang VY, Fatehi M and Light PE: Pharmacogenomic analysis of ATP-sensitive potassium channels coexpressing the common type 2 diabetes risk variants E23K and S1369A. *Pharmacogenet Genomics* 22: 206-214, 2012.
47. Inoue H, Ferrer J, Welling CM, Elbein SC, Hoffman M, Mayorga R, Warren-Perry M, Zhang Y, Millns H, Turner R, *et al*: Sequence variants in the sulphonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians. *Diabetes* 45: 825-831, 1996.
48. Hart LM, de Knijff P, Dekker JM, Stolk RP, Nijpels G, van der Does FE, Ruijs JB, Grobbee DE, Heine RJ and Maassen JA: Variants in the sulphonylurea receptor gene: Association of the exon 16-3t variant with type II diabetes mellitus in Dutch Caucasians. *Diabetologia* 42: 617-620, 1999.
49. Meirhaeghe A, Helbecque N, Cottel D, Arveiler D, Ruidavets JB, Haas B, Ferrières J, Tauber JP, Bingham A and Amouyel P: Impact of sulphonylurea receptor 1 genetic variability on non-insulin-dependent diabetes mellitus prevalence and treatment: A population study. *Am J Med Genet* 101: 4-8, 2001.
50. Zychma MJ, Gumprecht J, Strojek K, Grzeszczak W, Moczulski D, Trautsolt W and Karasek D: Sulphonylurea receptor gene 16-3 polymorphism - association with sulphonylurea or insulin treatment in type 2 diabetic subjects. *Med Sci Monit* 8: CR512-CR515, 2002.
51. Dawed AY, Donnelly L, Tavendale R, Carr F, Leese G, Palmer CN, Pearson ER and Zhou K: CYP2C8 and SLCO1B1 variants and therapeutic response to thiazolidinediones in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 39: 1902-1908, 2016.

ANEXO II
ARTÍCULO DE REVISIÓN

Polimorfismos de CYP P450 asociados a enfermedades y su valor como biomarcadores

PATRICIA CUAUTLE-RODRÍGUEZ^{1,2}, NIDIA SAMARA RODRÍGUEZ-RIVERA^{2,3}, ELISEO PÉREZ-SILVA⁴
Y JUAN ARCADIO MOLINA-GUARNEROS^{3*}

¹División de Investigación; ²Posgrado en Ciencias Biológicas; ³Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México; ⁴Servicio de Medicina Interna/Endocrinología, Hospital Regional de alta Especialidad, Ixtapaluca, Edo. de México. México

RESUMEN

El citocromo P450 (CYP P450) es una superfamilia de hemoproteínas que participan en el metabolismo de compuestos endógenos (esteroides, hormonas) y xenobióticos (ambientales, fármacos). Los polimorfismos de CYP P450 generan variabilidad en la actividad enzimática, y por ello se han asociado con la protección o susceptibilidad a varias enfermedades. Las investigaciones al respecto son recientes y existen controversias en sus resultados; de ahí la importancia de continuar con la búsqueda de biomarcadores adecuados y fiables que ayuden a la identificación, la prevención, el pronóstico y el tratamiento de las enfermedades. El objetivo de esta revisión es mostrar el panorama actual de las investigaciones que asocian a CYP P450 con algunas enfermedades, debido a su participación en el metabolismo endógeno y de xenobióticos ambientales, y su posible aplicación clínica como biomarcadores. Los citocromos más estudiados son los que se asocian con algún tipo de cáncer, como CYP1A1, CYP1B1 y CYP2E1; otras enfermedades, como la progresión de la cirrosis y algunos trastornos del comportamiento, con CYP2D6, y glaucoma con CYP1B1. Aproximadamente en el 60% de los estudios revisados se encontró asociación con la susceptibilidad a desarrollar alguna enfermedad. Sin embargo, las controversias en los resultados dificultan la validación de los polimorfismos como biomarcadores.

Palabras clave: Citocromo P450. Polimorfismos. Enfermedades. Biomarcadores.

Abstract

Cytochrome P450 (CYP P450) is a superfamily of hemo-containing proteins. These are involved in the metabolism of endogenous substrates (steroids, hormones) and xenobiotics (environmental, drugs). Genetic polymorphisms of *CYP P450* are sources of variability in their metabolic activity; therefore, these have been associated with protection against or susceptibility to several diseases. Research on P450 is very recent and its early results are controversial, thus making further attempts to find adequate and reliable biomarkers even more necessary in order to identify, prevent, prognosticate, and treat diseases. This work provides an overview of the most recent advances in different studies on diseases associated to *CYP P450* polymorphisms (endogenous and chemical xenobiotics metabolism) and their potential

Correspondencia:

*Juan Arcadio Molina-Guarneros
Departamento de Farmacología
Edificio D, Primer piso, Facultad de Medicina
Circuito escolar s/n
Ciudad Universitaria
Col. Universidad Nacional Autónoma de México, C.U.
Del. Coyoacán
C.P. 04510, Ciudad de México, México
E-mail: molina_ja2007@yahoo.com.mx

Recibido: 27-09-2016
Aceptado: 07-12-2016

clinical application as biomarkers. The most studied are cytochromes *CYP1A1*, *CYP1B1*, and *CYP2E1* associated with cancer, while other diseases such as cirrhosis and behavior disorders have been associated with *CYP2D6* and glaucoma with *CYP1B1*. About 60% of the current research on P450 polymorphisms has found some kind of association with disease susceptibility. Nevertheless, the controversy due to result variations makes it difficult to validate polymorphisms as biomarkers. (Evid Med Invest Salud. 2016;9:167-78)

Corresponding author: Juan Arcadio Molina-Guarneros, molina_ja2007@yahoo.com.mx

Key words: Cytochrome P450. Polymorphisms. Diseases. Biomarkers.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento actual sobre las enfermedades asociadas a polimorfismos del citocromo P450 (CYP P450) está en crecimiento constante debido al incremento de las investigaciones realizadas con muestras de humanos, tal como se observó en el periodo 2010-2012, con la publicación de aproximadamente 143 estudios, y en los últimos 3 años se llevan realizados 49. Además de identificar susceptibilidades a enfermedades, en estudios recientes se han investigado las diferencias entre poblaciones, así como la combinación de varios genes, y esto ha contribuido a que las investigaciones sean más complejas. En esta revisión se consideró la información más reciente (2012-2016), incluyendo la replicación de varios estudios y algunos metaanálisis. Se incluyeron artículos con estudios en humanos sobre polimorfismos de *CYP P450* asociados a enfermedades (metabolismo de sustratos endógenos o xenobióticos ambientales) publicados en revistas indexadas y bases de datos (PubMed).

CITOCROMO P450

El CYP P450 es una superfamilia de hemoproteínas que participan en el metabolismo de xenobióticos (ambientales, fármacos) y en la síntesis de compuestos endógenos (esteroides, hormonas, ácido araquidónico, vitaminas, etc.) importantes para la fisiología humana¹. Las enzimas P450 se expresan en gran variedad de órganos, glándulas y tejidos, como los riñones, el cerebro, los testículos, la mucosa intestinal, la garganta y el hígado². En los humanos se han identificado 57 genes de *CYP P450* que están organizados de acuerdo a su nivel de identidad en familias (números) y subfamilias (letras), así como en variantes alélicas nombradas *1 (más frecuente), *2, etc.^{1,2}.

POLIMORFISMOS DE CYP P450

Los polimorfismos (mutaciones genéticas identificadas en al menos el 1% de la población) de *CYP P450* pueden generar enzimas con diferentes niveles de actividad, como la pérdida o ganancia de función (afectaciones en el corte y empalme del mRNA, número de copias y variantes en regiones promotoras)³. Se ha reportado variabilidad individual en diferentes poblaciones, y debido a su relevancia clínica son ampliamente estudiados⁴. Se han identificado tres tipos de metabolismos para las enzimas CYP:

- Lento: enzimas con actividad disminuida.
- Rápido: enzimas con actividad no modificada (más frecuente).
- Ultrarrápido: enzimas con actividad mayor que el metabolismo más frecuente.

POLIMORFISMOS DE CYP P450 ASOCIADOS A ENFERMEDADES

Los polimorfismos de *CYP P450* se han asociado con la variabilidad en el metabolismo de sustratos endógenos y con la activación de sustancias químicas ambientales, por lo que generan alteraciones o desviaciones del estado fisiológico en algunos tejidos. Es por ello que al menos 13 diferentes citocromos (*CYP1B1*, *CYP11A1*, *CYP1A29*, etc.) se han asociado con la protección o la susceptibilidad de enfermedades. En este trabajo las agrupamos, de acuerdo al tipo de sustrato, en enfermedades asociadas al metabolismo de sustratos endógenos y enfermedades asociadas al metabolismo de xenobióticos ambientales.

ENFERMEDADES ASOCIADAS CON EL METABOLISMO DE SUSTRATOS ENDÓGENOS

El CYP P450 está involucrado en el metabolismo de sustratos endógenos esenciales para la fisiología humana, como son el colesterol (CYP7A1, CYP11A1, CYP7B1 y CYP8A1), los esteroides (CYP17A1 y CYP19A1), las prostaglandinas (CYP5A1 y CYP 8A1), las vitaminas solubles (24A1 y 26A1) y los eicosanoides (CYP2C8, CYP2C9 y CYP2J2)¹. En el metabolismo de los esteroides llegan a participar más de 40 citocromos; en la activación y la inactivación de vitaminas participan cuatro citocromos; y en la síntesis de ácidos grasos y eicosanoides por oxidación del ácido araquidónico participan nueve citocromos^{1,2} (Tabla 1).

CYP1B1

CYP1B1 es el citocromo más estudiado con respecto al metabolismo de sustratos endógenos. Constituye una fracción importante del CYP extrahepático, con expresión en casi todos los tejidos: ojos, riñón, pró-

Tabla 1. Citocromos involucrados en el metabolismo de sustratos endógenos

CYP	Sustrato endógeno	Producto	Función
11A1	Colesterol	Pregnenolona	Precursor de todas las hormonas esteroidales
11B1	Biosíntesis	Cortisol	Control de niveles de glucosa, respuesta al estrés y metabolismo de ácidos grasos
		Aldosterona	Regula la presión arterial y al equilibrio ácido-base
17A1	Biosíntesis	Glucocorticoides	Regulan el metabolismo de hidratos de carbono
		Testosterona	Desarrollo y promoción de caracteres sexuales
		Estrógenos	Desarrollo y promoción de caracteres sexuales
19A1	Biosíntesis	Estrógenos	Desarrollo y promoción de caracteres sexuales
21A1	Progesterona	Aldosterona	Regula la presión arterial y al equilibrio ácido-base
	cortisol		
46A1	Colesterol	24-hidroxi-colesterol	Atraviesa barrera hematoencefálica, se degrada en hígado
7B1	Hidroxilación de metabolitos del colesterol, un paso obligatorio en la modificación de núcleos esteroidales		
27A1	Hidroxilación de ácidos biliares		
7A1	Eliminación del colesterol del cuerpo		
51	Cataliza desmetilaciones de los precursores del colesterol		

tata, glándulas mamarias y ovarios. El cambio de aminoácido Leu432Val se ha identificado en pacientes con glaucoma primario congénito, neonatal y juvenil; sin embargo, existe controversia en los resultados.

A continuación se comentan los estudios más recientes sobre CYP1B1 y su asociación con enfermedades (Tabla 2).

CYP2D6

CYP2D6 es el segundo citocromo más estudiado y se ha asociado con diversas enfermedades, como el cáncer de mama (metabolismo de hormonas), en el que se observó una mayor frecuencia de la variante *10 en pacientes con respecto al grupo control; las variantes *3 y *4 (actividad disminuida y asociadas al metabolismo lento) no mostraron diferencias¹³. Este CYP también se ha estudiado con respecto a enfermedades inflamatorias de intestino y Alzheimer, sin encontrar asociación con la variante *4^{14,15}. En la progresión de cirrosis hepática (*4; *odds ratio* [OR]: 2.27; p = 0.05), el lupus eritematoso (*4; OR: 2.9; p = 0.047) y los trastornos de la alimentación (más frecuentes en mujeres portadoras de más de dos genes activos), de personalidad y suicidio (*3 y *4; más frecuentes en pacientes), se han identificado algunos polimorfismos de *CYP2D6*; en los últimos cuatro debido a su expresión en el cerebro¹⁶⁻¹⁹. Sin embargo, no hay replicaciones de estos estudios en diversas poblaciones, salvo en el caso del intento de suicidio y los trastornos de la personalidad¹⁹.

CYP2C9 y 2C19

CYP2C9 y CYP2C19 se han asociado con distintas enfermedades debido a la variabilidad en el metabolismo del ácido araquidónico o por cambios en su nivel de expresión. CYP2C9 se ha estudiado como marcador de disminución de la agresividad en el cáncer de mama (altos niveles de expresión disminuyen la proliferación y la migración de células cancerígenas), 430C>T se ha asociado con la susceptibilidad al cáncer y al adenoma colorectal (OR: 0.92 y 1.39, respectivamente; p = 0.05); en la enfermedad de arteria coronaria, el alelo C se identificó como factor de riesgo (OR: 2.42; p = 0.05), y la disminución de la densidad mineral ósea se asoció con las variantes *2 o *3 (OR: 4; p = 0.05)²⁰⁻²³. CYP2C19 metaboliza al ácido araquidónico y produce ácido epoxy-eicosanoico, que está involucrado en el tono vascular y en la regulación de la presión sanguínea; los niveles elevados

Tabla 2. Investigaciones que involucran a CYP1B1 con enfermedades

Enfermedad (n.º de estudios)	Estudio (n)	Resultados	Referencias (año)
Glaucoma congénito primario (3)	Casos (57) - controles (101)	14.9% de los pacientes presentaron fenotipo atribuible a SNP de <i>CYP1B1</i>	5 (2015)
	Prevalencia de SNP (26 pacientes)	Sí; 182G>A, 317C>A, 535delG, 1064_1076del, 1159G>A, 1310C>T, 1390dupT	6 (2015)
	Prevalencia del número de copias de genes (50 pacientes)	No se identificaron variaciones en el número de copias del gen en pacientes	7 (2013)
Glaucoma ángulo abierto juvenil (2)	Casos (61) - controles (100)	No hubo diferencia en la frecuencia entre casos y controles (403-13C>T, 142C>G, 355G>T, 1294G>C, 1347T>C)	8 (2012)
	Metaanálisis (6 estudios)	Se estudiaron 20 SNP y no se encontró diferencia entre casos y controles	9 (2012)
Glaucoma en recién nacidos (1)	Casos (5) - controles (110)	443A>G solo se identificó en 2 de los 5 casos	10 (2012)
Lesiones en ovario/endometrio (1)	Casos (58 pacientes) - controles (25)	Incremento en niveles de expresión	11 (2016)
Menopausia (síntomas) (1)	Cohorte (399)	Leu342Val se identificó en pacientes menopáusicas con inflamación estomacal, sequedad vaginal, etc.	12 (2012)

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido.

en su expresión se han observado como factor predisponente a padecer enfermedad crónica de Keshan y cardiomiopatía dilatada, pero no hemorragias^{24,25}. Las variantes *2 y *3 (metabolismo lento) se asociaron con una mayor susceptibilidad a la retinopatía en pacientes (mujeres) con diabetes *mellitus* tipo 2 (OR: 7.49; $p = 0.05$)²⁶.

Otros citocromos como CYP1A2, CYP4F y CYP2J2 metabolizan el ácido araquidónico a ácido epoxi-eicosatrienoico, el cual posee efectos cardioprotectores, vasodilatadores, antiinflamatorios, antitrombóticos, etc., y las enzimas con baja actividad se asocian con enfermedades cerebrovasculares (hipertensión y enfermedad arteriocoronaria)² (Tabla 3).

CYP4A11 y CYP4F2 sintetizan al ácido 20-hidroxi-eicosanoico (20-HETE) a partir del ácido araquidónico. El 20-HETE es un potente vasoconstrictor de las arterias cerebrales. La combinación entre los polimorfismos de *CYP4A11* (C-296T) y *CYP4F2* (V433M) se ha asociado con susceptibilidad a padecer isquemia cerebral (OR: 1.5 y 1.38, respectivamente; $p < 0.05$)³⁷.

ENFERMEDADES ASOCIADAS AL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Varios estudios sugieren que tanto las predisposiciones genéticas adquiridas (modificaciones epigenómicas)

como las heredadas desempeñan un papel importante en la carcinogénesis². Las enzimas P450 pueden activar la mayoría de los carcinógenos químicos, y se ha reportado que las principales enzimas implicadas en este proceso son CYP1A1, CYP1B1 y CYP2E1. Sin embargo, la relevancia en la modulación de P450 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer no han sido fáciles de establecer en los seres humanos.

CYP1A1

CYP1A1 se expresa en diversos tejidos y es una de las enzimas de mayor importancia en la carcinogénesis en humanos, debido a que activa diversos procarcinógenos y compuestos, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos². Es el citocromo más estudiado por su asociación con el cáncer de pulmón, y se sabe que su transcripción es inducida por hidrocarburos aromáticos presentes en el humo del tabaco. Se ha reportado que la interacción entre el alelo 2 y la delección del gen y ser fumador incrementa el riesgo de padecer cáncer de pulmón. Además, la delección del gen es más frecuente en los pacientes en comparación con los controles³⁸ (Tabla 4). Se han observado con mayor frecuencia modificaciones en la actividad de CYP1A1 en pacientes con cáncer de cérvix, próstata y ovario, que tienen en común la influencia hormonal y la biotransformación de carcinógenos^{39,40}.

Tabla 3. Otros citocromos que metabolizan sustratos endógenos que se han asociado con enfermedades

Citocromo (n.º de estudios)	Enfermedad	Estudio (n)/resultados	Referencias (año)
1A1 (3)	Arteria coronaria	Casos (293) - controles (408)/rs4886605 CC (OR: 0.37, p = 0.018) en pacientes vs. controles	27 (2015)
	Cardiopatías (Keshan y cardiomiopatía dilatada)	Casos (67 y 28) - controles (58)/nivel de expresión incrementado en pacientes	24 (2016)
	Lesiones de ovario y peritoneales	Casos (24) - controles (25)/nivel de expresión incrementado en pacientes	11 (2016)
17 (2)	Cáncer de vesícula biliar	Casos (414) - controles (230)/rs743572 alelo de riesgo (OR: 2.23, p = 0.016)	28 (2014)
	Síndrome de ovario poliquístico	Casos (287) - controles (187)/No se encontraron diferencias en las frecuencias de rs10883783, rs1004467, rs6162 y rs743572 entre pacientes y controles	29 (2012)
4A11 (2)	Enfermedad arteriocoronaria	Casos (361) - controles (315)/rs3890011 fue más frecuente en pacientes que en controles	30 (2013)
	Infarto al miocardio	Casos (239) - controles (285)/la frecuencia del haplotipo T-T-A(rs2269231, rs1126742 y rs9333025) fue menor entre pacientes (hombres) vs. controles (p < 0.001)	31 (2012)
2CB (2)	Evento cerebrovascular (susceptibilidad)	Casos (396) - controles (378)/No hay diferencia en la frecuencia de rs17110453 y rs1934980	32 (2015)
	Cáncer de mama	Cohorte (40 pacientes)/nivel de expresión incrementado en pacientes (2.5 veces)	20 (2014)
2J2 (2)	Alzheimer (susceptibilidad)	Casos (672) - controles (351)/para rs890293, alelo T OR: 2.641, p < 0.05	33 (2015)
	Cáncer de mama	Cohorte (40 pacientes)/nivel de expresión incrementado en pacientes (2.5 veces)	20 (2014)
26B1 (1)	Aterosclerosis	Cohorte (233)/(rs2241057) para portadores del alelo menor, el tamaño de la lesión (aterosclerosis) fue diferente a la del alelo mayor (p < 0.013)	34 (2012)
11B2 (1)	Hipertensión arterial	Casos (514) - controles (192)/T-344C afecta las estructuras ventriculares en mujeres (T/T) más propensas a hipertensión vs. controles (p = 0.045)	35 (2013)
4F2 (1)	Hipertensión arterial Evento cerebrovascular	Casos (507; 279 hipertensos: 228 no hipertensos) - controles (487)/para 1347 G/A, el alelo A se asoció con hipertensión y evento cerebrovascular (OR: 1.59, p < 0.05)	36 (2012)

Para el estudio de las asociaciones entre los polimorfismos de *CYP1A1* y el riesgo de padecer cáncer se han empleado herramientas como el metaanálisis y la estratificación por grupos. Además, en estudios recientes, *CYP1A1* se ha asociado con 17 tipos de cáncer en diferentes órganos (Tabla 4).

CYP1B1

CYP1B1 se expresa en diversos tejidos, metaboliza procarcinógenos y activa algunas especies reactivas electrófilas para la formación de aductos. Se ha considerado como factor de predisposición a desarrollar

carcinogénesis en el hígado, el pulmón, la próstata, la vejiga y el riñón. Son dos los cambios de aminoácidos que se han estudiado principalmente: Ile462Val y Asn453Ser^{57,58}. En la tabla 5 se muestran los tipos de cáncer estudiados con respecto a *CYP1B1*.

CYP2E1

CYP2E1 es importante en el metabolismo del etanol. Su expresión se incrementa en los sujetos alcohólicos, ya que es inducible por el consumo crónico de alcohol, y esto contribuye a una tolerancia al alcohol y otras drogas⁶⁶. Se ha asociado a la variante c2, con una mayor

Tabla 4. Estudios realizados sobre los diferentes tipos de cáncer asociados a CYP1A1 y el nivel de evidencia reportada

Enfermedad (n.º de estudios)	Estudio (n)	Resultados	Referencias (año)
Cáncer de pulmón de células no pequeñas (1)	Casos (150) - controles (150)	Delección del gen en 73.3% pacientes (OR: 2.28, $p < 0.05$) Alta prevalencia de fumadores: 77.8% de los pacientes Riesgo de padecer la enfermedad si hay delección del gen y el hábito de fumar: OR: 5.6 ($p < 0.05$)	38 (2016)
Neoplasia cervical (3)	Metaanálisis: casos (1,912) - controles (1,812)	T3801C = factor de riesgo alelo T (OR: 1.32, $p < 0.05$) y genotipo TT (OR: 1.99, $p < 0.05$)	39 (2013)
	Metaanálisis: casos (1,087) - controles (1,326)	Incrementa riesgo: Val vs. Ile (OR: 1.43, $p < 0.05$); ValVal vs. IleIle (OR: 2.43, $p < 0.05$); ValVal+ValIle vs. IleIle (OR: 1.59, $p < 0.05$). Asociación significativa para caucásicos: (OR: 2.03, $p < 0.05$)	40 (2012)
	Casos (195) - controles (106)	T380C = factor de riesgo alelo T, no se observó para la muestra de la población de China y de India. Para la muestra de la población Malay si es factor de riesgo (OR: 4.66, $p < 0.05$)	41 (2016)
Cáncer de próstata (2)	Metaanálisis: casos (2,350) - controles (2,992)	Asociación de Ile462Val con riesgo: Val vs. Ile: OR: 1.27 ($p < 0.001$); ValVal vs. IleIle: OR: 1.51 ($p = 0.004$); ValVal+ValIle vs. IleIle: OR: 1.31 ($p < 0.001$)	42 (2013)
	Casos (138) - controles (138)	La frecuencia de las variantes w1m1 (15.22%) y m1m1 (17.39%) fue similar en pacientes y en controles	43 (2012)
Carcinoma renal (1)	Metaanálisis MspI: casos (531) - controles (739)	Polimorfismo de riesgo; modelo alélico OR: 1.49, $p < 0.05$ Modelo dominante OR: 1.72, $p < 0.05$	44 (2015)
	Ile462Val: casos (742) - controles (975)	No hubo diferencia en la frecuencia del polimorfismo entre pacientes y controles Estratificación por hábito de fumar: alelo Val; OR: 3.39, $p < 0.05$	
Leucemia mieloide crónica (1)	Casos (132) - controles (140)	Frecuencia del alelo *2C fue diferente entre controles y pacientes: AA = 16 vs. 38%, AG = 78 vs. 57% y GG = 6 vs. 5% Alta frecuencia de AG en controles lo sugieren como factor protector	45 (2015)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (1)	Metaanálisis: casos (1,050) - controles (1,202)	Polimorfismo MspI factor de riesgo: CC vs. TC+TT; OR: 1.57, $p = 0.02$ CC vs. TT; OR: 1.73, $p = 0.005$ Polimorfismo Ile462Val factor de riesgo: GG vs. AG+AA; OR: 2.75, $p = 0.009$ GG vs. AA; OR: 3.23, $p = 0.003$ AG vs. AA; OR: 1.39, $p = 0.04$	46 (2015)
Cáncer colorectal (1)	Casos (74) - controles (199)	Polimorfismo MspI: OR: 0.75, $p = 0.463$	[47] (2015)
Cáncer de esófago (1)	Metaanálisis: casos (1,519) - controles (1,962)	Polimorfismo MspI: C vs. T OR: 1.25, $p < 0.05$; CC+CT vs. TT OR: 1.35, $p < 0.05$; CC vs. TT+CT OR: 1.35, $p < 0.05$	[48] (2015)
Tumor óseo (1)	Casos (52) - controles (100)	Polimorfismo Ile462Val: mas frecuente en pacientes (46.2%). Homócigo Val como factor de riesgo: OR: 4.15, $p < 0.05$	[49] (2015)
Cáncer hepatocelular (1)	Metaanálisis: casos (731) - controles (1,059)	Polimorfismo 3801T>C: TT vs. CC OR: 1.21, $p < 0.05$; TT vs. TC OR: 0.87, $p < 0.05$. Por grupo étnico: Modelo dominante OR: 1.26, $p < 0.05$ y modelo recesivo OR: 1.25, $p < 0.05$ para asiáticos	[50] (2015)

(Continúa)

Tabla 4. Estudios realizados sobre los diferentes tipos de cáncer asociados a CYP1A1 y el nivel de evidencia reportada (*Continuación*)

Enfermedad (n.º de estudios)	Estudio (n)	Resultados	Referencias (año)
Cáncer de mama (1)	Casos (742) - controles (742)	Polimorfismo A4889G: Alelo G como factor de riesgo OR: 1.5, $p < 0.05$. Para caucásicos, el alelo G OR: 1.6, $p < 0.05$ Polimorfismo T6235C: CC más frecuente en pacientes (48.4%)	[51] (2015)
Cáncer de vejiga (1)	Casos (114) – controles (114)	No hubo diferencia en la frecuencia de los polimorfismos para Ile462 entre pacientes y controles	[52] (2013)
Cáncer de ovario (1)	Metaanálisis: MspI Casos (1,051) - controles (1,613) Ile462Val Casos (1,680) - controles (3,345) Th461Asn Casos (349) - controles (785)	Polimorfismo MspI: TC vs. TT OR: 1.10, $p = 0.329$ Polimorfismo (Ile462Val): Homócigos como factor de riesgo, OR: 2.65, $p = 0.02$ Polimorfismo (Th461Asn): heterócigo OR: 1.62, $p = 0.06$	[53] (2012)
Carcinoma oral (1)	Metaanálisis: Casos (1,515) - controles (2,233)	Polimorfismo Ile462Val: Val/Val vs. Ile/Ile OR: 1.46, $p < 0.05$. Modelo dominante OR: 1.01, $p < 0.05$ y modelo recesivo OR: 1.46, $p < 0.05$ Análisis por grupo étnico, para asiáticos: modelo recesivo aditivo (Val/Val vs. Ile/Ile) OR: 1.74, $p < 0.05$	[54] (2012)
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (1)	Casos (313) - controles (417)	Polimorfismo MspI: asociación con la edad OR: 8.15, $p < 0.05$. Asociación con el hábito de fumar OR: 5.37, $p < 0.05$	[55] (2012)
Leucemia linfoblástica (1)	Metaanálisis: casos (2,013) - controles (2,903)	Polimorfismo MspI: CC+TC vs. TT OR: 1.33, $p < 0.05$. De acuerdo al grupo étnico, no se encontraron asociaciones con asiáticos ni caucásicos	[56] (2012)

tasa de transcripción en el desarrollo de determinados tipos de cáncer (Tabla 6); se ha considerado como un factor de susceptibilidad para cáncer de garganta junto con el hábito de fumar, y para cáncer de pulmón (fumadores moderados). Es más relevante en poblaciones orientales, donde la frecuencia de c es alta⁶⁷.

Otros citocromos menos estudiados son CYP17A1, asociado con cáncer de pulmón de células no pequeñas; CYP3A5 y CYP1A2, con riesgo de padecer cáncer^{71,72}; CYP2W1, 4F11 y 8A1, con cáncer de mama; y la variante *4 de CYP2D6 con la progresión de cirrosis hepática y con la disminución en la transformación de procarcinógenos y un efecto protector para cáncer de mama^{73,74}. En la actualidad, las investigaciones han ampliado el panorama de estudio al considerar la interacción de varios citocromos que, en conjunto, participan en la generación de carcinógenos. Por ejemplo, la interacción de CYP1A1, 1A2 y 2E1 (Japón) se ha asociado con susceptibilidad a padecer cáncer gástrico⁷⁵. Además, se ha considerado la combinación con enzimas de fase II, como la glutatión S-transferasa. Por

ejemplo, en la interacción de CYP1A1, 1B1 y ALDH en pacientes jóvenes con carcinoma escamoso, no se encontró asociación con el nivel de expresión de CYP1A1, pero sí con el de CYP1B1, que fue mayor en los controles, lo que se sugiere un menor riesgo de recurrencia con un metabolismo incrementado de CYP1B1⁷⁶.

Cada vez son más las poblaciones estudiadas con respecto a las asociaciones entre citocromos y enfermedades, ya que se ha reportado que existe variabilidad étnica. La mayoría de los citocromos se han estudiado en población china, quienes han buscado la reproducibilidad de sus resultados dentro de sus grupos étnicos. Como se muestra en la tabla 7, son pocas las poblaciones estudiadas hasta el momento y la mayoría de las investigaciones se han realizado en poblaciones asiáticas y europeas. Del continente americano, solo se tienen estudios en muestras de los EE.UU., Brasil y México, pero son pocos los citocromos estudiados en estas poblaciones.

Tabla 5. Estudios realizados sobre los diferentes tipos de cáncer asociados a CYP1B1 y evidencia reportada

Enfermedad (n.º de estudios)	Estudio (n)	Resultados	Referencias (año)
Cáncer de próstata (3)	Metaanálisis: casos (3,221) - controles (3,447)	Polimorfismo Leu432Val: Val/Val vs. Leu/Leu (OR: 1.07, p = 0.67); Leu/Val vs. Leu/Leu (OR: 1.05, p = 0.42). Asiáticos Val/Val vs. Leu/Leu OR: 2.48, p = 0.02; Leu/Leu vs. Leu/Leu OR: 1.40, p = 0.03	57 (2012)
	Metaanálisis: casos (2,788) - controles (2,968)	Polimorfismo 4326C/G: factor de riesgo alelo G OR: 1.100, p = 0.014; GC vs. CC OR: 1.10, p = 0.421; GG vs. CC OR: 1.15, p = 0.027	58 (2012)
	Metaanálisis: G119T - casos (15,376) - controles (18,382)	Polimorfismo G119T: TT vs. GG OR: 1.59, p = 0.051; G/T vs. G/G OR: 1.31, p = 0.305	59 (2015)
Cáncer colorectal (2)	A453G - casos (27,983) - controles (35,839)	Polimorfismo A453G: G/G vs. A/A OR: 1.266, p = 0.277; A/G vs. A/A OR: 1.182, p = 0.045	
	Metaanálisis: casos (6,375) - controles (7,003)	Polimorfismo Asn453Ser: factor de riesgo G/G vs. A/A OR: 0.94, p < 0.05; G/A vs. A/A OR: 0.99, p < 0.05	60 (2012)
Cáncer hepatoceleular (1)	Metaanálisis: casos (8,466) - controles (9,301)	Polimorfismo (Leu432Val): G/G vs. C/C OR: 1.01, p < 0.05; G/C vs. C/C OR: 0.97, p < 0.05	61 (2012)
	Casos (468) - controles (515)	Polimorfismo rs1056836: alelo de riesgo G OR: 2.13, p < 0.05; combinación del genotipo G/G con el hábito de fumar OR: 13.97, p < 0.05	62 (2015)
Cáncer de laringe (1)	Casos (300) - controles (300)	Polimorfismo rs1056827: alelo de riesgo T OR: 1.43, p < 0.0034 Polimorfismo rs1056836: alelo de riesgo G OR: 0.56, p < 0.0027	63 (2015)
Cáncer de pulmón (1)	Metaanálisis: casos (7,067) - controles (9,374)	Polimorfismo 432GG vs. CC tuvo un 39.7% de riesgo y el alelo de riesgo G tuvo un riesgo del 26.3% Polimorfismo 119TT OR: 2.13, p < 0.05 Polimorfismo 48G/G: factor de riesgo OR: 3.859, p < 0.05	64 (2012)
Cáncer renal (1)	Casos (133) - controles (208)	Polimorfismo G/G (Ala119): factor de riesgo OR: 2.08, p < 0.05	65 (2012)

Tabla 6. Estudios realizados sobre los diferentes tipos de cáncer asociados a CYP2E1 y el nivel de evidencia reportada

Enfermedad (n.º de estudios)	Estudio (n)	Resultados	Referencias (año)
Cáncer gástrico (2)	Casos (510) - controles (510)	Polimorfismo PstI/RsaI: factor de riesgo para C2/C2 OR: 2.15, p < 0.05; alelo de riesgo C2 OR: 1.48, p < 0.05	66 (2012)
	Casos (105) - controles (118)	Polimorfismo rs2031920: alelo de riesgo OR: 8.38, p < 0.0001	67 (2015)
Cáncer colorectal (1)	Metaanálisis: rs2031920 - casos (5,291) - controles (6,477)	Polimorfismo rs2031920: c2 vs. c1 OR: 1.19, p = 0.02; c2/c2 vs. c2/c1 OR: 1.16, p = 0.046	68 (2013)
	rs3813867 - casos (2,312) - controles (3,002)	Polimorfismo rs3813867: c2 vs. c1 OR: 0.96, p = 0.67; c2/c2 vs. c2/c1 OR: 1.26, p = 0.67	
Carcinoma de tiroides (1)	Metaanálisis: casos (767) - controles (2,429)	Polimorfismo rs2480258: factor de riesgo G/A OR: 1.24, p < 0.05 y A/A OR: 1.56, p < 0.05	69 (2016)
Hepatocarcinoma (1)	Metaanálisis: casos (1,661) - controles (2,317)	Polimorfismo PstI/RsaI: factor de riesgo c2/c2 vs. c1/c1 OR: 0.73, p < 0.05; c1/c2 vs. c1/c1 OR: 1.00, p < 0.05 Alelo de riesgo c2 y alcoholismo OR: 1.73, p < 0.05	70 (2012)

Tabla 7. Citocromos estudiados por su asociación con enfermedades en muestras de diferentes poblaciones

Citocromo (CYP)	Muestras (países)	Citocromo (CYP)	Muestras (países)	Citocromo (CYP)	Muestras (países)		
1B1	Brasil	2D6	España	4F	China		
	Eslovaquia		China		India		
	Turquía		Brasil				
	Arabia Saudita		República Checa		2C9	China	
	Estados Unidos de Norteamérica		Rusia			Austria	
	Australia		Estados Unidos de Norteamérica		Estados Unidos de Norteamérica		
	Portugal						
	España		2E1		China	4A11	Japón
	India				Italia		China
	China				Brasil		
1A1	China	2C19	India	3A5	China		
	Brasil		Taiwán				
	Malasia		Corea	1A2	China		
			Estados Unidos de Norteamérica		2W1, 4F11	México	
	Inglaterra						
	Turquía		Japón	8A1			
	España		China		2J2	China	
			17	Estados Unidos de Norteamérica	2C8	China	
				India			
				China			

POLIMORFISMOS COMO POSIBLES BIOMARCADORES

La mayoría de las enfermedades se deben a factores ambientales y genéticos; de ahí la necesidad de estudiarlos para obtener un perfil molecular de una determinada enfermedad. Los polimorfismos genéticos o de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en enzimas involucradas en la degradación y eliminación de xenobióticos y de sustratos endógenos presentan variabilidad en el metabolismo de los individuos⁴. Es por ello que su uso como biomarcadores puede ser un factor clave en la medicina. Se entiende como biomarcadores a las biomoléculas, características específicas o indicadores de un cambio en cualquier estructura biológica que pueden ser objetivamente medidos en un organismo vivo. Estos indican un estado biológico normal, algún proceso patológico o bien manifiestan la respuesta a un tratamiento farmacológico^{4,77,78}. Para el establecimiento de algún SNP como posible biomarcador, primero se tiene que

identificar el polimorfismo que esté asociado con alguna enfermedad. Generalmente se hace mediante dos estrategias diferentes: a) estudios de asociación de genoma completo (GWAS, *genome-wide association studies*), en los que se analiza el genoma completo de determinadas regiones o genes, pues no se parte de un gen candidato en concreto; y b) estudios de asociación de genes candidatos y de patogénesis, ya que para la mayoría de las enfermedades existe una gran cantidad de estudios que han identificado genes o regiones cromosómicas de interés^{78,79}. Posteriormente se realiza la genotipificación en una muestra determinada de pacientes y de controles, y se analizan los resultados obtenidos. Una vez que los biomarcadores han sido descubiertos y seleccionados, no solo se considera la significancia estadística, sino también su potencial para resolver realmente un problema clínico y la relación coste-efectividad.

Es por ello que la búsqueda de factores genéticos como biomarcadores adecuados y fiables asociados a

enfermedades podría contribuir a tomar medidas oportunas de prevención, así como a un mejor pronóstico del curso de las enfermedades. Existen dos tipos de biomarcadores importantes para el campo de la biomedicina:

- Biomarcadores predictivos, que proporcionan información sobre qué personas o pacientes es probable e improbable que se asocien con alguna enfermedad o variable sujeta a investigación, o bien que se beneficien con un tratamiento específico.
- Biomarcadores de pronóstico, que reflejan el riesgo inicial o el avance de una enfermedad, además de proveer información sobre el resultado a largo plazo de los pacientes no tratados comparados con los que recibieron tratamiento^{78,79}.

Para el desarrollo de biomarcadores es necesario considerar la validación y la utilidad clínica en el contexto de ensayos clínicos aleatorizados, que son el estándar de referencia para evaluar la utilidad clínica^{78,79}. La encargada de la validación y la aprobación de los biomarcadores en la práctica clínica es la Food and Drug Administration (FDA), que define a un biomarcador validado como aquel que es medido mediante un sistema analítico cuyo procedimiento está bien establecido y cuyo significado científico en el campo biológico, toxicológico, farmacológico o clínico está bien establecido^{78,79}. Los criterios de validación analítica, clínica y de utilidad para un biomarcador dependerán del uso previsto. La validación analítica se refiere al establecimiento de la robustez, la reproducibilidad del ensayo y la precisión de la medición (sensibilidad y especificidad) relativas a un estándar en una cohorte inicial. La validación clínica se refiere al establecimiento de la capacidad del biomarcador en la identificación o asociación con alguna enfermedad, o bien del efecto estudiado en pacientes⁷⁷⁻⁷⁹ en una segunda cohorte independiente, generalmente en las fases I y II de ensayos clínicos, seguidos por otros ensayos con mayor tamaño de muestra (fases III y IV). La decisión de continuar con el proceso de implantación de un biomarcador depende de su utilidad en la práctica clínica habitual. Hasta el momento, los avances en la biotecnología y la genómica han contribuido gradualmente al estudio molecular de muchas enfermedades y han generado conocimiento sobre las fuentes de heterogeneidad; sin embargo, son pocos los biomarcadores recogidos en la FDA para los que realmente se recomienda realizar un test genético al tomar una decisión terapéutica.

CONCLUSIONES

En los últimos años, el estudio de los polimorfismos de *CYP P450* asociados a enfermedades ha sido de gran interés, lo que se ve reflejado en el incremento en el número de publicaciones cada año. Citocromos como CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 y CYP2D6 han sido de los más estudiados, ya que se expresan en varios tejidos y órganos, además que estar involucrados en varias reacciones importantes dentro del metabolismo de sustratos endógenos y de xenobióticos. El cáncer es la enfermedad más común asociada a los polimorfismos de *CYP P450*, con 14 tipos de cáncer asociados a 13 citocromos. Sin embargo, no hay replicación de estudios para una misma enfermedad en una población ni en distintas poblaciones. Cabe mencionar que para CYP1A1 y CYP1B1 se han realizado metaanálisis para el cáncer de próstata, de mama, de cérvix, hepatocelular y de ovario; además, ambos citocromos se han estudiado en forma independiente y en combinación. El metaanálisis reduce la probabilidad de cometer errores tipo I y II al aumentar considerablemente el tamaño de las muestras, lo que proporciona una mayor confianza en las asociaciones identificadas y ayuda a esclarecer las controversias en la información. Cabe mencionar que la tendencia actual es investigar la interacción de varias enzimas que pudieran estar involucradas en una misma enfermedad. La población más estudiada es la china, con estudios sobre 15 de los 18 citocromos que hasta el momento se han asociado a enfermedades y que ha replicado estudios dentro de su población. La mayoría de los estudios existentes no se han replicado en la misma población ni en otros países. Tanto los metaanálisis como los estudios de casos y controles presentaron algunas limitaciones, principalmente estos últimos. Algunas de estas limitaciones son que no se realizaron ajustes en las mediciones, no consideraron subtipos dentro de una misma enfermedad, no consideraron la diferencia debida a la variabilidad étnica, los tamaños de muestra fueron pequeños, hubo poca replicación de estudios, etc. Recientemente se busca que los polimorfismos identificados sean útiles como biomarcadores (pronóstico o prevención), por lo que son necesarias más investigaciones que, además de identificarlos, validen y prueben que son adecuados y fiables para que así contribuyan a tomar medidas oportunas de prevención y mejoren el pronóstico del curso de las enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Esta revisión constituye un cumplimento parcial del plan académico para la graduación en el Programa en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. PAPIIT IN218216, DGAPA-UNAM.

BIBLIOGRAFÍA

- Guengerich P. Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *J Biol Chem.* 2013;288:17065-73.
- Pikuleva I, Waterman M. Cytochromes P450: roles in diseases. *J Biol Chem.* 2013;288:17091-8.
- Zanger U, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138:103-41.
- Pérez-Prieto R, Cabaleiro T, Abad-Santos F. Cómo se establece la relevancia clínico-farmacológica de polimorfismos. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica.* 2012;10:91-4.
- Souzeau E, Hayes M, Ruddle JB, et al. CYP1B1 copy number variation is not a major contributor to primary congenital glaucoma. *Mol Vis.* 2015;21:160-4.
- Cardoso MS, Anjos R, Vierira L, Ferreira C, Xavier A, Brito C. CYP1B1 gene analysis and phenotypic correlation in Portuguese children with primary congenital glaucoma. *Eur J Ophthalmol.* 2015;25:474-7.
- Lim S, Tran-Viet K, Yanovitch T, et al. CYP1B1, MYOC, and LTBP2 mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States. *Am J Ophthalmol.* 2013;155:508-17.
- Su C, Liu Y, Yang J, Yen Y. Mutations in the CYP1B1 gene may contribute to juvenile-onset open-angle glaucoma. *Eye.* 2012;26:1369-77.
- Dong S, Yang J, Yu W, Kota P, Xia P, Xu H. No association of genetic polymorphisms in CYP1B1 with primary open-angle glaucoma: a meta- and gene- based analysis. *Mol Vis.* 2012;18:786-96.
- Khan A, Aldahmesh MA, Mohamed JY, Hijazi H, Alkuraya F. CYP1B1 analysis of unilateral primary newborn glaucoma in Saudi children. *J AAPOS.* 2012;16:571-2.
- Piccinato C, Neme RM, Torres N, et al. Increased expression of CYP1A1 and CYP1B1 in ovarian/peritoneal endometriotic lesions. *Reproduction.* 2016;151:683-92.
- Luptáková L, Siváková D, Srámeková D, Cvicelová M. The association of cytochrome P450 1B1 Leu432Val polymorphism with biological markers of health and menopausal symptoms in Slovak midlife women. *Menopause.* 2012;19:216-24.
- Marins DM, Vidal FC, Souza RD, Brusca SA, Brito LM. Determination of CYP2D6*3, *4, and *10 frequency in women with breast cancer in Sao Luis, Brazil, and its association with prognostic factors and disease-free survival. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47:1008-15.
- Dudarewicz M, Rychlik-Sych M, Baranska M, et al. Significance of the genetic polymorphism of CYP2D6 and NAT2 in patients with inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Rep.* 2014;66:686-90.
- Lu Y, Qin X, Zhang X, et al. Quantitative assessment of CYP2D6 polymorphisms and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. *J Neuro Sci.* 2014;343:15-22.
- Neopmyashchikn DL, Vavilin VA, Aidagulova SV, et al. Cytochrome P450 2D6 polymorphism is a molecular genetic marker of liver cirrhosis progression. *Bull Exp Med.* 2012;152:633-66.
- Baranska M, Rychlik M, Kaszuba A, Dzikowska B, Waszczykowska E. Genetic polymorphism of CYP2D6 with systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *Autoimmunity.* 2016;1-6.
- Peñas-Lledó EM, Dorado P, Agüera Z, et al. CYP2D6 polymorphism in patients with eating disorders. *Pharmacogenomics J.* 2012;12:173-5.
- Blasco H, Peñas E, Vaquero C, et al. CYP2D6 polymorphism and mental and personality disorders in suicide attempters. *J Pers Disord.* 2014;28:873-83.
- Wie X, Zhang D, Dou X, et al. Elevated 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid by increasing of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 and decreasing of soluble epoxide hydrolase associated with aggressiveness of human breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;18:841.
- Wang H, Ren L, He Y, et al. Association between cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms and colorectal cancer susceptibility: evidence from 16 case-control studies. *Tumor Biol.* 2014;35:4317-22.
- Fu Z, Zhu Q, Ma Y, et al. Diplotypes of CYP2C9 gene is associated with coronary artery disease in the Xinjiang Han Population for women in China. *Lipids Health Dis.* 2014;13:143.
- Brunner-Ziegler S, Giurgea GA, Sunder-Plassmann R, et al. CYP2C9 genotype and association with bone mineral density: a pilot study. *Gene.* 2013;526:295-8.
- Zhou B, He S, Wang Xi, Zhen X, Su S, Tan W. Metabolism of arachidonic acid by the cytochrome P450 enzyme in patients with chronic Keshan disease and dilated cardiomyopathy. *Biomed Rep.* 2016;4:251-5.
- Sorich MJ, Polasek TM, Wiese MD. Systematic review and meta-analysis of the association between cytochrome P450 2C19 genotype and bleeding. *Thromb Haemost.* 2012;108:199-200.
- Kajiwara A, Sauwatari J, Kita A, et al. Sex differences in the effect of cytochrome P450 2C19 polymorphisms on the risk of diabetic retinopathy: a retrospective longitudinal study in Japanese patients with type 2 diabetes. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23:1-4.
- Zou J, Ma Y, Xie X, Yang Y, Lui F. Association between CYP1A1 genetic polymorphisms and coronary artery disease in Uygur population in Xinjiang, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Za Zhi.* 2015;36:393-8.
- Rai R, Sharma K, Misra S, Kumar A, Mittal B. CYP17 polymorphism (rs743572) is associated with increased risk of gallbladder cancer in tobacco users. *Tumor Biol.* 2014;35:6531-7.
- Chua A. Association study of CYP17 and HSD11B1 in polycystic ovary syndrome utilizing comprehensive gene coverage. *Mol Human Reprod.* 2012;18:320-4.
- Fu Z, Ma Y, Xie X, et al. A novel polymorphism of the CYP4A11 gene is associated with coronary artery disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2013;19:60-5.
- Fu Z, Nakayama T, Sato N, et al. Haplotype-based case-control study of CYP4A11 gene and myocardial infarction. *Hereditas.* 2012;149:91-8.
- Yi X, Zhang B, Wang C, Liao D, Lin J, Chi L. CYP2C8 rs17110453 and EPHX2 rs751141 two-locus interaction increases susceptibility to ischemic stroke. *Gene.* 2015;565:85-9.
- Yan H, Kong Y, He B, et al. CYP2J2 rs890293 polymorphism is associated with susceptibility to Alzheimer's disease in the Chinese Han population. *Neurosci Lett.* 2015;593:56-60.
- Krivospitskaya O, Elmabsout A, Sundman E, et al. A CYP26B1 polymorphism enhances retinoic acid catabolism and may aggravate atherosclerosis. *Mol Med.* 2012;18:712-8.
- Sia SK, Chiou HL, Chen SC, Tsai CF, Yang SF, Ueng KC. Distribution and phenotypic expression of mineralocorticoid receptor and CYP11B2 T-344C polymorphisms in a Taiwanese hypertensive population. *Mol Biol Rep.* 2013;40:3705-11.
- Munshi A, Sharma V, Kaul S, et al. Association of 1347 G/A cytochrome P450 4F2 (CYP4F2) gene variant with hypertension and stroke. *Mol Biol Rep.* 2012;39:1677-82.
- Ding H, Cui G, Zhang L, et al. Association of common variants of CYP4A11 and CYP4F2 with stroke in the Han Chinese population. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20:187-94.
- Xie YQ, Liu Y. Interaction of the CYP1A1 gene polymorphism and smoking in non-small cell lung cancer susceptibility. *Genet Mol Res.* 2016;14:19411-7.
- Xia L, Gao J, Liu Y, Wu K. Significant association between CYP1A1 T3801C polymorphism and cervical neoplasia risk: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol.* 2013;34:223-30.
- Yang S, Jia C, Zhu H, Han S. CYP1A1 Ile462Val polymorphism and cervical cancer: evidence from a meta-analysis. *Tumor Biol.* 2012;33:2265-72.
- Tan YH, Sidk SM, Syed H, Lye MS, Chong PP. CYP1A1 MspI polymorphism and cervical carcinoma risk in the multi-ethnic population of Malasia: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17:57-64.
- Han G, Ma Y, Liu P, Wei X, Zhang X, Zhy F. Quantitative synthesis of the association between the cytochrome P450 1A1 Ile462Val polymorphism and prostate cancer risk. *Tumor Biol.* 2013;34:1511-6.
- Souiden Y, Mahdouani M, Chaleb K, Bakhrour A, Mahdouani K. Lack of association of CYP1A1 polymorphism with prostate cancer susceptibility of Tunisian Men. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16:661-6.
- Meng FD, Ma P, Sui CG, Tian X, Jiang YH. Association between cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphisms and the risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5:8108.
- Lakkireddy S, Aula S, Avn S, Kapley A, Rao Digumarti R, Jamil K. Association of the common CYP1A1*2C variant (Ile462Val polymorphism) with chronic myeloid leukemia (CML) in patients undergoing imatinib therapy. *Cell J.* 2015;17:510-9.
- Wang CD, Chen N, Huang L, et al. Impact of CYP1A1 polymorphisms on susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:942958.
- Pronça MA, Fernandes GM, Russo A, et al. A case-control of CYP2E1 (PstI) and CYP1A1 (MspI) polymorphisms in colorectal cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14:17856-63.
- Zheng H, Zhao Y. Association of CYP1A1 MspI polymorphism in the esophageal cancer risk: a meta-analysis in the Chinese population. *Eur J Med Resp.* 2015;30:20-46.
- Li L, Ji JG, Liu CY, Ding YJ. Effect of CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms on bone tumor susceptibility. *Genet Mol Res.* 2015;14:16600-7.

50. Yu BW, Zhang LQ, Teng XL, Zhang Y, Zou LB, Ying HY. Association between the CYP1A1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Genet Mol Res.* 2015;14:1076-84.
51. Oliveira CB, Cardoso-Filho C, Bossi LS, Lourenço GJ, Costa-Gurgel MS, Lima CS. Association of CYP1A1 and T6235C polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in Brazilian women. *Clinics.* 2015;70:680-5.
52. Berber U, Yilmaz I, Yilmaz O, et al. CYP1A1 (Ile462Val), CYP1B1 (Ala119Ser and Val432Leu), GSTN1 (null) and GSTT1 (null) polymorphisms and bladder cancer risk in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;11:3925-9.
53. Sergentanis TN, Economopoulos KP, Choussein S, Vlahos NF. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphisms and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39:9921-30.
54. Zhuo X, Zhao H, Chang A, et al. Cytochrome P450 1A1 Ile462Val polymorphism and oral carcinoma risk: an updated meta-analysis including 1,515 cases and 2,333 controls. *Tumor Biol.* 2012;33:2079-89.
55. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and CYP2E1 gene in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep.* 2012;39:1055-63.
56. Zhuo W, Zhang L, Qiu Z, Zhu B, Chen Z. Does cytochrome P450 1A1 MspI polymorphism increase acute lymphoblastic leukemia risk? Evidence from 2,013 cases and 2,903 controls. *Gene.* 2012;510:14-21.
57. Cui L, Dillehay K, Chen W, Shen D, Dong Z, Li W. Association of the CYP1B1 Leu432Val polymorphism with the risk of prostate cancer. *Mol Biol Rep.* 2012;39:7465-71.
58. Yang J, Xu D, Lu Q, et al. Prostate cancer risk and aggressiveness association with the CYP1B1 432601G (Leu432Val) polymorphism: a meta-analysis of 2788 cases and 2968 controls. *Asian J Andrology.* 2012;14:560-8.
59. Li C, Long B, Qin X, Li W, Zhou Y. Cytochrome P1B1 (CYP1B1) polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 52 studies. *Toxicol.* 2015;327:77-86.
60. Mei Q, Zhou D, Han J, Lu H, Tang B. CYP1B1 Asn453Ser polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Metabolism.* 2012;61:1321-9.
61. Xie Y, Liu GQ, Milao XY, Liu Y, Zhou W, Zhong DW. CYP1B1 Leu432Val polymorphism and colorectal cancer risk among Caucasians: a meta-analysis. *Tumor Biol.* 2012;33:809-16.
62. Liu F, Luo LM, Wei YG, et al. Polymorphisms of the CYP1B1 gene and hepatocellular carcinoma risk in a Chinese population. *Gene.* 2015;564:14-20.
63. Yu PJ, Chen WG, Feng QL, Chen W, Jiang MJ, Li ZQ. Association between CYP1B1 gene polymorphisms and risk factors and susceptibility to laryngeal cancer. *Med Sci Monit.* 2015;21:239-45.
64. Xu W, Zhou Y, Hang X, Shen D. Current evidence on the relationship between CYP1B1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39:2821-9.
65. Salinas-Sánchez A, Sánchez-Sánchez F, Donate-Moreno MJ, et al. GSTT1, GSTM1, and CYP1B1 gene polymorphisms and susceptibility to sporadic renal cell cancer. *Urol Oncol.* 2012;30:864-70.
66. Feng J, Pan X, Yu J, et al. Functional Pst I/Rsa I polymorphism in CYP2E1 is associated with the development, progression and poor outcome of gastric cancer. *Plos One.* 2012;7:e4478.
67. Elingarami S, Liu H, Kalinjuma AV, Hu W, Li S, He N. Polymorphisms in NEIL-2, APE-1, CYP2E1 and MDM2 genes are independent predictors of gastric cancer risk in Northern Jiangsu Population. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015;15:4815-28.
68. Peng H, Xie SK, Huang MJ, Ren DL. Association of CYP2E1 rs2031920 and rs3813867 polymorphisms with colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol.* 2013;34:2389-95.
69. Pellé L, Cipollini M, Tremmel R, et al. Association between CYP2E1 polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinoma. *Arch Toxicol.* 2016;90:3099-109.
70. Liu C, Wang H, Pan C, Shen J, Liang Y. CYP2E1 1 PstI/Rsa I polymorphism and interaction with alcohol consumption in hepatocellular carcinoma susceptibility evidence from 1,661 cases and 2,317 controls. *Tumor Biol.* 2012;33:979-84.
71. Wang B, Liu Z, Xu WX, Sun SL. CYP3A5*3 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis and meta-regression. *Tumor Biol.* 2013;34:2357-66.
72. Wang H, Zhang Z, Han S, Lu Y, Feng F, Yan J. CYP1A2 rs762551 polymorphism contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis from 19 cases-controls studies. *BMC Cancer.* 2012;12:528.
73. Cárdenas-Rodríguez N, Lara-Padilla E, Bandala C, et al. CYP2W1, CYP4F11, and CYP8A1 polymorphisms and interaction of CYP2W1 genotypes with risk factors in Mexican women with breast cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2012;13:837-41.
74. Fernández-Santander A, Del Saz-Sánchez M, Tejerina-Gomez A, Bandrés-Moya F. CYP2D6 allele and breast cancer risk: is there any association? *Clin Transl Oncol.* 2012;14:157-9.
75. Ghoshal U, Tripathi S, Kumar S, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, and CYP2E1 genes modulate susceptibility to gastric cancer in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Gastric Cancer.* 2014;17:226-34.
76. Kaminagakura E, Caris A, Coutinho-Camillo C, Soares FA, Takahama-Júnior A, Kowalski LP. Protein expression of CYP1A1, CYP1B1, ALDH1A1, and ALDH2 in young patients with oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016;45:706-12.
77. Arango S. Biomarkers for the evaluation of human health risks. *Rev Fac Nac Salud Pública.* 2011;30:75-82.
78. Pérez-Prieto R, Cabaleiro T, Abad-Santos F. Cómo se establece la relevancia clínico-farmacológica de polimorfismos. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica.* 2012;10:91-4.
79. Matsui S. Genomic biomarkers for personalized medicine: development and validation in clinical studies. *Comput Math Methods Med.* 2013;2013:865980.

ANEXO III: CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

ESTUDIO DE VARIANTES ALÉLICAS EN LOS GENES KCNJ11 Y ABCC8 DEL CANAL DE POTASIO DEPENDIENTE DE ATP, EN PACIENTES DIABÉTICOS QUE RECIBEN TRATAMIENTO CON SULFONILUREAS

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

SEDE DONDE SE REALIZARA EL ESTUDIO. Centro de Salud T-III Portales, Secretaría de Salud del D.F.

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 20 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 04455 45 32 42 05.

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 repercuta 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

ANEXO IV: APROVACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN FMUNAM



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA
OFICIO NO. FMEDI/CI/JMOI/079/2012

ASUNTO:	DICTAMEN DEL PROYECTO 041/2012
---------	--------------------------------

DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS
Profesor Titular "A" TC
Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Presente

Estimado Dr. Molina Guarneros:

Me complace informarle que su proyecto número 041-2012 "Estudio de variantes alélicas en los genes KCNJ11Y ABCC8 del canal de potasio dependiente de ATP, en pacientes diabéticos que reciben tratamiento con sulfonilureas" ha sido APROBADO por las Comisiones de Investigación y Ética de esta Facultad de Medicina, en su sesión ordinaria de fecha 02 de octubre de 2012, con vigencia de 3 años a partir de la fecha de aprobación.

Para conocer el seguimiento de esta investigación, es necesario que entregue un informe anual, en la División de Investigación, tomando en cuenta esta fecha de elaboración del dictamen.

Asimismo, le solicitamos atentamente nos envíe una copia del o los artículos y/o copia de la carátula y resumen de las tesis que pudieran generarse relacionadas con el proyecto.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de octubre de 2012.

EL SECRETARIO TÉCNICO

DR. JAIME MAS OLIVA



ANEXO V: PRÓRROGA DE VIGENCIA DEL PROYECTO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN

OFICIO NO. FMED/DI/SPLR/ 379/2015

ASUNTO: Vigencia de proyecto.

Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

Profesor Titular "B" TC
Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina - UNAM
Presente.

Estimado doctor Molina Guarneros:

Por este conducto me permito comunicarle que su proyecto 041-2012 titulado "Estudio de variantes alélicas en los genes KCNJ11 y ABCC8 del canal de potasio dependiente de ATP en pacientes diabéticos que reciben tratamiento con sulfonilureas de segunda generación, biguanidas o ambas" con fecha de aprobación del 2 de octubre de 2012, permanecerá vigente del 3 de octubre de 2015 hasta el 2 de octubre de 2016, con el fin de reunir el número de muestras propuestas para validar los datos estadísticamente.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 1º de octubre de 2015

EL JEFE DE LA DIVISIÓN

DR. SAMUEL PONCE DE LEÓN ROSALES

*SPLR/SCM/hap.

