

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Identificación de polimorfismos para sulfonilureas y para metformina en población diabética ecuatoriana**  
**Trabajo de Investigación**

**Mauro Sebastián Bonilla Landázuri**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 7 de mayo de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Identificación de polimorfismos para sulfonilureas y para metformina en  
población diabética ecuatoriana**

**Mauro Sebastián Bonilla Landázuri**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Enrique Terán, Ph.D.

Firma del profesor:

---

Quito, 7 de mayo de 2018

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Mauro Sebastián Bonilla Landázuri

Código:

00116684

Cédula de Identidad:

1722816889

Lugar y fecha:

Quito, 7 de mayo de 2018

## **DEDICATORIA**

A mis padres Abdón y María Sol, por haberme hecho la persona que soy ahora.

A mi hermano Mateo.

A mis abuelos Mauro y Susana.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi papá, mi mamá y mi hermano; por haberme acompañado durante todo este camino.

A Enrique Terán, por la confianza depositada en mí y su guía como investigador y director del presente trabajo.

A Leandro Tana, por su colaboración técnica durante todo el proceso.

A mis amigos Santiago Padilla, Pamela Borja y Nathaly Chicaiza; excelentes colegas y futuros profesionales.

## RESUMEN

Los polimorfismos son variaciones en sitios determinados de una secuencia de ADN en individuos de una población. Estas variantes alélicas son responsables de una diversidad de fenotipos en aspectos como respuesta a fármacos, susceptibilidad a enfermedades, entre otros. La farmacogenética usa herramientas moleculares para la detección de distintos polimorfismos asociados a la respuesta al tratamiento de distintas enfermedades, entre las que se puede mencionar la diabetes tipo 2. La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica en la que el cuerpo no utiliza correctamente la insulina producida provocando distintas complicaciones. Esta enfermedad tiene una prevalencia del 8,5% en adultos ecuatorianos. El éxito en el tratamiento con sulfonilureas y metformina ha sido asociado a polimorfismos en el gen CYP2C9 (CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3) y en el transportador OCT1 (OCT1-R61C, OCT1-G465R, OCT1-G410S/420del) respectivamente. En el presente trabajo se utilizó la metodología de PCR en tiempo real con el agente SYBR Green con primers descritos en estudios anteriores para determinar las frecuencias de estos polimorfismos en la población diabética ecuatoriana y comparar con estudios previos. Los resultados obtenidos con la metodología propuesta en este estudio no fueron discriminatorios. Después de realizar los análisis pertinentes, se concluyó que los primers propuestos eran inespecíficos, por lo que se recomienda el uso de sondas TaqMan para futuros estudios en este campo.

**Palabras clave:** polimorfismo, diabetes tipo 2, sulfonilureas, metformina, CYP2C9, OCT1, SYBR Green.

## ABSTRACT

Polymorphisms are genetic variations in certain sites of DNA sequences from individuals in a population. These allelic variants are responsible of a wide diversity of phenotypes in aspects such as response to drugs, susceptibility to diseases, among others. Pharmacogenetics uses molecular tools for the detection of different polymorphisms associated to treatment response of different diseases, among which stands type 2 diabetes. Type 2 diabetes is a chronic disease in which the body doesn't use the insuline produced correctly causing various complications. This disease has a prevalence of 8,5% among Ecuadorian adults. The success in the treatment using sulphonylureas and metformin has been associated to polymorphisms in the gene CYP2C9 (CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3) and in the transporter OCT1 (OCT1-R61C, OCT1-G465R and OCT1-G410S/420del) respectively. In the present study, the real time PCR technology with SYBR Green reagent with primers previously described in other studies was used to determine the frequencies of these polymorphisms in the Ecuadorian diabetic population and to compare these with previous studies. The results obtained with the proposed methodology were not discriminatory. After performing the relevant analyzes it concluded that the proposed primers were non-specific, so it is recommended the use of TaqMan probes in future studies in this field.

**Key words:** polymorphism, type 2 diabetes, sulphonylureas, metformin, CYP2C9, OCT1, SYBR Green.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivo general.....	20
2.2. Objetivos específicos .....	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>4. ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>23</b>
<b>5. MATERIALES.....</b>	<b>24</b>
4.1. Extracción y cuantificación de ADN .....	24
4.2. PCR en tiempo real de variantes alélicas para sulfonilureas y metformina .....	24
<b>6. MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
6.1. Toma de muestras.....	25
6.2. Extracción de ADN.....	25
6.3. PCR en tiempo real de variantes alélicas para sulfonilureas y metformina .....	26
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
7.1. Toma de muestras y extracción de ADN.....	28
7.2. PCR en tiempo real de variantes alélicas para sulfonilureas y metformina .....	28
7.3. PCR en gradiente para variante alélica OCT1-R61C .....	29
7.4. PCR punto final para variantes alélicas usando un control negativo secuenciado .....	30
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>38</b>
<b>11. TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>42</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Detalle de secuencias de primers para PCR en tiempo real de alelos de interés (Aynacioglu, et al., 1999; Shu, et al., 2008) .....	42
Tabla 2: Detalle de muestras, concentración de ADN y pureza.....	43
Tabla 3: CT promedio de los polimorfismos analizados mediante PCR en tiempo real.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prueba t de dos muestras para los valores CT promedio del alelo CYP2C9*2.....	45
Figura 2. Curva de melting para la variante alélica CYP2C9*2.....	46
Figura 3. Curva de melting para la variante alélica CYP2C9*3.....	47
Figura 4. Curva de melting obtenida para la variante alélica OCT1-G410S/420del.....	48
Figura 5. Curva de melting obtenida para la variante alélica OCT1-G465R.....	49
Figura 6. Curva de melting obtenida para la variante alélica OCT1-R61C.....	50
Figura 7. PCR de gradiente para variante alélica OCT1-R61C.....	51
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa variantes alélicas CYP2C9*2 y CYP2C9*3.....	51
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa variantes alélicas OCT1-G465R y OCT1-G410S/420del.....	52

# 1. INTRODUCCIÓN

La genética es una rama de la biología que se encarga de estudiar la herencia y la variación entre individuos. El fundamento en el que se basa es la teoría cromosómica de la herencia que indica que los caracteres hereditarios están controlados por genes, estos se encuentran ubicados en los cromosomas que, al momento de la recombinación, se encargarán de transmitir esta información de generación en generación. La importancia de la genética radica en que sus fundamentos se aplican en la actualidad en investigaciones de diversidad genética, genética médica, filogenia, entre otras (Klug, et al., 2013).

Las variaciones genéticas o alelos que existen para un mismo gen son denominados polimorfismos. Los polimorfismos son una variación en un sitio determinado de una secuencia de ADN en distintos individuos de una población. Estos polimorfismos pueden representar cambios a nivel de expresión que después se verán reflejados en los fenotipos de los individuos que los poseen. Cabe recalcar, que para que un cambio a nivel de genotipo sea considerado un polimorfismo, este debe tener una frecuencia mayor al 1% en la población (Bajo, 2009). Los polimorfismos más comunes son los de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms - SNPs por sus siglas en inglés). Estos se encuentran distribuidos de forma no aleatoria en el genoma, con una frecuencia de 1 en 1000 bases. Menos del 1% de estos SNPs tendrá un efecto en el genotipo, pero los que sí tienen, son los responsables de la mayoría de diversidad entre individuos en aspectos como respuesta a fármacos, susceptibilidad a enfermedades, entre otros (Lodge, et al., 2007).

La principal herramienta para la detección de polimorfismos son los marcadores moleculares. Estos permiten conocer las proporciones de genes en una población de manera directa utilizando el ADN. Existen varios tipos de marcadores moleculares, un ejemplo son los microsatélites, que han sido utilizados para estudios de variación genética por su alta cantidad

de repeticiones, producidas por la generación de polimorfismos. Este tipo de marcadores requiere el conocimiento de la secuencia de interés o polimorfismo que se está buscando y son dependientes de amplificación, que se realizan usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de polymerase chain reaction) (Alcántara, 2007). Un tipo de PCR es la PCR RFLP. Esta se basa en la detección de polimorfismos usando enzimas de restricción. Los productos de PCR son cortados usando estas y producen fragmentos de tamaños conocidos, que posteriormente son analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Vignal, et al., 2002). En la actualidad, otra técnica que se puede utilizar para la detección de polimorfismos es la secuenciación. Esta se basa en la detección de la secuencia, la clonación de la misma; secuenciación mediante técnicas químicas, enzimáticas o automáticas; y la alineación de la secuencia usando bioinformática. De esta manera se obtiene información precisa sobre la presencia o ausencia de un polimorfismo en una región del genoma o en el genoma completo de un organismo (Alcántara, 2007).

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de polimorfismos en un individuo es la PCR en tiempo real (qPCR). Esta técnica se basa en la detección del aumento de fluorescencia que se produce con el aumento de producto de PCR amplificado, en relación con el tiempo de ciclo. Es por esto que la principal ventaja de la qPCR es que permite la obtención de resultados de carácter cualitativo (presencia o ausencia) y cuantitativo, por ejemplo, permite conocer la concentración exacta de ADN molde con el que se inicia o evaluar la expresión génica bajo distintos tratamientos. Debido a esto, esta técnica es utilizada en campos como biomedicina, farmacología, microbiología, entre otros. Esta técnica utiliza agentes intercalantes como SYBR Green o sondas específicas como las sondas TaqMan (Navarro, et al., 2015).

El término farmacogenética se mencionó por primera vez en los años 50, pero no fue hasta 1980 que se popularizaron los estudios en esta área, debido a la mejora en la tecnología

y técnicas de detección molecular. Este progreso en las técnicas ha impulsado también un creciente número de estudios en este campo en la pasada década (Daly, 2017). La farmacogenética es una disciplina que estudia la interacción entre las variaciones genéticas y la exposición al fármaco con relación a la modulación en la respuesta a la terapia. En otras palabras, el enfoque de la farmacogenética es identificar biomarcadores genéticos de enfermedades que puedan servir como blancos eficientes para los fármacos (Florez, 2017; Surendiran, et al., 2017). Los estudios de farmacogenética tienen como objetivos la estratificación de pacientes, esta busca dar la medicación correcta a los pacientes correctos en el tiempo correcto; identificación de blancos, para descubrir nuevas terapias mediante la identificación de nuevos genes objetivos para terapias; y la caracterización funcional, que tiene que ver con los efectos, distintos a los normales, que puede tener una droga en pacientes con un determinado perfil genético (Florez, 2017). Como es de suponer, los estudios de farmacogenética son altamente específicos a la población de estudio que fueron realizados, esto quiere decir que no pueden ser extrapolados a poblaciones cercanas o subgrupos de la misma población (Ang, et al., 2017).

En el Ecuador, se han realizado varios estudios de farmacogenética, en los cuales se ha evaluado por separado al gen CYP2D6 (Dorado, et al., 2012.a) y al CYP2C9 (Dorado, et al., 2012.b), pero posteriormente se realizó la validación del uso del coctel CEIBA para poder genotipar y fenotipar simultáneamente a las 5 fracciones más importantes del citocromo P450 (De Andrés, et al., 2016.a) en una población sana. Con esta información ya disponible, se hizo por primera vez la caracterización del perfil farmacogenético de la población ecuatoriana, evaluando simultáneamente las cinco fracciones clave del CYP450 involucradas en el metabolismo de los fármacos: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, y CYP3A4 en 139 voluntarios sanos y sin ninguna medicación (De Andrés, et al., 2016). En este estudio se encontró de acuerdo con el genotipo, 0.75% y 3.10% de los sujetos fueron metabolizadores

pobres para CYP2C19 y CYP2D6, respectivamente. En el otro extremo, los metabolizadores ultrarrápidos, de acuerdo con el genotipo, fueron 15.79% para CYP2C19 y 5.43% para CYP2D6. Entre los individuos genotipados para CYP2C9, no se detectaron mutantes homocigotos, pero 13.7% fueron heterocigotos para genotipos asociados con actividad reducida (\*1/\*2 and \*1/\*3). De hecho, 7.9% de los sujetos fueron portadores del alelo CYP2C9\*2 y 5.7% del alelo CYP2C9\*3. El alelo de actividad nula CYP2C9\*6 no se encontró en la población estudiada (De Andrés, et al., 2016.b).

Por otro lado, la diabetes mellitus es una enfermedad crónica que se produce por una deficiencia del páncreas en la producción de insulina, o cuando no se utiliza eficazmente la insulina producida. Esta falla puede ser adquirida y/o heredada, por lo tanto, la diabetes se produce por la interacción de factores ambientales y genéticos, siendo estos últimos de carácter multifactorial (Becker, et al., 2013; WHO, 2018). Dependiendo de la etiología de la enfermedad, factores como: la secreción reducida de insulina, utilización de glucosa reducida, y producción elevada de glucosa; contribuirán al desarrollo de hiperglicemia, fenotipo común en estas enfermedades (Kasper, et al., 2015).

Los síntomas de la diabetes comprenden un numeroso grupo de trastornos metabólicos, entre los que se puede mencionar la hiperglicemia. La hiperglicemia se define como una alta concentración de glucosa en la sangre, y se produce cuando existen anormalidades en la producción y secreción de insulina al torrente sanguíneo. Como consecuencia, se da un trastorno en la regulación metabólica que resulta en daños sistemáticos a nivel del organismo, principalmente a nivel de vasos sanguíneos y nervios (Kasper, et al., 2015; WHO, 2018).

La diabetes mellitus se clasifica en dos tipos, de acuerdo con el proceso patogénico que causa la condición hiperglicémica, que son la diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. La diabetes tipo 1 es el resultado de una deficiencia completa o casi total de insulina. En este tipo de diabetes, el

páncreas presenta una falla la cual no le permite producir la insulina necesaria para el organismo (Kasper, et al., 2015).

Por otro lado, la diabetes tipo 2 es un grupo heterogéneo de desórdenes que se caracterizan por grados variables de condiciones como: resistencia a la insulina, secreción alterada de insulina, y aumento en la producción de glucosa. Es importante mencionar que la patofisiología y genética de este tipo de diabetes presenta una gran variación dependiendo del grupo étnico al que afecta. Entre las diferencias que se pueden mencionar, se tiene que los latinos presentan una mayor resistencia a la insulina, por su parte, los asiáticos presentan una mayor disfunción de las células beta, entre otras. La diabetes tipo 2 presenta una prevalencia del 5% en países desarrollados y aumenta cada año a nivel mundial (Becker, et al., 2013; Kasper, et al., 2015).

La diabetes tipo 2 presenta un componente genético bastante importante. Su concordancia en gemelos idénticos es del 70 al 90%. También, individuos cuyos ambos padres presentan la enfermedad tienen un riesgo de aproximadamente el 40% de presentarla. La diabetes tipo 2 es poligénica y multifactorial debido a que, además de la susceptibilidad genética, también existen factores ambientales que modulan el fenotipo; siendo uno de los más importantes la obesidad. A estos se les puede añadir otros factores como la nutrición, actividad física, ambiente dentro del útero, peso al nacer, entre otros. Los genes que afectan a la predisposición de diabetes tipo 2 no se han podido identificar completamente hasta la fecha. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) han identificado un número mayor a 70 genes que presentan un riesgo relativo bajo de padecer diabetes tipo 2 (Kasper, et al., 2015).

El tratamiento de la diabetes comprende la administración de hipoglicemiantes orales a los pacientes, para de esta manera eliminar los síntomas relacionados a la hiperglicemia. Los

objetivos de mejorar el control glicémico en los pacientes serán disminuir la “toxicidad” de la glucosa para las células beta y mejorar la secreción endógena de insulina (Kasper, et al., 2015). Existe una gran variedad de hipoglicemiantes orales que tienen como objetivo reprimir diferentes procesos de la patofisiología de la diabetes tipo 2. Se dividen basados en su mecanismo de acción en agentes que aumentan la secreción de insulina, reducen la producción de glucosa, aumentan la sensibilidad a la insulina, mejoran la acción de GLP-1, o promueven la excreción de glucosa por la orina. Finalmente, otra de las posibles estrategias para la disminución de glucosa en la sangre es la administración de insulina vía intramuscular (Kasper, et al., 2015).

Las sulfonilureas son hipoglicemiantes que pertenecen a la familia de los secretagogos de insulina. Estos estimulan la secreción de insulina interactuando con el canal de potasio sensible al ATP en las células beta. Las sulfonilureas se pueden dividir en dos clases: sulfonilureas de primera y segunda generación. Las sulfonilureas de primera generación, entre las que se pueden mencionar la tolazamida y la tolbutamida; presentan una alta incidencia de hipoglicemia, tienen una larga vida media y una interacción con otras drogas más frecuente. Por estas razones, las sulfonilureas de primera generación ya no son administradas a los pacientes con diabetes tipo 2 en países desarrollados. Por otra parte, las sulfonilureas de segunda generación poseen un inicio rápido en su acción y una mejor cobertura en el aumento de glucosa postprandial. Sin embargo, su vida media es más corta, lo que implica una duración en la acción de estas de entre 12 a 24 horas, requiere que sean administradas más de una vez al día. El mecanismo de acción de las sulfonilureas comprende la estimulación en la liberación de insulina por parte de las células beta del páncreas. Esto ocurre por un bloqueo en los canales de potasio, dando lugar a la entrada de calcio a la célula. Las sulfonilureas también se encargan de disminuir la producción de glucosa en el hígado, donde son metabolizadas, y aumentar la sensibilidad periférica a la insulina (Harvey, et al., 2012; Kasper, et al., 2015).

Por su parte, la metformina es una clase de biguanida, cuyos principales objetivos son reducir la producción de glucosa hepática y mejorar ligeramente la utilización de la glucosa periférica. La metformina también reduce la glucosa plasmática en ayunas y mejora el perfil lipídico. La metformina es una droga bastante efectiva en monoterapia, y a veces también es utilizada en combinación con insulina. El mecanismo de acción de la metformina, como se mencionó anteriormente, es el descenso en la producción de glucosa en el hígado principalmente por la inhibición de la gluconeogénesis. Esto ocurre debido a que la metformina funciona como antagonista de la habilidad del glucagón para generar cAMP en los hepatocitos. También hace más lenta la absorción de los azúcares en el intestino y mejora la captación y utilización de glucosa. La metformina es una droga que no se metaboliza, su absorción se da por vía oral, para luego ser eliminada por vía urinaria (Harvey, et al., 2012; Kasper, et al., 2015).

A pesar de los esfuerzos realizados para que estos fármacos contribuyan significativamente en el tratamiento de diabetes tipo 2, se ha visto que la respuesta a los mismos varía significativamente entre pacientes. Esto puede ser atribuido a factores de riesgo que pueden ser modificables o no modificables. Entre los factores modificables se pueden mencionar una dieta adecuada, actividad física, entre otros; mientras que entre los factores no modificables el más importante es el perfil genético de cada paciente (Surendiran, et al., 2017).

Las sulfonilureas han sido asociadas a varios polimorfismos que afectan su correcto funcionamiento, produciendo complicaciones como hipoglicemia, y en general una alta variabilidad en la respuesta a los tratamientos en los pacientes. Se han determinado polimorfismos en los genes ABCC8, que codifica para el receptor de sulfonilurea SUR1; KCNJ11, que codifica para el canal de potasio rectificado; y CYP2C9, que codifica para la enzima del mismo nombre, la cual se encarga de la metabolización de la droga (Surendiran, et al., 2017).

Las sulfonilureas son metabolizadas por la fracción CYP2C9 del citocromo P450 en el hígado (Elliot, et al., 2007). Las principales variantes alélicas de este gen son CYP2C9\*2 (Arg144Cys) y CYP2C9\*3 (Ile359Leu) las que producen una disminución en la actividad enzimática (Surendiran, et al., 2017). Estudios realizados con tolbutamida y glimepirida muestran una disminución en el aclaramiento oral del fármaco 6.5 veces con tolbutamida, y de un 50% con glimepirida, en pacientes que presentan la variante alélica CYP2C9\*3 comparados con pacientes con el alelo normal (Kirchheiner, et al., 2002). En otro estudio, se encontró que los pacientes con las variantes CYP2C9\*2, CYP2C9\*3 o ambas; mostraron una reducción de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) 0.5% más alta que pacientes con el genotipo normal. También se demostró que los mismos pacientes presentaban una mejor posibilidad de llegar a valores de HbA1c menores al 7% en comparación a pacientes que presentaban el genotipo normal. En este mismo estudio también se demostró que los pacientes que tenían al menos una de las dos variantes alélicas, eran menos propensos a sufrir una falla en su tratamiento (Zhou, et al., 2010). Finalmente, en otro estudio, los pacientes que presentaron las variantes CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3 o solo CYP2C9\*3 presentaron hipoglicemia en comparación con los pacientes con genotipo normal (Holstein, et al., 2005).

Por su parte, la metformina también se ha asociado a varios polimorfismos que afectan su funcionamiento adecuado. Estos polimorfismos han sido ligados con una influencia en la dosificación y con el perfil de toxicidad del fármaco (Surendiran, et al., 2017). La metformina se absorbe principalmente en el intestino delgado, es una base hidrofílica que se mantiene como catión a pH fisiológico. Por esta razón, su difusión pasiva a través de las membranas biológicas es muy limitada (Gong, et al., 2012; Graham, et al., 2011; Higgins, et al., 2012). Los transportadores de cationes orgánicos (OCT) pertenecientes a la familia de genes SLC son los encargados de la distribución de la metformina a través de las membranas biológicas (Surendiran, et al., 2017).

Los transportadores OCT1, OCT2 y OCT3 transportan la metformina al hígado, y son codificados por los genes SLC22A1, SLC22A2 y SLC22A3 respectivamente (Surendiran, et al., 2017). El transportador OCT1 presenta dos mutaciones no sinónimas de tipo SNP llamadas G410S y R61C, las cuales mostraron una actividad de transporte reducida (Kerb, et al., 2002). En otro estudio se identificó otro SNP más que, a su vez, mostró actividad reducida en el transporte de metformina, conocido como G465R (Shu, et al., 2003). Se ha encontrado una alta distribución de los polimorfismos 420del y R61C en comparación a los demás mencionados anteriormente. Finalmente, la presencia de las variantes alélicas defectuosas del gen SLC22A1 muestran un aumento de metformina a nivel plasmático, lo que resulta en un aumento en la actividad del fármaco, y puntualmente las variantes alélicas de OCT1 afectan el aclaramiento renal de la metformina (Shu, et al., 2007; Tzvetkov, et al., 2009).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

- Identificar los polimorfismos que impiden el mecanismo de acción normal en sulfonilureas y metformina en la población con diabetes tipo 2 del Ecuador.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar las frecuencias de los polimorfismos relacionados a la farmacogenética de la diabetes tipo 2 en la población ecuatoriana.

- Generar una nueva metodología usando primers descritos en otros estudios y el agente intercalante SYBR Green, que sea discriminatoria, confiable y más económica.

- Proponer una metodología rápida y confiable para el reconocimiento de las variantes alélicas de interés para su posterior traslación al diagnóstico clínico.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El mejor conocimiento de la genética, el desarrollo de la biología molecular y el entendimiento de los mecanismos involucrados en la respuesta a los fármacos, es decir, la farmacogenética, han abierto un interesante campo de estudio para la biotecnología, particularmente en el campo de la salud humana. Por tal motivo, cada vez se hace más importante poder contar con técnicas que permitan el diagnóstico molecular y que al mismo tiempo puedan tener una utilidad clínica. En este sentido, la identificación de polimorfismos para el metabolismo de los fármacos es, en la actualidad, una prioridad en las patologías de mayor prevalencia y morbi-mortalidad asociada. Con esos antecedentes, la diabetes es una enfermedad cuya prevalencia, en los últimos años, ha presentado un crecimiento tanto en el Ecuador como a nivel mundial. Se estima que la prevalencia de diabetes en adultos de 20 a 79 años en el Ecuador es del 8,5% (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2017). En un grupo de edades más reducido, de 30 a 59 años, la diabetes tiene una prevalencia de 4,1% (Freire, et al., 2014). En 2017, se registraron 6731 casos de diabetes en una población de 65 años o más, y un total de 8662 casos en individuos de 35 a 64 años. Esto se puede traducir a la prevalencia de diabetes por decenios, siendo el quinto decenio de la vida el que muestra una prevalencia mayor de 10,3% (Freire, et al., 2014; INEC, 2017). Finalmente, la diabetes es la segunda causa de muerte en mujeres y la tercera en hombres de la población ecuatoriana, solamente por debajo de las enfermedades isquémicas del corazón (INEC, 2016).

Estudios a lo largo de los años han demostrado que los tratamientos de la diabetes tipo 2 presentan una alta variabilidad entre pacientes, lo que ha contribuido a una progresión de la enfermedad. Esta variabilidad en la respuesta a los tratamientos ha sido asociada con el perfil genético de cada individuo en cuanto a genes de transporte y absorción de las drogas (Elliot, et al., 2007; Graham, et al., 2011). Por estas razones, la importancia de este estudio radica en el desarrollo de una metodología de reconocimiento que sea rápida y confiable. Las técnicas de

detección molecular brindan estas características y permiten la detección de los distintos polimorfismos asociados a las fallas en el tratamiento de diabetes tipo 2. La estandarización de estas técnicas y su posterior traslación al diagnóstico clínico permitirán reconocer a los sujetos que estén sujetos a esta variabilidad en su tratamiento. Es así como de acuerdo con su perfil genético se podrán proponer tratamientos más efectivos.

## **4. ÁREA DE ESTUDIO**

Las muestras de sangre fueron recolectadas en el Dispensario Central del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social (IESS), localizado en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha. Tanto el procesamiento de las muestras, como los análisis moleculares, fueron realizados en el Laboratorio de la Escuela de Medicina de la Universidad San Francisco de Quito.

## 5. MATERIALES

### 4.1. Extracción y cuantificación de ADN

- 300 microlitros de sangre venosa extraído en tubo con anticoagulante EDTA
- Wizard Genomic DNA Purification Kit
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Microcentrífuga Spectrafuge 24D
- Espectrofotómetro Epoch BioTek

### 4.2. PCR en tiempo real de variantes alélicas para sulfonilureas y metformina

- 1X Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)
- 10 uM Primers F (CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, OCT1-R61C, OCT1-G465R, OCT1-G410S/420del) (Invitrogen)
- 10 uM Primers R (CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, OCT1-R61C, OCT1-G465R, OCT1-G410S/420del) (Invitrogen)
- Ultra Pure Water
- 1 ng ADN
- Termociclador en tiempo real (StepOne Real Time PCR System, Applied Biosystems)

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Toma de muestras

Para la toma de muestras, personal del Laboratorio Clínico del Dispensario Central del IESS se encargó de la captación de pacientes y extracción de sangre. Los criterios de inclusión para la captación de los pacientes fueron: personas con diabetes tipo 2, de cualquier sexo, entre los 35 y 65 años, y que hayan recibido tratamiento con sulfonilureas o metformina por un periodo mayor a 6 años. Los pacientes dispuestos a participar fueron informados sobre los objetivos y procedimientos de la investigación mediante un Consentimiento Informado, previamente aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito. Después de que los pacientes estuvieron de acuerdo y firmaron el documento, se procedió a la extracción de 5 ml de sangre venosa en tubos con anticoagulante EDTA. Se etiquetaron y almacenaron los tubos y luego fueron trasladados al Laboratorio de Investigación de la Escuela de Medicina de la USFQ para su análisis. Se clasificó a los pacientes en dos grupos de acuerdo con el parámetro de hemoglobina glicosilada (HbA1c), dato provisto por el Laboratorio Clínico del Dispensario Central del IESS. El grupo de “respondedores” que corresponde a pacientes con un HbA1c menor o igual al 8%; y el grupo de “no respondedores” que presentan un valor mayor al 8% en este parámetro.

### 6.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se siguió el protocolo del kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, 2010). En este se comenzó tomando 300 microlitros de sangre total extraída en un tubo con anticoagulante EDTA. Esto se combinó con 900 microlitros de Solución de Lisis Celular y se mezcló por inversión. Se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 16100 g\* durante 40 segundos. Se descartó el sobrenadante y se mezcló el pellet realizando un vórtex. Se añadieron 300 microlitros de

Solución de Lisis Nuclear y se mezcló por inversión. Después se añadieron 100 microlitros de Solución de Precipitación de Proteínas y se mezcló por vórtex durante 20 segundos. Se centrifugó a 16100 g\* durante 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml con 300 microlitros de isopropanol añadido previamente. Se centrifugó a 16100 g\* durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 300 microlitros de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente a 16100 g\* durante 1 minuto. Luego se aspiró el etanol y se dejó secar el pellet al aire durante 15 a 20 minutos. Finalmente, se añadieron 100 microlitros de Solución de Rehidratación de ADN y se dejaron las muestras a 4 grados centígrados durante la noche. Al día siguiente, se cuantificaron las muestras usando el espectrofotómetro Epoch de BioTek para obtener los valores de concentración y pureza de cada una de las muestras. Finalmente, las muestras se congelaron a – 20 grados centígrados para los posteriores análisis.

### **6.3. PCR en tiempo real de variantes alélicas para sulfonilureas y metformina**

La detección de presencia o ausencia de los alelos se realizó mediante PCR en tiempo real con tecnología Fast SYBR Green. Se realizaron reacciones por duplicado de 10 microlitros de 1X de Fast SYBR Green Máster Mix, 10 uM de primers Forward y Reverse de cada una de las variantes alélicas (CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, OCT1-R61C, OCT1-G465R, OCT1-G410S/420del), 10 ng/ul de ADN, o 4 microlitros de Ultra Pure Water en los blancos. Las secuencias de los primers a validar (distintos a los antes utilizados) fueron obtenidas de estudios realizados previamente y se encuentran detalladas en la **Tabla 1** (Aynacioglu, et al., 1999; Shu, et al., 2008). Todos los genes se corrieron bajo el siguiente programa: 94 grados centígrados durante 5 minutos; 35 ciclos a 94 grados centígrados durante 30 segundos, 60 grados centígrados por 20 segundos, 72 grados centígrados por 1 minuto. Finalmente, se realizó una curva de melting en todos los ensayos para comprobar la especificidad del producto

amplificado y que no existan dímeros de primers. Estos ensayos fueron realizados en la plataforma StepOne Real Time PCR System de Applied Biosystems.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Toma de muestras y extracción de ADN

Se trabajó con las muestras de 24 pacientes que acudieron al Dispensario Central del IESS entre los meses de septiembre a diciembre del año 2017. Se verificó que los mismos cumplieran con los criterios de inclusión para el estudio, y que estén de acuerdo en participar del mismo firmando un documento de consentimiento informado previo. Se realizó la extracción de un tubo de 5 ml de sangre venosa en anticoagulante EDTA por paciente. Posteriormente las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Investigación de la Escuela de Medicina de la USFQ. Estas fueron codificadas y clasificadas de acuerdo con el parámetro de HbA1c provisto por el Laboratorio Clínico del Dispensario Central del IESS en “respondedores” (R) y “no respondedores” (NR). Esta información se encuentra detallada en la **Tabla 2** en una sección posterior. En esta se observa el código generado para cada muestra, las fechas de extracción de sangre y extracción de ADN, el parámetro de HbA1c en porcentaje, y el grupo al que pertenece cada uno.

Los resultados de la extracción de ADN se encuentran detallados en la **Tabla 2**. En esta se observa la concentración de ADN en nanogramos / microlitro obtenida de cada muestra y la pureza usando la relación 260/280. El promedio obtenido de concentración de ADN fue de 176,94 ng/ul, con un mínimo de 42,25 ng/ul, y un máximo de 876,55 ng/ul. En cuanto a la pureza de las muestras, se obtuvo un promedio de pureza de 1,97 en el parámetro 260/280, con un mínimo de 1,91 de pureza, un máximo de 2,02. Estos valores se encuentran dentro del rango establecido de pureza que va desde 1,80 a 2,00 (Damián, et al., 2013).

### 7.2. PCR en tiempo real de variantes alélicas para sulfonilureas y metformina

En la **Tabla 3** se observan los  $C_T$  promedio obtenidos después de la realización de la PCR en tiempo real para los polimorfismos de interés, junto con el grupo al que corresponde

cada muestra. Para determinar si existía alguna diferencia entre los  $C_T$  promedio de los pacientes “respondedores” y “no respondedores”, se realizó una prueba T de dos muestras para los resultados de cada variante alélica con un valor alfa de 0,05. Ninguno de los grupos presentó diferencia estadística significativa para ninguna de las variantes alélicas analizadas ( $p = 0,686$ ). Un ejemplo de esto se observa en la **Figura 1** para los valores  $C_T$  promedio del alelo CYP2C9\*2.

Las reacciones de PCR en tiempo real fueron complementadas con curvas de melting para cada una de las variantes alélicas analizadas. En la **Figura 2** se observa la curva de melting obtenida para el alelo CYP2C9\*2, la temperatura de melting obtenida de la curva es de 80,97 °C. La **Figura 3** muestra la curva de melting para el alelo CYP2C9\*3 con una temperatura de melting de 80,84 °C. En la **Figura 4** se observa la curva de melting para el alelo OCT1-G410S/420del que presenta una temperatura de melting de 82,17 °C. En la **Figura 5** se observa la curva de melting obtenida del gen OCT1-G465R con una temperatura de melting de 72,95 °C. Finalmente, en la **Figura 6** se observa la curva de melting obtenida para la variante alélica OCT1-R61C que presenta una temperatura de melting de 83,24 °C. En esta figura, se observa la formación de dímeros de primers o una inespecificidad en el producto amplificado debido a un pico temprano a los 74 grados centígrados aproximadamente.

### 7.3. PCR en gradiente para variante alélica OCT1-R61C

En la Figura 7, se observan los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de la PCR en gradiente para el alelo OCT1-R61C. Se observa el rango de temperatura encima de cada pocillo que fue desde los 62 grados centígrados hasta los 55 grados centígrados. Se observa que existe amplificación del alelo con una intensidad muy similar en todas las temperaturas de annealing propuestas, que es la etapa de alineamiento de los primers con la secuencia diana. También se observa que en todos los casos se generaron bandas inespecíficas, por lo que se infiere que el primer utilizado no es apropiado debido a esta inespecificidad.

#### **7.4. PCR punto final para variantes alélicas usando un control negativo secuenciado**

En la **Figura 8**, se observan los resultados de la PCR punto final realizada para las variantes alélicas CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3. En los primeros pocillos para cada gen se observa un control negativo (C-) que es una muestra de un individuo secuenciado para todas las variantes alélicas y que resultó ser negativo para todas las mismas. En el siguiente pocillo se encuentra la muestra FD-10, y en el último pocillo se encuentra un Blanco con agua y sin ADN. Se observa que existe amplificación en todas las muestras exceptuando el blanco.

Por su parte, en la **Figura 9** se observan los resultados de la PCR punto final realizada para las variantes alélicas OCT1-G465R y OCT1-G410S/420del. Igualmente, en los pocillos se encuentran las muestras del control negativo (C-), FD-10 y blanco en el mismo orden. Se observa que existe amplificación en ambas muestras exceptuando el blanco.

## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio, utilizando los primers publicados por Aynacioglu y colaboradores (1999), y Shu y colaboradores (2008) no se logró identificar diferencias en la presencia de los polimorfismos para el citocromo P450, específicamente CYP2C9, entre los sujetos con y sin control metabólico adecuado para su diabetes, situación que podría inicialmente interpretarse como un importante hallazgo. Sin embargo, un elemento esencial a tomar en consideración fue que la totalidad de los sujetos estudiados dieron positivo para la presencia de polimorfismos CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3, situación que contrastaba francamente con los resultados previos en los que se encontró la presencia de CYP2C9\*2 en un 7.9% y de CYP2C9\*3 en un 5.7% de la población ecuatoriana sana (De Andrés, et al., 2016.b).

En el estudio de Aynacioglu y colaboradores, los resultados obtenidos indicaron una frecuencia de 79% del alelo CYP2C9\*1, 11% para el alelo CYP2C9\*2, y del 10% para el alelo CYP2C9\*3 (Aynacioglu, et al., 1999), pero la metodología empleada por ellos fue PCR-RFLP para ambas variantes alélicas. Se realizó una PCR seguida de digestión enzimática usando la enzima Sau96I para la variante CYP2C9\*2 y su posterior detección en un gel de agarosa al 3%. Mientras que la detección de la variante CYP2C9\*3 se realizó usando la enzima StyI que cortaba únicamente los alelos mutantes en dos fragmentos, pero no cortaba los de tipo silvestre, haciendo más fácil su detección mediante electroforesis. Quizás por esa razón, los mismos primers no dieron buenos resultados en el presente estudio, en el cual se utilizó PCR en tiempo real con tecnología SYBR Green, debido a que el factor discriminatorio en este caso, no eran los primers, sino las enzimas de restricción utilizadas que generaban los distintos patrones en el gel de agarosa (Vignal, et al., 2002).

En el caso de la metformina, las secuencias de los primers seleccionados se encuentran detalladas en el estudio realizado por Shu y colaboradores (2008), utilizando la metodología propuesta en este estudio, PCR en tiempo real con tecnología SYBR Green, los resultados

obtenidos no permiten obtener una frecuencia de cada polimorfismo en la población ecuatoriana. Es que, en el trabajo original, las variantes alélicas OCT1-R61C y OCT1-G465R fueron genotipadas mediante ensayos TaqMan, mientras que, los polimorfismos OCT1-G410S y OCT1-420del fueron genotipados mediante secuenciación de los exones. Como se mencionó anteriormente, estas dos técnicas presentan una alta especificidad en sus resultados, pero a su vez requieren de una mayor inversión económica (Navarro, et al., 2015). Las frecuencias de estos alelos en la población europea americana son de: 18,5% para OCT1-420del, 7,2% para OCT1-R61C, mientras que la de los alelos restantes es mayor al 1% (Shu, et al., 2008). En el caso de estos polimorfismos, no hay ningún estudio con el que se pueda comparar a nivel nacional.

Como se observa en la **Tabla 3** y se confirma con el análisis estadístico presentado en la **Figura 1**, no existe una diferencia estadística entre los valores  $C_T$  promedio entre grupos “respondedores” y “no respondedores”. Esto indica que la metodología propuesta en este estudio, con los primers obtenidos de la literatura, no permite obtener una discriminación precisa entre la presencia o ausencia de los alelos de interés en cada paciente, ni en los grupos propuestos.

La metodología propuesta se basa en la detección de las diferentes variantes alélicas usando el agente intercalante SYBR Green en combinación con las curvas de melting para cada primer. Si bien, el SYBR Green no se recomienda para experimentos de presencia / ausencia, las curvas de melting permiten asegurar que el producto amplificado sea el alelo de interés y no cualquier ADN de doble cadena. Otras ventajas de la utilización de SYBR Green es su menor costo en comparación con sondas más específicas como las sondas TaqMan (Navarro, et al., 2015). En los estudios donde se utiliza esta metodología, los  $C_T$  considerados como ausencia o una muestra negativa, donde no se encuentra el alelo de interés, son los mayores a 31 (Martins, et al., 2017). Como se observa en la **Tabla 3**, ninguno de los valores de  $C_T$

encontrados es mayor a 31. Esto indicaría que todos los alelos de interés están presentes en todas las muestras analizadas. Esto resultaría imposible de acuerdo con las frecuencias encontradas de los alelos en la población ecuatoriana y americana-europea mencionadas anteriormente (De Andrés, et al., 2016.b.; Shu, et al., 2008).

De acuerdo con las metodologías realizadas con los primers en los estudios mencionados, se infiere que la reproducción exacta de estas es la que determina el éxito en los resultados. En el caso de los primers utilizados para sulfonilureas, la restricción enzimática del producto de PCR amplificado será la que discrimine entre la presencia / ausencia de los alelos de interés (Vignal, et al., 2002). Por su parte, para los primers que se usaron en el estudio de las variantes alélicas para metformina, las sondas TaqMan específicas para los mismos fueron determinantes para discriminar entre la presencia / ausencia de los alelos. Finalmente, en la metodología propuesta en este estudio se usó el agente SYBR Green más curvas de melting. Para que esta metodología tenga resultados más certeros se debería usar primers mucho más específicos al polimorfismo de interés. Esto quiere decir que, el primer forward debe amplificar la región exacta donde se encuentra la mutación, encontrando una secuencia que sea complementaria con información de la secuencia del polimorfismo. De esta manera, se evita que se amplifiquen regiones más grandes del gen, como se explicará que sucede posteriormente con los demás análisis realizados (Navarro, et al., 2015). Desafortunadamente, esto requiere de técnicas de secuenciamiento para cada uno de los polimorfismos, y esto no estuvo disponible al momento de realizar el presente trabajo debido a limitaciones económicas y de tiempo.

Se procedió también a realizar un análisis de las curvas de melting obtenidas de la PCR en tiempo real. Una curva de melting presenta la información de la temperatura a la que se disocia el 50% del producto amplificado mediante PCR. Esta presentará un solo pico a la temperatura a la que ocurre esta disociación indicando que el amplicón obtenido es específico a los primers con los que se está realizando la reacción. Las curvas de melting obtenidas se

observan en las **Figuras 2, 3, 4, 5 y 6**. Las curvas de melting obtenidas para los alelos CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, OCT1-G465R y OCT1-G410S/420del presentan un solo pico en temperaturas que van desde los 72 a 83 grados centígrados. Estas también muestran un solo pico a su temperatura de melting respectiva, lo que indica que son específicas para el producto amplificado y que no se formaron dímeros de primers durante las reacciones de PCR. Sin embargo, la curva de melting para el alelo OCT1-R61C presentó múltiples picos de temperatura en todas las reacciones realizadas. Esto se puede observar en detalle en la **Figura 6**, donde aparte del pico a 83 grados centígrados, se observa otro cercano a los 74 grados centígrados. Esto indica que existió la formación de dímeros de primers o hay una inespecificidad en los primers y por ende en el producto que se desea amplificar (Navarro, et al., 2015).

Para confirmar que existe una falta de especificidad en los productos de PCR amplificados, se realizó una PCR en gradiente para el alelo OCT1-R61C. La temperatura de annealing utilizada para este primer en los ensayos fue de 60 grados centígrados. Como se observa en la **Figura 7**, para evaluar la especificidad del producto se usaron temperaturas desde los 62 hasta los 55 grados centígrados. Se observa que hay amplificación en todas las temperaturas y que se generan muchas bandas inespecíficas en el gel de agarosa. Esto comprueba los resultados inferidos a partir de la curva de melting para la variante OCT1-R61C que indicaba que el amplicón obtenido de la PCR no era específico. Esto quiere decir que el primer propuesto en la literatura para amplificar de manera específica la variante OCT1-R61C no amplifica solamente este alelo, sino también otros segmentos del mismo gen (Ishii y Fukui, 2001).

A pesar de que para las demás variantes alélicas las curvas de melting mostraban especificidad en el producto amplificado, las lecturas obtenidas de  $C_T$  menores a 31 indicaban la presencia de todas las variantes en la población analizada. Esto, según lo encontrado en

estudios previos en la población ecuatoriana no tiene concordancia (Dorado, et al., 2012). Para comprobar si los otros primers eran en efecto específicos para las variantes alélicas que se afirmaba en la literatura, se realizó una PCR punto final usando el ADN de un individuo que era de tipo silvestre para todos estos alelos. Esto había sido comprobado mediante secuenciación para todas las variantes resultando negativo para estas, por lo que se utilizó como control negativo. La electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos de la PCR punto final se observan en las **Figuras 8 y 9**. En estas se observa que hay amplificación para todas las variantes alélicas en la muestra del control negativo, además de ciertas amplificaciones inespecíficas para la variante alélica CYP2C9\*3.

Con todas las pruebas realizadas que se mencionaron anteriormente, se afirma que los primers utilizados para este estudio son inespecíficos para las variantes alélicas para las que sus estudios aseguran son específicos. Esto pone en duda las metodologías y resultados obtenidos en los artículos de los que se recuperaron las secuencias de los primers que se utilizaron para el presente estudio.

Finalmente, se realizó un alineamiento de los primers con las secuencias de tipo silvestre. Los resultados obtenidos indican, como se evidenció en las **Figuras 8 y 9**, que los primers recuperados de estudios previos son complementarios a las secuencias de tipo silvestre, y no a los polimorfismos cuya detección se planteó al inicio del trabajo. Es por esto que los resultados obtenidos no son discriminatorios, por lo que no se puede cumplir con el objetivo de conocer la frecuencia de estos polimorfismos en la población diabética ecuatoriana.

En el estudio realizado por De Andrés, et al., se estudiaron las variantes alélicas del gen CYP2C9 en una población sana del Ecuador (2016). La metodología propuesta en este trabajo utilizó sondas TaqMan específicas para la identificación de las variantes alélicas de este gen. Las sondas TaqMan son oligonucleótidos que tienen fluoróforos aceptores y receptores, al momento de la extensión la sonda aceptora es degradada y se genera fluorescencia. Esta

tecnología es mucho más específica que el SYBR Green y se usa en aplicaciones de expresión genética, discriminación alélica, detección de SNPs, entre otros (Navarro, et al., 2015). Para el desarrollo del trabajo realizado por De Andrés, et al., los alelos CYP2C9\*2, CYP2C9\*3 y CYP2C9\*6 fueron detectados mediante un kit de sondas TaqMan prediseñadas. Este kit contiene un par de primers específicos para cada variante alélica y un par de sondas TaqMan fluorescentes (2012). Como se mencionó anteriormente, con esta metodología se logró la detección de las variantes alélicas de interés y se llegó a obtener una frecuencia de estas en la población sana ecuatoriana.

Debido a que los primers escogidos para la realización del presente estudio no permiten la diferenciación en la detección de los alelos tipo silvestre de los alelos de interés, no se pueden realizar comparaciones con estudios previos. Las frecuencias alélicas obtenidas en el estudio de Dorado, et al., y De Andrés, et al., son un buen indicio de lo que se podría obtener. Sin embargo, debido a lo que se ha encontrado sobre las implicaciones de la presencia o ausencia de estos alelos en el cuadro de diabetes tipo 2 en otros estudios, no se pueden emitir conclusiones sobre las implicaciones de estos en los pacientes ecuatorianos (2012; 2016).

## 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente trabajo buscó determinar las frecuencias de los polimorfismos relacionados a la farmacogenómica de diabetes tipo 2 en la población ecuatoriana. Para esto se realizó la extracción del ADN genómico de individuos que cumplieron con los criterios de inclusión para el estudio y se realizaron los análisis moleculares pertinentes.

Los resultados obtenidos de la PCR en tiempo real con tecnología SYBR Green usando los primers de estudios anteriores no resultaron informativos. Se concluye esto ya que no se encontró diferencia entre los grupos “respondedores” y “no respondedores” propuestos. Tampoco se encontró diferencia en la amplificación entre individuos de cada variante alélica ni entre variantes alélicas. Por esta razón se concluye que los primers utilizados no son específicos ni discriminatorios entre el alelo de tipo silvestre y los polimorfismos.

Para comprobar esto, se realizaron distintas pruebas usando herramientas más simples de biología molecular como la PCR de gradiente y la PCR punto final. Los resultados obtenidos apoyaron las conclusiones de que los primers escogidos y reportados como exitosos no son informativos.

Con lo mencionado anteriormente, se afirma que no se cumplieron los objetivos propuestos en el presente trabajo. Sin embargo, se logró comprobar que los primers usados en estudios anteriores no funcionan como se reporta en estos debido a las diversas metodologías que se usaron en cada estudio. Esto indica que no se pudieron utilizar estos mismos primers para discriminar entre variantes alélicas con la metodología propuesta en este trabajo. Por estas razones, se recomienda que para futuros estudios de farmacogenómica se utilicen sondas TaqMan diseñadas específicamente para cada variante alélica. De esta manera, los resultados que se obtendrán serán concluyentes y se podrá continuar con la investigación en esta área a nivel nacional, proporcionando herramientas útiles que incorporen la investigación biomédica en el área clínica.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología Molecular*. 541 – 566.
- Ang, H., et al. (2017). Pharmacogenomics in Asia: a systematic review on current trends and novel discoveries. *Pharmacogenomics*. (10), 2217, 2017 – 2026.
- Aynacioglu, A., et al. (1999). Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance of phenytoin. *Journal of Clinical Pharmacology*. 48, 409-415.
- Bajo, J. (2009). *Fundamentos de reproducción*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Becker, M., Pearson, E., y Tkac, I. (2013). Pharmacogenetics of oral antidiabetic drugs. *International Journal of Endocrinology*. (1), 1 – 10.
- Daly, A. (2017). Pharmacogenetics: a general review on progress to date. *British Medical Bulletin*. (124), 65 – 69.
- Damián, P., et al. (2013). *Técnicas básicas de Biología Molecular*. México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- De Andrés, F., et al. (2016.a). Multiplex Phenotyping for Systems Medicine: A One-Point Optimized Practical Sampling Strategy for Simultaneous Estimation of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 Activities Using a Cocktail Approach. *OMICS*. 20, (2), 88-96.
- De Andrés, F., et al. (2016.b). To Genotype or Phenotype for Personalized Medicine? CYP450 Drug Metabolizing Enzyme Genotype-Phenotype Concordance and Discordance in the Ecuadorian Population. *OMICS*. 20, (12), 699-710.
- Dorado, P., et al. (2012.a). CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 68, (5), 637-44.

- Dorado, P., et al. (2012.b). Losartan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population: influence of CYP2C9 genetic polymorphism, habits and gender. *Pharmacogenomics*. 13, (15), 1711 – 1717.
- Elliot, D., et al. (2007). Identification of the human cytochromes P450 catalyzing the rate-limiting pathways of gliclazide elimination. *British Journal of Clinical Pharmacology*. (64), 4, 450 – 457.
- Florez, J. (2017). Pharmacogenetics in type 2 diabetes: precision medicine or discovery tool?. *Diabetologia*. 60, 800 – 807.
- Freire, W., et al. (2014). Tomo 1: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de la población ecuatoriana de 0 a 59 años. *ENSANUT*. Quito: INEC.
- Gong, L., et al. (2012). Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. (22), 820 – 827.
- Graham, G., et al. (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*. (50), 2.
- Harvey, R., et al. (2012). *Lippincot's Illustrated Reviews: Pharmacology*. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins.
- Higgins, J., et al. (2012). Ablation of both organic cation transporter (OCT)1 and OCT2 alters metformin pharmacokinetics but has no effect on tissue drug exposure and pharmacodynamics. *Drug Metab Dispos*. (40), 1170 – 1177.
- Holstein, A., et al. (2005). Association between CYP2C9 slow metabolizer genotypes and severe hypoglycemia on medication with sulphonylurea hypoglycemic agents. *British Journal of Clinical Pharmacology*. (60), 103.
- INEC. 2016. Estadísticas Vitales: registro estadístico de nacidos vivos y defunciones 2016. Quito: INEC.

- INEC. 2017. Diabetes, segunda causa de muerte después de enfermedades isquémicas del corazón. Quito: INEC.
- Ishii, K. y Fukui, M. (2001). Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, (8), 3753 – 3755.
- Kasper, D., et al. (2015). Harrison's Principles of Internal Medicine 19<sup>th</sup> Edition. New York: McGraw-Hill.
- Kerb, R., et al. (2002). Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*. (12), 591 – 595.
- Kirchheiner, J., et al. (2002). Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. (71), 4, 286 – 296.
- Lodge, J., et al. (2007). *Gene cloning: principles and applications*. Birmingham: Taylor & Francis Group.
- Martins, C., et al. (2017). Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based Real-Time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an area where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*. 55, (2), 526 – 534.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2017). *Diabetes mellitus tipo 2: Guía de Práctica Clínica*. Quito: Ministerio de Salud Pública.
- Navarro, E., et al. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. (439), 231 – 250.
- Promega. (2010). Wizard Genomic DNA Purification Kit: Quick Protocol. USA: Promega Corporation.

- Shu, Y., et al. (2003). Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci USA*. (100), 5902 – 5907.
- Shu, Y., et al. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest*. (117), 1422 – 1431.
- Shu, Y., et al. (2008). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 83, (2), 273-280.
- Surendiran, A., Saranya, V., y Anusha, N. (2017). Pharmacogenomics of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Basic, Clinical & Applied Health Sciences*. (1), 1, 6 – 19.
- Tzvetkov, M., et al. (2009). The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2 and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther*. (86), 299 – 306.
- Vignal, A., et al. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol*. 34, 275 – 305.
- WHO. (2018). Diabetes mellitus. Obtenido el 21 de febrero de 2018 desde <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>
- Zhou, K., et al. (2010). Loss-of-function CYP2C9 variants improve therapeutic response to sulfonylureas in type 2 diabetes: a Go-DARTS study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 87, 52 – 60.

## 11. TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1:** Detalle de secuencias de primers para PCR en tiempo real de alelos de interés (Aynacioglu, et al., 1999; Shu, et al., 2008).

<b>Alelo</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
<b>CYP2C9*2</b>	F	CACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAG
	R	GTGATATGGAGTAGGGTCACCCAC
<b>CYP2C9*3</b>	F	AGGAAGAGATTGAACGTGTGA
	R	GGCAGGCTGGTGGGGAGAAGGCCAA
<b>OCT1-R61C</b>	F	GCCTTTGCGCCCATCTG
	R	CTCCGCAGGGCTCCAG
<b>OCT1-G465R</b>	F	GTGAATCACAGAATTATCGTATTTTTTGTCT
	R	GTCACACAGGGAGGAACACA
<b>OCT1-G410S/ 420del</b>	F	TTTCTTCAGTCTCTGACTCATGC
	R	TCCCCACACTTCGATTGC

**Tabla 2:** Detalle de muestras, concentración de ADN y pureza.

<b>Código</b>	<b>Extracción suero</b>	<b>Extracción DNA</b>	<b>Conc. DNA [ng/ul]</b>	<b>Calidad 260/280</b>	<b>HbA1c [%]</b>	<b>Grupo</b>
<b>FD-01-4</b>	7/9/2017	8/9/2017	876,55	1,96	6,68	R
<b>FD-02-4</b>	6/9/2017	8/9/2017	138,35	2,00	6,78	R
<b>FD-03-0</b>	13/9/2017	13/9/2017	459,25	1,96	5,58	R
<b>FD-04-0</b>	15/9/2017	15/9/2017	317,35	1,91	7,65	R
<b>FD-05-0</b>	15/9/2017	15/9/2017	99,95	1,95	5,80	R
<b>FD-06-0</b>	18/9/2017	18/9/2017	98,50	2,01	7,03	R
<b>FD-07-0</b>	18/9/2017	18/9/2017	338,50	1,95	6,14	R
<b>FD-08-0</b>	20/9/2017	20/9/2017	93,25	1,92	5,92	R
<b>FD-09-0</b>	20/9/2017	20/9/2017	64,05	1,99	6,88	R
<b>FD-10-0</b>	20/9/2017	20/9/2017	116,90	1,98	6,53	R
<b>FD-11-0</b>	20/9/2017	20/9/2017	337,40	1,94	6,21	R
<b>FD-12-0</b>	22/9/2017	22/9/2017	64,95	1,99	8,25	NR
<b>FD-13-0</b>	22/9/2017	22/9/2017	59,60	2,00	6,69	R
<b>FD-14-0</b>	29/9/2017	29/9/2017	129,45	1,89	6,25	R
<b>FD-15-0</b>	29/9/2017	29/9/2017	142,10	1,97	7,45	R
<b>FD-16-0</b>	6/10/2017	6/10/2017	169,05	2,00	5,86	R
<b>FD-17-0</b>	13/10/2017	13/10/2017	77,05	2,01	9,51	NR
<b>FD-18-0</b>	18/10/2017	18/10/2017	42,25	1,97	7,72	R
<b>FD-19-0</b>	20/10/2017	20/10/2017	110,85	2,00	7,36	R
<b>FD-20-0</b>	20/10/2017	20/10/2017	108,35	2,02	6,99	R
<b>FD-21-0</b>	27/10/2017	27/10/2017	57,40	1,97	5,93	R
<b>FD-22-0</b>	27/10/2017	27/10/2017	98,15	1,99	9,75	NR
<b>FD-23-0</b>	11/12/2017	11/12/2017	121,55	1,99	7,90	R
<b>FD-24-0</b>	15/12/2017	15/12/2017	125,85	1,99	10,00	NR

**Tabla 3:** C<sub>T</sub> promedio de los polimorfismos analizados mediante PCR en tiempo real.

		<b>CYP2C9*2 (CT)</b>	<b>CYP2C9*3 (AT)</b>	<b>G465R</b>	<b>G410S/420del</b>
<b>Código</b>	<b>Grupo</b>	<b>C<sub>T</sub> Mean</b>	<b>C<sub>T</sub> Mean</b>	<b>C<sub>T</sub> Mean</b>	<b>C<sub>T</sub> Mean</b>
<b>FD-01-4</b>	R	21,05	16,18	22,56	25,20
<b>FD-02-4</b>	R	25,56	22,28	21,32	24,33
<b>FD-03-0</b>	R	28,36	22,75	24,24	22,96
<b>FD-04-0</b>	R	23,37	20,42	20,94	22,12
<b>FD-05-0</b>	R	18,76	20,62	24,03	17,75
<b>FD-06-0</b>	R	23,35	18,88	17,55	22,20
<b>FD-07-0</b>	R	22,73	24,84	21,83	22,28
<b>FD-08-0</b>	R	16,70	20,53	21,39	21,81
<b>FD-09-0</b>	R	20,58	23,49	18,02	22,42
<b>FD-10-0</b>	R	20,52	22,54	21,32	21,85
<b>FD-11-0</b>	R	17,63	23,10	23,83	23,06
<b>FD-12-0</b>	NR	21,29	21,94	22,47	19,35
<b>FD-13-0</b>	R	23,59	22,78	20,91	16,57
<b>FD-14-0</b>	R	20,62	26,39	24,43	21,96
<b>FD-15-0</b>	R	16,75	24,37	22,18	16,55
<b>FD-16-0</b>	R	24,72	22,32	22,30	22,01
<b>FD-17-0</b>	NR	22,00	21,08	21,13	20,23
<b>FD-18-0</b>	R	21,42	21,10	20,91	21,05
<b>FD-19-0</b>	R	24,63	21,20	17,36	23,05
<b>FD-20-0</b>	R	21,65	21,29	21,43	21,81
<b>FD-21-0</b>	R	23,43	23,46	22,96	24,14
<b>FD-22-0</b>	NR	23,87	20,82	24,11	21,26
<b>FD-23-0</b>	R	25,40	21,04	21,68	23,03
<b>FD-24-0</b>	NR	23,61	20,97	22,19	21,94

**Two-Sample T-Test and CI: R; NR**

Two-sample T for R vs NR

	N	Mean	StDev	SE Mean
R	20	22,04	3,08	0,69
NR	4	22,69	1,25	0,62

Difference =  $\mu$  (R) -  $\mu$  (NR)

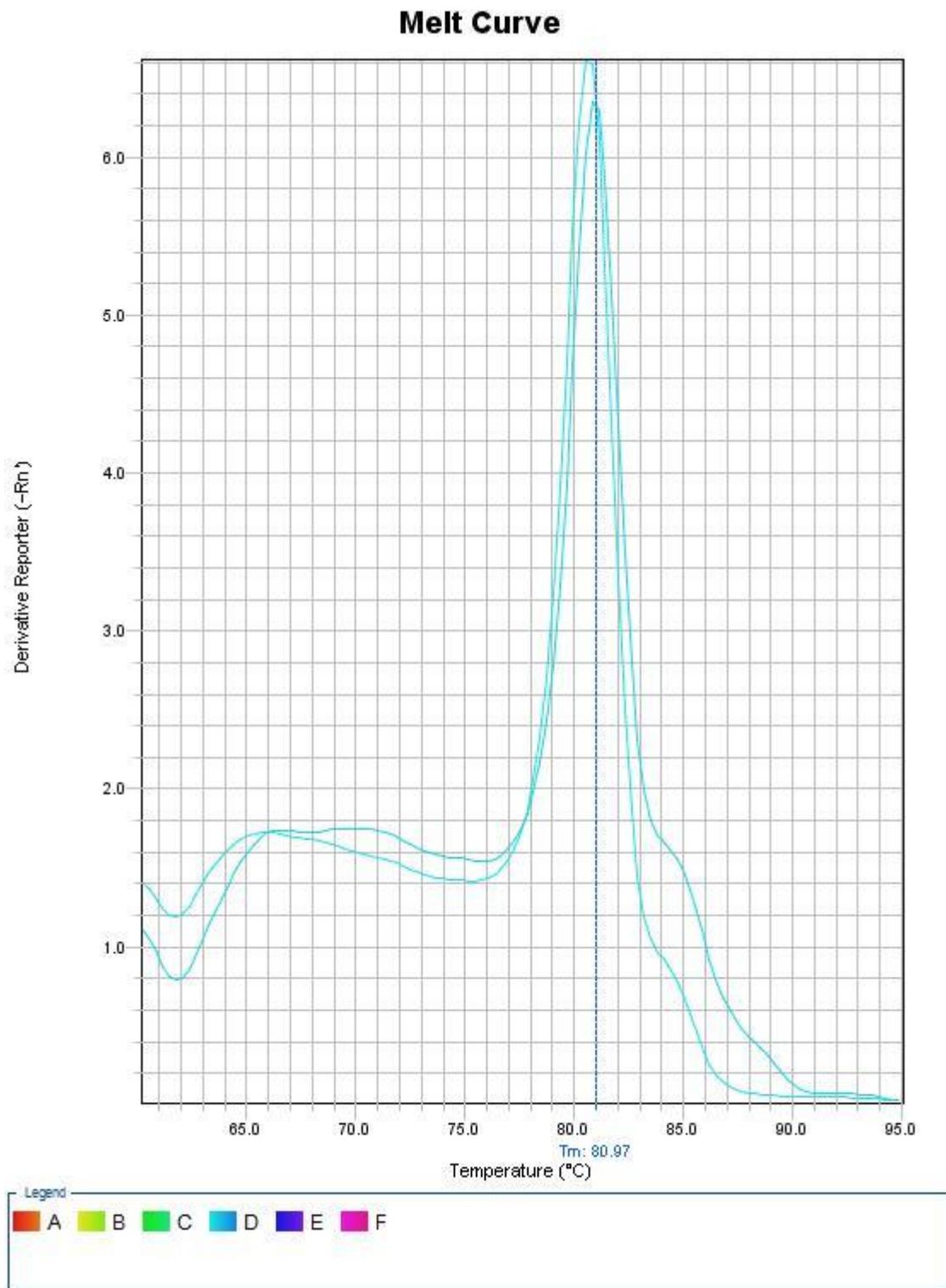
Estimate for difference: -0,65

95% CI for difference: (-3,95; 2,64)

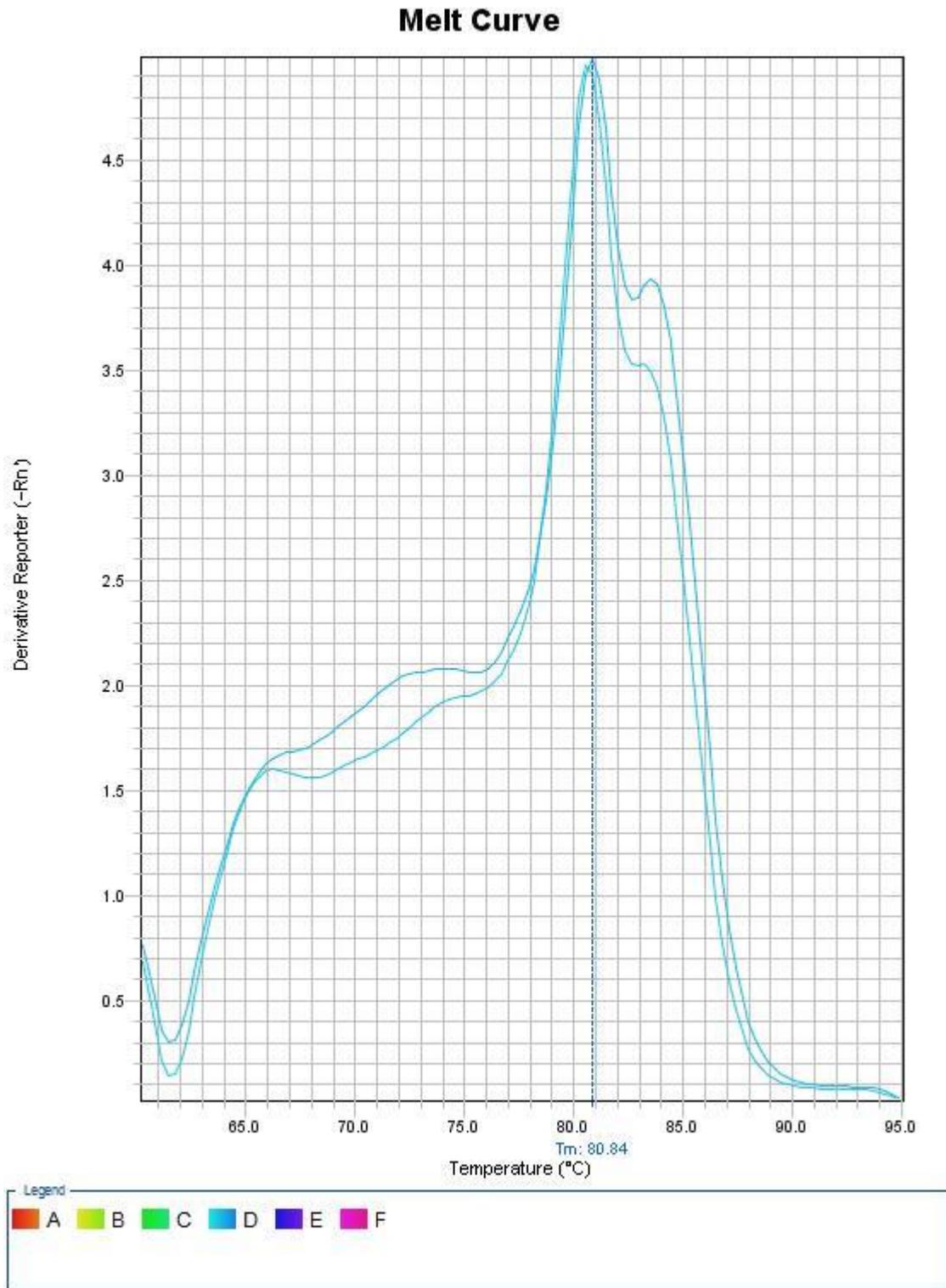
T-Test of difference = 0 (vs  $\neq$ ): T-Value = -0,41 P-Value = 0,686 DF = 22

Both use Pooled StDev = 2,9011

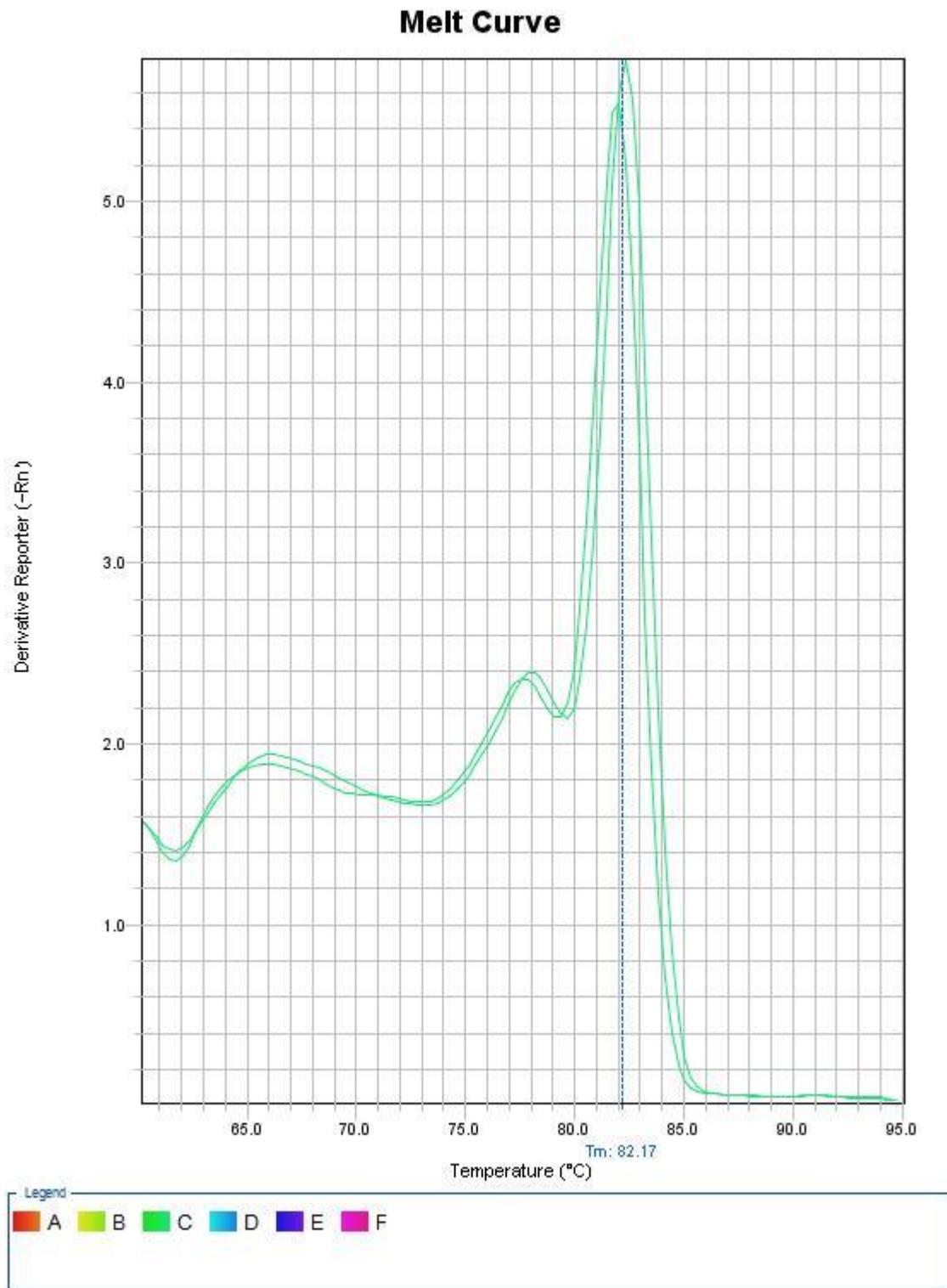
**Figura 1.** Prueba t de dos muestras para los valores  $C_T$  promedio del alelo CYP2C9\*2.



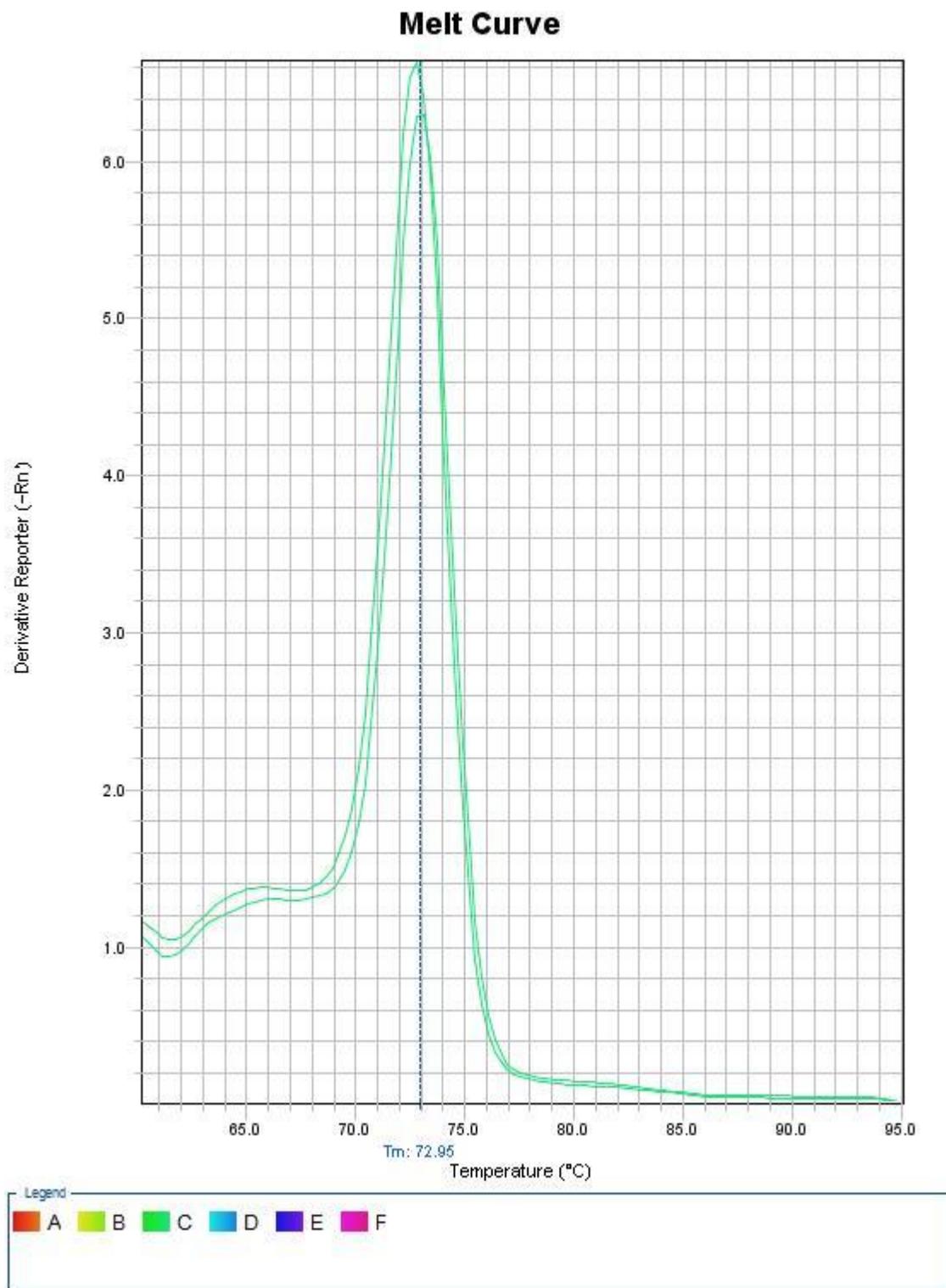
**Figura 2.** Curva de melting para la variante alélica CYP2C9\*2.



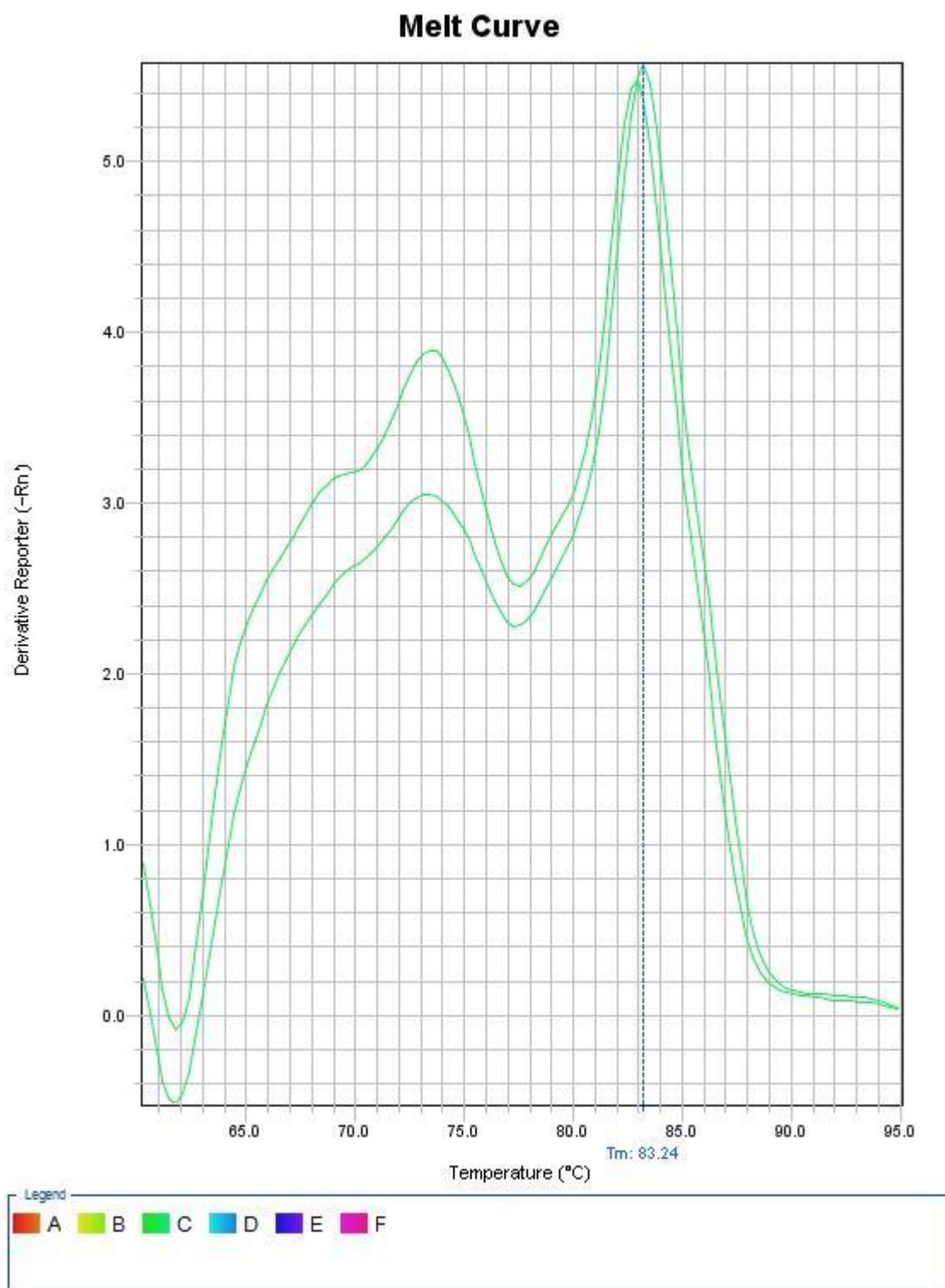
**Figura 3.** Curva de melting para la variante alélica CYP2C9\*3.



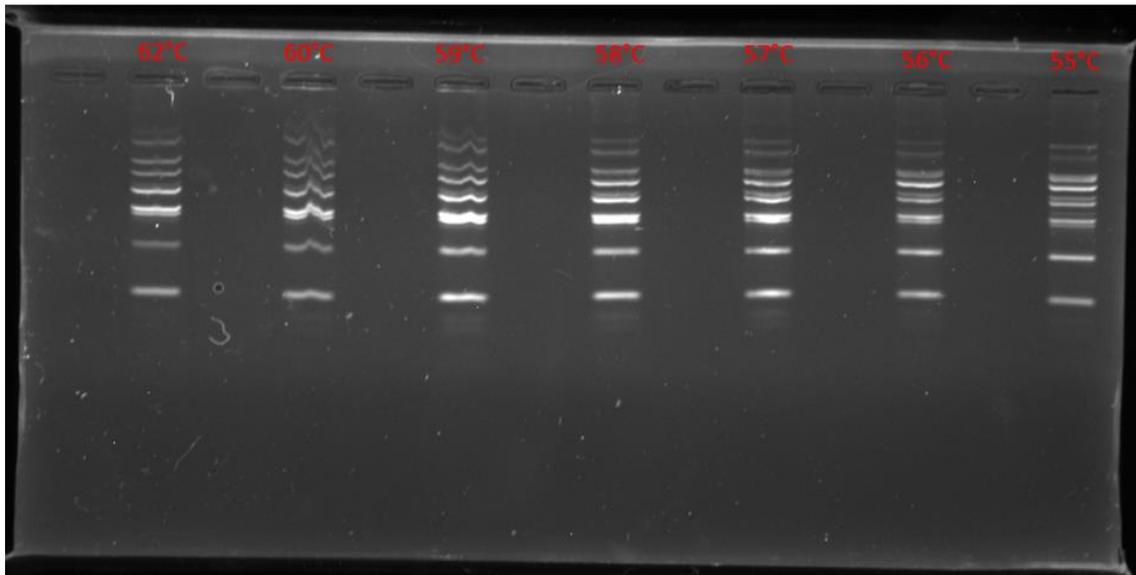
**Figura 4.** Curva de melting obtenida para la variante alélica OCT1-G410S/420del.



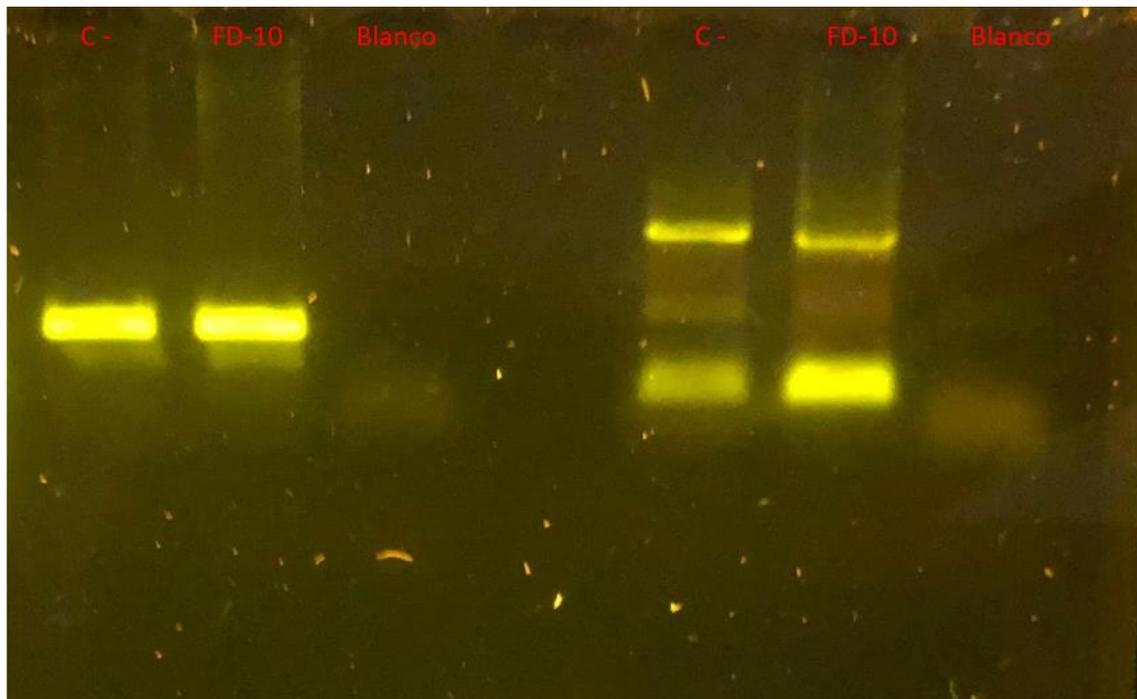
**Figura 5.** Curva de melting obtenida para la variante alélica OCT1-G465R.



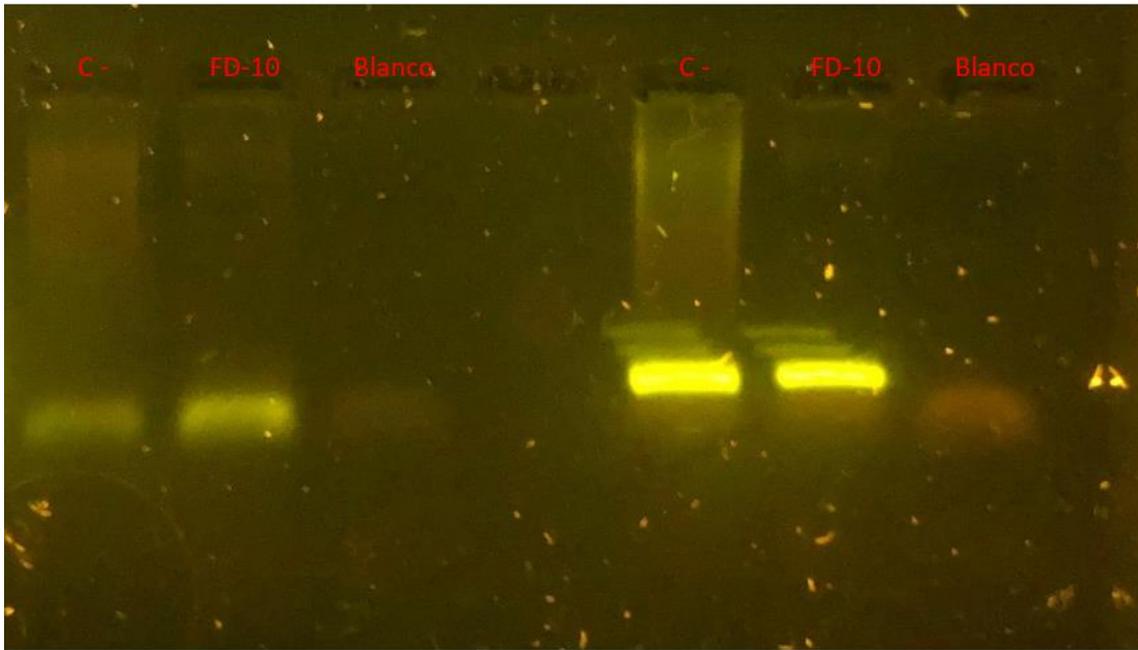
**Figura 6.** Curva de melting obtenida para la variante alélica OCT1-R61C.



**Figura 7.** PCR de gradiente para variante alélica OCT1-R61C.



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa variantes alélicas CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3.



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa variantes alélicas OCT1-G465R y OCT1-G410S/420del.