



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE VARIANTES EN GENES DE LAS FAMILIAS SLC EN LA
FARMACOCINÉTICA DE LA METFORMINA EN PACIENTES MEXICANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. MORALES RIVERA MONSERRAT IVONNE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/684/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de junio de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **MORALES RIVERA MONSERRAT IVONNE** con número de cuenta **406051325** con la tesis titulada **“EFECTO DE VARIANTES EN GENES DE LAS FAMILIAS SLC EN LA FARMACOCINÉTICA DE LA METFORMINA EN PACIENTES MEXICANOS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. LUZ MARÍA TORRES ESPÍNDOLA
Vocal: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Vocal: DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ
Vocal: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
Secretario: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 04 de agosto de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México quienes brindaron la estructura académica y administrativa para la realización de la presente tesis

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología por la manutención otorgada con la beca 288447.

Al Comité Tutorial dirigido por la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco, y conformado por la Dra. Marisol López López y el Dr. Rafael Camacho Carranza quienes brindaron siempre retroalimentación y atención durante el desarrollo del proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi familia, mis padres y mi hermano.

A mis amigos y acompañantes, especialmente a Mirna y a Carlos Julio.

Por el Instituto Nacional de Medicina Genómica a la Dra. Lorena Orozco, al Dr. Francisco Barajas, a la Dra. Angélica Martínez, al Dr. Humberto García, a la M. en C. Elaheh Mirzaeicheshmeh, al Dr. Federico Centeno, a la Dra. Cecilia Contreras, a la Dra. Elvia Mendoza, a la Lic. Isabel Cicerón, a la Dra. Adriana Reséndiz, al Ing. Juan Jiménez y al Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas.

Por el Instituto Nacional de Pediatría al Dr. Radamés Alemón, a la Dra. Gabriela Pérez, a la Bióloga Josefina Gómez, a la Dra. Nelly Altamirano y a la Q.F.B. Raquel García.

A todas las personas que sumaron al proyecto a través de sus ideas, propuestas y correcciones.

DEDICATORIA

A la infancia mexicana

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Fisiopatología de la obesidad y la diabetes	5
Abordaje terapéutico de la obesidad y la DT2	9
ANTECEDENTES	10
Acidosis Láctica	11
Farmacocinética de la metformina	12
Farmacogenética de la metformina.....	14
Farmacogenética de la metformina en población latina	17
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
METODOLOGÍA.....	22
Estrategia general	22
Tipo de estudio	22
Lugar de estudio	22
Población de estudio.....	24
Tamaño de la muestra	24
Variables de estudio.....	24
Consideraciones éticas	25
Criterios de inclusión.....	25
Criterios de exclusión.....	25
Criterios de eliminación.....	26
Abordaje de gen candidato	26
Extracción de ADN, genotipificación y secuenciación.....	26

Cuantificación de metformina.....	26
Determinaciones de lactato.....	27
Ensayos de funcionalidad <i>in silico</i>	27
Ensayo de dinámica molecular	27
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS.....	29
Análisis de asociación a descontrol glucémico	32
Selección de variantes con alta frecuencia en la población mexicana.....	32
Análisis de distribución de frecuencia en población amerindia.	36
Análisis de asociación a farmacocinética.....	36
Análisis de asociación a hiperlactatemia.....	40
Análisis de dinámica molecular	40
Identificación de fenotipos extremos	43
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO: ARTÍCULO DE REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DE GRADO.....	66

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Señalización de insulina y captación de glucosa.	7
Tabla 1. Principales grupos de fármacos para el tratamiento de diabetes.	9
Figura 2. Mecanismos de acción de la metformina.	11
Figura 3. Transportadores involucrados en la farmacocinética de la metformina..	13
Tabla 2. Variantes de un solo nucleótido (SNVs) asociadas a alteraciones de la PK, la función del transportador o la respuesta de la metformina en diversas poblaciones	15
Figura 4. Diagrama de la estrategia general del proyecto.	23
Tabla 3. Características generales de las poblaciones MEZ, AM y PED	30
Tabla 4. Características de la población MEZ tratada con metformina estratificada por control /descontrol glucémico	31
Figura 5. Análisis realizado en la plataforma Human Splicing Finder.....	33
Tabla 5. SNVs con MAF \geq 1% en los transportadores de metformina.	34
Figura 6. Distribución mundial de la variante L125F MATE1 (rs77474263C> T). .	37
Figura 7. Curva de metformina plasmática en 24 horas en población pediátrica, de acuerdo al genotipo rs622591 C>T de OCT1 (SLC22A1).....	38
Figura 8. Curva de metformina plasmática en 24 horas en población pediátrica, de acuerdo al genotipo rs77474263 C>T MATE1 (L125F).....	38
Figura 9. Curva de metformina plasmática en 24 horas en población pediátrica, de acuerdo al genotipo rs117483482 G>A MATE2-K (SLC47A2).....	39
Figura 10. Lactatemia en pacientes pediátricos antes y después de la toma oral de metformina de acuerdo al genotipo rs77474263 C>T.	41
Figura 11. Representación de la interacción con el residuo 125 (rojo) y los aminoácidos vecinos Trp256 (azul) y Leu260 (amarillo) en la región transmembranal de MATE1.	42
Figura 12. Caracterización <i>in silico</i> de la permeación de aguas del transportador MATE1	42
Figura 13. Distribución de la concentración plasmática de metformina en 24 h de la población pediátrica.	44

Tabla 6. Características de pacientes con fenotipo farmacocinético extremo. 45

Figura 14. Identificación por secuenciación de Exoma de variante P59S en el gen *GCK* asociada a fenotipo MODY en paciente femenina..... 46

Figura 15. Identificación por secuenciación Sanger de variante P59S en el gen *GCK* asociada a fenotipo MODY en paciente masculino. 46

LISTA DE ABREVIATURAS

Acarreadores de Solutos	SLCs
Acidosis Láctica Asociada a Metformina o <i>Metformin Associated Lactic Acidosis</i>	MALA
Adenina Monofosfato	AMP
Adenina Trifosfato	ATP
Administración Distribución Metabolismo y Excreción Africana	ADME AFR
Amerindios	AM
Área Bajo la Curva	ABC
Asia Oriental	EAS
Cinasa 3 de Fosfatidilinositol o <i>Phosphatidylinositol 3 Kinase</i>	PI3K
Concentración Máxima	Cmax
Diabetes Juvenil de Inicio en la Madurez o <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>	MODY
Diabetes Tipo 2	DT2
Dinámica Molecular	DM
Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	ENSANUT
Enhancer de Splicing Exónico	ESE
Equilibrio de Hardy-Weinberg	HWE
Estudio Amplio del Genoma o <i>Genome-Wide Association Study</i>	GWAS
Europea	EUR
Factor de Crecimiento Tipo Insulina 2 o <i>Insulin-Like Grow Factor 2</i>	IGF2
Factor Nuclear Hepático 1 alfa o <i>Hepatic Nuclear Factor 1 alpha</i>	HNF1A
Farmacocinética o <i>Pharmacokinetics</i>	PK
Glicerofosfato Deshidrogenasa mitocondrial	mGPD
Hélice Transmembranal	TM
Hemoglobina Glucosilada	HbA1c
<i>Human Splicing Finder</i>	HSF
Índice de Masa Corporal	IMC
Instituto Nacional de Medicina Genómica	INMEGEN
Instituto Nacional de Pediatría	INP
Latinoamericana	LAT
Lipoproteína de Alta Densidad o <i>High Density Lipoprotein</i>	HDL
Maya	MAY

Mestizos	MEZ
Náhuatl	NAH
Nicotinamida Adenina Dinucleótido o <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>	NADH
Número Molecular, Temperatura Y Presión	NPT
Otomí	OTO
Protein Cinasa Activada o <i>AMP-Activated Protein Kinase</i>	AMPK
Proteínas de Eflujo de Multifármacos y Toxinas o <i>Multidrug and Toxin Extrusion Proteins</i>	MATE
Receptor de Peroxisoma Proliferador Activado Gamma o <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>	PPAR γ
Resistencia a la Insulina	RI
Sustratos del Receptor de Insulina o <i>Insulin Receptor Substrate</i>	IRS
Tarahumara	TAR
Tasa de Filtración Glomerular o <i>Estimated Glomerular Filtration Rate</i>	eGFR
Tensión Arterial Diastólica	TAD
Tensión Arterial Sistólica	TAS
Transportador de Glucosa o <i>Glucose Transporter</i>	GLUT
Transportador de Monoaminas de Membrana Plasmática	PMAT
Transportador de Tiamina 2 o <i>Thiamine Transporter</i>	THTR-2
Transportador Orgánico de Cationes/Carnitina 1 o <i>Carnitine/Organic Cation Transporter</i>	OCTN1
Transportadores de Cationes Orgánicos u <i>Organic Cation Transporters</i>	OCT
Enfermedad por coronavirus o <i>Coronavirus disease Type 2 Diabetes</i>	COVID
<i>Variant Effect Predictor</i>	T2D
Variante de un Solo Nucleótido o <i>Single Nucleotide Variants</i>	VEP
<i>Visual Molecular Dynamics</i>	SNVs
Zapoteca	VMD
	ZAP

RESUMEN

Introducción: La obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2) constituyen problemas de salud pública que condicionan al desarrollo de otros padecimientos, y son causas principales de mortalidad. En la actualidad, México se sitúa dentro de los primeros lugares de prevalencia de ambas enfermedades. El fármaco de primera elección para el tratamiento de DT2 es la metformina, su principal mecanismo de acción es la inhibición de la gluconeogénesis y de la lipogénesis, mientras que su farmacocinética es facilitada por transportadores de la superfamilia de acarreadores de solutos.

Justificación: A la fecha, se ha documentado la variabilidad interindividual en la farmacocinética de la metformina en población mexicana, sin embargo, el abordaje farmacogenético ha sido escasamente descrito. Entender la contribución de los factores genéticos a la farmacocinética y respuesta a la metformina, permitirá el avance de la medicina de precisión en DT2.

Objetivo: Identificar las variantes en genes involucrados en el transporte de la metformina, que se encuentran asociadas a la farmacocinética y la respuesta al tratamiento en pacientes mexicanos.

Material y métodos: La población adulta constó de 968 adultos mestizos mexicanos no relacionados, que forman parte del repositorio gnomAD, en quienes se identificaron las variantes de un solo nucleótido (SNVs) con al menos 1% de frecuencia, en los genes *OCT1 (SLC22A1)*, *OCT2 (SLC22A2)*, *OCT3 (SLC22A3)*, *PMAT (SLC29A4)*, *MATE1 (SLC47A1)* y *MATE2-K (SLC47A2)*. Se llevó a cabo un estudio de asociación a descontrol glucémico en aquellos individuos tratados con metformina. La distribución y frecuencia de las variantes asociadas se analizó en 452 individuos de etnias indígenas de México. Los perfiles farmacocinéticos se evaluaron en 30 niños y adolescentes diagnosticados con DT2 u obesidad tratados con metformina. La respuesta al tratamiento se definió con base al control glucémico, de acuerdo al porcentaje de hemoglobina glucosilada (%HbA1c). Aunado a esto, se evaluaron los niveles séricos de lactato y se correlacionaron con la farmacocinética de la metformina. El ADN se extrajo de sangre periférica y se

genotipificó por la técnica de TaqMan. La concentración del fármaco se obtuvo a partir de sangre obtenida de punciones dactilares en distintos tiempos. La extracción del fármaco se realizó por cromatografía líquida de ultra-alto desempeño y su cuantificación se llevó a cabo por espectrometría de masas. El análisis de asociación genética se realizó por modelo de regresión generalizado. La implicación de las variantes asociadas sobre la función de los transportadores se evaluó *in silico* a través de las plataformas Variant Effect Predictor (VEP), Human Splicing Finder (HSF) y los softwares CHARMM y NAMD.

Resultados: Se encontraron 37 variantes con al menos 1% de frecuencia en los genes *OCT1*, *OCT2*, *OCT3*, *PMAT*, *MATE1* y *MATE2-K*. El análisis de asociación mostró a las SNVs rs622591/C de *OCT1* y rs117483482/A de *MATE2-K* involucradas en el descontrol glucémico. Los portadores homocigotos (CC) de la SNV intrónica rs622591 mostraron una disminución de la concentración plasmática de metformina en dos horas. Por su parte, de acuerdo al ensayo *in silico* en HSF, la SNV rs117483482 se ubica en un sitio de “enhancer de splicing”. Finalmente, el cambio no sinónimo L125F de *MATE1* resultó enriquecido en la población mexicana y se asoció al incremento en la concentración máxima (C_{max}), de forma aditiva. El análisis de la función *in silico* mostró que esta variante altera las interacciones entre aminoácidos vecinos y la permeabilidad del transportador.

Conclusiones: La representación de poblaciones latinas en los estudios de farmacogenómica de las enfermedades metabólicas resulta fundamental para comprender cómo los individuos con ancestría amerindia responden a terapias farmacológicas como la metformina. Este hecho impacta directamente en la salud pública dada la susceptibilidad que estas poblaciones tienen de desarrollar enfermedades metabólicas, y de las diversas aplicaciones terapéuticas que tiene el fármaco. Asimismo, incluir a la farmacocinética como el vínculo entre la genómica y la respuesta a la metformina, puede enriquecer a la medicina de precisión al refinar los algoritmos de tratamiento a través de los ajustes de dosis, el monitoreo de los efectos adversos en individuos susceptibles o incluso la sustitución por alternativas terapéuticas más efectivas.

ABSTRACT

Introduction. Obesity and type 2 diabetes (T2D) are public health problems that predispose to other comorbidities and are main causes of mortality. Nowadays, Mexico is among the first places of prevalence of both conditions. The first choice drug for T2D treatment is metformin, its main mechanism of action is gluconeogenesis and lipogenesis inhibition, while its pharmacokinetics (PK) is facilitated by solute carrier superfamily transporters.

Background. To date, metformin PKs interindividual variability has been documented in Mexican population, however, pharmacogenetics approach has been scarcely described. To understand genetic factors contribution to PK and metformin response allows precision medicine advance on T2D.

Objective. To identify variants in genes involved on metformin transport that are associated to PK and metformin response in Mexican patients.

Material and methods. The adult population consisted on 968 non-related Mexican mestizos, that also belong to gnomAD repository, in whom SNVs (Single Nucleotide Variants) with a distribution of at least 1% in *OCT1 (SLC22A1)*, *OCT2 (SLC22A2)*, *OCT3 (SLC22A3)*, *PMAT (SLC29A4)*, *MATE1 (SLC47A1)* y *MATE2-K (SLC47A2)* genes, were selected. An association study was carried out in those individuals under metformin treatment. Associated variants distribution was analyzed in an indigenous sample of 452 individuals of the most representative Mexican Amerindian groups. PK profiles were evaluated in 30 children and adolescents diagnosed with T2D or obesity and treated with metformin. Metformin response was defined by glycemic control, according to glycosylated hemoglobin (%HbA1c). In addition, serum lactate levels were correlated with metformin PK. DNA was extracted from peripheral blood and genotyped by TaqMan assay. PK was performed from blood sampling by dactylar puncture. Metformin determination was carried out by ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Genetic association to PK and glycemic control was analyzed by regression model. Impact of associated variants on transporter function was evaluated *in silico* by Variant

Effect Predictor (VEP) and Human Splicing Finder (HSF) platforms, as well as CHARMM and NAMD softwares.

Results. A total of 37 SNVs with at least 1% of frequency were found on *OCT1*, *OCT2*, *OCT3*, *PMAT*, *MATE1* and *MATE2-K* genes. Association analysis showed that rs622591/C of *OCT1* and rs117483482/A of *MATE2-K* were involved on uncontrolled T2D. Homozygous carriers (CC) of intronic SNV rs622591 showed a diminished metformin plasmatic concentration at 2 hours of its administration. On the other hand, according to an *in silico* assay in HSF, the rs117483482 SNV is located at an exonic splicing enhancer region of *MATE2-K*. Finally, the non-synonymous change L125F of *MATE1*, resulted enriched in Mexican population while in the PK analysis, it was associated to metformin maximum concentration (C_{max}) increase in an additive manner. The functional analysis *in silico* showed that this variant alters interactions between neighboring amino acids and transporter permeability.

Conclusions. Latin populations inclusion in pharmacogenomics studies of metabolic diseases, is essential to understand how individuals of Amerindian ancestry respond to pharmacological therapies like metformin. This fact impacts directly on public health given the susceptibility of these populations to develop metabolic diseases, and also because of the several therapeutic applications that has been reported for this drug. Furthermore, including PK as the link between genomics and metformin response can enrich precision medicine by refining treatment algorithms through dose adjustments, monitoring of adverse effects in susceptible individuals or even replacement by more effective therapeutic alternatives.

INTRODUCCIÓN

La obesidad y la diabetes constituyen patologías de salud pública, cuya prevalencia global continúa en aumento, al igual que el riesgo de sus comorbilidades. Se estima que el 80% de las personas con DT2 viven en países de ingresos bajos a medios¹. En 2018, en México se alcanzaron máximos históricos en la prevalencia de estas enfermedades en población adulta e infantil. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2018, tres cuartas partes de la población mayor de 20 años y más del 35% de la población de entre 5 y 19 años padece sobrepeso u obesidad². La ENSANUT del 2018 identificó que el 10.3% de la población mexicana adulta ya contaba con un diagnóstico de DT2, sin embargo, aún falta por adicionar a este dato, aquellos que aún no han sido diagnosticados con esta enfermedad. De acuerdo al reporte 2019 de la Federación Internacional de Diabetes, México se encuentra dentro de los primeros diez lugares de países con diabetes sin diagnosticar³.

Fisiopatología de la obesidad y la diabetes

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud⁴, debido a que condiciona al desarrollo de otras enfermedades crónicas no transmisibles como la DT2. Por su parte, la diabetes se caracteriza por la alteración en la secreción de la hormona insulina por las células β -pancreáticas, la resistencia a esta hormona, o una combinación de ambos signos⁵. Ambas enfermedades son de etiología multifactorial por lo que el componente genético aunado a un ambiente obesogénico, condicionan a su desarrollo. De hecho, generalmente la DT2 es precedida por un estado de sobrepeso (Índice de masa corporal, $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$), así como de prediabetes ($HbA1c \text{ } 5.7 \text{ a } < 6.5\%$)⁶. La falta de actividad física también aumenta el estrés sobre las células β -pancreáticas, llevando a una disminución progresiva en la secreción de insulina. Así, la resistencia a la insulina (RI) se establece en varios órganos simultáneamente, siendo de los más afectados el hígado y el músculo⁵. En condiciones fisiológicas la unión de la insulina a su receptor activa a la tirosin cinasa del receptor de insulina y a la familia de sustratos del receptor de insulina,

particularmente a IRS1 e IRS2 (por sus siglas en inglés *Insulin Receptor Substrate*) (Fig. 1). A su vez, estas proteínas activan moléculas de señalización intracelular entre las que se encuentran la cinasa 3 de fosfatidilinositol (PI3K por sus siglas en inglés *Phosphatidylinositol 3 Kinase*). La PI3K promueve la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 (por sus siglas en inglés *Glucose Transporter 4*) a la membrana, lo que resulta en la captación de glucosa en el músculo esquelético. En condiciones patológicas, particularmente obesidad y diabetes, la vía PI3K ha sido comúnmente asociada a RI. Se ha descrito que el incremento en la fosforilación de serina en las proteínas IRS inhibe la fosforilación de tirosina, esto promueve la degradación proteasomal de la proteína⁷, y se favorece la RI⁵. Las causas por las que existe un incremento en la fosforilación de serina incluyen acumulación de lípidos, disfunción mitocondrial e inflamación⁵. De hecho, se ha documentado que la acumulación lipídica, específicamente de colesterol, también puede alterar la translocación de GLUT4⁸. Esto debido a que el exceso de colesterol en la membrana plasmática causa disrupción de los filamentos de actina, esenciales para la translocación de GLUT4⁸. En condiciones fisiológicas la vía encargada de regular este mecanismo es conocida como dependiente de AMPK (por sus siglas en inglés *AMP-Activated Protein Kinase*). La enzima AMPK se encarga de inhibir la síntesis de lípidos, por lo que es elemental para mantener la adecuada captación de glucosa y evitar el estado de RI.

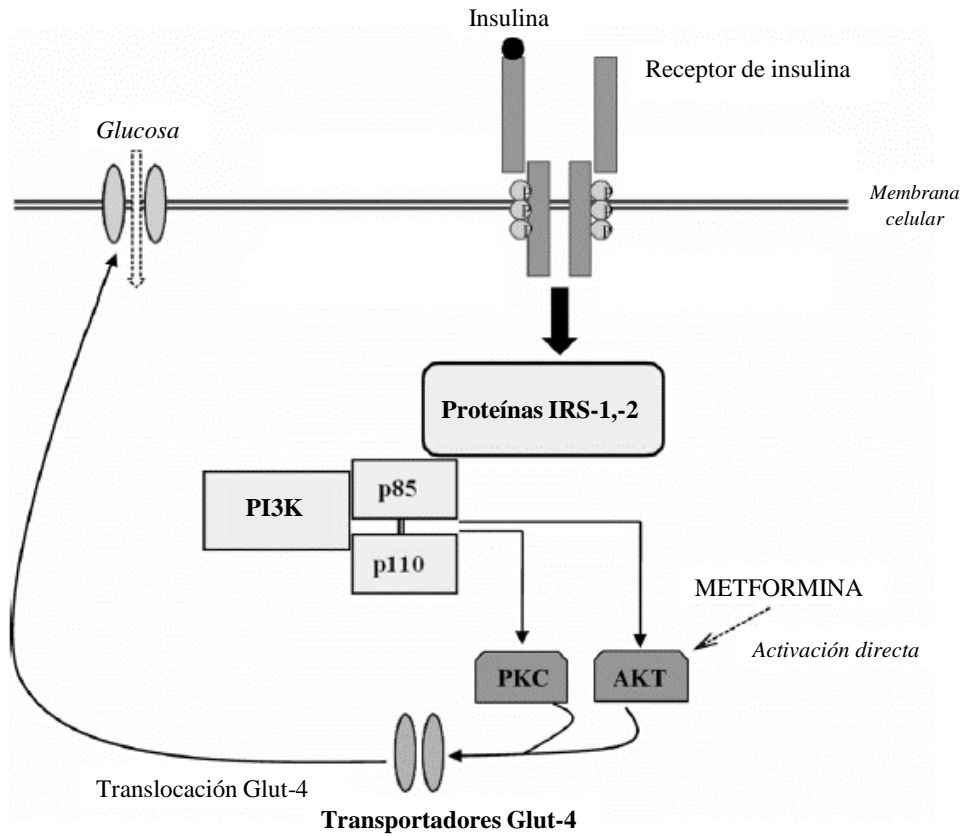


Figura 1. Señalización de insulina y captación de glucosa. Modificada de Rice S. 2011⁹.

Por otra parte, a través del análisis de los factores genéticos que influyen en el desarrollo de la patología metabólica, se ha logrado estimar que la heredabilidad del sobrepeso y la obesidad varía entre el 30 y el 70%, muy similar a la reportada para DT2, sin embargo, aunque las variantes genéticas incrementan el riesgo a padecer estas patologías, estas sólo explican entre el 10 y el 20% de su etiología^{1,5,10}. Asimismo, se ha demostrado que la ancestría también juega un papel importante en la predisposición a padecer diabetes y obesidad. De hecho, se ha descrito que la ancestría amerindia y africana confiere una mayor predisposición a padecer este tipo de patologías, y su inclusión en los estudios de asociación ha permitido explicar la alta tasa de incidencia de estas enfermedades en poblaciones latinas¹¹⁻¹³. Así, estudios amplios del genoma (GWAS por sus siglas en inglés *Genome-Wide Association Study*) han revelado variantes propias de la población de origen amerindio, fuertemente asociadas a diabetes. En un reporte del 2014, se identificó un haplotipo en el gen *SLC16A11* que codifica para el transportador de monocarboxilatos MCT11, el cual tiene una frecuencia del 30% en mexicanos e incrementa el riesgo a desarrollar DT2 en un 25% por cada copia del alelo de riesgo¹⁴. En ensayos funcionales se ha descrito que variantes de este haplotipo disminuyen la expresión del transportador en hígado, alterando el metabolismo de ácidos grasos y lípidos¹⁵. Adicionalmente, se logró la identificación de una variante propia de la población mexicana (rs483353044), no sinónima (E508K) que se localiza en el gen *HNF1A* (del inglés *Hepatic Nuclear Factor 1 alpha*), previamente descrito como responsable de diabetes juvenil de inicio en la madurez, MODY3 (por sus siglas Maturity Onset Diabetes of the Young)¹⁶. Notablemente, E508K se asoció con DT2, presentando uno de los ORs más elevados (5.48) descritos hasta la fecha para una enfermedad metabólica de origen multifactorial. Aún más, el análisis del exoma también ha puesto en evidencia variantes de protección para DT2, como la SNV de pérdida de función rs149483638 en el gen del Factor de crecimiento tipo Insulina 2, (*IGF2* por sus siglas *Insulin-like Grow Factor*), la cual se asoció con una reducción del 20% para el riesgo de DT2¹⁷. Los estudios *in vitro* mostraron que la variante reduce la expresión de la isoforma 2 de *IGF2* en hígado y tejido adiposo, revelando un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de diabetes. Cabe hacer

énfasis que todas estas variantes han resultado con una alta frecuencia en población mexicana, pero son raras o se encuentran ausentes en otras poblaciones¹².

Abordaje terapéutico de la obesidad y la DT2

El abordaje terapéutico de las enfermedades crónico degenerativas inicia con intervenciones en el estilo de vida, tales como incremento en la actividad física y ajustes dietarios. Sin embargo, cuando el estadio de la enfermedad es avanzado, se requieren de abordajes robustos que pueden ir desde tratamiento farmacológico hasta intervenciones quirúrgicas. Los principales grupos farmacológicos para el tratamiento de la hiperglucemia son las biguanidas, las sulfonilureas, los agonistas del Receptor de peroxisoma proliferador activado gamma (PPAR γ por sus siglas en inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) y los inhibidores de la α -glucosidasa¹⁸. En la tabla 1 se resumen el mecanismo de acción y los ejemplos de estos grupos.

Tabla 1. Principales grupos de fármacos para el tratamiento de diabetes.

Grupo farmacológico	Mecanismo	Ejemplos
Biguanidas	Reducen la producción hepática de glucosa a través de la supresión de la gluconeogénesis y la activación de la glucólisis.	Fenformina ^a Buformina ^a Metformina
Sulfonilureas	Incrementan la secreción de insulina en el páncreas por unión al receptor de sulfonilureas en el canal de potasio sensible a ATP de las células β .	Glibenclamida Glimepirida Glipizida
Agonistas de PPAR γ	Incrementan la sensibilidad de las células a la insulina. Disminuyen la síntesis de ácidos grasos y su captación.	Pioglitazona Rosiglitazona Ciglitazona
Inhibidores de la α -glucosidasa	Retrasan el proceso de absorción de los carbohidratos en el tracto gastrointestinal a través de inhibición competitiva de la enzima glucosidasa.	Acarbosa Migitol Voglibosa

^a En desuso por incremento de riesgo a acidosis láctica.

ANTECEDENTES

En México se calcula que de las personas diagnosticadas con DT2, un 67.1 % utiliza fármacos de administración oral² y el 8.8 % lo hace en combinación con insulina¹⁹. Actualmente diversas guías de tratamiento, así como la regulación mexicana, establecen como fármaco de primera elección la monoterapia con metformina²⁰. La metformina es un derivado de la galegina, extracto inicialmente obtenido de la planta *Gallega officinalis*²¹. Este fármaco pertenece al grupo de las biguanidas y es utilizado desde hace más de 60 años para la DT2, debido a sus ventajas sobre otras terapias farmacológicas. Entre estas ventajas se encuentra que su presentación farmacéutica comercial es oral, de costo accesible y el riesgo de producir hipoglucemia es bajo^{22,23}. Adicionalmente, la metformina reduce el riesgo de desarrollar comorbilidades asociadas al sobrepeso y a la resistencia a la insulina. La metformina también es utilizada en otras patologías como el síndrome de ovario poliquístico^{24,25}, se sabe que es segura y eficaz en diabetes gestacional^{25,26} y se utiliza para prevenir ciertos tipos de cáncer²⁷⁻²⁹. La metformina se absorbe principalmente a nivel de intestino delgado, su biodisponibilidad es de alrededor del 55 ± 16 % y se estima que entre el 20-30 % del fármaco se excreta sin ser absorbido²¹.

Esta amplia gama de utilidades clínicas puede explicarse a través de los efectos pleiotrópicos derivados de sus mecanismos de acción. Los estudios *in vitro* señalan que la inhibición por metformina del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, aumenta la relación adenina monofosfato - adenina trifosfato (AMP: ATP)^{28,30-32} (Fig. 2). En el hígado, esto resulta en la activación de la cinasa AMPK que incide sobre diversas vías, como en la regulación negativa de la gluconeogénesis, acción directamente correlacionada con el efecto antihiper glucemiante de la metformina³¹. Más recientemente, en modelos *in vivo* se ha demostrado que la metformina inhibe una enzima mitocondrial llamada glicerofosfato deshidrogenasa (mGPD). En condiciones fisiológicas, mGDP ayuda a que la lanzadera de glicerofosfato ingrese equivalentes reducidos (NADH por sus siglas en inglés *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) del citoplasma a la mitocondria (Fig. 2). Como consecuencia de la inhibición de mGDP por metformina, hay un

aumento de NADH citosólico que suprime la gluconeogénesis por alteración del estado redox, y por otro lado, favorece la producción de lactato, evento íntimamente relacionado con el efecto adverso letal de la metformina, la acidosis láctica^{33,34}.

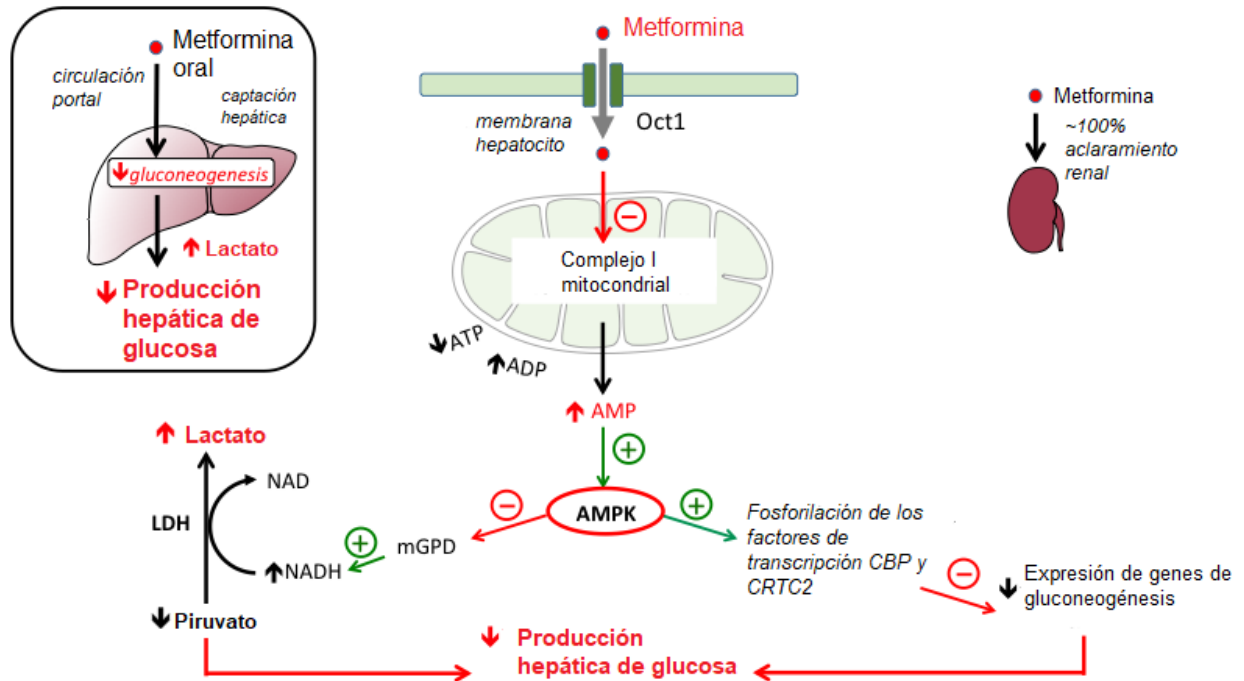


Figura 2. Mecanismos de acción de la metformina. Modificada de TMedWeb³⁵

Acidosis Láctica

La acidosis láctica asociada a metformina (MALA por sus siglas en inglés Metformin Associated Lactic Acidosis), es una condición que se relaciona con el uso crónico de metformina y que deriva en el desbalance de la producción de lactato y alteraciones en el pH sistémico³⁶. En México, no se conoce la incidencia de MALA ya que ésta ha sido principalmente documentada en reportes de casos^{23,37,38}. En otras poblaciones, su incidencia se ha descrito en un rango de 1.5 - 530 casos por 100,000 individuos³⁹⁻⁴¹, aunque la media se calcula en 10 casos por 100,000 individuos/año⁴². Si bien la incidencia de MALA no es elevada, el riesgo de mortalidad asociada llega a ser hasta del 50%⁴². A la fecha, aún es controversial si el lactato y el pH son indicadores de mortalidad adecuados en MALA³⁶. Diversos autores indican que existen otros factores de riesgo como insuficiencia hepática o renal, así como un estado de sepsis⁴³.

Farmacocinética de la metformina

La metformina es una base hidrofílica que a pH fisiológico requiere de difusión facilitada por transportadores para el ingreso y egreso de sus tejidos blanco. Estos transportadores son proteínas de membrana que pertenecen a la superfamilia de acarreadores de solutos (SLCs). La metformina es sustrato de los transportadores de cationes orgánicos 1, 2 y 3 (OCT por sus siglas en inglés *Organic Cation Transporters*), del Transportador de monoaminas de membrana plasmática (PMAT, por sus siglas en inglés *Plasma Monoamine Transporter*), y de las proteínas de eflujo de multifármacos y toxinas 1 y 2 (MATE por sus siglas en inglés *Multidrug and Toxin Extrusion*)^{21,44,45}. Algunos estudios, señalan a otros miembros de la familia SLC que podrían estar involucrados en su difusión, tal es el caso del Transportador orgánico de cationes/carnitina 1, (OCTN1 por sus siglas en inglés *Carnitine/organic cation transporter*)⁴⁶, y el Transportador de tiamina 2 THTR-2, (por sus siglas en inglés *Thiamine Transporter*)⁴⁷, sin embargo su participación en la farmacocinética de la metformina, ha sido escasamente reportada.

El proceso de absorción de metformina en los enterocitos es mediado en mayor proporción por PMAT (*SLC29A4*) y en menor por OCT3 (*SLC22A3*), mientras que su paso a circulación portal es llevado a cabo por OCT1 (*SLC22A1*)^{21,44,45}, (Fig. 3). A nivel hepático, OCT1 (*SLC22A1*) también media la incorporación de la metformina a la circulación sistémica. La principal vía de eliminación de metformina es a través del riñón, el fármaco ingresa a este órgano por medio del transportador OCT2 (*SLC22A2*), y los principales encargados de la excreción urinaria son MATE1 (*SLC47A1*) y MATE2-K (*SLC47A2*). Cabe señalar que la proteína MATE1 también se expresa en los conductos biliares, pero hasta el momento está en discusión si participa en el eflujo de la metformina en este sitio, aunque algunos autores así lo han referido⁴⁸.

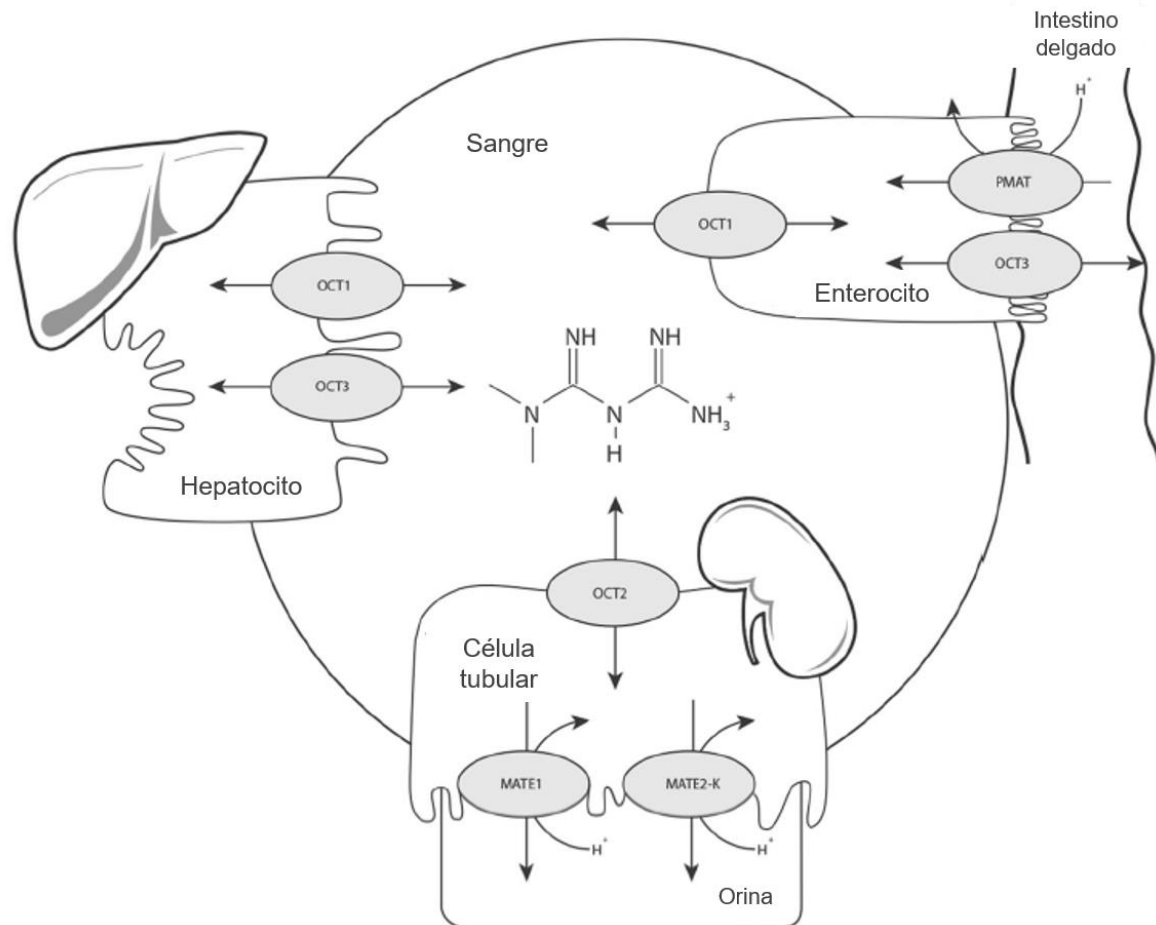


Figura 3. Transportadores involucrados en la farmacocinética de la metformina.
Modificada de Stage T. et al.⁴⁹

El proceso ADME (por sus siglas Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción) de la metformina también se ve influenciado por la participación de variables fisiológicas. En un estudio de farmacocinética poblacional en individuos mexicanos con diabetes, se identificó que los parámetros de masa corporal magra y aclaramiento de creatinina influyen significativamente en los perfiles farmacocinéticos⁵⁰. Recientemente, un estudio llevado a cabo en población china evaluó la contribución de la edad, el peso corporal, el IMC, la tasa de filtración glomerular (eGFR por sus siglas en inglés *Estimated Glomerular Filtration Rate*), así como de cuatro variantes genéticas: rs622342 de *OCT1 (SLC22A1)*, rs316019 de *OCT2 (SLC22A2)*, rs2289669 y rs2252281 de *MATE1 (SLC47A1)*, sobre la farmacocinética poblacional. Los resultados mostraron que la eGFR impacta significativamente a la PK de la metformina⁵¹. De esta forma la salud renal y, en particular el proceso de eliminación, juegan un rol determinante en el comportamiento farmacocinético de la metformina.

Farmacogenética de la metformina

A la fecha, se ha buscado identificar si variantes en los genes que codifican para estos transportadores participan en alteraciones de la PK de la metformina, en la función de los transportadores y en la respuesta o los efectos adversos del fármaco. En la tabla 2 se muestran las SNVs reproduciblemente asociadas a estos parámetros en distintas poblaciones.

Tabla 2. Variantes de un solo nucleótido (SNVs) asociadas a alteraciones de la PK, la función del transportador o la respuesta de la metformina en diversas poblaciones

GEN (Proteína)	Variante	Asociación a	Población de estudio	Referencia
SLC22A1 (OCT1)	rs12208357 (181C>T ó R61C)	PK, función del transportador, respuesta	EU, AS, BR, CEU	52-56
	rs34130495 (1201G>A ó G401S)		EU, CEU	52,54,55,57,58
	rs34059508 (1393G>A ó G465R)			
	rs628031 (1222A>G ó M408V)	Respuesta, efectos adversos	AS, EU	59-61
	rs622342 A>C Intrónica	Respuesta	EU, AFR	62,63
SLC22A2 (OCT2)	rs316019 (808G>T ó A270S)	PK, función del transportador	EU, AS,AA, CEU	55,64-70
SLC47A1 (MATE1)	rs2289669 (G>A Intrónica)	Respuesta	AS, EU	60,71-74
	rs8065082 (Intrónica C>T)		EU,	71,72
	rs2252281 (T>C promotor)	PK, función del transportador, respuesta	AA, CEU AS	69,75
	rs35395280 (G>T; C497S)	Función del transportador	AA, CEU, AS, ME	76
	rs77474263 (373 C>T ó L125F)			
SLC47A2 (MATE2- K)	rs12943590 (g-130G>A)	Función del transportador, Respuesta	AA, CEU	75,77

En un meta-análisis publicado en 2017 se analizaron 8 SNVs en los genes *OCT1* (*SLC22A1*), *OCT2* (*SLC22A2*), *OCTN1* (*SLC22A4*), *MATE1* (*SLC47A1*) y *MATE2-K* (*SLC47A2*) previamente asociadas a la respuesta a metformina en poblaciones europeas, sin embargo, ninguna de las variantes mostró asociación significativa. Entre las causales que se discuten para explicar este resultado se encuentran el tamaño de muestra, el posible tratamiento concomitante para otros padecimientos y, posiblemente, que los estudios considerados incluyen individuos con diversas ancestrías⁷⁸. Una de las SNVs estudiadas fue rs12208357 (R61C) en *OCT1* (*SLC22A1*), que se documentó asociada a falta de respuesta a la metformina en los individuos con presencia de cisteína en la posición 61 de la proteína OCT1 (*SLC22A1*)⁵⁷.

Tzvetkov y cols. en 2009 buscaron la correlación de esta variante con parámetros farmacocinéticos de eliminación renal de metformina en hombres sanos caucásicos⁵². Se encontró que R61C, en combinación con otras variantes del gen, incrementa el aclaramiento renal. Un análisis *in silico* donde se modeló la conformación tridimensional de la proteína, reveló que el efecto de R61C, ubicada en el dominio topológico extracelular, es la disminución de la afinidad de OCT1 (*SLC22A1*) al sustrato⁵⁵.

Otras variantes no sinónimas que han sido analizadas en *OCT1* (*SLC22A1*) son rs34130495 y rs34059508, sin embargo, su efecto en la PK de la metformina tiene una reproducibilidad menor⁵⁵⁻⁷⁹, probablemente por su escasa frecuencia. Por otra parte, la SNV intrónica rs622342 A>C de *OCT1* (*SLC22A1*) fue explorada en diversas poblaciones. En un estudio que incluyó 102 individuos de los Países Bajos, mostró que el alelo C de esta variante disminuye 0.28% el valor de hemoglobina glucosilada⁶². Diez años después, en un estudio en el que clasificaron a 127 egipcios adultos diabéticos como respondedores (HbA1c<7%) o no respondedores (HbA1c≥7%), se documentó que los homocigotos para la SNV ancestral (AA) de esta misma variante, fueron 2.7 veces más responsivos al tratamiento combinado con metformina y glimepirida⁶³. En el 2020, dos estudios, uno en población china y otro en población libanesa, buscaron la asociación de rs622342 a PK y respuesta a

metformina, respectivamente. El estudio de la PK en población asiática no mostró asociación significativa de la variante con el aclaramiento renal de la metformina⁵¹. Sin embargo, cuando se analizó la interacción de esta SNV con otras dos variantes: CYP2C9*2 y CYP2C9*3 en población libanesa, se observó una disminución de los niveles de HbA1c en pacientes diabéticos en tratamiento combinado de metformina y sulfonilurea, tanto a los 3 como a los 6 meses de tratamiento⁵².

Por otro lado, en el gen *OCT2 (SLC22A2)* la SNV rs316019 ha sido de las variantes más estudiadas. Los principales hallazgos correlacionan a esta variante con alteración de la eliminación del fármaco⁶⁸ y como posiblemente dañina en predicciones *in silico*^{55,70}, sin embargo, aún existen resultados controversiales sobre su participación en la respuesta a la metformina^{51,54,79,80}

Otro de los transportadores comúnmente abordados para su estudio farmacogenético es *MATE1 (SLC47A1)*. La variante intrónica rs2289669 ha sido ampliamente asociada a reducción de los niveles de HbA1c en pacientes tratados con metformina⁷¹⁻⁷⁴. Controversialmente, esta variante en haplotipo con rs8065082 se ha asociado a una pobre respuesta al fármaco⁸⁰. Por otro lado, rs2252281, una SNV ubicada en región promotora del gen, se ha correlacionado con una menor área bajo la curva de glucosa (ABC), en individuos adultos sanos tratados con metformina⁷⁵.

Farmacogenética de la metformina en población latina

A la fecha la relación entre las variantes en genes *SLC* y la PK de la metformina ha sido escasamente estudiada en población latina. En 2009 y 2011 se analizaron los genes *MATE1 (SLC47A1)*⁷⁶ y *MATE2-K (SLC47A2)*⁷⁷ de 272 individuos, de los cuáles 68 fueron mexico-americanos. Interesantemente, una de seis variantes no sinónimas (L125F) identificadas en el gen *MATE1*, se encontró presente en el 5.1% de los mexico-americanos y casi ausente en otras poblaciones. Un análisis *in vitro* mostró que la variante L125F reduce el transporte de la metformina⁷⁶. Posteriormente, un estudio realizado en un modelo de ratón *knockout* para *MATE1*, reveló acumulación plasmática de metformina y de lactato⁸¹. En dicho estudio se sugirió que tal comportamiento podría ser reproducible en homocigotos humanos

con la variante L125F, y con otras variantes de *MATE1* (G64D) y de *MATE2-K* (G211V). Para comprobar esta hipótesis, los mismos autores midieron niveles de metformina en plasma durante 9 horas en 48 individuos japoneses, sin embargo, la ausencia de homocigotos limitó comprobar si la presencia de los SNVs de riesgo incrementaban la concentración plasmática de metformina y de lactato en humanos⁴⁸.

Para el caso de *MATE2-K* (*SLC47A2*), además de la región codificante, se analizó la región promotora del gen⁷⁷. De un total de 23 variantes, cuatro resultaron ser no sinónimas, cuatro se encontraron en la región basal del promotor y seis fueron de carácter intrónico. De éstas, únicamente cuatro se encontraron con una frecuencia de más del 1% en los 68 mexico-americanos analizados: g.-130G>A (rs12943590), rs9900497, rs35263947 y rs12942065. De hecho, el análisis de asociación a respuesta a metformina únicamente fue llevado a cabo en población caucásica y afroamericana, por ser las poblaciones en quienes las variantes se encontraban mayormente representadas. El análisis arrojó que la variante g.-130G>A en región promotora, se asocia de forma recesiva a una menor respuesta del fármaco. Por otro lado, se llevó a cabo la modelación de la estructura de *MATE2-K* (*SLC47A2*) para evaluar el efecto de las variantes no sinónimas, el cual mostró que la variante P162L, localizada en la hélice transmembranal cuatro (TM4), altera la estructura de *MATE2-K* (*SLC47A2*) y su interacción con el ligando⁷⁷.

En el 2014, Yang P. y colaboradores analizaron variantes previamente reportadas como asociadas a respuesta de metformina en 103 pacientes diabéticos residentes de Argentina⁸². El estudio consistió en la identificación de las variantes R61C (rs12208357), P341L (rs2282143), M420del (rs35191146), G401S (rs34130495) y G465R (rs34059508) del gen *OCT1* (*SLC22A1*). Los parámetros bioquímicos evaluados fueron glucemia, niveles sanguíneos de HbA1c, función hepática y renal, así como el perfil lipídico. Los pacientes portadores de los alelos M420del y G465R presentaron niveles significativamente más elevados de HbA1c ($p=0.0273$ y $p=0,0018$, respectivamente), por lo que se consideraron no respondedores al tratamiento con metformina.

Uno de los análisis más extensos, en cuanto a número de genes y variantes analizadas, realizado en población latinoamericana, fue el llevado a cabo por Santoro A. y colaboradores en el 2018⁵⁶. En este estudio se evaluó la asociación de variantes previamente reportadas en la literatura con la PK de metformina en individuos sanos mestizos de Brasil. La metodología utilizada fue la de fenotipo discordante extremo⁸³, en la que se comparan grupos con fenotipos opuestos de acuerdo a una misma variable. Así, construyeron un histograma de ABC_{0-48h} para comparar a los individuos de las percentilas 20 de los extremos. En total se analizaron 106 individuos en quienes se genotiparon 11 variantes en los genes *OCT1 (SLC22A1)*, *OCT2 (SLC22A2)*, *MATE1*, *MATE2-K (SLC47A2)* y *SP1*. A diferencia de lo previamente reportado en europeos, el análisis de asociación ajustado por ancestría y superficie de área corporal mostró que, en población brasileña, la variante R61C (rs12208357) se asocia significativamente con menor ABC_{48h} . Esto recalca la importancia en realizar estudios en poblaciones con distintas ancestrías.

En el 2019, un estudio longitudinal analizó la correlación de cinco variantes en los genes *SLC22A1*, *SLC22A2* y *SLC47A1*, y cambios en los niveles de glucosa y %HbA1c en pacientes mexicanos con diabetes en monoterapia con metformina⁸⁴. Los genotipos CC y AA de las variantes rs622342 y rs628031, respectivamente, del gen *OCT1 (SLC22A1)*, se asociaron al incremento del porcentaje de hemoglobina glucosilada a los 12 meses de seguimiento, por lo que estarían implicadas en el descontrol glucémico.

Posteriormente, en el 2020 Menjivar M. y colaboradores analizaron 7 variantes previamente reportadas, de los genes *OCT1 (SLC22A1)*, *OCT2 (SLC22A2)*, *MATE1 (SLC47A1)* y *MATE2-K (SLC47A2)* en 256 individuos mexicanos con diabetes tratados con metformina⁸⁵. El parámetro evaluado en este estudio fue control glucémico (%HbA1c < 7). Interesantemente, 65.3% de la población analizada se encontró en descontrol glucémico, a pesar de estar bajo tratamiento con metformina en monoterapia, combinada con alguna sulfonilurea o bien tratada con gliburida (glibenclamida). El análisis de asociación fue ajustado por IMC, sexo, edad, edad

de diagnóstico de DT2 y tratamiento farmacológico. La delección rs72552763 *OCT1* (*SLC22A1*) se asoció a control glucémico, mientras que el genotipo heterocigoto de la SNV rs622342 del mismo gen, se asoció a menores niveles plasmáticos de glucosa y %HbA1c.

Recientemente, se llevó a cabo un análisis de asociación genética a cambios en el porcentaje de hemoglobina glucosilada en 100 pacientes diabéticos mexicanos tratados con metformina⁸⁶. En este estudio se utilizaron dos enfoques: GWAS y gen candidato. Para el análisis de gen candidato se analizaron un total de 86 genes que han sido reportados en la literatura como asociados a PK o farmacodinamia, así como a respuesta a metformina. En lo que concierne a los transportadores SLC, la variante rs2453580 del gen *MATE1* (*SLC47A1*), mostró asociación con la disminución de %HbA1c. De hecho, ésta y otras variantes se ingresaron a un modelo de predicción de HbA1c, encontrando a rs2453580 dentro de las que tienen mayor impacto sobre el modelo⁸⁶.

A pesar de los esfuerzos realizados en la materia, las poblaciones latinas en los estudios de genómica y farmacogenómica, aún se encuentran subrepresentadas. Esto limita identificar variantes exclusivas o mayormente distribuidas, en poblaciones con ancestría amerindia, y por tanto evaluar su efecto en la respuesta a fármacos de uso común como la metformina. Lo anterior cobra mayor relevancia dado que las poblaciones latinas son susceptibles de desarrollar enfermedades metabólicas, para las cuales la metformina es parte esencial del tratamiento. De ahí, la importancia de realizar estudios de farmacogenómica en cohortes representativas de pacientes con diabetes tratados con metformina, así como considerar la farmacocinética como pieza clave para para la comprensión integral de la relación genotipo - fenotipo.

JUSTIFICACIÓN

La obesidad y la diabetes son problemas de salud pública que afectan a la población mexicana infantil y adulta. Desde hace tiempo, México se encuentra entre los primeros lugares de estas enfermedades a nivel global, y a la fecha su incidencia continúa en aumento. Las estrategias de abordaje de estas enfermedades

metabólicas incluyen cambios en el estilo de vida, así como tratamiento farmacológico. El fármaco de primera elección para DT2 es la metformina, sin embargo, a la fecha se desconoce el nivel de éxito del tratamiento en pacientes mexicanos. Por otro lado, en la práctica clínica y en estudios de farmacocinética se ha evidenciado la variabilidad en la respuesta a este fármaco en nuestra población. Es por esto que, evaluar la participación de los factores genéticos que influyen sobre la respuesta a la metformina en pacientes mexicanos ha cobrado mayor relevancia en los últimos años, sin embargo, aún se requiere mayor evidencia. La farmacogenética es una herramienta que conlleva al avance de la medicina de precisión. La incorporación de esta herramienta permite identificar marcadores genéticos que mejoren los algoritmos de tratamiento, así como su respuesta, disminuyendo o evitando los efectos adversos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar variantes en genes que codifican para transportadores de la metformina, asociadas con la farmacocinética y la respuesta al tratamiento en pacientes mexicanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer la frecuencia de las variantes en los genes *OCT1 (SLC22A1)*, *OCT2 (SLC22A2)*, *OCT3 (SLC22A3)*, *PMAT (SLC29A4)*, *MATE1 (SLC47A1)* y *MATE2-K (SLC47A2)*, en individuos mexicanos.
- Determinar si la presencia de las variantes se asocia con la farmacocinética de la metformina y la respuesta al tratamiento.
- Determinar si las variantes afectan la estructura y el funcionamiento de la proteína *in silico* y si éstas se asocian con la respuesta al fármaco.
- Caracterizar las variantes implicadas en fenotipos extremos relacionados con la farmacocinética y respuesta a la metformina.

METODOLOGÍA

Estrategia general

A partir de la población de SIGMA DMS1 conformada por 968 adultos mestizos mexicanos previamente reclutados, de quienes se cuenta con exoma, seroteca e historia clínica, se identificaron las SNVs con al menos 1% de frecuencia en los genes *OCT1 (SLC22A1)*, *OCT2 (SLC22A2)*, *OCT3 (SLC22A3)*, *PMAT (SLC29A4)*, *MATE1 (SLC47A1)* y *MATE2-K (SLC47A2)*. De acuerdo con su frecuencia, su asociación a descontrol glucémico y su posible efecto funcional, se genotiparon SNVs dirigidamente en una población independiente de 452 individuos indígenas adultos, con el objetivo de conocer su distribución en población nativa. Para conocer si existe asociación de las variantes seleccionadas con la PK de la metformina, se genotipó una población pediátrica, a la cual se le realizó una cinética de 24 h de las concentraciones plasmáticas del fármaco y de 4 h para medir lactatemia. Las SNVs asociadas a la alteración de la PK se ingresaron a ensayos *in silico* con el objetivo de conocer la implicación en el fenotipo y a aquellas no sinónimas, se les realizó un ensayo de dinámica molecular (Fig.4).

Tipo de estudio

El estudio es de carácter analítico, porque se evalúa como variable independiente la presencia de SNVs y su posible relación causal con variables dependientes, tales como el descontrol glucémico, las concentraciones plasmáticas de metformina y la lactatemia. La asociación a descontrol glucémico en adultos fue de carácter observacional, transversal y retrospectiva, y el estudio de los parámetros farmacocinéticos y de lactatemia fue de tipo clínico, controlado, prospectivo y longitudinal.

Lugar de estudio

La extracción de DNA y el análisis genómico, se realizó en el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, SS, (INMEGEN).

ESTRATEGIA GENERAL

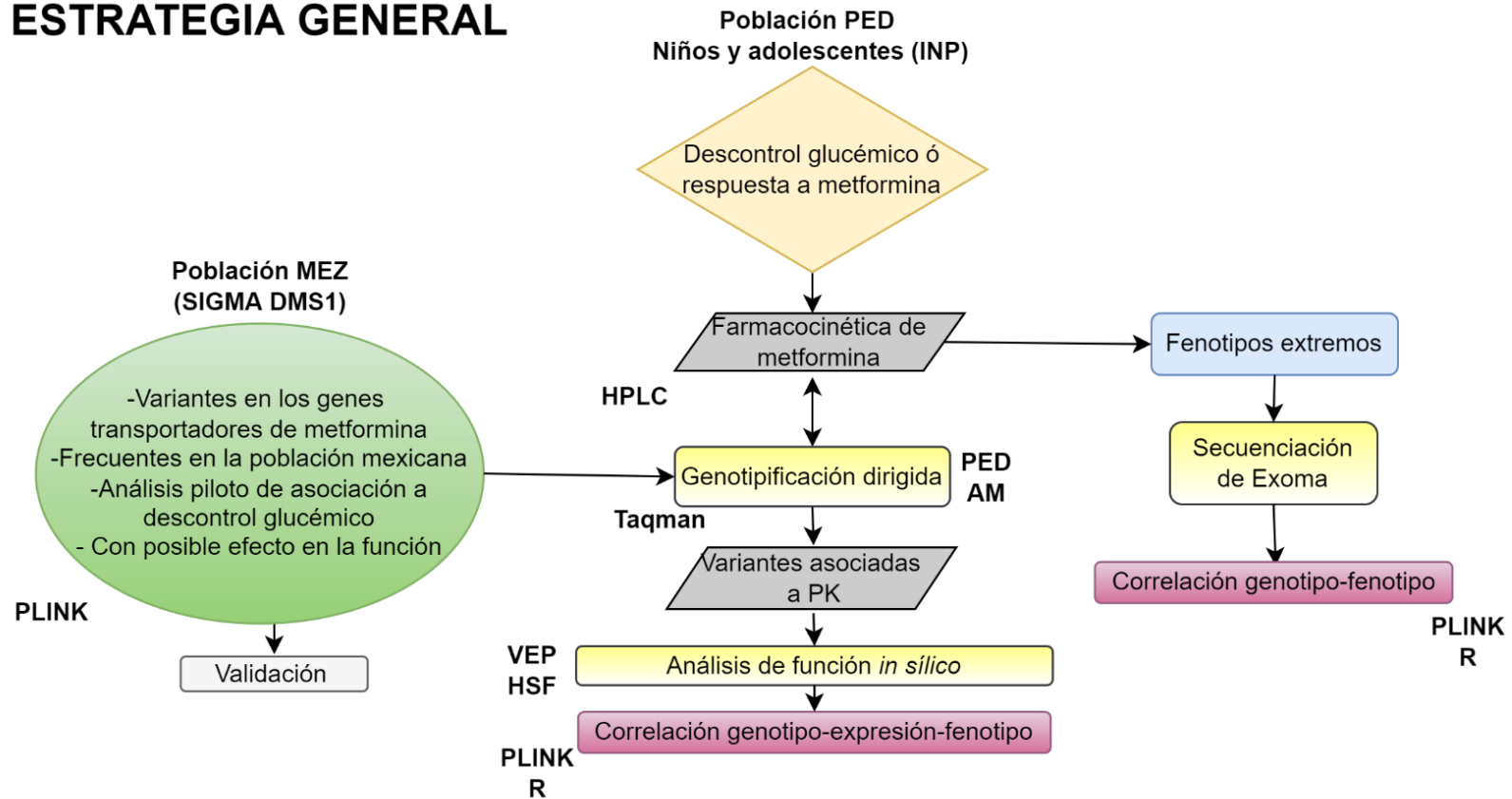


Figura 4. Diagrama de la estrategia general del proyecto.

Los niños y adolescentes fueron captados en el Servicio de Endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría, SS, (INP), donde se realizó la farmacocinética, las historias clínicas y los estudios bioquímicos de la población pediátrica.

Población de estudio

Adultos: Individuos mexicanos mestizos (MEZ) y amerindios (AM) no relacionados, de población voluntaria de distintas entidades del país, enrolados en la cohorte SIGMA DMS1⁸⁷ y en la cohorte MAIS⁸⁸, respectivamente, de los que se contaba previamente con exoma (MEZ), historias clínicas y seroteca.

Niños y adolescentes: Pacientes mexicanos de entre 5 y 17 años, con diagnóstico de sobrepeso, obesidad, DT2 o síndrome metabólico captados en el INP, tratados con metformina o candidatos a tomarla y que firmaron la carta de consentimiento o asentimiento informado.

Tamaño de la muestra

El tipo de muestreo fue a conveniencia dadas las siguientes consideraciones. En la población MEZ integrada por 968 individuos, únicamente 199 pacientes con DT2 referenciaron la toma de metformina. Aunado a esto, la prevalencia de DT2 en población pediátrica, si bien ha incrementado⁸⁹, aún es baja y se encuentra subdiagnosticada. Lo anterior limita la posibilidad de hacer un cálculo basado en individuos tratados con metformina en control/descontrol glucémico.

VARIABLES DE ESTUDIO

Las variables dependientes analizadas en este proyecto fueron:

- Control glucémico: La Norma Oficial Mexicana NOM, NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus²⁰, en el numeral 3.10 establece que un caso en control se define como el paciente bajo tratamiento en el Sistema Nacional de Salud, que presenta de manera regular, niveles de glucemia plasmática en ayuno de entre 70 y 130 mg/dL o de hemoglobina glucosilada (HbA1c) por debajo de 7%.
- Determinaciones de lactato. El inserto del dispositivo utilizado para evaluar lactato, Accutrend Plus metering device (Roche Products, Roche Diagnostics

Division, United Kingdom), establece un intervalo de referencia de lactato en plasma de entre 4.5 – 19.8 mg/dL o (0.5 y 2 mmol/L).

- Concentración máxima de metformina plasmática: En la literatura se reporta que con la administración de 500 mg de metformina cada 12 horas por día o 1 g dosis única en un día, se alcanza una Cmax de metformina de 3.25 µg/mL⁹⁰, equivalente a 3250 µg/L.

Consideraciones éticas

Este estudio se llevó a cabo con estricta adherencia a los principios éticos enunciados en la Declaración de Helsinki y las directrices de CONSORT, <http://www.consortstatement.org/consort-2010>. Todos los participantes proporcionaron un consentimiento informado por escrito. En el caso de los niños, los padres proporcionaron consentimiento por escrito y los niños un asentimiento. Los comités locales de ética e investigación de las instituciones participantes aprobaron este estudio que lleva a cabo el siguiente número de registro, por el Comité de Investigación (17CI09003109), Comité de Ética (Conbioetica-09-CEI-025-20161215) y Comité de Bioseguridad (17CB09003143), el número de registro internacional es IRB00008064.

Criterios de inclusión

Pacientes con prescripción de metformina en monoterapia o combinada o pacientes candidatos a recibirla que firmaron un consentimiento informado u otorgaron su asentimiento.

Criterios de exclusión

Pacientes con antecedentes de toxicomanías, alteraciones hepáticas o renales graves, cáncer, ovario poliquístico, VDRL, hepatitis o VIH positivos, embarazo confirmado, lactancia, o cuya condición clínica esté causada por algún síndrome genético, o secundaria a tratamiento farmacológico. También se excluyeron individuos transfundidos en los últimos tres meses.

Criterios de eliminación

Pacientes cuyas muestras fueron insuficientes o de calidad inadecuada para caracterizar la farmacocinética o los genes candidato; así como aquellos que decidieron abandonar voluntariamente el estudio en cualquier etapa.

Abordaje de gen candidato

La selección de los genes que codifican para los transportadores de metformina se llevó a cabo por medio de revisión de la literatura^{45,49}. Se evaluaron criterios como número de referencias de estudios publicados, órganos blanco de la metformina⁹¹ y datos de expresión génica de repositorios⁹²⁻⁹⁴. Los genes seleccionados se analizaron en el exoma de la población MEZ, correspondientes a la cohorte SIGMA DMS1. Las variantes candidatas derivadas de este análisis se validaron en una muestra al azar de la cohorte MEZ y se analizaron dirigidamente en las cohortes MAIS y en la pediátrica.

Extracción de ADN, genotipificación y secuenciación

El ADN se obtuvo de sangre periférica de los pacientes por medio del kit de extracción de QIAGEN®, y se genotipificó por la técnica de TaqMan, de acuerdo a las especificaciones de los proveedores. La secuenciación del exoma se realizó por tecnología de nueva generación en equipo NextSeq 500, y la validación se llevó a cabo por secuenciación Sanger.

Cuantificación de metformina

La concentración del fármaco se obtuvo en la cohorte PED a partir de sangre obtenida de punciones dactilares depositadas en papel filtro, previo a la toma oral de 500 mg de metformina y a las 1.5 o 2, 3 o 4, 8, 12 y 24 horas. Los participantes tomaron un refrigerio entre la segunda y la tercera hora de haber iniciado el estudio en ayuno, o antes en caso necesario. Los individuos que no completaron al menos tres determinaciones de metformina, fueron considerados solo para la genotipificación. La extracción del fármaco se realizó a partir de metodología previamente estandarizada⁹⁵ por precipitación directa con acetonitrilo y metanol a

través de cromatografía líquida de ultra-alto desempeño y su cuantificación se llevó a cabo por espectrometría de masas.

Determinaciones de lactato

Las mediciones de lactato en adultos se realizaron en 96 muestras de plasma crioconservado, seleccionadas al azar de la cohorte MEZ. Éstas comprendieron individuos sin tratamiento antihiper glucemiante, pacientes con DT2 en monoterapia con metformina y pacientes con DT2 en tratamiento combinado. Los niveles de lactato en PED se obtuvieron de la punción dactilar, a las 0 y 2 h después de la administración de metformina, utilizando el dispositivo Accutrend Plus (Roche Products, Roche Diagnostics Division, Reino Unido). Debido a que los niveles de lactato pueden cambiar si se interrumpe el ayuno, los pacientes que requirieron alimentación antes de la segunda determinación de lactato se consideraron solo para los perfiles de genotipificación o de PK.

Ensayos de funcionalidad *in silico*

Los ensayos de funcionalidad *in silico* fueron realizados en las plataformas Variant Effect Predictor (VEP)⁹⁶, Human Splicing Finder (HSP)⁹⁷, I-TASSER⁹⁸, así como los softwares Visual Molecular Dynamics⁹⁹, CHARMM¹⁰⁰, NAMD¹⁰¹, VEGA ZZ^{102,103} y CARMA.

Ensayo de dinámica molecular

Para este estudio se utilizaron los residuos 29 al 470 de la secuencia de uniprot (Q96FL8), esto en virtud de que, de acuerdo a estudios experimentales de la estructura de MATE1, las primeras 12 hélices transmembranales constituyen el núcleo funcional¹⁰⁴. La secuencia propuesta fue utilizada para realizar el modelo de la estructura 3D mediante el Servidor I-TASSER. Después se modeló la estructura de la proteína mutada (Leu125Phe) con el software VMD v.1.9 y el resultado de la predicción de I-TASSER. A partir de las dos estructuras nativa y mutada se llevaron a cabo dos simulaciones de Dinámica Molecular (DM) con representación explícita de los átomos para proteínas, la membrana de bicapa lipídica (POPC), el agua y los iones. Para la simulación del campo de fuerza se utilizó CHARMM v.40, mientras

que, para las condiciones de límite periódicas, se consideraron el método de Malla de partículas de Ewald (del inglés: *particle mesh Ewald method*) y un punto de corte de 14 Amstrongs cronometrado a 2 femtosegundos (fs), el software utilizado fue NAMD v.3.13. El ensamble NPT (número molecular, temperatura y presión constantes) se mantuvo con el termostato Langevin (300 Kelvins) y un barostato de piston Langevin (1 atmósfera). Para cada modelo, el sistema se sometió a minimizaciones de energía de los diferentes componentes, este procedimiento fue seguido de un proceso de estabilización durante 5 ns y la simulación continua durante 100 ns sin restricciones. Se utilizaron curvas de energía potencial para determinar la configuración en el análisis de interacciones en forma de T. Las visualizaciones y los análisis se hicieron utilizando programas de dinámica molecular visual (VMD, por sus siglas Visual Molecular Dynamics)¹⁰⁵ y herramientas de modelaje molecular Vega ZZ v.3.2¹⁰², CARMA v.1.7 y R Studio. La desviación estándar de la distribución del agua en la DM se utilizó como una estimación aproximada del tamaño del transportador dentro de la bicapa lipídica.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva de los datos antropométricos y los parámetros bioquímicos en las poblaciones de estudio, utilizando como parámetros estadísticos la media y la desviación estándar. Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba no paramétrica de Wilcoxon, por medio del programa R Studio. El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se confirmó con un valor $P > 0.05$. El análisis de asociación a descontrol glucémico se realizó con análisis de regresión logística, mientras que para el estudio de asociación a PK y lactatemia se llevó a cabo regresión lineal. Los análisis se ajustaron por las covariables de confusión: sexo, edad, años de diagnóstico, tratamiento combinado y ancestría, en adultos; así como: sexo, edad y diagnóstico de sobrepeso, en niños. El intervalo de confianza fue del 95%. El programa utilizado para las asociaciones fue PLINK v.1.07. La PK se determinó desde un enfoque poblacional, mediante el modelo no lineal de efectos mixtos.

RESULTADOS

La población fue conformada de 1420 adultos, 968 individuos MEZ pertenecientes a la cohorte SIGMA DMS1⁸⁷ e incluidos en la base de datos gnomAD¹⁰⁶, y 452 amerindios mexicanos (AM) pertenecientes a la cohorte MAIS⁸⁸ (del inglés *Metabolic Analysis in an Indigenous Sample*). La cohorte MAIS incluyó a individuos pertenecientes a las etnias más representativas de las regiones norte centro, sur y sureste de México (Tarahumara, Otomí, Náhuatl, Zapoteca y Maya). Las características de las cohortes se muestran en la tabla 3. Además, en una cohorte de 30 niños y adolescentes con diagnóstico de obesidad o DT2 pertenecientes a la cohorte PED¹⁰⁷, se evaluaron de efectos adversos y la farmacocinética. Las características generales de los pacientes PED se muestran en la tabla 3.

Para el análisis de asociación a descontrol glucémico se consideraron a los individuos de la población MEZ que estuvieran en tratamiento con metformina en monoterapia o combinada (n=199). Las características de estos individuos estratificados por descontrol glucémico se describen en la tabla 4. El descontrol glucémico se definió como variable dicotómica, de acuerdo al porcentaje de hemoglobina glucosilada (%HbA1c). El punto de corte para individuos diabéticos en control glucémico fue HbA1c < 7%. De manera relevante, el 71.9% de los individuos tratados con metformina en la población MEZ se encontraron en descontrol glucémico (%HbA1c≥7), siendo mayor en las mujeres (75%). Asimismo, entre individuos en control y descontrol glucémico se mostraron diferencias significativas entre los años de diagnóstico, IMC, circunferencia de cintura y colesterol total (p<.0.05).

Tabla 3. Características generales de las poblaciones MEZ, AM y PED

	MEZ n=968	AM n=452	PED n=30
Mujeres (%)	681 (70.4%)	327 (72.3%)	11 (36.7%)
Hombres (%)	287 (29.6%)	125 (27.7%)	19 (63.3%)
Edad (años)	54 ± 9.8	50 ± 16	13 ± 2.6
IMC (Kg/m²)	28.5 ± 5	28.3 ± 4.8	28.1 ± 4.5
Glucosa (mg/dL)	125.2 ± 61.4	106 ± 51.3	126.1 ± 69.4
HbA1c (%)	8.2 ± 2.6	8.7 ± 2.6	6.5 ± 2.5
TAS (mmHg)	128.9 ± 21.8	128.2 ± 22.1	
TAD (mmHg)	76.1 ± 11.3	74.8 ± 11.9	
Colesterol (mg/dL)	201.1 ± 43.8	178.1 ± 36.8	
HDL (mg/dL)	42.4 ± 12	39.8 ± 12.2	
Triacilglicéridos (mg/dL)	203.7 ± 129.3	198.5 ± 120.8	

IMC: Índice de masa corporal, HbA1c: Hemoglobina glucosilada, TAS: Tensión arterial sistólica, TAD: Tensión arterial diastólica. HDL: High density lipoprotein.

Tabla 4. Características de la población MEZ tratada con metformina estratificada por control /descontrol glucémico

	HbA1c<7%		HbA1c≥7%		<i>p</i>
Mujeres %(n)	25 (34)		75 (102)		≥0.05
Hombres %(n)	35 (22)		65 (41)		
Edad (años)	58 ± 13.3		58 ± 10.5		≥0.05
Años de diagnóstico	6.8 ± 6.3		9.7 ± 7.5		0.006
IMC (Kg/m²)	30.9 ± 7.3		28.3 ± 5.3		0.009
TAS (mmHg)	134.7 ± 25.6		131.4 ± 19.3		≥0.05
TAD (mmHg)	76 ± 9.5		76.6 ± 10.6		≥0.05
Glucemia (mg/dL)	105.6 ± 23.3		160.2 ± 62.9		1.32 x10 ⁻¹¹
HbA1c (%)	6.3 ± 0.45		9.8± 2.2		2.20 x10 ⁻¹⁶
Triglicéridos (mg/dL)	189.9 ± 97		214.3 ± 128.8		≥0.05
Colesterol (mg/dL)	178.7 ± 33.9		196.5 ± 42.4		0.006
HDL (mg/dL)	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	≥0.05
	32.9 ± 8.3	40.2 ± 7.8	36 ± 9.2	42.1 ± 9.9	
Cintura (cm)	98.6 ± 9.2	102.9 ± 17.9	98.3 ± 9.5	96.6 ± 12.2	0.04 (mujeres)

Los valores de los parámetros están dados en media ± desviación estándar. Los valores de *p* fueron analizados por la prueba de Wilcoxon.

Análisis de asociación a descontrol glucémico

Las variantes encontradas en MEZ se ingresaron a un análisis de asociación a descontrol glucémico ajustando por las covariables sexo, edad, años de diagnóstico, tratamiento combinado y ancestría. Las SNVs rs622591 y rs117483482 resultaron significativamente asociadas.

La SNV rs622591 en *OCT1 (SLC22A1)*, es un cambio de citosina por timina ubicado en el intrón 11 del gen. El alelo C, reportado como ancestral y el de mayor frecuencia a nivel global, resultó asociado a riesgo de descontrol glucémico (HbA1c \geq 7%, OR=1.838, IC[1.084 - 3.116], p=0.0238). Esta variante se encontró en el 47% de la población MEZ. El análisis en las plataformas PLINK v.1.07, VEP y HSP no sugirió un mecanismo de participación de rs622591 sobre el desequilibrio de ligamiento, la función del transportador o la alteración del corte y el empalme. Por otro lado, la SNV intrónica rs117483482 de *MATE2-K (SLC47A2)*, que representa un cambio de una G por una A, se asoció con riesgo de descontrol glucémico en la población MEZ (OR= 4.087, IC[1.216-13.73], p= 0.0228). Esta SNV se encuentra con una distribución a nivel mundial de 2.8%, mientras que, en la población de MEZ, se encontró con una frecuencia 2.5 veces mayor (7.1%), sólo por debajo de la población asiática del Proyecto 1000 Genomas (9.9%). El análisis de función *in silico* en la plataforma HSP reveló que el alelo rs117483482/A, asociado con descontrol glucémico en pacientes tratados con metformina, se ubica en un motivo de “Enhancer de Splicing Exónico” (ESE por sus siglas en inglés) en el intrón 1 del gen (Fig. 5).

Selección de variantes con alta frecuencia en la población mexicana

El análisis del exoma de los genes *OCT1 (SLC22A1)*, *OCT2 (SLC22A2)*, *OCT3 (SLC22A3)*, *PMAT (SLC29A4)*, *MATE1 (SLC47A1)* y *MATE2-K (SLC47A2)* en 968 individuos MEZ, permitió la identificación de un total de 37 variantes de un solo nucleótido con al menos 1% de frecuencia (Tabla 5). La comparación de la distribución de las 37 SNVs con las del proyecto 1000 genomas derivó en la identificación de dos variantes frecuentes en la población mexicana que son raras o nulas en otras poblaciones. Las SNVs que cumplieron estos criterios fueron dos:

una no sinónima y una sinónima, ambas en *MATE1* (rs77474263 C>T y rs16960203 C>T) con una frecuencia del 16 y 12%, respectivamente. De éstas, rs77474263 C>T en *MATE1* cobró especial relevancia, ya que además de que representa un cambio no sinónimo del aminoácido leucina por fenilalanina en la posición 125 (L125F) de la proteína MATE1, tiene una distribución a nivel global prácticamente nula (tabla 5).



Figura 5. Análisis realizado en la plataforma Human Splicing Finder. La variante rs117483482 G>A del gen MATE2-K (*SLC47A2*) se ubica en una región de Enhancer de Splicing Exónico (ESE Motif).

Tabla 5. SNVs con MAF \geq 1% en los transportadores de metformina.

GEN	ID	Alelo	MAF (MEZ)	MAF (1000 genomas)
OCT1 (SLC22A1)	rs622591	T	0.47	0.35
	rs1867351	C	0.41	0.28
	rs4646272	G	0.40	0.20
	rs2297374	T	0.17	0.39
	rs683369	G	0.05	0.12
	rs7762846	T	0.05	0.09
	rs45584532	T	0.05	0.09
	rs9457843	T	0.04	0.09
	rs41267797	A	0.03	0.07
	rs36107168	T	0.03	0.06
rs12208357	T	0.01	0.02	
OCT2 (SLC22A2)	rs624249	A	0.12	0.26
	rs316003	C	0.07	0.31
	rs2774230	G	0.07	0.27
	rs316019	A	0.04	0.14
OCT3 (SLC22A3)	rs2292334	G	0.41	0.31
	rs668871	T	0.34	0.43
	rs555754	A	0.34	0.43
	rs2457574	A	0.14	0.47
	var_6_160857775	T	0.02	
OCTN1 (SLC22A4)	rs12777	G	0.02	0.04
	rs272879	C	0.29	0.33
	rs272893	T	0.29	0.32
	rs1050152	T	0.14	0.24
	rs11568506	A	0.03	0.02
	rs2304081	A	0.02	0.07
PMAT (SLC29A4)	rs59119551	T	0.34	0.30
	rs6950111	C	0.18	0.29
	rs34551990	G	0.14	0.18
	rs6946155	G	0.14	0.17
	rs181930968	T	0.04	0.01
	rs11761173	T	0.02	0.02
	rs149588788	T	0.02	0.02

Tabla 5 (continuación). SNVs con MAF \geq 1% en los transportadores de metformina.

GEN	ID	Alelo	MAF (MEZ)	MAF (1000 genomas)
MATE1 (SLC47A1)	rs2247436	A	0.23	0.21
	rs77474263*	T	0.16	0.01
	rs2247437	C	0.16	0.18
	rs16960203*	T	0.12	0.02
MATE2-K (SLC47A2)	rs4925042	G	0.47	0.57
	rs4924792	T	0.38	0.36
	rs35263947	T	0.37	0.29
	rs12942065	C	0.19	0.2
	rs117483482*	A	0.07	0.03
	rs34169093	T	0.01	0.06
THTR2 (SLC19A3)	rs73997321	A	0.01	0.04
	var_2_228560839	G	0.02	

*SNVs con frecuencia de más del doble en la población de estudio que en la de referencia.

Análisis de distribución de frecuencia en población amerindia.

Las SNVs asociadas a descontrol glucémico rs622591 y rs117483482, junto con L125F de *MATE1*, se genotiparon dirigidamente en 452 muestras de las etnias más representativas del país (Tarahumara, Otomí, Náhuatl, Zapoteca y Maya), pertenecientes a la cohorte MAIS. El análisis de estas variantes en indígenas reveló que rs622591/C *OCT1* (*SLC22A1*), tiene una frecuencia similar entre las poblaciones AM y MEZ (46.1 vs 47%) y rs117483482/A *MATE2-K* (*SLC47A2*) presenta una frecuencia ligeramente mayor en AM que en MEZ (9.9 vs 7%). Por su parte, L125F de *MATE1* (*SLC47A1*) mostró una frecuencia 2.25 veces mayor en AM que en MEZ (27 vs 12%) y, sin contar a las poblaciones latinas del Proyecto 1000 Genomas, esta variante es prácticamente nula en el resto del mundo. Finalmente, estratificando por etnia, el grupo maya presentó la mayor distribución de L125F reportada hasta la fecha (34%) (Fig. 6). Notablemente, por primera vez en el mundo se reportan homocigotos para el alelo T de L125F *MATE*, los cuáles se encontraron tanto en la población MEZ como en la población AM (3.3 y 8.9%, respectivamente).

Análisis de asociación a farmacocinética

Las tres variantes de interés, rs622591 de *OCT1* (*SLC22A1*), rs77474263 de *MATE1* (L125F) y rs117483482 de *MATE2-K* (*SLC47A2*), se ingresaron a un análisis de asociación a concentraciones plasmáticas de metformina en 2 y 4 horas, en la población pediátrica. Se ajustaron por las covariables de confusión: sexo, edad y diagnóstico de sobrepeso. La forma homocigota CC de la SNV intrónica rs622591 de *OCT1* (*SLC22A1*) se asoció con la reducción de los niveles plasmáticos de metformina a las 2 horas de la administración del fármaco ($\beta = -274.1$ ng/mL, IC[-485.1 a -63.19], $p = 0.027$) (Fig. 7). Por su parte, la variante L125F se asoció a incremento de los niveles plasmáticos del fármaco en ese mismo intervalo de tiempo ($\beta = 373.3$ ng/mL, IC[45.4 a 701.2], $p = 0.045$) (Fig. 8). El análisis de la PK en una paciente homocigota para esta variante, reveló un efecto aditivo de la SNV L125F sobre la concentración máxima (C_{max}) del fármaco en plasma. Por otro lado, la SNV rs117483482 de *MATE2-K* (*SLC47A2*) no mostró asociación a la alteración de los niveles plasmáticos del fármaco en estado heterocigoto (Fig. 9). Cabe aclarar

que en la cohorte pediátrica no se encontraron individuos homocigotos para el alelo menor de esta variante.

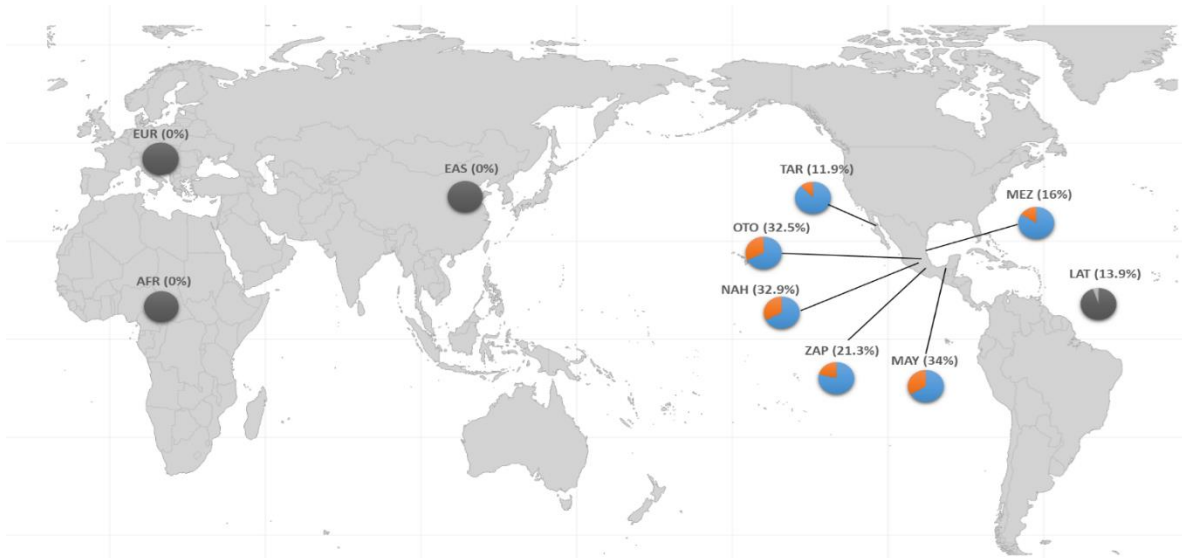


Figura 6. Distribución mundial de la variante L125F MATE1 (rs77474263C> T). Los pasteles color azul y naranja muestran las frecuencias de la SNV encontradas en poblaciones mestiza (MEZ), Tarahumara (TAR), Otomí (OTO), Zapoteca (ZAP), Náhuatl (NAH) y Maya (MAY). Los gráficos en escala de grises muestran las frecuencias alélicas en Europa (EUR), en poblaciones africanas (AFR), de Asia oriental (EAS) y de América Latina (LAT), extraídas de la base de datos gnomAD. Los porcentajes entre paréntesis representan el alelo de menor frecuencia del SNV.

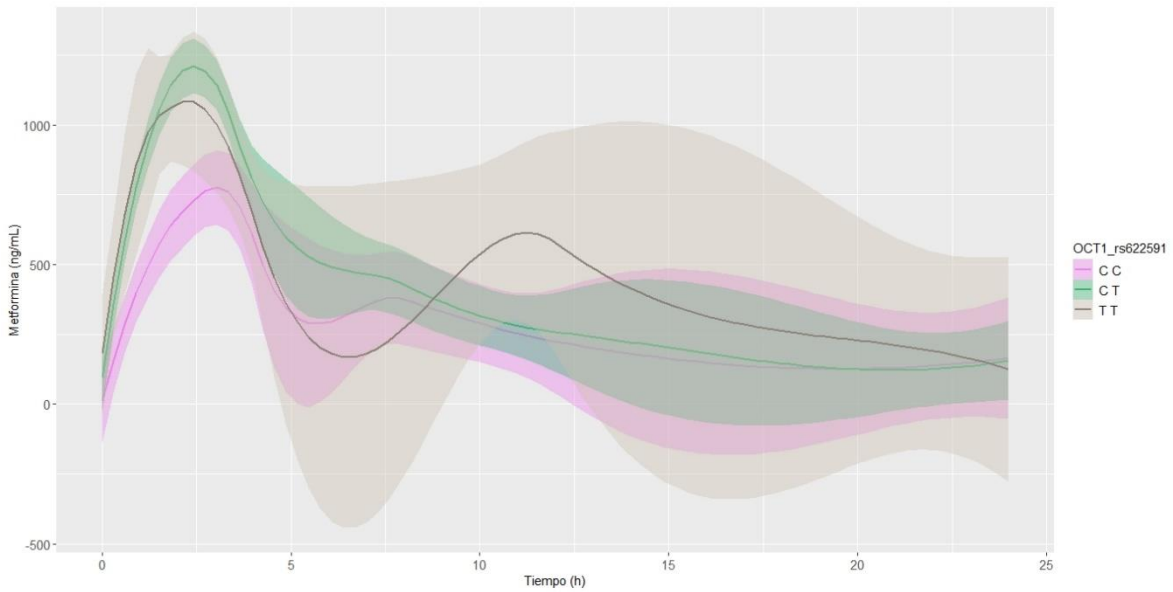


Figura 7. Curva de metformina plasmática en 24 horas en población pediátrica, de acuerdo al genotipo rs622591 C>T de OCT1 (SLC22A1).

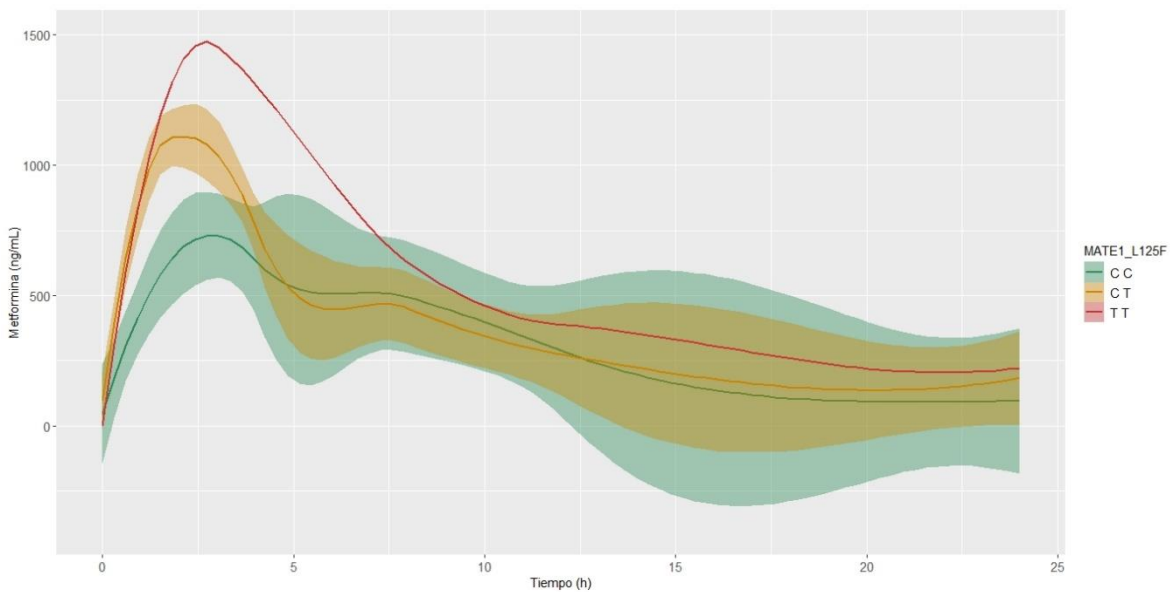


Figura 8. Curva de metformina plasmática en 24 horas en población pediátrica, de acuerdo al genotipo rs77474263 C>T MATE1 (L125F).

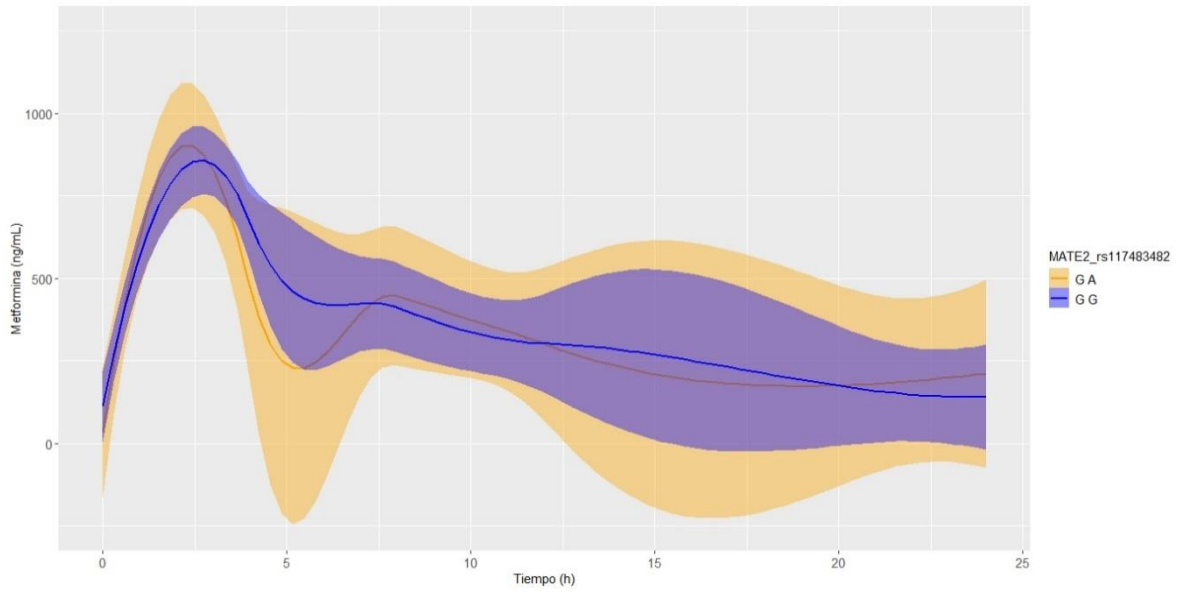


Figura 9. Curva de metformina plasmática en 24 horas en población pediátrica, de acuerdo al genotipo rs117483482 G>A *MATE2-K* (*SLC47A2*).

Análisis de asociación a hiperlactatemia

En la población MEZ se midieron los niveles de lactato en plasma crioconservado en una submuestra de 96 individuos. Este grupo se conformó por 49 individuos no diabéticos sin tratamiento farmacológico y 40 individuos diabéticos en monoterapia con metformina. El resto (n=7), no fueron considerados para el análisis debido a que se encontraban en terapia combinada. Los resultados mostraron una mayor concentración media de lactato (29.1 ± 11.71 mg/dL) en los pacientes tratados, comparado con los individuos sin tratamiento (16.3 ± 10.2 mg/dL), ($p < 0.05$). El análisis de regresión lineal reveló que ninguna de las variantes estudiadas se asoció significativamente a hiperlactatemia ($p \geq 0.05$).

Adicionalmente, se midieron los niveles de lactatemia en la población PED, antes y dos horas después de la toma oral de metformina. El análisis de asociación mostró una tendencia en la asociación de las SNVs rs622591 C>T de *OCT1 (SLC22A1)* y rs77474263 C>T (L125F) de *MATE1* con el incremento de lactato a las dos horas de la administración de metformina ($p=0.07$). Interesantemente, la única paciente homocigota para la variante L125F *MATE1*, mostró los niveles de lactato más elevados (75.6 mg/dL) a las 2 horas de administrados los 500 mg de metformina (Fig.10), en concordancia con el incremento de los niveles plasmáticos del fármaco observados en la PK por un efecto aditivo de esta variante.

Análisis de dinámica molecular

Dado el efecto de la variante no sinónima L125F sobre el incremento de metformina y lactato en suero, se llevó a cabo un ensayo de dinámica molecular con el objetivo de identificar el impacto de la SNV sobre la función del transportador. La sustitución del aminoácido de carácter alifático leucina por uno de carácter aromático como la fenilalanina, resultó en un cambio en la interacción entre aminoácidos cercanos a la posición 125, la cual se ubica en la hélice transmembranal 3 (TM3). La interacción que se forma entre la sustitución Phe125 y otros aminoácidos con anillos aromáticos como Trp256, que se ubica en la hélice transmembranal 7 (TM7), se conoce como tipo T (del inglés T-shape) (Fig. 11). Como puede observarse, las alteraciones en las interacciones transmembranales conllevan a reacomodos conformacionales en

la región del canal de MATE1. De hecho, la simulación de permeación de aguas mostró que L125F reduce el radio del canal de 3.9 a 2.1 nm, (Fig 12).

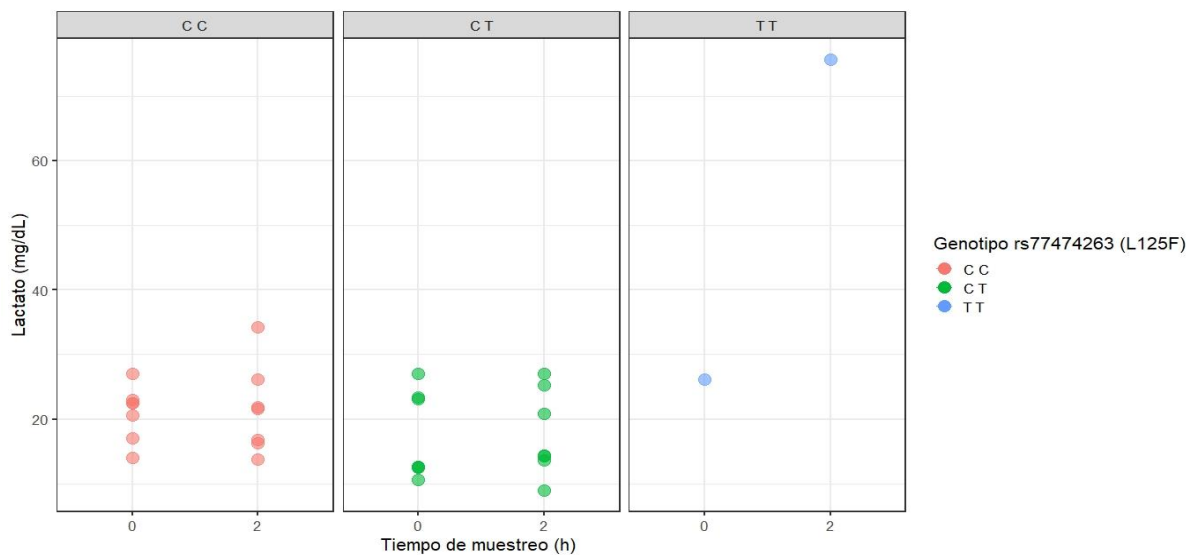


Figura 10. Lactatemia en pacientes pediátricos antes y después de la toma oral de metformina de acuerdo al genotipo rs77474263 C>T.

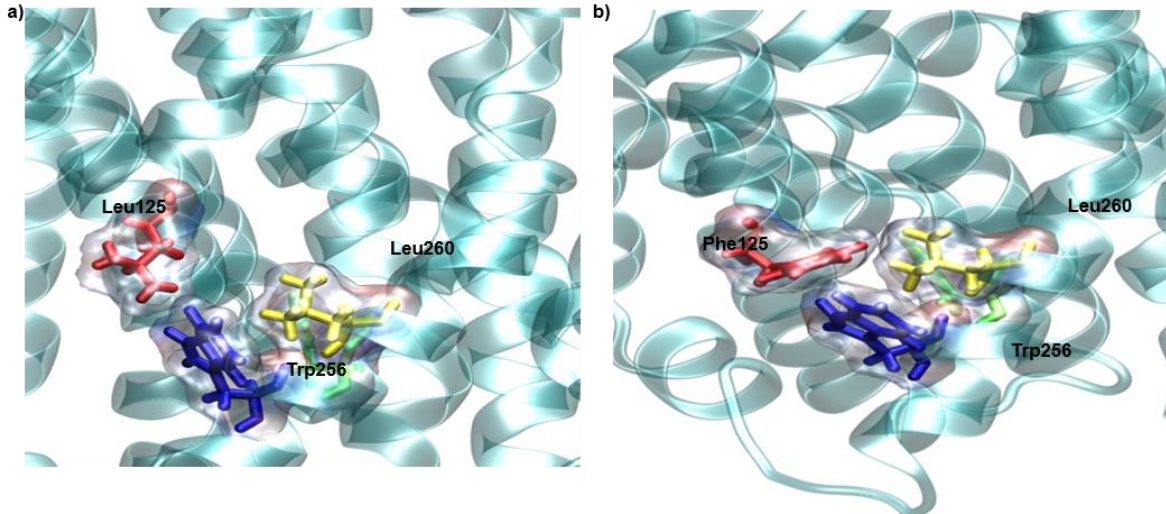


Figura 11. Representación de la interacción con el residuo 125 (rojo) y los aminoácidos vecinos Trp256 (azul) y Leu260 (amarillo) en la región transmembranal de MATE1. a) Interacciones con el aminoácido nativo Leu 125. b) Interacción tipo T formada entre aminoácidos de carácter aromático.

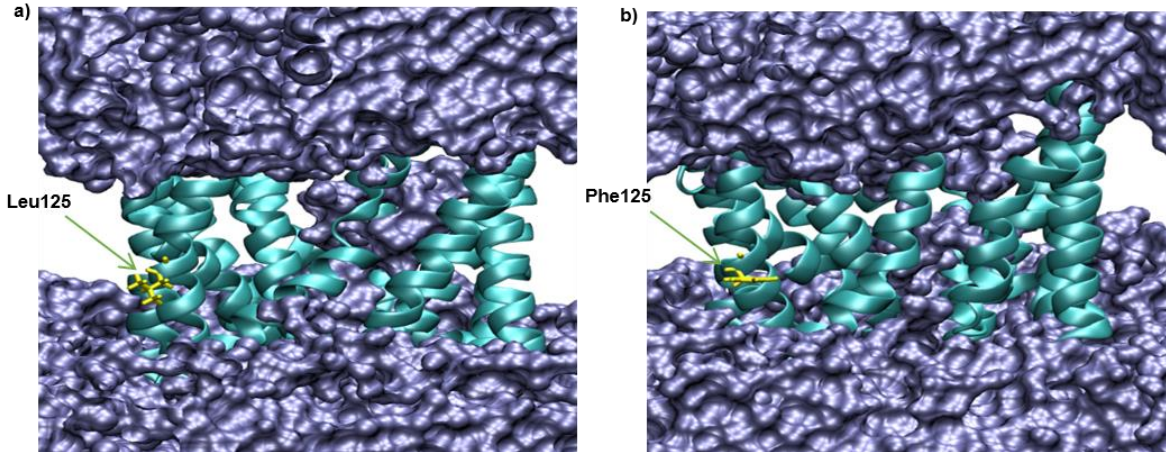


Figura 12. Caracterización *in silico* de la permeación de aguas del transportador MATE1 con a) el aminoácido nativo Leu125 y b) la variante Phe125. Ambos representados en color amarillo. Las hélices azul claro constituyen la región transmembranal de MATE1. Las moléculas de agua se encuentran representadas en azul oscuro.

Identificación de fenotipos extremos

Los individuos con fenotipos extremos se definieron como aquellos que en la PK superaron por más de dos desviaciones estándar la media poblacional en uno o más puntos de la curva de concentración de metformina plasmática (Fig. 13). En la cohorte pediátrica estas características fueron identificadas en dos hermanos, una niña de 15 años y un niño de 11 años diagnosticados con DT2 desde los 4 y 8 años de edad, respectivamente. De acuerdo a nuestro algoritmo metodológico se procedió a analizarlos de forma independiente. En los antecedentes familiares obtenidos de la historia clínica se documentó que contaban con padres aparentemente sanos, abuelos paternos con hipertensión arterial sistémica, y el abuelo materno con diabetes tipo 2. La niña presentó macrosomía fetal y la madre refirió diabetes gestacional en el embarazo del niño. A la edad de 9 años, la niña presentó proteinuria leve e hiperfiltración glomerular, por lo que se diagnosticó con daño renal y tratamiento con enalapril. Al momento de la toma de muestra el niño contaba con salud renal sin compromiso. Las características de ambos se muestran en la tabla 6. Los picos de concentración máxima de estos pacientes superaron los 2000 ng/mL después de 2 h de la administración oral de 500mg de metformina en el niño (curva azul), y después de 12 h en la niña (curva rosa). De acuerdo a la estrategia general a estos pacientes se buscó identificarles variantes en los exones de los transportadores de metformina que se correlacionaran con su fenotipo. Se identificaron un total de 19 variantes en los genes *OCT1* (*SLC22A1*), *OCT2* (*SLC22A2*), *OCT3* (*SLC22A3*), *PMAT* (*SLC29A4*), *MATE1* (*SLC47A1*) y *MATE2-K* (*SLC47A2*), las cuales a su vez se ingresaron a la plataforma VEP. Los algoritmos Polyphen y SIFT de esta plataforma mostraron que las 19 variantes son de carácter benigno. A estos pacientes, a su vez, se les genotiparon los tres SNVs candidatos, rs622591C>T de *OCT1* (*SLC22A1*), rs77474263 de *SLC47A1* (L125F, *MATE1*). y rs117483482G>A de *MATE2-K* (*SLC47A2*). De estas variantes, únicamente difirieron entre sí, en el genotipo de rs622591, para el que la niña presenta una copia del alelo C, considerado como de riesgo a descontrol glucémico. No obstante, tanto la niña como su hermano mostraron datos indicativos de control glucémico al momento de la toma de muestra. En la secuenciación completa del exoma en esta

niña, se encontró una variante no sinónima (P59S) con genotipo heterocigoto, localizada en el exón 2 del gen *GCK* Fig. 14, la cuál ha sido previamente reportada como responsable de Diabetes tipo MODY¹⁰⁸⁻¹¹⁰. La búsqueda dirigida de esta SNV por secuenciación Sanger en su hermano, reveló la presencia de la misma variante patogénica Fig. 15.

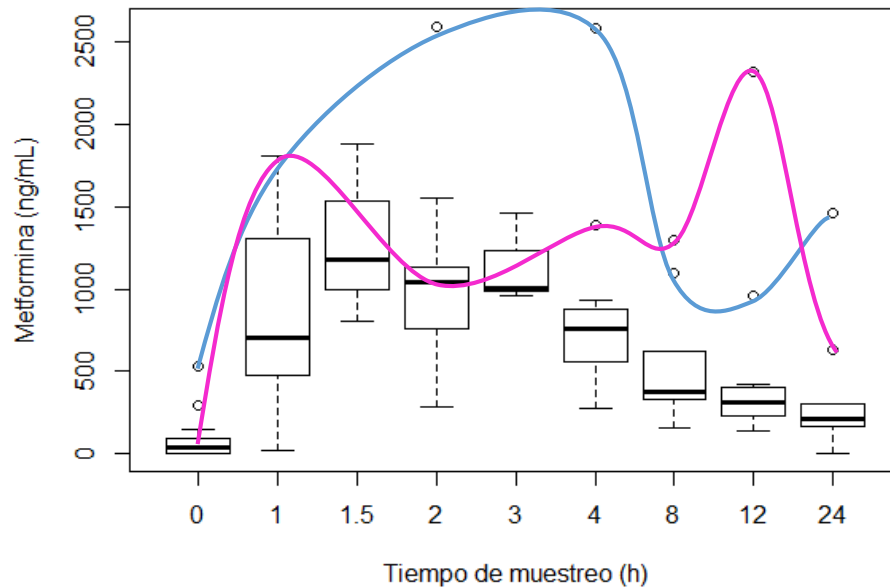


Figura 13. Distribución de la concentración plasmática de metformina en 24 h de la población pediátrica. Las curvas representan a los pacientes con fenotipo extremo.

Tabla 6. Características de pacientes con fenotipo farmacocinético extremo.

Sexo	F	M
Edad	15	11
Glucosa (mg/dL)	116	142
%HbA1c	6.7	6.1
Antecedentes familiares	Padres aparentemente sanos. Abuelos paternos HAS. Abuelo materno DM2.	
Antecedentes perinatales	Macrosomía fetal	Madre con diabetes gestacional
Edad de diagnóstico (años)	4.5	8
Tiempo de diagnóstico* (años)	13	5
Salud renal	A los 9 años proteinuria leve e hiperfiltración glomerular. Daño renal Enalapril como protector	Aparentemente sano
rs622591 OCT1 (SLC22A1)	CT	TT
rs77474263 SLC47A1 (L125F MATE1)	CC	CC
rs117483482 MATE2-K (SLC47A2)	GG	GG

Características al momento de la toma de muestra para cuantificación de metformina

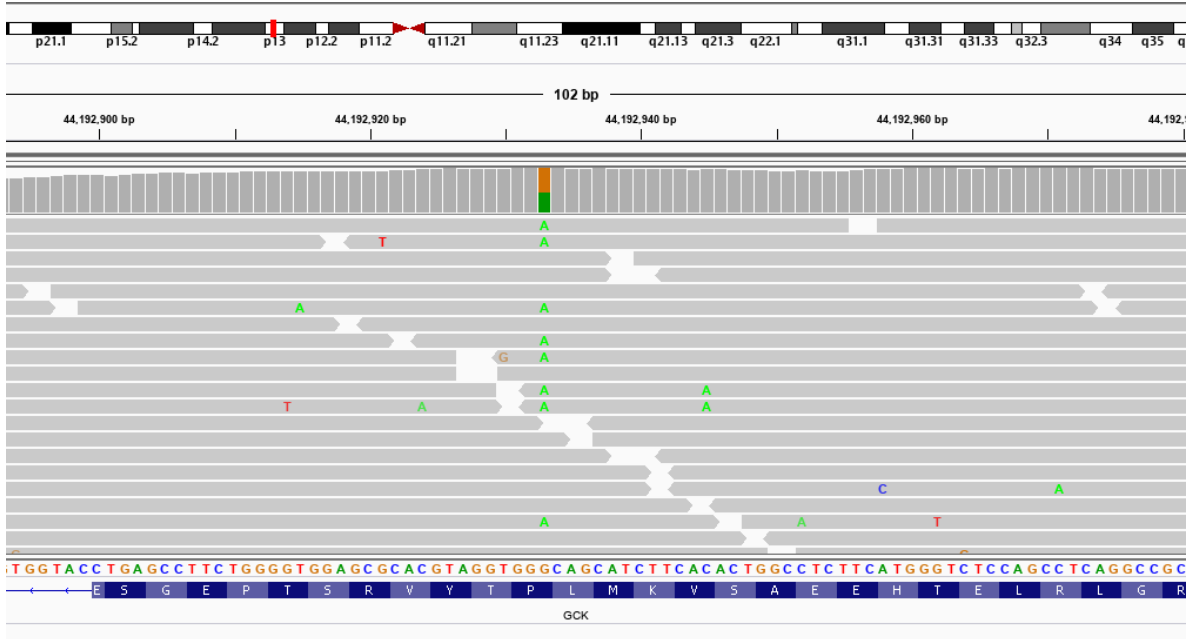


Figura 14. Identificación por secuenciación de Exoma de variante P59S en el gen *GCK* asociada a fenotipo MODY en paciente femenina.



Figura 15. Identificación por secuenciación Sanger de variante P59S en el gen *GCK* asociada a fenotipo MODY en paciente masculino.

DISCUSIÓN

México cursa con un serio problema de salud pública en materia de enfermedades metabólicas. Desde hace más de 20 años la prevalencia de sobrepeso y obesidad en nuestro país ha incrementado en población adulta, y en la última década también en población infantil^{19,111}. Este padecimiento tiene un componente inflamatorio que condiciona al desarrollo de otras comorbilidades como la DT2 y el cáncer, pero además incrementa la susceptibilidad a enfermedades infecciosas¹¹²⁻¹¹⁴. Paralelamente, la DT2 también ha registrado un incremento de la prevalencia en adultos y en niños en nuestro país^{89,111} y se espera que, dado el ambiente diabetogénico en el que se encuentra la población mexicana, esta tendencia a la alza continúe¹¹⁵. Aún más, diversos estudios señalan a la ancestría amerindia como un factor de riesgo para el desarrollo de padecimientos metabólicos^{12,13}. Recientemente, en las ediciones 2018 y 2020 de la ENSANUT¹¹⁵, se integró el dato de prevalencia de control glucémico en población diagnosticada con DT2 en México. Los resultados muestran que, en estos años, el 42% y el 39% respectivamente, de los individuos diagnosticados, se registraron en control su enfermedad. La importancia del control glucémico en la DT2 radica en la prevención o el retraso de complicaciones asociadas, tales como enfermedad cardíaca, enfermedad cerebrovascular, retinopatía diabética, enfermedad renal crónica y neuropatía¹¹⁶. Aunado a esto, la emergencia por coronavirus COVID-19 (por sus siglas en inglés *Coronavirus Disease 2019*) volvió a resaltar la susceptibilidad de los pacientes que cursan con diabetes en descontrol glucémico y obesidad, a contraer infecciones como SARS-CoV-2¹¹⁷. A partir del año 2020, con el inicio de esta pandemia en México, se ha estimado que de los fallecimientos ocasionados por este virus, el 36.7% padecían diabetes y el 20.7% obesidad¹¹⁸.

Los pacientes con obesidad o diabetes tienen en común la posibilidad de cursar con RI, estado metabólico en el cual los signos y síntomas pueden ser reversibles a través de ajustes en el estilo de vida y la terapia farmacológica. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, el tratamiento farmacológico de primera elección es la metformina²⁰, la cual también ha mostrado efectividad terapéutica en la reducción

parcial de peso^{119,120} y en la mejora de la RI^{24,25}. En la práctica clínica se ha observado variabilidad interindividual en la respuesta a este fármaco, sin embargo, el conocimiento de los factores que contribuyen a la falla terapéutica de la metformina es escaso^{22,121}, principalmente en población latina. En estudios de farmacocinética llevados a cabo en población mexicana adulta se ha documentado el efecto de la PK sobre la variabilidad interindividual^{50,95}. En el presente trabajo analizamos la correlación genotipo - farmacocinética – respuesta, con el fin de elucidar los factores genéticos implicados en la variabilidad interindividual en la respuesta a la metformina en población mexicana.

En esta tesis se incluyeron 968 pacientes mestizos, de los cuáles 509 fueron diagnosticados con DT2 y de estos 199 se encontraban bajo tratamiento con metformina. Notablemente, uno de los resultados más alarmantes fue la proporción de individuos encontrados en descontrol glucémico (71.9%), en quienes los niveles séricos de colesterol total, también se hallaron significativamente más elevados. Esto último correlaciona con el hecho de que la metformina también incide sobre los valores de colesterol total en adultos mayores con diabetes¹²⁰. Estos hallazgos son un reflejo de la complejidad en el manejo de la DT2 a la cual se enfrenta el sistema de salud de nuestro país.

La identificación de variantes en el exoma realizada en este estudio, mostró 37 SNVs en los genes SLC transportadores de metformina, con al menos 1 % de frecuencia. El análisis de asociación genética reveló la implicación de tres SNVs con la alteración de la PK de la metformina o el descontrol glucémico. De hecho, algunas de estas SNVs raramente han sido abordadas o incluso, no se ha documentado su correlación con la respuesta, con la farmacocinética o con la función del transportador de metformina. Tal es el caso de las dos variantes intrónicas, rs622591 C>T localizada en *OCT1 (SLC22A1)* y rs117483482 G>A en *MATE2-K (SLC47A2)*. El alelo C de la SNV rs622591 mostró asociación con el riesgo a descontrol glucémico, lo cual pudiera ser explicado a través del estudio de farmacocinética. En éste se documentó que en pacientes con el genotipo homocigoto CC, los niveles plasmáticos de metformina son significativamente más

bajos que en los heterocigotos CT y que en los homocigotos TT, sugiriendo un efecto recesivo del alelo C. El transportador *OCT1 (SLC22A1)* media el ingreso de la metformina del intestino a la circulación portal, y de la vena porta al hígado, donde la metformina ejerce su mecanismo de acción. Nuestros hallazgos podrían ser el reflejo de la reducción en la absorción de la metformina a través del intestino, por la presencia del genotipo C en estado homocigoto. Así, el genotipo CC conllevaría a la disminución de la cantidad de metformina que inhibe la gluconeogénesis a nivel hepático. Esto cobra mayor relevancia por el hecho de que la metformina ejerce su mecanismo de acción de forma dosis dependiente. De tal forma que es posible que a concentraciones sub-farmacológicas, si bien exista inhibición de complejo I del transporte de electrones, ésta no alcance a mantenerse por el tiempo necesario para activar a la AMPK, y por tanto para inhibir la gluconeogénesis¹²². Esto también podría explicar la asociación de esta variante con muerte cardiovascular reportada previamente en pacientes tratados con metformina¹²³.

Con respecto a la SNV rs117483482 G>A de *MATE2-K (SLC47A2)*, asociada a descontrol glucémico, los ensayos *in silico* mostraron que esta variante se localiza en una región de *Enhancer de Splicing Exónico*. Éstas son secuencias cortas que se asocian a la unión del complejo proteico encargado de iniciar el proceso de corte y empalme¹²⁴. De acuerdo al análisis realizado en *Human Splicing Finder*⁹⁷, esta variante ocasiona un cambio en la secuencia de reconocimiento del complejo de corte y empalme que podría asociarse con la disminución en la respuesta a la metformina y resultar en el descontrol glucémico. Sin embargo, puesto que *MATE2-K (SLC47A2)* se expresa principalmente en riñón, serían necesarios estudios *in vitro* o *in vivo*, que complementen la información sobre el efecto de rs117483482 a nivel sistémico. Interesantemente, esta SNV se encontró diferencialmente distribuida en la población indígena siendo el grupo étnico otomí el de frecuencia más alta (9.7%) y el zapoteca el de frecuencia más baja (4.9 %). Aunado a esto, hasta donde sabemos este sería el primer reporte donde se describe a la variante rs117483482 asociada a la respuesta de la metformina.

El análisis de frecuencias alélicas en los transportadores de metformina SLCs, puso de manifiesto que las variantes con mayor distribución en población mexicana han sido raramente estudiadas a nivel global, reflejo de la subrepresentación de los estudios genómicos en poblaciones de origen Amerindio. Por el contrario, variantes profundamente estudiadas en otras poblaciones como rs12208357 de *OCT1* (*SLC22A1*), tienen una baja frecuencia en nuestra cohorte. El mejor ejemplo de este contraste es la variante L125F en *MATE1*, la cual a pesar de tener un efecto funcional descrito⁷⁶, fue poco estudiada debido a su baja distribución mundial (0.1%)¹⁰⁶. En nuestro estudio demostramos que la frecuencia de esta SNV en población abierta es decenas de veces mayor a la global. Aunado a esto, en este trabajo se reporta por primera vez, la existencia de portadores homocigotos (TT) para la variante de riesgo. En virtud de su distribución en nuestra población, nuestros resultados mostraron que la variante podría ser de origen amerindio. En este sentido, es importante resaltar que, según la base de datos del Proyecto 1000 Genomas, la distribución de la SNV tiene su mayor frecuencia en los mexicanos de los Ángeles (13.9 %), seguida por los peruanos (8%) y los colombianos (5%).

Por otra parte, a la fecha aún existe controversia sobre si la metformina contribuye o no a la acidosis láctica, sin embargo, en la extensa mayoría de los estudios que lo discuten, no se ha considerado a la genética como factor de susceptibilidad. En esta tesis, el análisis de asociación al riesgo de hiperlactatemia, mostró que existe diferencia significativa entre los individuos que toman metformina y los que no. Adicionalmente, el estudio de farmacocinética sugiere que la acumulación de metformina plasmática es reflejo de la disminución en la eliminación del fármaco en individuos con la variante L125F de *MATE1* (*SLC47A1*). Esto apoya la hipótesis previamente sugerida por Toyama K., y cols., y Chen Y., y cols., con base en estudios en ratones *knock out* y líneas celulares⁷⁶. Hasta donde sabemos el presente trabajo representa el primer reporte donde se incluyen individuos homocigotos para rs77474263 de *MATE1* y se demuestra el efecto de la metformina sobre la concentración de lactato de acuerdo al genotipo de la SNV¹⁰⁷. Con el fin de profundizar en el impacto de esta variante sobre la proteína, nosotros llevamos a cabo un análisis de dinámica molecular *in silico*, el cuál demostró que la variante

promueve la acumulación plasmática de metformina, a través de la disminución de la permeabilidad del canal. El aminoácido nativo leucina, interactúa con aminoácidos vecinos como 256 Trp o 260 Leu, ambos ubicados en la hélice transmembranal TM-7, un componente clave para la estructura de la cavidad¹²⁵. Los ensayos realizados sugieren que la sustitución del aminoácido aromático fenilalanina modifica estas interacciones, alterando la conformación del transportador y reduciendo el radio de la cavidad interna. Esto se corroboró con la caracterización de la permeación de agua, que mostró una disminución en el radio de distribución del solvente. Nuestros hallazgos sugieren que el mecanismo por el cual la variante L125F afecta la permeabilidad de MATE1 es alterando la interacción entre TM-3 y TM-7. Sin embargo, estudios funcionales y evaluaciones de metformina en orina ayudarían a confirmar esta hipótesis.

El análisis de fenotipos extremos mostró que las alteraciones en la PK de la metformina además, pueden deberse al daño renal establecido por el inicio temprano de la diabetes y sus complicaciones. No obstante, este análisis mostró la importancia de contar con el exoma de pacientes de fenotipo extremo, pues permitió la identificación de la variante P59S del gen *GCK*, asociada a fenotipo MODY 2, en pacientes previamente diagnosticados con DT2. Hasta donde sabemos, esta SNV únicamente ha sido descrita en población italiana^{108,109} y japonesa¹¹⁰. En esta tesis presentamos los resultados de dos hermanos de fenotipo extremo que representarían el primer reporte de caso de diabetes MODY tipo 2 descrito en población mexicana.

Dentro de las consideraciones para mejorar nuestro estudio estarían analizar otras variables de confusión que también modifican la respuesta, como lo son la dieta y la actividad física, así como incrementar el tamaño de las cohortes. Lo anterior cobra mayor importancia dado que la metformina además de ser usada para el control de obesidad y diabetes tipo 2, es utilizada para mejorar la resistencia a la insulina en ovario poliquístico y como coadyuvante en la reducción de la proliferación celular, en algunos tipos de cánceres. Entonces, a mayor número de implicaciones médicas, estarían en riesgo de acidosis láctica, un número más grande de personas.

CONCLUSIONES

Existe una asociación entre la variación genética y la respuesta a fármacos. Así, la representación de poblaciones latinas en los estudios de farmacogenómica de las enfermedades metabólicas resulta fundamental para comprender cómo los individuos con ancestría amerindia responden a terapias farmacológicas como la metformina. Este hecho impacta directamente en la salud pública dada la alta susceptibilidad que estas poblaciones tienen para desarrollar enfermedades metabólicas, y de las diversas aplicaciones terapéuticas que tiene el fármaco. En este trabajo, se identifican variantes en genes de las familias SLC que se encuentran asociadas con descontrol glucémico o con alteración de la farmacocinética en la población mexicana. Una de estas variantes, la L125F, mostró un impacto importante en la eliminación del fármaco que conduce a la presencia de hiperlactatemia en los pacientes. Notablemente, su frecuencia es mayor en población mexicana que en otras poblaciones, y aún más en población de origen maya, lo que sugiere que esta SNV es de origen amerindio.

Así, incluir a la farmacocinética como el vínculo entre la genómica y la respuesta a la metformina, puede enriquecer a la medicina de precisión al refinar los algoritmos de tratamiento a través de los ajustes de dosis, del monitoreo de los efectos adversos en individuos susceptibles o incluso la sustitución por alternativas terapéuticas más efectivas. La presente tesis sienta las bases para la creación de un catálogo de variantes implicadas en la farmacogenética de los medicamentos y para la implementación de los algoritmos de utilidad en la medicina de precisión en población mexicana tratada con metformina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017;389(10085):2239-2251. doi:10.1016/S0140-6736(17)30058-2
2. Teresa Shamah Levy, Lucía Cuevas Nasu, Martín Romero Martínez, Elsa Berenice Gaona Pineda, Luz María Gómez Acosta, Laura Rosario Mendoza Alvarado, Ignacio Méndez Gómez Humarán JRD. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19.*; 2020.
3. Federación Internacional de Diabetes. *Atlas de La Diabetes de La FID. Actualización.*; 2019. http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf.
4. Vaamonde JG, Álvarez-Món MA. Obesidad y sobrepeso. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. doi:10.1016/j.med.2020.07.010
5. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(July):1-23. doi:10.1038/nrdp.2015.19
6. Salud SDE. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. *D la Fed*. 2011.
7. Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-reyes JA. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina : Una Actualización. *Gac Med Mex*. 2017;153:214-228.
8. Habegger KM, Hoffman NJ, Ridenour CM, Brozinick JT, Elmendorf JS. AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol. *Endocrinology*. 2012;153(5):2130-2141. doi:10.1210/en.2011-2099
9. Rice S, Pellatt LJ, Bryan SJ, Whitehead SA, Mason HD. Action of Metformin on the Insulin-Signaling Pathway and on Glucose Transport in Human Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(May):427-435. doi:10.1210/jc.2010-2060
10. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288-298. doi:10.1038/s41574-019-0176-8
11. Pierlot R, Cuevas-Romero E, Rodríguez-Antolín J, Méndez-Hernández P,

- Martínez-Gómez M. Prevalencia De Síndrome Metabólico En Niños Y Adolescentes De América. *Tip.* 2017;20(1):40-49. doi:10.1016/j.recqb.2016.11.004
12. Mercader JM, Florez JC. The Genetic Basis of Type 2 Diabetes in Hispanics and Latin Americans: Challenges and Opportunities. *Front Public Heal.* 2017;5(December):1-7. doi:10.3389/fpubh.2017.00329
 13. Mendoza-Caamal EC, Barajas-Olmos F, García-Ortiz H, et al. Metabolic syndrome in indigenous communities in Mexico: A descriptive and cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2020;20(339):1-8. doi:10.1186/s12889-020-8378-5
 14. The SIGMA (Slim Initiative in Genomic Medicine for the Americas) Type 2 Diabetes Consortium, Williams AL, Jacobs SB, et al. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature.* 2014;506(7486):97-101. doi:10.1038/nature12828.Sequence
 15. Rusu V, Hoch E, Mercader JM, et al. Type 2 Diabetes Variants Disrupt Function of SLC16A11 through Two Distinct Mechanisms. *Cell.* 2017;170(1):199-212.e20. doi:10.1016/j.cell.2017.06.011
 16. Consortium T2D. Association of a Low-Frequency Variant in HNF1A With Type 2 Diabetes in a Latino Population. *JAMA.* 2014;22(311):2305-2314. doi:10.1001/jama.2014.6511.Association
 17. Mercader JM, Liao RG, Bell AD, et al. A loss-of-function splice acceptor variant in *igf2* is protective for type 2 diabetes. *Diabetes.* 2017;66(11):2903-2914. doi:10.2337/db17-0187
 18. Padhi S, Nayak AK, Behera A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110708. doi:10.1016/j.biopha.2020.110708
 19. Rojas Graciela. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. 2016;2016(Ensanut):1-154.
 20. Salud México S de. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2 2010 Para la prevención, tratamiento y control de la Diabetes. *D Of la Fed.* 2010;2:40. www.ssa.gob.mx.

21. Graham GG, Punt J, Arora M, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(2):81-98. doi:10.2165/11534750-000000000-00000
22. Nichols GA, Conner C, Brown JB. Initial nonadherence, primary failure and therapeutic success of metformin monotherapy in clinical practice. *Curr Med Res Opin*. 2010;26(9):2127-2135. doi:10.1185/03007995.2010.504396
23. Dehesa-López E, Hernández-Quintero DA, Peña-Peredia HG, Salas-Zazueta RR, Tamayo-García B, Rochin-Terán JL. Un caso raro de acidosis láctica persistente. *Med interna Méx*. 2017;33(3):415-420. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-48662017000300415.
24. Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I, Purcărea VL, Hudita D. Metformin-clinical pharmacology in PCOs. *J Med Life*. 2015;8(2):187-192.
25. Romero R, Erez O, Hüttemann M, et al. Metformin, the aspirin of the 21st century: its role in gestational diabetes mellitus, prevention of preeclampsia and cancer, and the promotion of longevity. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;217(3):282-302. doi:10.1016/j.ajog.2017.06.003
26. Tripathi R, Tyagi S, Goel V. Metformin in gestational diabetes mellitus. *Indian J Med Res*. 2017;145(May):588-591. doi:10.4103/ijmr.IJMR_1572_16
27. Kasznicki J, Sliwinska A, Drzewoski J. Metformin in cancer prevention and therapy. *Ann Transl Med*. 2014;2(6):1-11. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.06.01
28. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(3):143-156. doi:10.1038/nrendo.2013.256
29. Saraei P, Asadi I, Kakar MA, Moradi-Kor N. The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: A comprehensive review of recent advances. *Cancer Manag Res*. 2019;11:3295-3313. doi:10.2147/CMAR.S200059
30. Luengo A, Sullivan LB, Heiden MG Vander. Understanding the complex-ty of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy.

BMC Biol. 2014;12(1):82. doi:10.1186/s12915-014-0082-4

31. An H, He L. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J Endocrinol.* 2016;228(3):R97-R106. doi:10.1530/JOE-15-0447
32. Hur KY, Lee M, Lee M. New mechanisms of metformin action : Focusing on mitochondria and the gut. *J Diabetes Investig.* 2015;6(6):600-609. doi:10.1111/jdi.12328
33. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature.* 2014;510(7506):542-546. doi:10.1038/nature13270
34. Madiraju AK, Qiu Y, Perry RJ, et al. Metformin Inhibits Gluconeogenesis by a Redox-Dependent Mechanism In Vivo. *Nat Med.* 2019;24(9):1384-1394. doi:10.1038/s41591-018-0125-4.Metformin
35. Tulane University. Oral hypoglycemic drugs [TUSOM _ Pharmwiki]. TMedWeb.
36. Blumenberg A, Benabbas R, Sinert R, Jeng A, Wiener SW. Do Patients Die with or from Metformin-Associated Lactic Acidosis (MALA)? Systematic Review and Meta-analysis of pH and Lactate as Predictors of Mortality in MALA. *J Med Toxicol.* 2020;16(2):222-229. doi:10.1007/s13181-019-00755-6
37. Carrillo E, Sosa J. Acidosis láctica por metformina. *Med interna Méx.* 2010;26(3):276-280.
38. Sánchez-Díaz JS, Monares-Zepeda E, Martínez-Rodríguez EA, et al. Metformin-related lactic acidosis: Case report. *Colomb J Anesthesiol.* 2017;45(4):353-359. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rcae.2017.08.010>.
39. Stang M, Wysowsky DK, Butler-Jones D. Incidence of Lactic Acidosis in Metformin Users. *Heal (San Fr.* 1999;22(6):1998-2000.
40. Defronzo R, Fleming GA, Chen K, Bicsak TA. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolism.* 2016;65(2):20-29. doi:10.1016/j.metabol.2015.10.014
41. Boucaud-Maitre D, Ropers J, Porokhov B, et al. Lactic acidosis: relationship between metformin levels, lactate concentration and mortality. *Diabet Med.*

- 2016;33(11):1536-1543. doi:10.1111/dme.13098
42. Deden LN, Aarts EO, Aelfers SCW, et al. Risk of Metformin-Associated Lactic Acidosis (MALA) in Patients After Gastric Bypass Surgery. *Obes Surg.* 2018;28(4):1080-1085. doi:10.1007/s11695-017-2974-1
 43. Ángeles-Velázquez J, García-González A, Díaz-Greene E, Rodríguez-Weber F. Índices estáticos y dinámicos de la hiperlactatemia. *Med interna Méx.* 2016;32(2):225-231.
 44. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE, Li Gong, Srijib Goswamic, Kathleen M. Giacomini, Russ B. Altman, b and TEK. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(11):820-827. doi:10.1097/FPC.0b013e3283559b22.Metformin
 45. Florez JC. The pharmacogenetics of metformin. *Diabetologia.* 2017;60(9):1648-1655. doi:10.1007/s00125-017-4335-y.
 46. Nakamichi N, Shima H, Asano S, et al. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in gastrointestinal absorption of metformin. *J Pharm Sci.* 2013;102(9):3407-3417. doi:10.1002/jps.23595
 47. Liang X, Chien H, Yee SW, et al. Metformin Is a Substrate and Inhibitor of the Human Thiamine Transporter, THTR-2 (SLC19A3). *Mol Pharmacol.* 2016;12(12):4301-4310. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00501.Five
 48. Toyama K, Yonezawa A, Masuda S, et al. Loss of multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) is associated with metformin-induced lactic acidosis. *Br J Pharmacol.* 2012;166(3):1183-1191. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01853.x
 49. Stage TB, Brøsen K, Christensen MMH. A Comprehensive Review of Drug–Drug Interactions with Metformin. *Clin Pharmacokinet.* 2015;54(8):811-824. doi:10.1007/s40262-015-0270-6
 50. Garduño, L. M. B, Salvador JCN, Olguín HJ, Goytia GL, Portugal MC, Murrieta FF. Population pharmacokinetics of metformin in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Pharmacol.* 2015;11(6):632-637. doi:10.3923/ijp.2015.632.637
 51. Li L, Guan Z, Li R, et al. Population pharmacokinetics and dosing optimization

- of metformin in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(46):e23212. doi:10.1097/MD.00000000000023212
52. Tzvetkov M V, Vormfelde S V, Balen D, et al. The Effects of Genetic Polymorphisms in the Organic Cation Transporters OCT1 , OCT2 , and OCT3 on the Renal Clearance of Metformin. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;86(3):299-306. doi:10.1038/clpt.2009.92
 53. Shu Y, Sheardown S a S, Brown C, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1422-1431. doi:10.1172/JCI30558.
 54. Christensen MMH, Brasch-andersen C, Green H, et al. The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21:837-850. doi:10.1097/FPC.0b013e32834c0010
 55. Costa V, Federico A, Pollastro C, et al. Computational Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Altered Drug Responsiveness in Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1-14. doi:10.3390/ijms17071008
 56. Santoro AB, Botton MR, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Influence of pharmacogenetic polymorphisms and demographic variables on metformin pharmacokinetics in an admixed Brazilian cohort. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(5):987-996. doi:10.1111/bcp.13522
 57. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 on metformin action. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1422-1431. doi:10.1172/JCI30558
 58. Shu Y, Brown C, Castro RA, et al. Effect of Genetic Variation in the Organic Cation Transporter 1, OCT1, on Metformin Pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(2):273-280. doi:10.1038/sj.clpt.6100275.
 59. Shikata E, Yamamoto R, Takane H, et al. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *J Hum Genet*. 2007;52(2):117-122. doi:10.1007/s10038-006-0087-0
 60. Klen J, Goričar K, Janež A, Dolžan V. The role of genetic factors and kidney and liver function in glycemic control in type 2 diabetes patients on long-term

- metformin and sulphonylurea cotreatment. *Biomed Res Int.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/934729
61. Zhou Y, Ye W, Wang Y, et al. Genetic variants of OCT1 influence glycemic response to metformin in Han Chinese patients with type-2 diabetes mellitus in Shanghai. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8):9533-9542.
 62. Becker ML, Visser LE, van Schaik RHN, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BHC. Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes mellitus. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(4):242-247. doi:10.1038/tpj.2009.15
 63. Ebid A-HIM, Ehab M, Ismail A, Soror S, Mahmoud MA. The influence of SLC22A1 rs622342 and ABCC8 rs757110 genetic variants on the efficacy of metformin and glimepiride combination therapy in Egyptian patients with type 2 diabetes. *J Drug Assess.* 2019;8(1):115-121. doi:10.1080/21556660.2019.1619571
 64. Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, et al. Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5896-5901. doi:10.1073/pnas.0730857100
 65. Kang HJ, Song IS, Ho JS, et al. Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters in a Korean population. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(4):667-675. doi:10.1124/dmd.106.013581
 66. Song IS, Shin HJ, Shin JG. Genetic variants of organic cation transporter 2 (OCT2) significantly reduce metformin uptake in oocytes. *Xenobiotica.* 2008;38(9):1252-1262. doi:10.1080/00498250802130039
 67. Wang ZJ, Yin OQP, Tomlinson B, Chow MSS. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: Studies with metformin and cimetidine. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(7):637-645. doi:10.1097/FPC.0b013e328302cd41
 68. Chen Y, Li S, Brown C, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 2 on the renal elimination of metformin. *Pharmacogenet*

- Genomics*. 2009;19(7):497-504. doi:10.1097/FPC.0b013e32832cc7e9
69. Christensen MMH, Pedersen RS, Stage TB, et al. A gene-gene interaction between polymorphisms in the OCT2 and MATE1 genes influences the renal clearance of metformin. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(10):526-534. doi:10.1097/FPC.0b013e328364a57d
70. Sajib AA, Islam T, Paul N, Yeasmin S. Interaction of rs316019 variants of SLC22A2 with metformin and other drugs- an in silico analysis. *J Genet Eng Biotechnol*. 2018;16(2):769-775. doi:10.1016/j.jgeb.2018.01.003
71. Becker ML, Visser LE, Van Schaik RHN, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BHC. Genetic variation in the multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein influences the glucose-lowering effect of metformin in patients with diabetes: A preliminary study. *Diabetes*. 2009;58(3):745-749. doi:10.2337/db08-1028
72. Tkáč I, Klimčáková L, Javorský M, et al. Pharmacogenomic association between a variant in SLC47A1 gene and therapeutic response to metformin in type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab*. 2013;15(2):189-191. doi:10.1111/j.1463-1326.2012.01691.x
73. Xiao D, Guo Y, Li X, et al. The Impacts of SLC22A1 rs594709 and SLC47A1 rs2289669 Polymorphisms on Metformin Therapeutic Efficacy in Chinese Type 2 Diabetes Patients. *Int J Endocrinol*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/4350712
74. Mousavi S, Kohan L, Yavarian M, Habib A. Pharmacogenetic variation of SLC47A1 gene and metformin response in type2 diabetes patients. *Mol Biol Res Commun*. 2017;6(2):91-94.
75. Stocker SL, Morrisey K, Yee SW, et al. The effect of novel promoter variants in MATE1 and MATE2 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;93(2):186-194. doi:10.1038/clpt.2012.210.
76. Chen Y, Teranishi K, Li S, et al. Genetic variants in multidrug and toxic compound extrusion-1, hMATE1, alter transport function. *Pharmacogenomics J*. 2009;9(2):127-136. doi:10.1038/tpj.2008.19

77. Choi J, Yee SW, Ramirez A, et al. A common 5'UTR in MATE2-K is associated with poor response to metformin. 2012;90(5):674-684. doi:10.1038/clpt.2011.165.
78. Dujic T, Zhou K, Yee SW, et al. Variants in Pharmacokinetic Transporters and Glycemic Response to Metformin: A Metgen Meta-Analysis. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(6):763-772. doi:10.1002/cpt.567
79. Tarasova L, Kalnina I, Geldnere K, et al. Association of genetic variation in the organic cation transporters OCT1, OCT2 and multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein genes with the gastrointestinal side effects and lower BMI in metformin-treated type 2 diabetes patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(9):659-666. doi:10.1097/FPC.0b013e3283561666
80. Jablonski KA, McAteer JB, De Bakker PIW, et al. Common variants in 40 genes assessed for diabetes incidence and response to metformin and lifestyle intervention in the diabetes prevention program. *Diabetes.* 2010;59(10):2672-2681. doi:10.2337/db10-0543
81. Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, et al. Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(2):135-138. doi:10.1097/FPC.0b013e328335639f
82. Yang P, Nicolás JC, Galván CA, et al. Efectividad de la metformina en pacientes con diabetes tipo II según variantes en el gen SLC22A1. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* 2014;48(2):229-235.
83. Nebert DW. Extreme discordant phenotype methodology: An intuitive approach to clinical pharmacogenetics. *Eur J Pharmacol.* 2000;410(2-3):107-120. doi:10.1016/S0014-2999(00)00809-8
84. Reséndiz-Abarca CA, Flores-Alfaro E, Suárez-Sánchez F, et al. Altered Glycemic Control Associated With Polymorphisms in the SLC22A1 (OCT1) Gene in a Mexican Population With Type 2 Diabetes Mellitus Treated With Metformin: A Cohort Study. *J Clin Pharmacol.* 2019;59(10):1384-1390. doi:10.1002/jcph.1425
85. Marta M, Sánchez-Pozos K, Jaimes-Santoyo J, et al. Pharmacogenetic

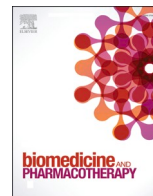
- Evaluation of Metformin and Sulphonylurea Response in Mexican Mestizos with Type 2 Diabetes. *Curr Drug Metab.* 2020;21(4):291-300. doi:10.2174/1389200221666200514125443
86. Gonzalez-Covarrubias V, Sánchez-Ibarra H, Lozano-Gonzalez K, et al. Transporters, TBC1D4, and ARID5B Variants to Explain Glycated Hemoglobin Variability in Patients with Type 2 Diabetes. *Pharmacology.* 2021;106(11-12):588-596. doi:10.1159/000517462
 87. Cid-Soto MA, Martínez-Hernández A, García-Ortíz H, et al. Gene variants in AKT1, GCKR and SOCS3 are differentially associated with metabolic traits in Mexican Amerindians and Mestizos. *Gene.* 2018;679:160-171. doi:10.1016/j.gene.2018.08.076
 88. Contreras-Cubas C, Sánchez-Hernández BE, García-Ortiz H, et al. Heterogenous distribution of MTHFR gene variants among mestizos and diverse amerindian groups from Mexico. *PLoS One.* 2016;11(9):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0163248
 89. Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, Dabelea D, et al. Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002–2012. *N Engl J Med.* 2017;376(15):1419-1429. doi:10.1056/NEJMoa1610187
 90. Velázquez O, Lara A, Tapia R. Metformina y síndrome metabólico.
 91. Gormsen LC, Sundelin EI, Jensen JB, et al. In Vivo Imaging of Human ¹¹C-Metformin in Peripheral Organs: Dosimetry, Biodistribution, and Kinetic Analyses. *J Nucl Med.* 2016;57(12):1920-1926. doi:10.2967/jnumed.116.177774
 92. GTEx Project. GTEx portal. *GTEx Anal Release V6p (dbGaP Access phs000424.v6.p1).* 2017.
 93. Diabetes FI de. *Atlas de La Diabetes de La FID.*; 2015. doi:2-930229-80-2
 94. Navani S. The human protein atlas. *J Obstet Gynecol India.* 2011;61(1):27-31. doi:10.1007/s13224-011-0013-z
 95. Alemón-Medina R, Chávez-Pacheco JL, Rivera-Espinosa L, et al. Extemporaneous Formulations of Metformin for Pediatric Endocrinology: Physicochemical Integrity, Cytotoxicity of Sweeteners, and Quantitation of

- Plasma Levels. *Clin Ther.* 2015;37(8):1689-1702. doi:10.1016/j.clinthera.2015.05.502
96. McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016:1-14. doi:10.1186/s13059-016-0974-4
 97. Hamroun D, Lalande M. Human Splicing Finder : an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):1-14. doi:10.1093/nar/gkp215
 98. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 2015;12(1):7-8. doi:10.1038/nmeth.3213
 99. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33-38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
 100. Brooks BR, Brooks C., Mackerell AD, et al. CHARMM: Molecular dynamics simulation package. *J Comput Chem.* 2009;30(10):1545-1614. doi:10.1002/jcc.21287.
 101. Phillips JC, Braun R, Wang W, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem.* 2005;26(16):1781-1802. doi:10.1002/jcc.20289
 102. Pedretti A, Villa L, Vistoli G. VEGA: A versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. *J Mol Graph Model.* 2002;21(1):47-49. doi:10.1016/S1093-3263(02)00123-7
 103. Pedretti A, Villa L, Vistoli G. VEGA - An open platform to develop chemo-bioinformatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aided Mol Des.* 2004;18(3):167-173. doi:10.1023/B:JCAM.0000035186.90683.f2
 104. Zhang X, Wright SH. MATE1 has an external COOH terminus, consistent with a 13-helix topology. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2009;297(2). doi:10.1152/ajprenal.00123.2009
 105. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33-38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
 106. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance

- across human protein-coding genes. *bioRxiv*. 2019:531210. doi:10.1101/531210
107. Morales-Rivera MI, Alemón-Medina R, Martínez-Hernández A, et al. The L125F MATE1 variant enriched in populations of Amerindian origin is associated with increased plasma levels of metformin and lactate. *Biomed Pharmacother*. 2021;142(July):1-7. doi:10.1016/j.biopha.2021.112009
 108. Delvecchio M, Ludovico O, Bellacchio E, et al. MODY type 2 P59S GCK mutant: Founder effect in South of Italy. *Clin Genet*. 2013;83(1):83-87. doi:10.1111/j.1399-0004.2012.01856.x
 109. Ludovico O, Carella M, Bisceglia L, et al. Identification and Clinical Characterization of Adult Patients with Multigenerational Diabetes Mellitus. *PLoS One*. 2015;10(8):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0135855
 110. Kawakita R, Hosokawa Y, Fujimaru R, et al. Molecular and clinical characterization of glucokinase maturity-onset diabetes of the young (GCK-MODY) in Japanese patients. *Diabet Med*. 2014;31(11):1357-1362. doi:10.1111/dme.12487
 111. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. *Ensanut*. 2018;1:47. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 112. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004;25(1):4-7. doi:10.1016/j.it.2003.10.013
 113. Golay A, Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19(4):649-663. doi:10.1016/j.beem.2005.07.010
 114. Haslam D. Obesity and diabetes: The links and common approaches. *Prim Care Diabetes*. 2010;4(2):105-112. doi:10.1016/j.pcd.2010.04.002
 115. Basto-Abreu A, López-Olmedo N, Rojas-Martínez R, et al. Prevalence of diabetes and glycemic control in Mexico: national results from 2018 and 2020. *Salud Publica Mex*. 2021;63(6):725-733. doi:10.21149/12842
 116. CDC. Póngale el freno a las complicaciones de la diabetes. Cdc.gov. <https://www.cdc.gov/diabetes/spanish/resources/features/prevent-complications.html>. Published 2021.

117. Alonso N, Batule S. COVID-19 y diabetes mellitus. Importancia del control glucémico COVID-19. *Clin e Investig en Arteriosclerosis*. 2021;33(January):148-150. doi:doi.org/10.1016/j.arteri.2021.05.001
118. COVID-19 Tablero México - CONACYT. <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>. Published 2022.
119. Rodríguez-Moctezuma J, Robles-López G, López-Carmona J, Gutiérrez-Rosasa M. Effects of metformin on the body composition in subjects with risk factors for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2006;8(2):136-145. doi:10.1111/j.1463
120. Solymár M, Ivic I, Pótó L, et al. Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels in the elderly – A meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(11):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0207947
121. Rashid M, Shahzad M, Mahmood S, Khan K. Variability in the therapeutic response of metformin treatment in patients with type 2 diabetes mellitus. *Pakistan J Med Sci*. 2019;35(1):71-76. doi:10.12669/pjms.35.1.100
122. He L, Wondisford FE. Metformin action: Concentrations matter. *Cell Metab*. 2015;21(2):159-162. doi:10.1016/j.cmet.2015.01.003
123. Schweighofer N, Genser B, Maerz W, et al. Intronic variants in OCT1 are associated with all-cause and cardiovascular mortality in metformin users with type 2 diabetes. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2020;13:2069-2080. doi:10.2147/DMSO.S235663
124. Blencowe BJ. Exonic splicing enhancers: Mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(3):106-110. doi:10.1016/S0968-0004(00)01549-8
125. Kusakizako T, Miyauchi H, Ishitani R, Nureki O. Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2020;1862(12):183154. doi:10.1016/j.bbamem.2019.183154

ANEXO: ARTÍCULO DE REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DE GRADO



The L125F MATE1 variant enriched in populations of Amerindian origin is associated with increased plasma levels of metformin and lactate

Monserrat I. Morales-Rivera^{a,b}, Radamés Alemón-Medina^c, Angélica Martínez-Hernández^a, Josefina Gómez-Garduño^c, Elaheh Mirzaeicheshmeh^a, Nelly F. Altamirano-Bustamante^d, Ian Ilizaliturri-Flores^e, Elvia C. Mendoza-Caamal^a, María G. Pérez-Guillé^c, Raquel García-Álvarez^c, Cecilia Contreras-Cubas^a, Federico Centeno-Cruz^a, Cristina Revilla-Monsalve^f, Humberto García-Ortiz^a, Francisco Barajas-Olmos^a, Lorena Orozco^{a,*}

^a Immunogenomics and Metabolic Diseases Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, SSA, CDMX, Mexico

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico

^c Pharmacology Laboratory, Instituto Nacional de Pediatría, SSA, CDMX, Mexico

^d Endocrinology Department, Instituto Nacional de Pediatría, SSA, CDMX, Mexico

^e Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, IPN, Hidalgo, Mexico

^f Medical Research Unit in Metabolic Diseases, UMAE Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Metformin
Pharmacogenetics
MATE1
SLC
Adverse effect
Lactate

ABSTRACT

Genetic factors that affect variability in metformin response have been poorly studied in the Latin American population, despite its being the initial drug therapy for type 2 diabetes, one of the most prevalent diseases in that region. Metformin pharmacokinetics is carried out by members of the membrane transporters superfamily (SLCs), being the multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1), one of the most studied. Some genetic variants in *MATE1* have been associated with reduced *in vitro* metformin transport. They include rs77474263 p. [L125F], a variant present at a frequency of 13.8% in Latin Americans, but rare worldwide (less than 1%). Using exome sequence data and TaqMan genotyping, we revealed that the Mexican population has the highest frequency of this variant: 16% in Mestizos and 27% in Amerindians, suggesting a possible Amerindian origin. To elucidate the metformin pharmacogenetics, a children cohort was genotyped, allowing us to describe, for the first time, a *MATE1* rs77474263 TT homozygous individual. An additive effect of the L125F variant was observed on blood metformin accumulation, revealing the highest metformin and lactate serum levels in the TT homozygote, and intermediate metformin values in the heterozygotes. Moreover, a molecular dynamics analysis suggested that the genetic variant effect on metformin efflux could be due to a decreased protein permeability. We conclude that pharmacogenetics could be useful in enhancing metformin pharmacovigilance in populations having a high frequency of the risk genotype, especially considering that these populations also have a higher susceptibility to the diseases for which metformin is the first-choice drug.

1. Introduction

Metformin is an antihyperglycemic drug used by nearly 150 million people each year [1]. It is the first-choice treatment for type 2 diabetes (T2D) [2], but is also used to treat obesity, insulin resistance, and polycystic ovary syndrome as well as for cancer prevention [3].

Inter-individual variability in metformin response has been described [4,5], and patients can be classified as responders or non-responders according to their decrease in glycosylated hemoglobin (HbA1c) [6]. In addressing this difference, diverse pharmacogenetic studies have focused on the solute carrier superfamily (SLC) members that are involved in metformin transport and drug response [7–11]. Most of

* Correspondence to: Immunogenomics and Metabolic Diseases Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, SSA, Periférico Sur No. 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, 14610 Mexico, Mexico.

E-mail address: lorozco@inmegen.gob.mx (L. Orozco).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2021.112009>

Received 12 June 2021; Received in revised form 26 July 2021; Accepted 2 August 2021

0753-3322/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

these studies have been carried out in Asian and Caucasian populations [6,8,12–16], with just a few including Latin Americans [17–20]. The pioneering study by Chen *et al.* in 2009 identified variants in the *SLC47A1* gene, which encodes multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) protein, in ethnically diverse individuals [17]. Interestingly, a non-synonymous variant (*MATE1* rs77474263C>T), a leucine to phenylalanine change at amino acid residue 125 p.[L125F], was present in 5.1% of Mexican Americans and almost absent in the other populations. This finding is supported by the Genome Aggregation Database (gnomAD) [21] and 1000 Genomes Project browser [22], which report allele frequencies for this variant of 13.8% and 6.3%, respectively. L125F reduces MATE1 transporter function *in vitro* [17], and in *knockout mate1^{-/-}* mice both metformin and plasma lactate concentrations are significantly increased with respect to those in the heterozygous and wild-type mice [23,24]. Notably, the risk conferred by the effect of L125F on metformin pharmacokinetics in humans is still unclear [23]. Despite the relevance of metformin in metabolic diseases, pharmacogenetic studies of the L125F have been scarce. Based on these prior results, we investigated the distribution of the MATE1 L125F variant in Mexican Amerindian and Mestizo groups. To gain more insight into the effect of this single nucleotide variant (SNV), we determined its impact on metformin pharmacokinetics (PK) and lactatemia levels. We also performed molecular dynamics analysis and a water permeability *in silico* characterization of the native and L125F variant structures of MATE1.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The discovery population consisted of 1420 non-related adults, including 968 Mestizos (MEZ) belonging to the SIGMA DMS1 [25] cohort and included in the gnomAD database [21], and 452 Mexican Amerindians (MA) belonging to the Metabolic Analysis in an Indigenous Sample (MAIS) cohort [26]. The most representative indigenous groups, such as Tarahumara, Náhuatl, Otomí, Zapoteca, and Maya, were considered because of their population density. Thirty children and adolescents (PED) diagnosed with obesity or T2D, who were candidates for or receiving treatment with metformin, were recruited by the Endocrinology Service from National Institute for Pediatrics (INP), Mexican Ministry of Health, to evaluate the genotypic effects on lactate and metformin plasma concentrations. The medical record of patients showed no evidence of liver or kidney disease.

This study was carried out with strict adherence to the ethical principles enunciated in the Declaration of Helsinki and to the CONSORT guidelines, <http://www.consort-statement.org/consort-2010>. All participants provided informed written consent. In the case of children, the parents provided written consent and the children assented. Local ethics and research committees from participant Institutions approved this study bringing following register numbers Research Committee (17CI09003109), Ethics Committee (CONBIOETICA-09-CEI-025–20161215) and Biosafety Committee (17CB09003143), the international registration number is IRB00008064.

2.2. Genotyping

The stored MA and MEZ DNA and new PED DNA samples were all obtained from whole peripheral blood, using a Gentra Puregene Blood Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The SNV rs77474263, *SLC47A1* c.[373 C>T], MATE1 p.[L125F] was genotyped by allelic discrimination by use of a TaqMan SNP genotyping assay on a QuantStudio 3 Real-Time PCR System AB (Thermo Fisher Scientific) in the MA and PED populations. In the MEZ population, the SNV genotype was obtained from exome data previously sequenced and deposited at the gnomAD project [25].

2.3. Pharmacokinetic profiles

Fasting PED individuals were administered a single 500-mg dose of commercial metformin (GLUCOPHAGE, Merck, Darmstadt, Germany). Dried blood-spot samples were obtained from dactylar puncture on Whatman 903 filter paper discs, at 0, 1.5 or 2, 3 or 4, 8, 12, and 24 h. Participants had lunch 2–3 h after study onset, or before if necessary. Individuals who did not complete at least three blood determinations were considered only for genotyping. Metformin concentration was determined by use of a previously standardized method [27] using ultra-high performance liquid chromatography (Acquity; Waters, Milford, Massachusetts) and mass spectrometry. Extraction was made by direct precipitation with acetonitrile (PubChem CID 6342) and methanol (PubChem CID 887). Mobile phase characteristics were as follows: 5 mM ammonium acetate (PubChem CID 517165) and acetonitrile (80:20; v/v), 0.25 mL/min, with isocratic elution. Pharmacokinetics were determined using WinNonlin Pro v3.1 software. A calibration curve was constructed using stock metformin solution (PubChem CID 14219) (1 mg/mL) at different dilutions (20, 40, 60, 80, 100, and 200 ng/mL) and quality-control points (30, 70, and 150 ng/mL). The external standard was ranitidine (1 mg/mL).

2.4. Lactate determinations

PED lactate levels were obtained from peripheral blood from the same dactylar puncture, at 0 and 2 h after oral intake of a single 500-mg dose of metformin, using an Accutrend Plus metering device (Roche Products, Roche Diagnostics Division, United Kingdom). Because lactate levels may change if fasting is disrupted, patients who needed feeding before the second lactate determination were considered only for genotyping or PK profiles.

2.5. Molecular dynamics

MATE1 protein sequence was obtained from the Universal Protein Resource (Uniprot; identifier Q96FL8). Residues from 29 to 470 were considered for diverse analyses and modeling, based on prior studies of the structure finding that the first 12 transmembrane helices constitute the transporter's functional core [28]. The sequence was used to model the 3D structure through the I-TASSER server [29] which, along with the molecular visualization program VMD v.1.9 [30], allowed us to predict the structure of the variant protein p.[L125F]. Next, molecular dynamics simulations of the native and variant proteins with explicit representation of the atoms of proteins, the phospholipid bilayer membrane, water, and ions, were carried out. For force-field simulation, the Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics program (CHARMM v.40) [31] was used, and periodic limit conditions, the particle-mesh Ewald method, a time step of 2 ps, and a cutoff of (1.4 nm), were established using NAMD software [32] v.3.13. Atmospheric pressure and temperature were maintained at standard conditions (Langevin thermostat: 300 K, and Langevin piston barostat: 1 atm). For each model the system was submitted to energy minimizations and protein backbone constriction, followed by balancing during 5 ns, and 100 ns without any constraints. Potential energy curves were used to determine settings in the T shape analysis [33,34]. The visualizations and analyses were made using Visual Molecular Dynamics (VMD) programs, a molecular modeling toolkit VEGA ZZ v.3.2 [35], CARMA v.1.7, and R Studio 3.5.

2.6. Statistical analysis

Association between genetic variants and lactatemia or metformin concentrations was evaluated through multiple regression analysis with 95% confidence intervals. Sex, age, overweight, and T2D diagnosis were considered as covariates. The software used for this analysis was PLINK v.1.07 [36]. Metformin plasma concentrations were represented as medians and determined using WinNonlin Pro 3.1 software. The

standard deviation of water distribution was used as a rough estimate for transporter size within the lipid bilayer in molecular dynamics analysis.

3. Results

When we measured the allele frequency of the L125F variant in the 968 MEZ individuals belonging to the SIGMA DMS1 cohort and included in the gnomAD database [21], we observed that it was the highest frequency (16%) reported worldwide. Interestingly, genotyping analysis of 452 MA individuals showed an even higher frequency (27%) than that of the MEZ group. In particular, the Mayan group showed a variant allele frequency of 34% (Fig. 1). Notably, 3.3% and 8.9% of MEZ and MAs, respectively, displayed a homozygous variant genotype.

Due to this high frequency and the existing knowledge about the impact of L125F on metformin transport *in vitro* [17], we evaluated the effect of the SNV on metformin PK. For this, we genotyped 30 PED patients younger than 18 years old who were candidates for metformin treatment for T2D or obesity. Among them, 16 (53.3%) were CC homozygotes, 13 (43.3%) were CT heterozygotes, and 1 (3.3%) was a TT homozygote. Anthropometric and biochemical characteristics of the pediatric patients are summarized in Table 1.

A standard dose of oral metformin (500 mg) was administered to PED on fasting, and drug curves were obtained within 0, 1.5 or 2, 3 or 4, 8, 12, and 24 h after intake, while lactate measurements were obtained in 13 patients, at 0 and 2 h.

Two hours after oral metformin administration, the TT homozygous child showed the highest lactate serum levels (75.6 mg/dL), compared with the CT heterozygous (16.6 ± 5.4 mg/dL) and CC homozygous (18 ± 3.5 mg/dL) children ($P\text{-value}_{2h} = 0.07$, Fig. 2).

Interestingly, the TT homozygous girl's serum lactate reached a maximum concentration (C_{max} , 1456.2 ng/mL). CT heterozygous children showed an intermediate C_{max} (1169.9 ± 211.4 ng/mL), between those of the TT girl and CC homozygous (772.4 ± 439.9 ng/mL)

Table 1

Demographic and clinical data of Mexican Pediatric (PED) patients.

PED	Clinical data	Reference values [37]
Female n (%)	11 (36.7)	–
Male n (%)	19 (63.3)	–
Overweight n	20	–
T2D n	10	–
Patients with concomitant drugs n (%)	Insulin: 2 (6.6) Antihypertensive: 1 (3.3) Antidepressant: 1 (3.3)	–
Age (years \pm s.d.)	13 ± 2.9	–
Body Mass Index BMI (Kg/m ² \pm s.d.)	27.6 ± 4.8	BMI for age 5th - 85th percentile
Glucose (mg/dL \pm s.d.)	50th - 95th percentile	<126
Glycated hemoglobin HbA1c (% \pm s.d.)	119.8 ± 69.6	<6.5
Serum creatinine (mg/dL \pm s.d.)	0.56 ± 0.17	0.31–1.08 (male) ^a 0.31–0.84 (female) ^a

^a Reference creatinine intervals according to age group: 5 to <12 years: 0.31–0.61; 12 to <15 years: 0.45–0.81; 15 to <19 years (male): 0.62–1.08; 15 to <19 years (female): 0.49–0.84.

children, suggesting an additive effect of the L125F variant on blood metformin accumulation ($P\text{-value}_{2h} = 0.04$, Fig. 3, Supplemental Fig. 1).

In order to elucidate the impact of the phenylalanine residue on variant MATE1 function, we performed a molecular dynamics simulation comparing it with the wild-type protein. Replacement of the aliphatic leucine residue by the aromatic phenylalanine residue resulted in a T-shaped interaction with Trp256 and Leu260 neighboring amino acids (average distance 0.55 nm and an energy of 2 kcal/mol; Fig. 4).

To further understand the possible influence of MATE1 L125F on metformin accumulation, we carried out a water permeability characterization *in silico*. There was an evident decrease in water distribution

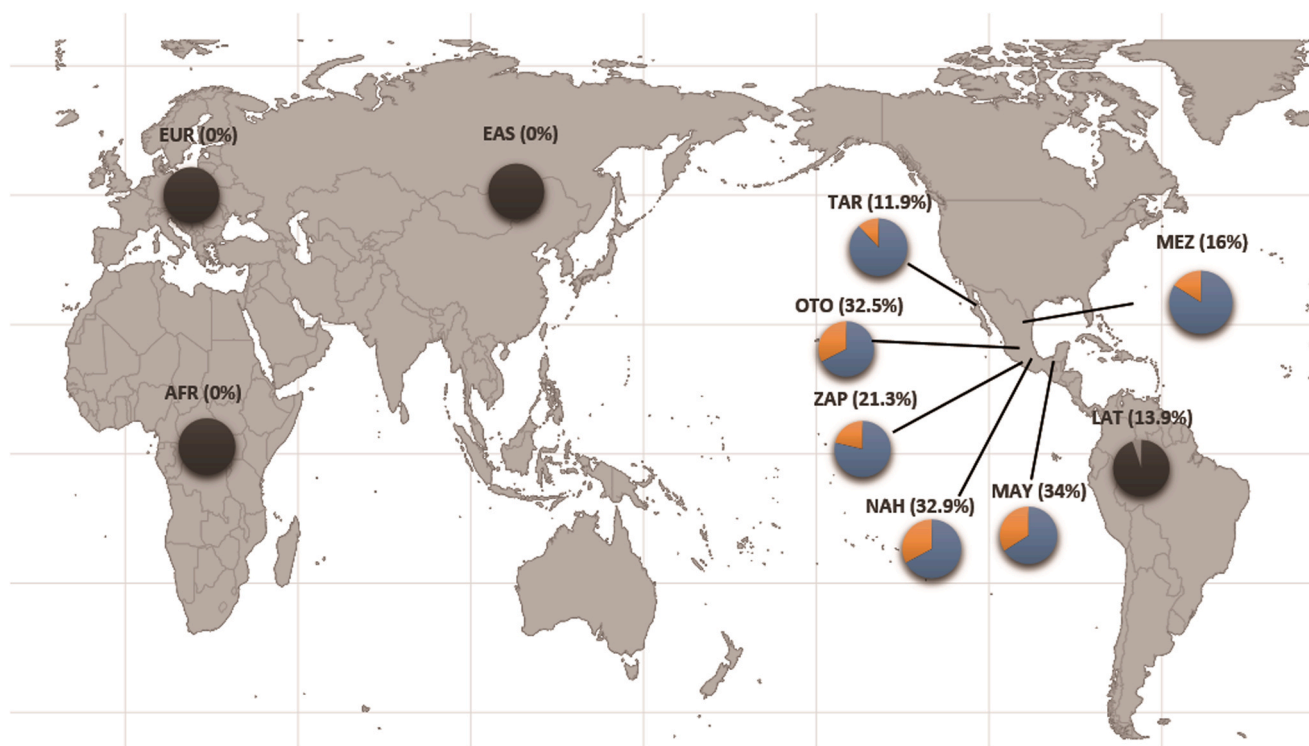


Fig. 1. Worldwide distribution of the MATE1 L125F variant (rs77474263C>T). The blue and orange pie charts show the SNV frequencies found in Mexican Mestizo (MEZ), Tarahumara (TAR), Otomí (OTO), Zapoteca (ZAP), Náhuatl (NAH), and Maya (MAY) samples. The gray-scale charts show the allele frequencies in European (EUR), African (AFR), East Asian (EAS), and Latin American (LA) populations, taken from the gnomAD database. Percentages in brackets represent the minor allele frequencies of the SNV.

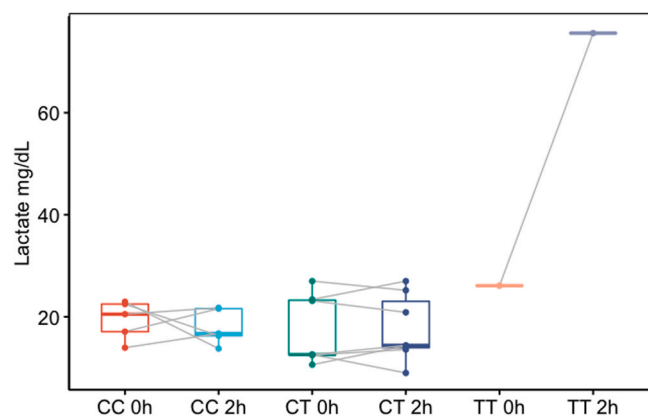


Fig. 2. Paired lactatemia comparison according to *MATE1* rs77474263C>T genotypes. Two hours after metformin administration there is an increase in lactatemia in the TT homozygous pediatric patient compared with the CC and CT groups.

radius (from 3.9 to 2.1 nm), suggesting that the transmembrane central cavity transporter structure and the efflux function could be altered (Fig. 5).

4. Discussion

Obesity and T2D are serious public health problems worldwide, and Amerindian ancestry has been described as a risk factor for these diseases [53]. In fact, Mexico is one of the countries with the highest prevalences [38–40]. According to clinical guidelines, metformin is the first-choice drug for T2D treatment, but is also used for weight control and many other important pathologies [41–46]. However, the metformin treatment failure rate in T2D patients is estimated to be nearly 30% in adults [4] and more than 50% in children and adolescents [47]. Additionally, non-adherence to metformin treatment could be a result of adverse effects, being gastrointestinal intolerance the most common (25%) [48], and lactic acidosis the most lethal [49]. To date, a high variability in metformin PK profiles has been described in several populations, including Mexican adults [27]. The mounting evidence of inter-individual variability in metformin response has encouraged

attempts to understand the genetic contribution to its absorption, distribution, and elimination. Thus, diverse pharmacogenetic studies have focused on SNVs in metformin transporters encoded by SLC family members. *OCT1*, *OCT2*, and *MATE1* have been the genes most related to alterations in pharmacokinetic parameters, transporter function, and response to metformin [8,12–15]. A limitation of metformin pharmacogenetic studies has been that they have included mostly Asian and Caucasian individuals, from whom Latin American populations differ widely in genetic background. An example of this is the L125F variant of *MATE1*, on which Toyama *et al.* based on their observations in knockout mice, suggesting that human TT homozygotes could suffer from metformin accumulation and lactic acidosis [24]. However they were not able to document their hypothesis because no TT homozygotes had been described in any population.

Herein, we have presented the first pharmacogenetic analysis of a *MATE1* TT homozygous carrier. We have shown that Mexican Mestizo people display the highest frequency of the T allele worldwide (16%), and that the frequency is still higher in indigenous (27%) Mexican populations, suggesting that this variant could be of Amerindian origin. Moreover, our analyses reveal great diversity in the frequency distributions of this variant, not only between MEZs and MAs, but also among the different studied MA groups. Additionally, we also showed evidence that *MATE1* TT homozygotes are at higher risk of lactic acidosis than are heterozygotes or ancestral homozygotes. The TT genotype was found in a newly diagnosed overweight 11-year-old girl without concomitant treatments, who showed the highest metformin and lactic acid serum levels compared with CT heterozygous and CC homozygous children. Notably, the heterozygous group had an intermediate metformin C_{max} value between those of the TT girl and the wild-type homozygous group, suggesting an additive effect of the L125F variant allele on blood metformin accumulation. The role of metformin in lactic acidosis development is still debated, but its pharmacogenetic association with hyperlactatemia has been poorly addressed. Some studies supporting this approach are a genome-wide association study that showed association of an SNV in the *PPP1R3B/LOC157273* locus with lactate levels in European Americans [50], and a study in Chinese diabetic individuals that resulted in the association of the TT genotype of *SLC22A2* c. [808 G>T] with increased lactatemia [51].

To gain more insight, we performed a molecular dynamic *in silico* analysis, which supported our findings showing that *MATE1* L125F

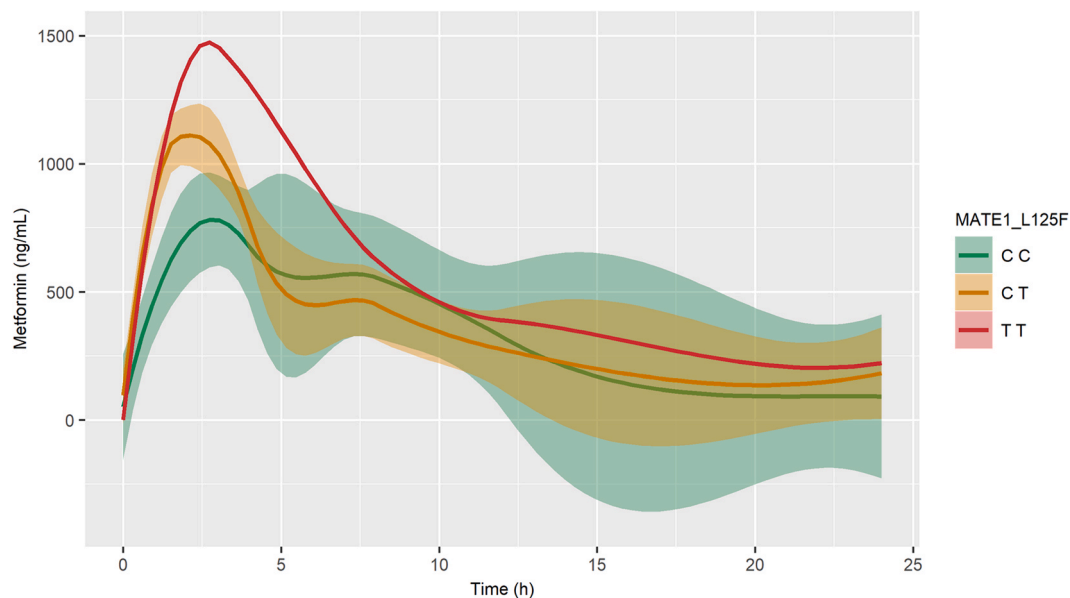


Fig. 3. Plasma metformin according to *MATE1* rs77474263C>T genotype. There is an increase in metformin concentration in patients carrying one or two copies of the T allele. The shaded areas represent the standard deviations of the CC and CT values.

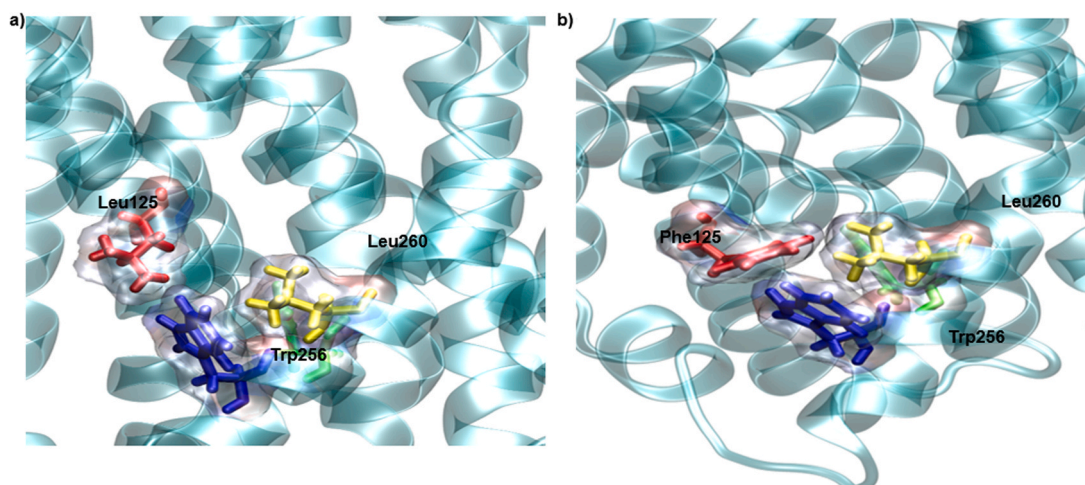


Fig. 4. Representation of the interactions among the amino acid residues at positions 125 (red), 256 (blue), and 260 (yellow) in the MATE1 transmembrane region. a) Native interactions between Leu125, Trp256, and Leu260. b) T-shaped interaction between variant Phe125, Trp 256, and Leu260.

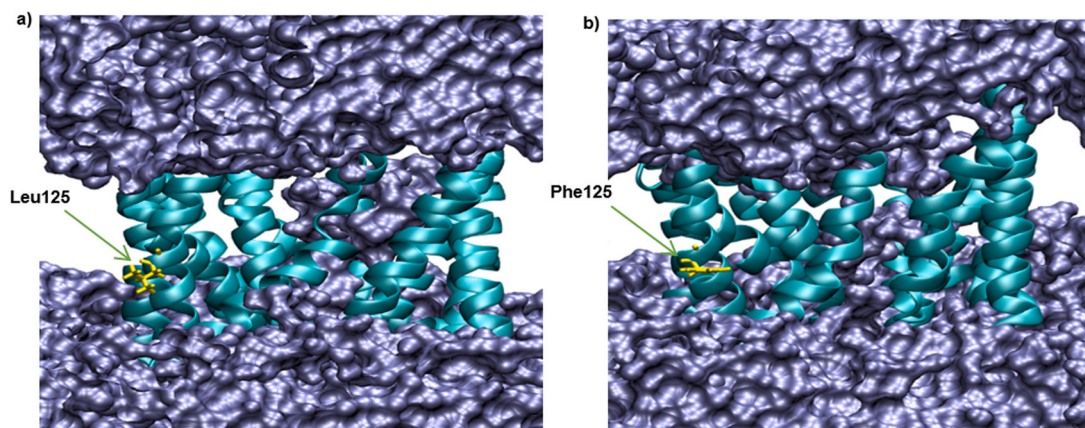


Fig. 5. *In silico* water distribution characterization of MATE1 with a) native leucine and b) variant phenylalanine at position 125. Both the native and variant amino acid residues are represented in yellow. Light-blue helices constitute the MATE1 transmembrane region. Water molecules are represented in darker blue, passing through the MATE1 transmembrane region.

substitution promotes plasma metformin accumulation, probably by a reduction of the transporter function. The native amino acid, leucine, has an aliphatic structure at position 125 in the transmembrane helix 3 (TM-3) of MATE1, that interacts with neighboring amino acids such as 256Trp or 260Leu, both located in TM-7, a key component for the substrate pocket structure [52]. These results suggest that the substitution of the aromatic amino acid phenylalanine modifies these interactions, altering the transporter conformation and reducing the internal cavity radius. This was corroborated with the water permeation modeling, which showed a decrease in water distribution radius. Our findings suggest that the mechanism by which the variant L125F affects the permeability of MATE1, is by altering the interaction between TM-3 and TM-7. However, more functional studies, urine metformin evaluations, and a bigger sample would help to confirm this hypothesis.

5. Conclusions

In the last years new metformin uses have been explored. So, it is expected that the proportion of people with suboptimal drug clearance will be higher in populations having the risk genotype, such as those of Amerindian origin, in which it has been documented that susceptibility to diseases such as T2D and obesity is one of the highest worldwide. Thus, our study supports the recommendations to perform genetic analyses before metformin administration to consider dosage adjustment,

along with adequately monitoring of lactatemia, or alternative treatments, in homozygous or heterozygous individuals for risk alleles like L125F MATE1.

Funding information

This study was supported by the Secretariat of Education, Science, Technology, and Innovation of Mexico City (SECTEI), grant number 9757C19, and the National Council of Science and Technology (CONACYT), fellowship number 288447.

CRedit authorship contribution statement

Monserrat I. Morales-Rivera: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Radamés Alemón-Medina:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Angélica Martínez-Hernández:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Supervision. **Josefina Gómez-Garduño:** Methodology, Investigation, Resources. **Elaheh Mirzaeicheshmeh:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **Nelly F. Altamirano-Bustamante:** Investigation, Resources. **Ian Ilizaliturri-Flores:** Methodology, Formal analysis, Investigation. **Elvia C. Mendoza-Caamal:** Investigation, Resources. **María G.**

- M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoseck, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, Y. D.M, M. Karplus, CHARMM: molecular dynamics simulation package, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 1545–1614, <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.
- [32] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1781–1802, <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- [33] C.D. Sherrill, B.G. Sumpter, M.O. Sinnokrot, M.S. Marshall, E.G. Hohenstein, R. C. Walker, I.R. Gould, Assessment of standard force field models against high-quality Ab Initio potential curves for prototypes of π - π , CH/ π , and SH/ π interactions, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2187–2193, <https://doi.org/10.1002/jcc.21226>.
- [34] M.O. Sinnokrot, C.D. Sherrill, Highly accurate coupled cluster potential energy curves for the benzene dimer: sandwich, T-shaped, and parallel-displaced configurations, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 10200–10207, <https://doi.org/10.1021/jp0469517>.
- [35] A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on windows-based PCs, *J. Mol. Graph. Model.* 21 (2002) 47–49, [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(02\)00123-7](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(02)00123-7).
- [36] S. Purcell, B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M.A.R. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P.I.W. de Bakker, M. Daly, P. Sham, PLINK: whole genome data analysis toolset, *Am. J. Hum. Genet.* 81 (2007) 559–575. <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/contact.shtml>.
- [37] K. Kleinman, L. McDaniel, M. Molloy (Eds.), *The Harriet Lane Handbook*, twenty second ed., Elsevier, Philadelphia, 2021 <https://doi.org/10.1097/00006454-198305000-00027>.
- [38] OECD, Obesity Update 2017, 13, 2017, 331–341. www.oecd.org/health/obesity-update.htm.
- [39] Federación Internacional de Diabetes., Atlas de la Diabetes de la FID. Actualización., 2019. http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf.
- [40] E.C. Mendoza-Caamal, F. Barajas-Olmos, H. García-Ortiz, I. Cicerón-Arellano, A. Martínez-Hernández, E.J. Córdova, M. Esparza-Aguilar, C. Contreras-Cubas, F. Centeno-Cruz, M. Cid-Soto, M.E. Morales-Marín, A. Reséndiz-Rodríguez, J. L. Jiménez-Ruiz, M.G. Salas-Martínez, Y. Saldanã-Alvarez, E. Mirzaeicheshmeh, M. R. Rojas-Martínez, L. Orozco, Metabolic syndrome in indigenous communities in Mexico: a descriptive and cross-sectional study, *BMC Public Health* 20 (2020) 1–8, <https://doi.org/10.1186/s12889-020-8378-5>.
- [41] A. Luengo, L.B. Sullivan, M.G. Vander Heiden, Understanding the complex-I-ty of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy, *BMC Biol.* 12 (2014) 82, <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0082-4>.
- [42] R. Dumitrescu, C. Mehedintu, I. Briceag, V.L. Purcărea, D. Hudita, *Metformin-clinical pharmacology in PCOs*, *J. Med. Life* 8 (2015) 187–192.
- [43] R. Romero, O. Erez, M. Hüttemann, E. Maymon, B. Panaitescu, A. Conde-Agudelo, P. Pacora, B.H. Yoon, L.I. Grossman, Metformin, the aspirin of the 21st century: its role in gestational diabetes mellitus, prevention of preeclampsia and cancer, and the promotion of longevity, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 217 (2017) 282–302, <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.06.003>.
- [44] R. Tripathi, S. Tyagi, V. Goel, Metformin in gestational diabetes mellitus, *Indian J. Med. Res.* 145 (2017) 588–591, https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1572_16.
- [45] H.L. Htun, T.W. Yeo, C.C. Tam, J. Pang, Y.S. Leo, D.C. Lye, Metformin use and severe dengue in diabetic adults, *Sci. Rep.* (2018) 1–9, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21612-6>.
- [46] H.J. Zhang M, Impacts of metformin on tuberculosis incidence and clinical outcomes in patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Eur. J. clinical Pharmacol.* 76 (2) (2020) 149–159, <https://doi.org/10.1007/s00228-019-02786-y>.
- [47] T.S. Group, A clinical trial to maintain glycemic control in youth with type 2 diabetes, *New Engl. J. Med.* 366 (2012) 2247–2256, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109333>.
- [48] T. Dujic, K. Zhou, L.A. Donnelly, R. Tavendale, C.N.A. Palmer, Association of organic cation transporter 1 with intolerance to metformin in type 2 diabetes: a GoDARTS study, *Diabetes* 64 (2015) 1786–1793, <https://doi.org/10.2337/db14-1388>.
- [49] R. Defronzo, G.A. Fleming, K. Chen, T.A. Bicsak, Metformin-associated lactic acidosis: current perspectives on causes and risk, *Metabolism* 65 (2016) 20–29, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.014>.
- [50] A. Tin, P. Balakrishnan, T.H. Beaty, E. Boerwinkle, R.C. Hoogeveen, J.H. Young, W. H.L. Kao, GCKR and PPP1R3B identified as genome-wide significant loci for plasma lactate: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, *Diabet. Med.* 33 (2016) 968–975, <https://doi.org/10.1111/dme.12971>.
- [51] Q. Li, F. Liu, T.S. Zheng, J.L. Tang, H.J. Lu, W.P. Jia, SLC22A2 gene 808 G/T variant is related to plasma lactate concentration in Chinese type 2 diabetics treated with metformin, *Acta Pharmacol. Sin.* 31 (2010) 184–190, <https://doi.org/10.1038/aps.2009.189>.
- [52] T. Kusakizako, H. Miyauchi, R. Ishitani, O. Nureki, Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters, *Biochim Biophys. Acta Biomembr.* 1862 (2020), 183154, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2019.183154>.
- [53] Josep M. Mercader, Jose C. Florez, The Genetic Basis of Type 2 Diabetes in Hispanics and Latin Americans: Challenges and Opportunities, *Front Public Health.* 5 (329) (2017), <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00329>.