Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Evaluación genómica de variantes de respuesta a metformina en pacientes peruanos con diabetes mellitus tipo 2

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica

AUTOR

Aracely Paola SALAZAR EUSEBIO

ASESOR

Mg. Oscar ACOSTA CONCHUCOS

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Salazar A. Evaluación genómica de variantes de respuesta a metformina en pacientes peruanos con diabetes mellitus tipo 2 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Aracely Paola Salazar Eusebio
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72704449
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-6261-5412
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Oscar Acosta Conchucos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09456570
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1912-0251
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Gabriela Norma Solano Canchaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41679636
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Rojas Ríos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09738868
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Elizabeth Liz Chávez Hidalgo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41354431

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.5.4 Tecnologías ómicas y bioinformática aplicadas en salud
Grupo de investigación	Grupo de investigación de Genética, Ómicas, Bioinformática y Desarrollo Computacional aplicado a Biomedicina, Farmacia, Toxicología y Alimentos - GENOBIDC
Agencia de financiamiento	No Aplica.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324 Edificio: Hospital Nacional Dos de Mayo País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Calle: Parque "Historia de la Medicina Peruana", S/N, Av. Miguel Grau 13 Latitud: -12.0559577 Longitud: -77.0156729
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021 – 2023
URL de disciplinas OCDE	Genética humana https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.02 Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05 Bioinformática https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

EVALUACIÓN GENÓMICA DE VARIANTES DE RESPUESTA A METFORMINA EN PACIENTES PERUANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

ARACELY PAOLA SALAZAR EUSEBIO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

19 (DIECINUEVE) APROBADO CON MÁXIMOS HONORES

de conformidad con el Art. 14.° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 04 de agosto de 2023.

Dra. Gabriela Norma Solano Canchaya
Presidente

Mg. Luis Alberto Rojas Ríos
Miembro

Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo
Miembro

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. DECANA DE AMÉRICA.
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

INFORME DE EVALUACIÓN DE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD

1	Facultad	**FARMACIA Y BIOQUÍMICA**
2	Escuela	**FARMACIA Y BIOQUÍMICA**
3	Autoridad que emite el informe de originalidad	**Director de la Escuela Profesional**
4	Apellidos y nombres de la autoridad académica	**Luis Miguel V. Felix Veliz**
5	Operador del programa informático de similitudes	**Luis Miguel V. Felix Veliz**
6	Documento evaluado	**Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico: EVALUACIÓN GENÓMICA DE VARIANTES DE RESPUESTA A METFORMINA EN PACIENTES PERUANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**
7	Autor(es) del documento	Br. Salazar Eusebio Aracely Paola
8	Fecha de recepción del documento	**24/07/2023**
9	Fecha de aplicación del programa informático de similitudes	**24/07/2023**
10	Software utilizado	**Turnitin**
11	Configuración del programa detector de similitudes	**Excluye:** - **Textos entrecomillados** - **Bibliografía** - **Cadenas menores de 40 palabras**
12	Porcentaje de similitud según programa detector de similitudes	**8 % (El % de similitud debe ser ≤ 10%)**
13	Fuentes originales de las similitudes encontradas	• **Fuentes de internet varias 9 %** • **Publicaciones 7 %** • **Trabajo de estudiantes entregados a otras universidades 5 %**
14	Observaciones	Realizar la edición final de la tesis. Procede la sustentación.
15	Calificación de originalidad	**Documento cumple con los criterios de originalidad.**
16	Fecha del informe	**24/07/2023**

Nota: se adjunta archivo de reporte del sistema Turnitin en el que se resaltan las similitudes detectadas.

UNMSM
Firmado digitalmente por FELIX VELIZ Luis Miguel Visitacion FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 24.07.2023 10:49:51 -05:00

Dr. Luis Miguel V. Felix Veliz

Dedicatoria

Para mis papás Edgar y María.
Para mi hermana Larissa.
Para mis abuelos, tíos y primos.
Por su cariño y apoyo incondicional.

Agradecimientos

A la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM por las enseñanzas recibidas y el apoyo en mis estudios de pregrado.

Al Mg. Oscar Acosta por sus valiosos consejos, confianza, disposición y sobre todo su indispensable apoyo a lo largo de la realización de esta tesis.

Al Hospital Nacional Dos de Mayo, Dr. Arbañil por brindarnos el acceso a los pacientes que permitieron la realización de este trabajo.

A Renzo Cortez y a Danika por su apoyo en la obtención de muestras y parte experimental.

Al PhD Gustavo Sánchez y a la Licenciada Daisy Obispo por su apoyo en el análisis bioinformático.

ÍNDICE

Resumen ix
Abstract x
I. INTRODUCCIÓN 1
I.1. Introducción 1
I.2 Planteamiento del problema 2
I.3 Objetivos 4
I.4 Importancia y alcance de la investigación (justificación) 4
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA 6
II.1. Marco teórico 6
II.1.1. DMT2 6
II.1.1.1 DMT2: Fisiopatología 6
II.1.2. Tratamiento farmacológico de la DMT2 7
II.1.2.1. Metformina 7
II.1.2.1.4. Mecanismo de acción del fármaco metformina 9
II.1.3. Familia de transportadores de solutos (SLC) 10
II.1.3.1. Familia SLC22 10
II.1.3.1.2. Subfamilia OCTs 10
II.1.3.2. Familia SLC29 11
II.1.3.3. Familia SLC47 12
II.1.4. Gen SLC22A1 13
II.1.5. Gen SLC22A2 13
II.1.6. Gen SLC22A3 13
II.1.7. Gen SLC29A4 13
II.1.8. Gen SLC47A1 13
II.1.9. Gen SLC47A2 13
II.1.10. Variantes genéticas 13
II.1.11. Genómica 16
II.1.12. Secuenciación de Nueva Generación (NGS) 16

II.2. Antecedentes 20
II.3. Glosario de términos 22
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES 23
III.1. Hipótesis 23
III.2. Variables 23
III.3. Operacionalización de variables 24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS 25
IV.1. Área de estudio 25
IV.2. Diseño investigación 25
IV.3. Población, muestra 25
IV.4. Procedimientos, técnicas, instrumentos de recolección de información 26
IV.4.1. Toma de muestras 26
IV.4.2. Extracción y cuantificación de ADN 26
IV.4.3. Genotipaje previo del gen *SLC22A1* 27
IV.4.4. Secuenciación de Nueva Generación 27
IV.4.5. Análisis bioinformático 27
V. RESULTADOS 28
V.1. Presentación y análisis de los resultados 28
V.1.1. Calidad de los archivos Fastq de los genomas de diabéticos peruanos en tratamiento-metformina 28
V.1.2. Variantes conocidas y nuevas identificadas en los genomas de los diabéticos peruanos en tratamiento-metformina 29
VI. DISCUSIÓN 78
VII. CONCLUSIONES 91
VIII. RECOMENDACIONES 92
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 93
X. ANEXOS 104
X.I Consentimiento informado 104
X.II Lista de abreviaturas de aminoácidos 105
X.III Posible mecanismo de la relación entre ATM y metformina 106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2……. 6

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes…….…. 26

Tabla 3. Calidad de los archivos Fastq de genomas…….…… 28

Tabla 4. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC22A1……..…. 29

Tabla 5. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC22A2…….. 32

Tabla 6. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC22A3……..…. 35

Tabla 7. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC47A1…….. 39

Tabla 8. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC47A2……. 41

Tabla 9. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC29A4…….. 43

Tabla 10. Variantes conocidas y nuevas en el gen ATM……... 45

Tabla 11. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC2A2……. 61

.

Tabla 12. Variantes conocidas y nuevas en el gen CPA6……. 65

Tabla 13. Variantes conocidas y nuevas en el gen STAT3……... 67

Tabla 14. Variantes conocidas y nuevas en el gen STK11……... 69

Tabla 15. Variantes conocidas y nuevas en el gen PRKAG2…… 73

Tabla 16. Número de variantes totales reportadas por cada gen……. 76

Tabla 17. Número de variantes reportadas por cada paciente……..... 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Estructura de metformina…….. 7

Fig. 2 Transportadores catiónicos orgánicos que participan en la farmacocinética de metformina…… 8

Fig. 3 Mecanismo de acción del fármaco metformina en el hepatocito ……. 9

Fig. 4 Topología transmembrana predicha de los OCTs ……. 11

Fig. 5 Topología propuesta de PMAT Topología propuesta de PMAT……... 12

Fig. 6 Topología de membrana predicha de MATE1 y MATE2-K……..... 12

Fig. 7 Estructura de un gen ……..... 14

Fig. 8 Secuenciación de Illumina……... 19

ABREVIATURAS

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

ATM: Ataxia telangiectasia mutado

ATP: Adenosín trifosfato

CPA6: Carboxipeptidasa A6

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

GLUT2: Transportador de glucosa tipo 2

GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

INSR: Receptor de insulina

MATE1: Transportadores de extrusión de múltiples fármacos y toxinas 1

MATE2: Transportadores de extrusión de múltiples fármacos y toxinas 2

NGS: Secuenciación de próxima generación

OCT1: Transportador catiónico orgánico 1

OCT2: Transportador catiónico orgánico 2

OCT3: Transportador catiónico orgánico 3

PKA: Proteína quinasa A

PMAT: Transportador de monoaminas plasmáticas

PRPF31: Factor de procesamiento de pre-ARNm 31

SLC2A2: Transportador de solutos familia 2 (Transportador de glucosa facilitado), subfamilia A, miembro 2

SLC22: Transportador de solutos familia22

SLC22A1: Transportador de solutos familia 22, subfamilia A, miembro 1

SLC29A4: Transportador de solutos familia 29, subfamilia A, miembro 4

SLC47A1: Transportador de solutos familia 47, subfamilia A, miembro 1

SLC47A2: Transportador de solutos familia 47, subfamilia A, miembro 2

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es un trastorno metabólico caracterizado por la presencia de hiperglucemia, siendo la metformina el fármaco de primera línea y existe variabilidad individual en la respuesta farmacológica, influenciada por factores genéticos. La Genómica, utilizando las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS), permite evaluar toda la secuencia de bases o parte de ellas, y encontrar variantes que influyen en la respuesta al tratamiento farmacológico (Farmacogenómica), y específicamente con los antidiabéticos como la metformina. El objetivo de esta investigación fue evaluar por secuenciación genómica masiva la presencia de variantes de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2. Se aisló ADN genómico de 05 pacientes diabéticos en tratamiento con metformina y 01 persona sin DMT2, fueron evaluados por tecnología NGS y análisis bioinformático. Se encontraron variantes tipo SNPs e indels, 64 conocidas y 208 nuevas en los genes SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC47A1, SLC47A2, SLC29A4, ATM, SLC2A2, CPA6, STAT3, STK11 y PRKAG2, relacionadas con la respuesta a metformina. En conclusión, la tecnología NGS permitió detectar la presencia de variantes conocidas y nuevas en genes de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2, aportando al conocimiento de la Farmacogenómica de esta enfermedad altamente prevalente en el país.

Palabras clave: Diabetes mellitus tipo 2, secuenciación masiva, NGS, genómica, farmacogenómica, respuesta a metformina.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a metabolic disorder characterized by the presence of hyperglycemia, with metformin being the first-line drug; however, there is individual variability in the pharmacological response, influenced by genetic factors. Genomics, using next-generation massive sequencing (NGS) technologies, makes it possible to evaluate all or part of the base sequence, and find variants that influence the response to drug treatment (Pharmacogenomics), and specifically with antidiabetics such as metformin. The objective was to evaluate by massive genomic sequencing the presence of response variants to metformin in Peruvian patients with DMT2. Genomic DNA was isolated from 05 diabetic patients on treatment with metformin and 01 person without DMT2, they were evaluated by NGS technology and bioinformatic analysis. Variants of the SNPs and indels type, 64 known and 208 new, were found in the genes SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC47A1, SLC47A2, SLC29A4, ATM, SLC2A2, CPA6, STAT3, STK11 and PRKAG2, related to the response to metformin. In conclusion, the NGS technology allowed us to detect the presence of known and new variants in metformin response genes in Peruvian patients with DMT2, contributing to the knowledge of the Pharmacogenomics of this highly prevalent disease in the country.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, massive sequencing, NGS, genomics, pharmacogenomics, response to metformin.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad metabólica resultante de la interacción entre la predisposición genética de cada persona y factores ambientales como la poca actividad física, obesidad, dieta poco saludable, entre otros[1,2]. En la DMT2 los niveles de glucosa en sangre se encuentran elevados debido a la resistencia a la insulina, el incremento de la síntesis de glucosa hepática y la secreción deficiente de insulina en las células-β del páncreas[2].

En el año 2021, de acuerdo a cifras de la Federación Internacional de Diabetes, en el mundo se reportaron 537 millones de adultos (20-79 años) diabéticos, siendo 32 millones de América del Sur y América Central. En Perú hubo 1 millón 300 mil adultos diabéticos[3].

La metformina es el fármaco de primera línea en el tratamiento de la DMT2, la cual disminuye los niveles al reducir la producción de glucosa en el hígado y al aumentar la captación de glucosa en el músculo esquelético y disminuir la absorción intestinal de glucosa. La metformina presenta beneficios secundarios como la reducción de triglicéridos plasmáticos, colesterol y en pacientes que presentan obesidad o sobrepeso promueve la pérdida de peso[4].

La metformina es absorbida por los enterocitos mediante PMAT y OCT3 que se localizan apicalmente y después por el OCT1, ubicado en la membrana basolateral, se transporta a la vía sistémica. Luego, por medio de OCT1 y OCT3, ingresa a los hepatocitos y allí produce su efecto farmacológico. Finalmente, la metformina ingresa a los riñones a través de OCT2 y se elimina por la orina por la acción de MATE1 y MATE2-K[5].

Existe una variabilidad en la respuesta a metformina, con algunos pacientes que presentaron una reducción de su porcentaje de HbA1c en casi un 4 %, mientras que otros pacientes no mostraron cambios o aumentos significativos en la HbA1c después

del tratamiento y la mayor parte de dicha variabilidad se debe a causas genéticas[6]. A pesar de que se han estudiado algunas variantes en genes relacionados a la farmacocinética y farmacodinamia de metformina y se han asociado con la variabilidad de la respuesta de los pacientes al tratamiento, pueden existir otras variaciones genéticas que aún no han sido reportadas y que pueden ser determinantes en la respuesta a metformina[7].

La genómica estudia todos los genes de un individuo con el fin de identificar variantes en genes que causan enfermedades o que se asocian a la variabilidad de respuesta al tratamiento farmacológico (farmacogenómica), y las técnicas de secuenciación masivamente paralelas y de alto rendimiento conocidas como secuenciación de nueva generación (NGS) han sido fundamentales para el desarrollo de la genómica[8,9].

La secuenciación de nueva generación (NGS) es una tecnología de secuenciación del ADN a gran escala relativamente nueva y rápida que permite secuenciar todo el genoma, por lo que puede contribuir a encontrar variantes genéticas relacionadas a la respuesta diferencial al tratamiento con metformina[10].

En esta perspectiva, el objetivo de la investigación es evaluar por secuenciación genómica masiva la presencia de variantes de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2.

I.2 Planteamiento del problema

La metformina es el fármaco antidiabético por vía oral de primera línea, sin embargo, no todos los pacientes tienen la misma capacidad de respuesta, la variación interindividual comprende desde la disminución del porcentaje de hemoglobina glucosilada (HbA1c) en casi un 4%, hasta el aumento de los valores de HbA1c y la tasa de fracaso de la monoterapia de metformina es 35%, la mayor parte de dicha variabilidad puede estar influenciada por factores genéticos[6,7].

Si bien se han estudiado algunas variantes en genes que codifican proteínas de membrana que transportan metformina y asociadas a la variabilidad en la respuesta

al tratamiento, podrían existir otras variaciones genéticas que aún no han sido reportadas y que podrían ser determinantes en la respuesta farmacológica a metformina[7].

En Perú, se ha determinado en pobladores sanos (Lima y Puno) mediante PCR-RFLP, los genotipos y alelos de la variante Val408Met en el gen *SLC22A1*, que en otras etnias ha sido relacionado con la respuesta diferencial a metformina, y la presencia de efectos adversos (principalmente gastrointestinales), durante el tratamiento[11,12]. En el país, aún no se han realizado estudios que incluyan pacientes en tratamiento donde se busquen e identifiquen variaciones, no solo en el gen SLC22A1, sino también en otros genes, inclusive regiones no codificantes (intergénicas) y otras, es decir en el genoma completo, que se relacionen con la variación en la respuesta diferencial a la metformina.

Aunque la secuenciación de nueva generación (NGS) permite la detección de variantes genéticas comunes y raras, incluso nuevas, en el genoma, hasta el momento existen pocos estudios que evalúen, por secuenciación genómica masiva, las variantes relacionados a la respuesta diferencial a metformina, por lo que aún no se cuenta con la información necesaria (perfiles farmacogenómicos) que ayuden eficientemente a la toma de decisiones en el tratamiento de primera línea de los pacientes diabéticos[13].

I.2.1 Formulación del problema de investigación:

¿Existirán variantes de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2 evaluadas por secuenciación genómica masiva?

I.3 Objetivos

I.3.1 Objetivo general

Evaluar por secuenciación genómica masiva la presencia de variantes de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2.

I.3.2 Objetivos específicos

I.3.2.1 Realizar la secuenciación genómica masiva-NGS de muestras de pacientes diabéticos peruanos en tratamiento con metformina.

I.3.2.2 Identificar variantes conocidas en genes de respuesta a metformina en pacientes diabéticos peruanos.

I.3.2.3 Identificar variantes nuevas en genes de respuesta a metformina en pacientes diabéticos peruanos.

I.4 Importancia y alcance

En el año 2021 se reportaron 531 millones de adultos en el mundo con DMT2 y 1 millón 300 mil adultos diabéticos en Perú, siendo esta enfermedad un importante problema de salud pública[3].

Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, han proporcionado nuevos conocimientos sobre las bases moleculares de la DMT2, por lo que los estudios de evaluación genómica de variantes de respuesta a metformina en pacientes diabéticos son de vital importancia debido a que existe una intervariabilidad en la respuesta al tratamiento de metformina como medicamento de primera línea[7,14].

Algunas variaciones en los genes que codifican las proteínas de membrana que transportan metformina, como los transportadores de cationes orgánicos (OCTs), el transportador de monoaminas de membrana plasmática (PMAT) y los transportadores

de extrusión de múltiples fármacos y toxinas (MATE) afectan la farmacocinética de metformina y la respuesta al tratamiento en pacientes diabéticos de diferentes etnias[7]. Pero en el caso de Perú solo se ha estudiado la distribución del polimorfismo Val408Met del gen OCT1 en pacientes diabéticos y no las variaciones de los demás genes que codifican las proteínas de membrana involucradas en la farmacocinética de metformina, ni tampoco se han realizado estudios de asociación entre las variaciones en los genes que codifican los transportadores implicados en la farmacocinética de metformina y la respuesta a metformina, por lo que podrían existir más variaciones genéticas en pacientes diabéticos peruanos que o bien hayan sido reportadas en otras etnias o bien otras variaciones en estos genes que aún no hayan sido reportadas que pueden ser determinantes en la respuesta al tratamiento con metformina[15,16,17,18,19,20,21].

Es por ello que la secuenciación masiva o análisis genómico (genomas, exoma o regiones específicas) de pacientes diabéticos tiene un gran potencial para ayudar a personalizar el tratamiento de los pacientes con DMT2, como por ejemplo, si un diabético presenta variantes genéticas relacionadas con una respuesta ineficaz a metformina, se puede utilizar para su tratamiento otros fármacos antidiabéticos.

El enfoque de las ómicas es fundamental para el avance de la medicina de precisión de la DMT2 y con el desarrollo de las nuevas tecnologías NGS para evaluar la casi totalidad de los 3 mil millones de bases, el denominado genoma humano, se ha logrado avances en la comprensión y se ha ampliado la obtención de datos masivos y de esa manera, mediante análisis bioinformático se pueden encontrar variantes genéticas relacionadas a la respuesta diferencial al fármaco metformina[7]. Es por ello que el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar mediante genómica la presencia de variantes de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

II.1.1. DMT2

La DMT2 es una enfermedad metabólica que se caracteriza por la hiperglucemia, que es desencadenada por la resistencia a la insulina, el aumento de glucosa hepática y la secreción defectuosa de insulina por las células β del páncreas[1,22,23]. El diagnóstico de la DMT2 se confirma por medio de la realización de pruebas de laboratorio detalladas en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de DMT2

Criterios de Diagnóstico	
Prueba de laboratorio	**Valor diagnóstico**
Cantidad de glucosa plasmática	≥ 200 mg/dL
Glucosa plasmática en ayunas	≥ 126 mg/dL
Prueba de tolerancia a la glucosa	≥ 200 mg/dL
HbA1c	≥ 6.5%

Fuente: Grossman S, *et a*l[22].

II.1.1.1 DMT2: Fisiopatología

La DMT2 es una enfermedad metabólica caracterizada por la hiperglucemia provocada por la resistencia a la insulina en el hígado, los músculos y el tejido adiposo, el aumento de síntesis de glucosa hepática y la secreción deficiente de insulina por las células β del páncreas[1,2].

La resistencia insulínica en el músculo se debe a variantes o mutaciones que disminuyen la expresión del gen del receptor de la insulina (INSR) y del GLUT4, que en consecuencia, disminuyen la captación de glucosa[24,25].

En el tejido adiposo la resistencia a la insulina altera la inhibición de la lipólisis y se libera mayor cantidad de ácidos grasos, los cuales se almacenan hepáticamente y producen señales insulínicas deficientes que fomentan la gluconeogénesis[25].

A todo esto, las células β del páncreas compensan la resistencia a la insulina al secretar más insulina para mantener la glucosa, pero con el transcurso del tiempo la resistencia a la insulina aumenta y ya no se mantiene la normoglucemia[26]. El aumento de la secreción de insulina ocasiona el agotamiento y fallo de las células β, lo que reduce la secreción de insulina y aumentan los niveles de glucosa. La pérdida de función de las células β se puede deber a apoptosis, agotamiento, lipotoxicidad, glucotoxicidad y la reducción de la masa celular β. La mayor dinámica de la gluconeogénesis se debe a una menor señalización por insulina y al aumento de la señalización por glucagón[22,25,27].

II.1.2. Tratamiento farmacológico de la DMT2

II.1.2.1. Metformina.

El fármaco metformina (1,1-dimetilbiguanida) es la primera línea de tratamiento para la DMT2. La estructura se observa en la Fig. 1[28,29].

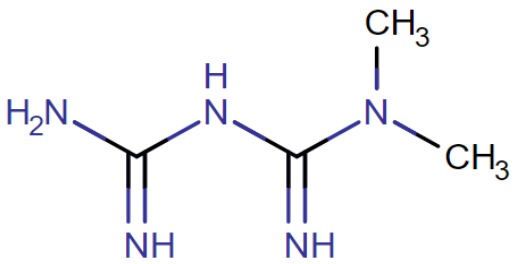


Fig. 1 Estructura de metformina.
Fuente: DrugBank[30].

II.1.2.1.1. Propiedades físico-químicas

Metformina posee una estructura guanidínica polar, es una base hidrofílica fuerte con un valor de pka=11.5, a pH fisiológico se encuentra, en más del 99%, como especies hidrofílicas catiónicas y las especies no ionizadas presentan baja lipofilicidad debido al valor bajo de logP=-1.43[29,31,32,33].

II.1.2.1.2. Efectos adversos

Los efectos adversos gastrointestinales son los más frecuentes (30%) y se encuentran incluidos el dolor en el abdomen, diarrea, náuseas, vómitos, que por lo regular se

presentan al empezar el tratamiento y son temporales, pero el 5% de casos no los tolera y detiene el tratamiento[34,35,24].

II.1.2.1.3. Farmacocinética

- **Absorción**

  Metformina se administra por vía oral y se absorbe en el intestino delgado, ingresa a través del PMAT y del OCT3 localizados en zona apical de los enterocitos y después por OCT1, localizado en la membrana basolateral, se transporta hacia la circulación sanguínea (Ver Fig. 2)[5,29,36].

- **Distribución**

  Metformina se distribuye en el hígado, intestino, riñones y músculo. Metformina es captada en el hígado por OCT1 y por OCT3, el cual también permite el ingreso de metformina al músculo esquelético (Ver Fig. 2)[5].

- **Metabolismo**

  No se metaboliza en el hígado ni en los riñones[5].

- **Eliminación**

  Metformina ingresa al riñón por OCT2 que se localiza en la región basolateral del tubo proximal y por la MATE1 y MATE2-K es excretada por la orina[5,37]. Metformina también es mínimamente eliminada en la bilis a través de MATE1, que se ubica en el hígado (Ver Fig. 2)[33,38,39,40].

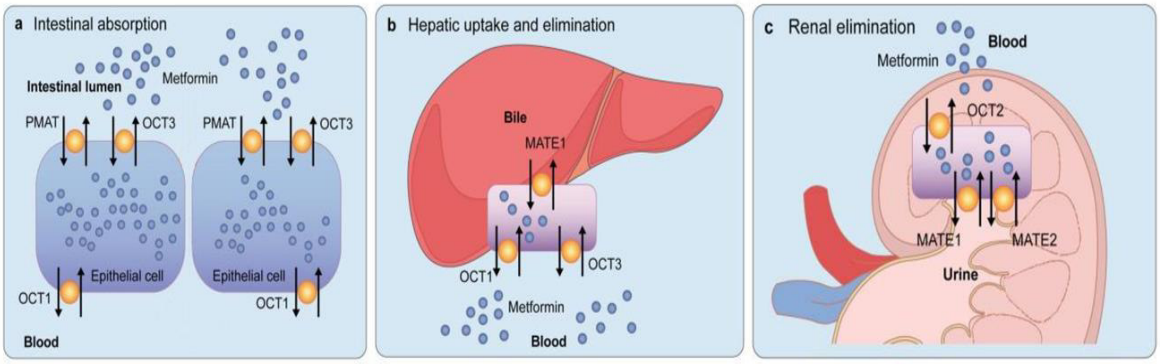


Fig. 2 Transportadores catiónicos orgánicos que participan en la farmacocinética de metformina. **(a)** Después de la ingestión, metformina es captada por los enterocitos a través de PMAT y OCT3 y luego a través de OCT1 se transporta a la sangre **(b)** Cuando llega al hígado OCT1 y OCT3 absorben metformina en los hepatocitos. La eliminación de metformina en la bilis es facilitada por MATE1. **(c)** A través de OCT2 metformina ingresa en el riñón, mientras que MATE1 y MATE2-K excretan metformina inalterada en la orina. Tomada de Flores JC[38].

II.1.2.1.4. Mecanismo de acción del fármaco metformina

La metformina llega al hígado por medio del OCT1 e inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, reduciendo la oxidación del NADH y el flujo de protones, disminuyendo la síntesis del ATP[41]. La reducción de los niveles de ATP mitocondrial ocasiona el incremento de las proporciones citoplasmáticas de ADP/ATP y AMP/ATP. El aumento de AMP/ATP inhibe la fructosa 1,6 bisfosfatasa, provocando una rápida disminución de la gluconeogénesis[39]. El aumento de la relación de AMP:ATP también activa AMPK, la cual inhibe la síntesis de grasa y promueve su oxidación[39,42,43]. Además, AMPK fosforila y aumenta la actividad del receptor de insulina y mejora la translocación de los transportadores de glucosa, mejorando así la sensibilidad a la insulina (Ver Fig. 3)[32,44,45].

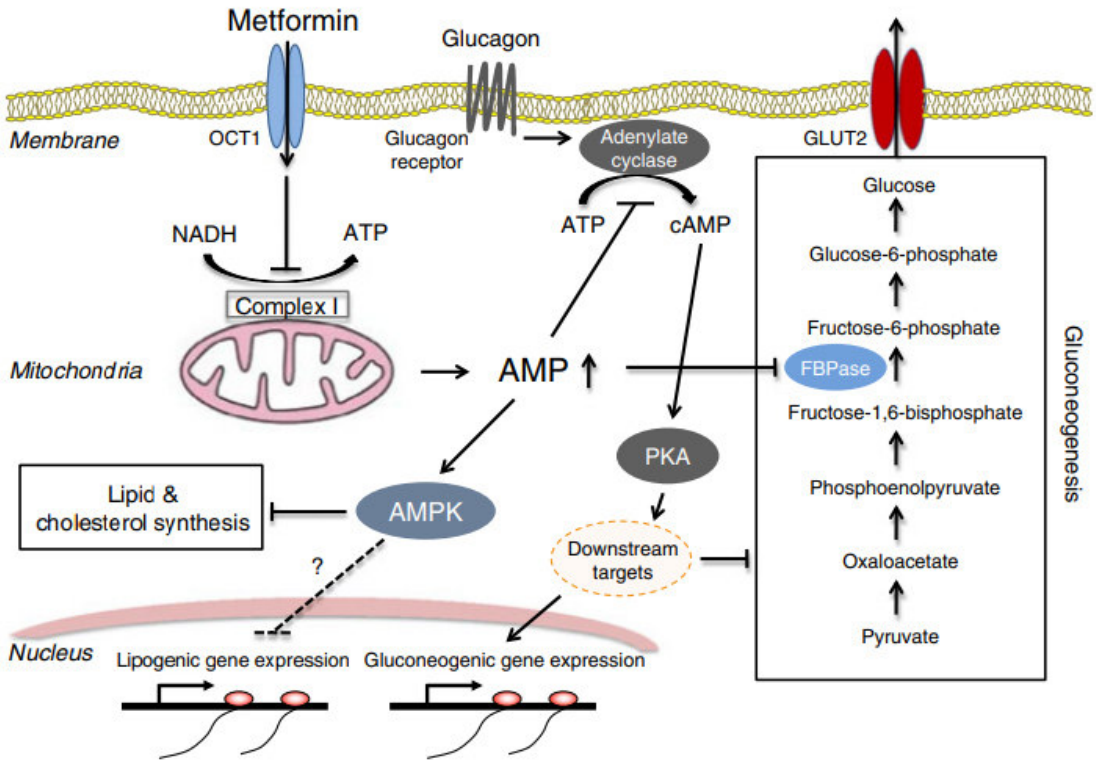


Fig. 3 Mecanismo de acción del fármaco metformina en el hepatocito.Tomado de Rena, *et al*[46].

Los niveles de glucagón se encuentran elevados en la DMT2 y la metformina inhibe su señalización cuando el AMP se une a la adenilato ciclasa e inhibe su activación y disminuye la síntesis de AMPc y la activación de PKA, reduciendo la actividad

transcripcional de los genes codificantes de la fosfoenolpiruvato quinasa y glucosa-6-fosfatasa (Ver Fig. 3)[44,47].

II.1.3. Familia de transportadores de solutos (SLC)

La familia de transportadores de solutos (SLC) está conformada por transportadores asociados a membranas cuya función es facilitar el paso de solutos como péptidos, aminoácidos, iones inorgánicos, neurotransmisores, fármacos y otros compuestos biológicamente activos a través de las membranas celulares (membrana plasmática y la membrana de organelas intracelulares). La estructura de los transportadores SLC consiste en varias α-hélices transmembranas conectadas por bucles intra y extracelulares[48]. En total son aproximadamente 400 transportadores organizados en 65 familias SLC en función de la homología de sus secuencias y el mecanismo de transporte[49,48,50,51].

En la familia SLC se encuentran transportadores pasivos (también conocidos como uniportadores o portadores de difusión facilitada) que transportan el sustrato por su gradiente de concentración y transportadores secundarios activos (simportadores y antiportadores) que catalizan el movimiento de un sustrato contra su gradiente de concentración, impulsado por el movimiento de uno o más iones en un gradiente electroquímico[52].

II.1.3.1. Familia SLC22

Los miembros de SLC22 se encargan del transporte de metabolitos endógenos (monoamina, L-carnitina, α-cetoglutarato, cAMP, cGMP, entre otros), fármacos y xenobióticos en el cuerpo. La familia SLC22 comprende a los OCTs, transportadores aniónicos orgánicos (OATs) y de cationes/zwitteriones orgánicos (OCTNs)[53,54].

II.1.3.1.2. Subfamilia OCTs

Los miembros de la subfamilia de OCTs (OCT1, OCT2, OCT3) tienen estructuras similares, mecanismo de transporte y especificidad de sustrato. Los OCTs cumplen un rol esencial en la absorción intestinal, la captación hepática y la excreción renal de fármacos como metformina, cimetidina, procainamida, entre otros[55,56,57,58].

Las proteínas OCTs presentan 542-556 aminoácidos y la identidad de la secuencia de aminoácidos de OCT1 y OCT2 es del 70% y del 50% para OCT1/OCT3 y OCT2/OCT3[55]. Además, presentan 12 dominios de transmembrana α helicoidales (TMDs), un extremo carboxilo (-COOH) y un extremo amino (-NH2) ubicados intracelularmente, con grandes bucles en sitios de N-glicosilación entre TMD-1 y 2 y de fosforilación entre TMD-6 y 7 (Ver Fig. 4)[52].

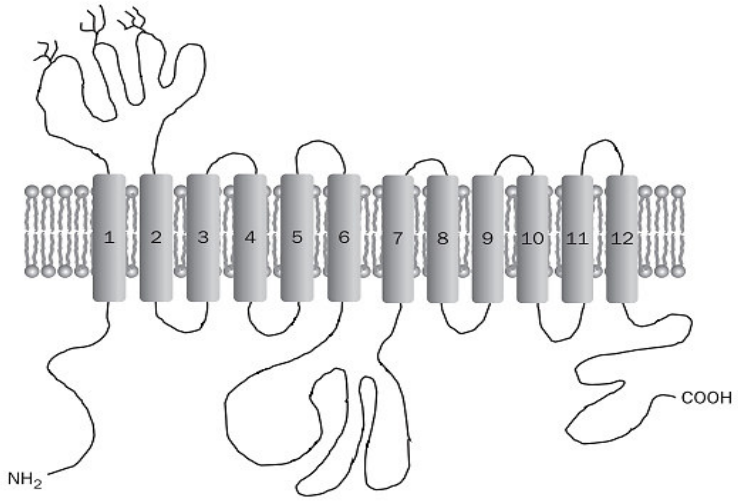


Fig. 4 Topología transmembrana predicha de los OCTs. Las proteínas contienen 12 dominios de transmembrana α helicoidales. Tomado de Lai Y[52].

II.1.3.2. Familia SLC29

La familia SLC29 está conformada por cuatro transportadores (ENT1-4). ENT1-3 transportan nucleósidos de purina y pirimidina y sus análogos estructurales, mientras que ENT4 o mayormente conocido como PMAT transporta neurotransmisores monoamínicos, como serotonina, dopamina, guanidina, histamina, epinefrina y norepinefrina. Además, participa en la absorción intestinal de metformina y atenolol. Se predice que PMAT presenta 11 dominios transmembrana con un extremo N intracelular largo y un extremo C extracelular corto (Ver Fig. 5). PMAT se expresa mayormente en el cerebro, pero se también se expresa en el intestino delgado, cerebelo, riñón y corazón[59].

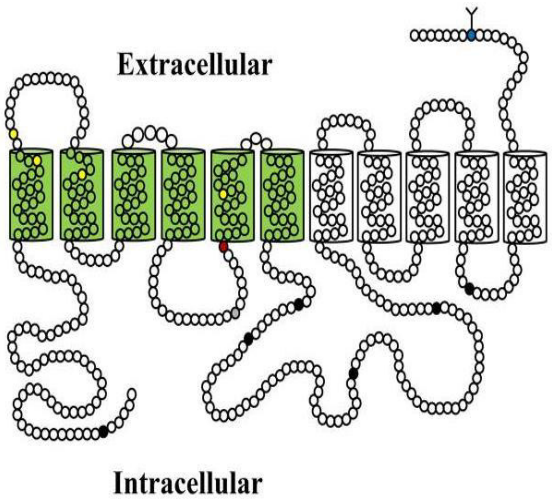


Fig. 5 Topología propuesta de PMAT. Presenta 11 dominios transmembrana. Círculo azul con líneas ramificadas: sitio de glicosilación potencial unido a N. Círculos negros rellenos: sitios de fosforilación de la proteína quinasa C. Círculo gris relleno: sitio de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Los TMD1-6 sombreados de verde son importantes para el reconocimiento de sustratos. Tomado de Wang J[59].

II.1.3.3. Familia SLC47

La familia SLC47 está conformada por MATE1 y MATE2-K que presentan 570 y 602 aminoácidos, respectivamente. Se predice que las proteínas MATE presentan 13 dominios transmembrana con un terminal -NH2 en la cara intracelular y un terminal -COOH en la cara extracelular de la membrana plasmática. MATE1 se expresa mayormente en el hígado y el riñón, y en menor medida en el músculo esquelético. MATE1 es un exportador de cationes orgánicos de un par de H^+ y es responsable del transporte de cationes orgánicos a la orina y la bilis. MATE2-K se expresa predominantemente en el riñón y funciona como intercambiador de cationes orgánicos/H^+ electroneutrales (Ver Fig. 6)[52].

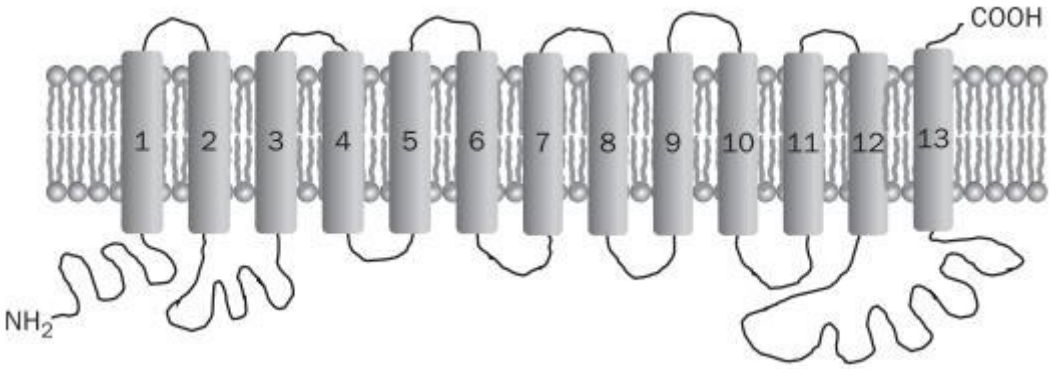


Fig. 6 Topología de membrana predicha de MATE1 y MATE2-K. Presentan 13 dominios transmembrana y ningún sitio de N-glicosilación. Tomado de Lai Y[52].

II.1.4. Gen SLC22A1

Denominado también OCT1, se localiza en el brazo largo del cromosoma 6, región 2, banda 5 y sub-banda 3 (6q25.3). Tiene 38,783 bases, 11 exones, 10 intrones[60,61]. Este gen codifica para el OCT1[62].

II.1.5. Gen SLC22A2

El gen SLC22A2 u OCT2 se localiza en el 6q25.3. Tiene 106,578 bases, 11 exones, 10 intrones. El gen SLC22A2 codifica par el OCT2[63].

II.1.6. Gen SLC22A3

Este gen denominado OCT3, al igual que el OCT1 y OCT2, se encuentra en el 6q25.3; tiene 106,605 bases, 11 exones, 10 intrones y codifica para el OCT3[64].

II.1.7. Gen SLC29A4

El gen SLC29A4 o PMAT se localiza en el 7p22.1. Tiene 32,602 bases. El gen SLC29A4 codifica para el PMAT[65].

II.1.8. Gen SLC47A1

El gen SLC47A1 o MATE1 se localiza en el 17p11.2. Tiene 83,650 bases. El gen SLC47A1 codifica a MATE1[66].

II.1.9. Gen SLC47A2

El gen SLC47A2 o MATE2 también se localiza en el 17p11.2. Tiene 41,311 bases. El gen SLC47A2 codifica a MATE2-K[67].

II.1.10. Variantes genéticas

Una variación genética es el cambio en la secuencia de un nucleótido del ADN. Algunas variantes genéticas no tienen efecto, o muy bajo, sobre el fenotipo, mientras que otras afectan la variabilidad fenotípica de la eficacia y las reacciones adversas o toxicidad de los medicamentos, etc[68].

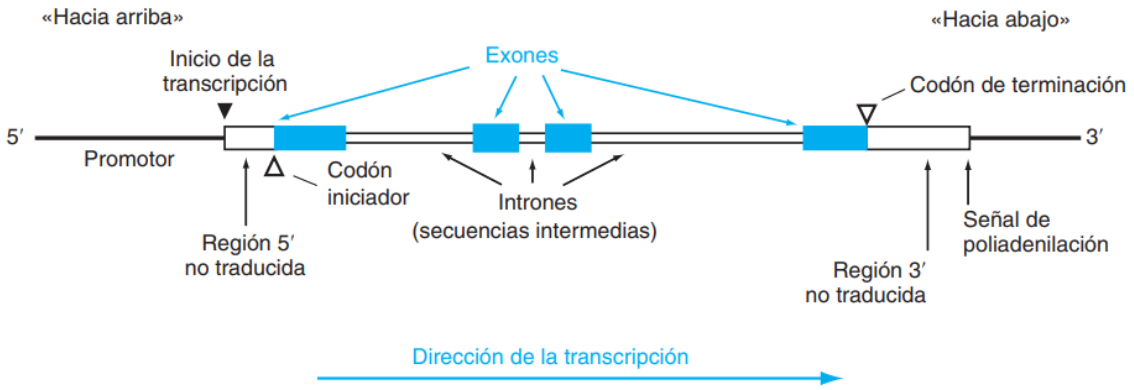


Fig. 7 Estructura de un gen. Tomado de Nussbaum, *et al*[68].

Los cambios pueden situarse en la región codificante de los genes, y generar diferentes proteínas que pueden asociarse a fenotipos distintos. Los cambios también pueden estar localizados entre genes (regiones intergénicas), en los intrones y en sitios reguladores, todos ellos importantes para el fenotipo al impactar la transcripción y/o la estabilidad del ARNm (Ver Fig. 7)[68].

- **Variante "missense" o con cambio de sentido:** Es una variante en la cual se sustituye un único nucleótido en el ADN que altera el código (triplete de bases) y genera el reemplazo de un aminoácido por otro en la proteína codificada[68].
- **Variante sinónima:** Es una variante en la cual se sustituye un único nucleótido en una secuencia de ADN que no cambia un aminoácido por otro en la proteína codificada[69].
- **Variantes "nonsense" o sin sentido:** Es la variante en el ADN que causa el cambio del codón normal por cualquiera de los tres codones de parada (stop). La traducción del ARNm se detiene al alcanzar un codón de terminación, por lo tanto, una variación que convierte una secuencia presente en un codón de parada, genera que la traducción se detenga sin terminar de leer la secuencia codificante del ARNm. El ARNm portador de una variación de terminación prematura es generalmente poco estable (degradación del ARNm por variante sin sentido), y eso imposibilita la traducción. Incluso cuando el ARNm es estable y factible su

traducción, la proteína generada es tan inestable que puede ser sujeta de una rápida degradación[68].

- **Variaciones del procesamiento del ARN:** El mecanismo que convierte los transcriptos iniciales de ARN en ARNm maduro pasa por una serie de modificaciones, como el agregado de la Cap 5´ (caperuza 5'), la poliadenilación y el splicing (el corte y empalme), las cuales dependen de secuencias específicas en el ARNm. En el splicing, se eliminan los intrones del pre-ARNm y se ligan los exones, alineando todos los exones del gen en el ARNm maduro. Para que los intrones del ARN inmaduro se separen y los exones se empalmen y generar un ARNm maduro es importante una secuencia específica en la unión entre exón e intrón (sitio donador 5'), o en la unión entre exón e intrón (sitio aceptor 3'), o cercana a esas regiones. Las variantes que afectan, tanto en el sitio donador como en el aceptor, interfieren e impiden totalmente el proceso de splicing normal del ARN en ese sitio. Por lo tanto, en esos casos el ARNm maduro puede tener secuencias intrónicas (retención parcial) ensambladas incorrectamente o puede conducir a la omisión (parcial) de un exón[70].

  Las variaciones ubicadas en los intrones también pueden afectar el splicing e implican una sustitución de las bases del intrón, que no afecta a la secuencia de los sitios donadores o aceptores. Las variaciones pueden generar sitios donantes o aceptores alternativos, que compiten con los sitios naturales durante el proceso molecular del ARN[68].

  Otras posiciones de nucleótidos en los intrones son más variables en su conservación, y los impactos de la variación genética en estas posiciones dependen de múltiples factores[71].
- **Indels (Inserción-deleción):** Son las variantes generadas por la inserción o la deleción (indels) de 2 a 100 bases. Las indels pueden tener un efecto importante en la estructura de la proteína, lo que lleva a la desestabilización y al plegamiento incorrecto[68,72].

II.1.11. Genómica

La genómica estudia todos los genes de un individuo, aplica la secuenciación de nueva generación (NGS) y la bioinformática para analizar la estructura y función del genoma completo o una gran fracción de él, con el fin de determinar variantes en genes relacionadas a la susceptibilidad a una enfermedad y a patrones de respuesta al tratamiento (farmacogenómica)[73].

II.1.12. Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

La secuenciación de nueva generación (NGS) es un grupo de tecnologías diseñadas para secuenciar el genoma de forma masiva y en paralelo, facilitando la secuenciación simultánea de millones de cadenas de ADN, pertenecientes al genoma fragmentado, en una sola ejecución, en poco tiempo y a un costo rentable[74,75]. La secuenciación de nueva generación (NGS) comprende a las tecnologías de secuenciación desarrolladas posteriormente a la secuenciación de Sanger. Mientras que el término "generación" se refiere a la química y la tecnología utilizadas en el proceso de secuenciación[75]. El flujo de trabajo de NGS consiste en el preprocesamiento de muestras, preparación de bibliotecas, secuenciación y análisis bioinformático[76].

Las variantes genéticas que pueden ser identificadas por NGS incluyen variantes de un solo nucleótido (SNV), pequeñas inserciones y deleciones (indels), variaciones en el número de copias (CNV) y grandes variantes estructurales (SV)[77].

- **Preprocesamiento de muestras**

El ADN se extrae a partir de muestras biológicas (sangre, saliva, etc.) por métodos químicos tradicionales o por kits comerciales[76].

- **Preparación de bibliotecas**

El ADN extraído y que será secuenciado mediante NGS es fragmentado en diversos tamaños y se ligan adaptadores en los extremos de cada fragmento para permitir que los primers de secuenciación se unan a todos los fragmentos de ADN[76,78].

- **Secuenciación**

La secuenciación se realiza utilizando un determinado secuenciador según la plataforma de NGS a utilizar[78].

- **Tecnología Illumina**

La tecnología de Illumina, pertenece a la segunda generación de NGS, y se basa en la técnica de amplificación en puente y el método de secuenciación por síntesis. El ADN genómico se fragmenta y luego ambos extremos de cada uno de los fragmentos son ligados con adaptadores que son complementarios a oligonucleótidos que se encuentran en la superficie de un canal de celda de flujo[79,80,81]. Los fragmentos de doble cadena se desnaturalizan quedando solo fragmentos de cadenas individuales que se colocan en los canales de la celda de flujo, uno de los adaptadores de cada fragmento se hibrida con los oligonucleótidos en la superficie, los cuales cumplen la función de primers, y se sintetiza la hebra complementaria de cada fragmento. Luego los fragmentos originales son eliminados, quedando solo las hebras complementarias de los fragmentos inmovilizadas en la superficie de la celda de flujo, las cuales son utilizadas para dar inicio a la amplificación en puente, en la que el extremo 3' de los fragmentos se hibridan con los oligonucleótidos complementarios en la celda de flujo, formando así una estructura de puente. Al terminar la amplificación, se producen múltiples copias de ADN, o clusters, aproximadamente un millón de copias de cada fragmento[79,80,81]. Posteriormente, se realiza una reacción de escisión química y lavado de las hebras inversas, dejando solo a las hebras forward para ser secuenciadas. Además, los extremos 3' de las hebras forward y de los oligonucleótidos unidos a las celdas de flujo se bloquean para evitar interferencias en la secuenciación[82].

Luego se inicia la secuenciación por síntesis, en la cual se agrega en los canales de la celda de flujo la ADN polimerasa, nucleótidos de terminación reversible y primers que se hibridarán a los adaptadores. Los nucleótidos de terminación reversible tienen el 3'-OH químicamente bloqueado y cada uno de los cuatro nucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) están unidos a un diferente tipo de fluoróforo. En cada ciclo de secuenciación, la ADN polimerasa añade un nucleótido a la hebra complementaria y luego de la excitación por un láser, se captura una imagen de la fluorescencia emitida

que señala cuál de los cuatro nucleótidos fue añadido. Después se elimina el fluoróforo del nucleótido añadido y se restaura su grupo 3'-OH libre para permitir la incorporación de otro nucleótido en la hebra complementaria en el siguiente ciclo de secuenciación. Los ciclos de secuenciación se repiten hasta sintetizar por completo la hebra complementaria y cada imagen generada representa un único dNTP (Ver Fig. 8)[79,83].

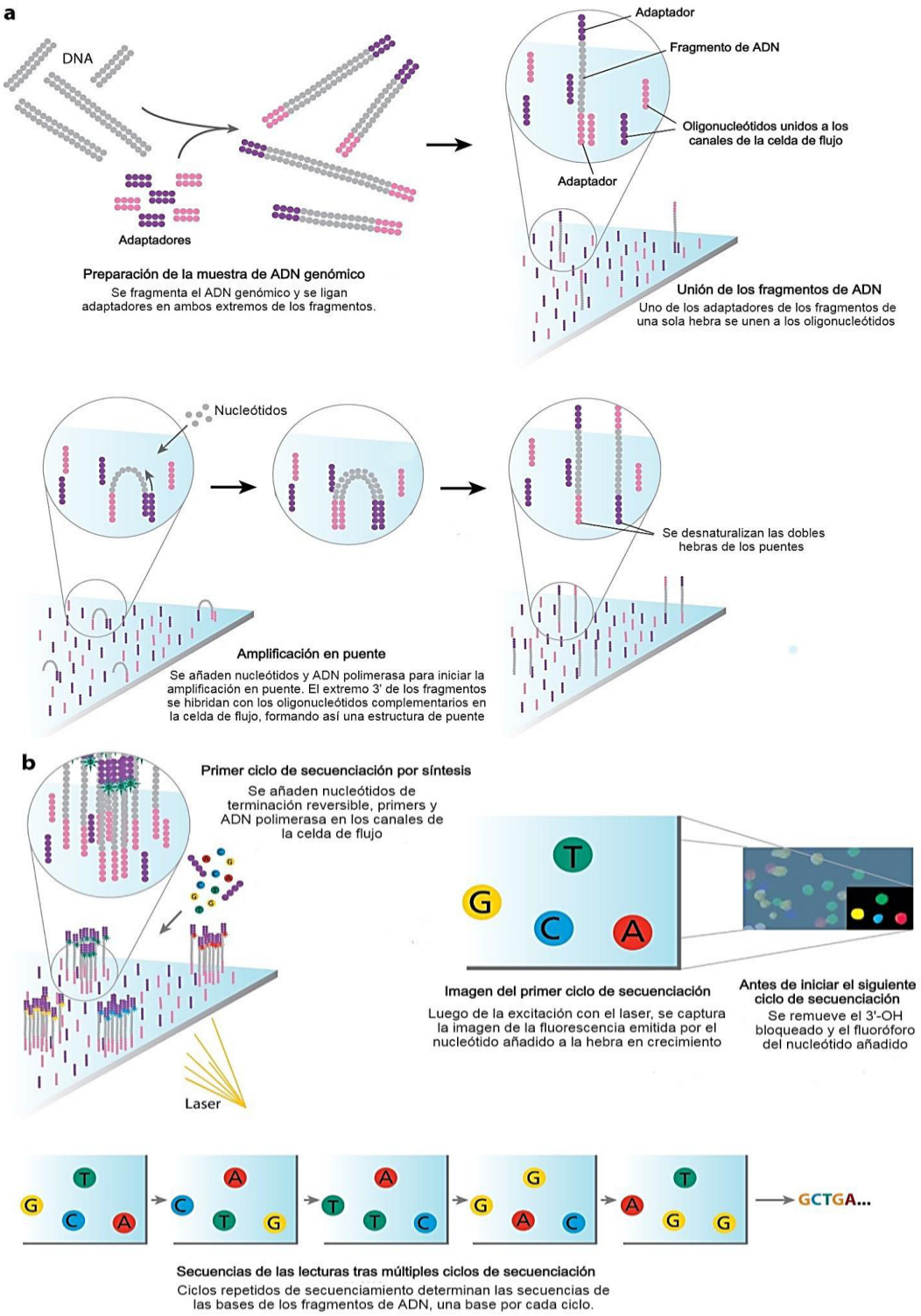


Fig. 8 Secuenciación de Illumina. a) Se prepara la muestra de ADN genómico y se colocan los fragmentos generados ligados con los adaptadores en las celdas de flujo para que se hibriden con los oligonucleótidos en la superficie y luego se da inicio a la amplificación en puente. b) Secuenciación por síntesis. Se añaden primers, nucleótidos de terminación reversible y ADN polimerasa. En cada ciclo de secuenciación se añade un nucleótido a la hebra complementaria y tras la excitación con un láser se captura la imagen de la fluorescencia particular del nucleótido añadido. Luego se desbloquea el 3'-OH y se remueve el fluorescente del nucleótido añadido para que en el siguiente ciclo de secuenciación se añada otro nucleótido y así sucesivamente se realizan más ciclos de secuenciación hasta sintetizar por completo las hebras complementarias de los fragmentos de ADN. Tomado de Kulkarni S, et. al[84].

- **Análisis bioinformático**

Los datos generados después de la secuenciación se analizan mediante bioinformática para generar información con significado biológico[75,78]. El análisis de los datos incluye la evaluación de la calidad de los datos sin procesar, la alineación de lectura con un genoma de referencia, la identificación de variantes y la anotación de las variantes[85].

II.2. Antecedentes del estudio

Se ha demostrado que existe una amplia variabilidad en la respuesta glucémica de los pacientes diabéticos en tratamiento con el fármaco de primera línea, metformina, que podría deberse en algunos casos a factores genéticos[6,86]. La farmacogenómica de la metformina se ha enfocado principalmente en las variantes de genes relacionadas a la farmacocinética y en menor medida a la farmacodinamia de este fármaco en pacientes de diversos grupos étnicos[7,87].

Estudios de asociación que involucran evaluar todo el genoma (GWAS) sobre la respuesta glucémica a metformina, se han realizado en pacientes escoceses con DMT2 y luego se replicó en una cohorte con otros pacientes europeos y con diabéticos escoceses. Se asoció el alelo menor C del SNP rs11212617 (variante intrónica) ubicado cerca al gen ATM con una mejor respuesta glucémica a la metformina, se logró una HbA1c por debajo del 7%[15].

En una investigación realizada en pacientes diabéticos europeos y no europeos en tratamiento con metformina, el alelo C del SNP rs8192675 en un intrón del gen SLC2A2 que altera los niveles de expresión de GLUT2 en el hígado fue asociado con una mejor respuesta glucémica a la metformina, observándose una mayor disminución de los valores de hemoglobina glicosilada en los pacientes con el SNP rs8192675[16].

En un estudio realizado en diabéticos en tratamiento con metformina, las variantes rs254271 (variante intrónica) en el gen PRPF31 y rs2162145 (variante upstream o corriente arriba) en el gen CPA6 se asociaron con una respuesta ineficaz y eficaz a metformina, respectivamente. Mientras que las variantes raras rs140604473 (cambio

de sentido), rs149214040 (cambio de sentido), rs114401618 (intrónica) y rs17882069 (sinónima) ubicadas en el gen STAT3 se asociaron con una ineficaz respuesta a la metformina[17].

En otro estudio realizado en pacientes diabéticos chinos se encontró que dos variantes rs2727528 (variante intrónica) y rs1105842 (variante intrónica) en el gen PRKAG2, que codifica la subunidad γ2 de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), están relacionadas con la respuesta al fármaco de primera línea. Los portadores del alelo C de rs2727528 y los portadores del alelo C de rs1105842 presentaron una mayor disminución en los niveles de HbA1c al usar metformina[20].

La farmacocinética de metformina está determinada por transportadores de membrana, como PMAT que se encarga de la captación de metformina en el intestino delgado, los OCTs que median la absorción intestinal, captación hepática, y excreción renal de metformina y los transportadores MATE que contribuyen a la excreción hepática y renal de metformina. Ciertas variantes en los genes SLC29A4 (PMAT), SLC22A1 (OCT1), SLC22A2 (OCT2), SLC22A3 (OCT3), SLC47A1 (MATE1), SLC47A2 (MATE2-K) han sido asociadas a variaciones interindividuales en la farmacocinética, seguridad y eficacia de metformina[87,88,89,90,91]. Al respecto, en nuestro país, se han encontrado las frecuencias genotípicas (GG=87.6%, GA=12.4% y AA=0.0%) y alélicas (alelo G=93.8% y alelo A=6.2%) de la variante Val408Met en el gen OCT1 en individuos de Lima y Puno[11]. Para la misma variante en el referido gen, en pacientes diabéticos peruanos con metformina como tratamiento, las frecuencias genotípicas son GG=76.92%, GA=18.46% y AA=4.62%, y las frecuencias de alelos son G=86.15% y A=13.85%[92].

II.3. Glosario de términos

- Secuenciación del genoma: secuenciación del ADN que se dirige a todo el genoma[93].
- Variante: una diferencia en una secuencia de ADN en comparación con la secuencia de referencia normal[93].
- Adaptador: Cualquier fragmento corto de ADN de secuencia conocida que se agrega a los extremos del ADN desconocido de interés, con el fin de luego permitir que un cebador de secuenciación se hibride en esta posición[94].
- Celda de flujo: Es un portaobjetos de vidrio que contiene pequeños canales fluídicos, a través de los cuales se bombea polimerasas, nucleótidos y tampones durante la secuenciación[94].

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

Existen variantes génicas de respuesta a metformina en pacientes peruanos con diabetes mellitus tipo 2.

III.2. Variables.

Variable X: Variantes génicas de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2.

III.3. Operacionalización de variables

VARIABLE(S)	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	OBSERVACIONES
Variantes génicas de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2.	Cualitativa Nominal	Son variaciones en genes involucrados en la respuesta diferencial al tratamiento farmacológico en pacientes con DMT2.	Variaciones génicas relacionadas con la respuesta diferencial al tratamiento específico con el fármaco metformina en pacientes con DMT2.	-Variantes génicas relacionadas directamente con la respuesta a metformina. -Variantes génicas complementarias a la respuesta a la metformina.	-Variantes conocidas o nuevas en genes relacionados directamente a la respuesta a metformina. -Variantes conocidas o nuevas en genes complementarios a la respuesta a metformina.	Variantes génicas tipo SNPs, indels u otras obtenidas mediante secuenciación genómico masiva de última generación (NGS)	-

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio

- Laboratorio GENOBIDC de la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM.
- Hospital Nacional Dos de Mayo, Lima, Perú.

IV.2. Diseño

- Tipo de estudio según análisis: No experimental, no se manipularon las variables.
- Tipo de estudio según su inicio: Retrospectivo, los eventos que generaron los datos de la variable acontecieron antes del estudio.
- Tipo de estudio según el periodo y secuencia: Transversal, se midió la variable en un determinado momento.

IV.3. Población, muestra

- Población: Pacientes diagnosticados con DMT2, servicio de Endocrinología, Hospital Nacional Dos de Mayo, tratamiento con metformina, y personas sin DMT2.
- Muestra: 05 pacientes con DMT2 del referido Servicio y Hospital que se trataron con metformina y 01 persona sin DMT2.

  Todos los participantes fueron mayores de 18 años, contaron con una ficha para datos personales y clínicos y manifiesto de su voluntad de participar en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado y conocimiento del protocolo de investigación aprobado el mes de noviembre del 2018, ampliado al año 2021, por Comité de Ética en Investigación Biomédica del referido hospital.

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes

Criterios de Inclusión	Criterios de exclusión
● Pacientes, mayores de 18 años diagnosticados con DMT2. ● Pacientes con metformina como primera línea de tratamiento. ● Pacientes que firmaron el respectivo consentimiento.	● Pacientes con diagnóstico DMT2 y otras condiciones metabólicas crónicas. ● Pacientes que no completaron o abandonaron el tratamiento.

IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información

IV.4.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de epitelio bucal de cada uno de los pacientes a través de hisopados. Luego, las muestras fueron colocadas en un tubo estéril conteniendo buffer de lisis y se trasladaron al Laboratorio GENOBIDC y se almacenaron a 4°C.

IV.4.2. Extracción y cuantificación de ADN

La extracción del ADN del epitelio bucal se realizó con el método de *salting out*, adaptado a las condiciones del laboratorio[95]. Se añadió Proteasa K a la muestra en buffer y se incubaron a 55°C durante la noche. Al día siguiente, el sobrenadante fue trasladado a un tubo nuevo, se añadió solución precipitante de proteínas y se congeló. Luego se añadió 1ml de isopropanol helado y se congeló durante la noche. Al día siguiente, se centrifugó y el sobrenadante fue eliminado, se agregó 1ml de etanol absoluto helado, se centrifugó, el sobrenadante fue eliminado y el precipitado secado a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió el ADN en buffer Tris EDTA Low y fue almacenado a 4°C.

La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis y se cuantificó con el fluorómetro Quantus, según las instrucciones del fabricante[96].

IV.4.3. Genotipaje previo del gen *SLC22A1*

A partir del ADN genómico, se realizó la técnica de PCR-RFLP, de acuerdo al procedimiento de Olivares, *et al.*[11] se amplificó el exón 7 del gen SLC22A1 y luego se detectó la presencia de los SNPs Val408Met y Met420del, con las enzimas MscI y BspHI, respectivamente. Todo ello estableció criterios para la selección de pacientes para secuenciación masiva con NGS según genotipos preliminares.

IV.4.4. Secuenciación de Nueva Generación

Los ADNs genómicos cuantificados de 05 pacientes diabéticos y un individuo sin DMT2, se enviaron a una empresa especializada que brinda el servicio de secuenciación masiva. En detalle, para el secuenciamiento del genoma humano completo (hWGS), utilizaron el kit Truseq Nano DNA library (tamaño de lecturas de 350 pb), procesadas en el equipo Illumina-NovaSeq con una profundidad de 30X (cada nucleótido está cubierto 30 veces).

IV.4.5. Análisis bioinformático

Se generó los archivos Fastq de genomas de los pacientes y una persona sin DMT2. El procesamiento inicial hasta obtener los VCF (archivo de llamado de variantes) considerando los 13 genes directamente relacionados a respuesta diferencial al tratamiento de primera línea-metformina, se realizó con el programa FreeBayes en el cluster del área de procesamiento bioinformático del Instituto de Ciencias y Tecnologías de Okinawa, Japón.

Se realizaron análisis posteriores en el laboratorio GENOBIDC con un flujo de trabajo (pipeline) diseñado *in house*, que incluyen el filtrado de las variantes, anotación, la predicción del efecto (impacto funcional), el tipo de variación y la significancia clínica, considerando el genoma de referencia (GRCh38).

V. RESULTADOS

V.1. Presentación, análisis

V.1.1. Calidad de los archivos Fastq de los genomas de pacientes diabéticos peruanos en tratamiento con metformina

Los archivos Fastq del genoma de cada paciente con DMT2 presentaron una calidad aceptable y los resultados se presentan de acuerdo al % > Fastq Q30, lecturas totales, longitud de lecturas (bp), rendimiento total (Mbp), tamaño de referencia (Mpb), profundidad media de rendimiento (X) y el % de cobertura con profundidad >= 30X (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Calidad de los archivos Fastq de genomas

Paciente/ Control	% > Fastq Q30	Lecturas totales	Longitud de lecturas (bp)	Rendimiento total (Mbp)	Tamaño de referencia (Mbp)	Profundidad media de rendimiento (X)	% de cobertura con profundidad >= 30X
Paciente 1	91.9	770,982,984	150.0	115,647	2,934	39.4	77.0
Paciente 2	93.3	797,828,088	150.0	119,674	2,934	40.8	76.9
Paciente 3	93.6	791,751,542	150.0	118,762	2,934	40.5	65.5
Paciente 4	89.5	760,869,172	150.0	114,130	2,934	38.9	75.2
Paciente 5	92.3	793,760,960	150.0	119,064	2,934	40.6	96.4
Persona sin DMT2	92.4	772,479,896	150.0	115,871	2,934	39.5	78.6

V.1.2. Variantes conocidas y nuevas identificadas en los genomas de diabéticos peruanos en tratamiento-metformina

En el gen SLC22A1 se encontraron las siguientes 9 variantes conocidas: rs683369, rs628031 y rs72552763 de impacto (efecto en la estructura y función de la proteína) moderado, rs2297374, rs4709400, rs4646272, rs594709, rs622342 de impacto modificador y rs1867351 de impacto bajo. Además, se encontraron 6 variantes nuevas de impacto (efecto en estructura, función de la proteína) moderado, el paciente 4 y el paciente 3 presentaron una variante probablemente y posiblemente dañina, respectivamente (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC22A1

Gen SLC22A1								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs683369/SNP/G/A/ variante con cambio de sentido/160130172/ L->F	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante rs683369 con impacto moderado y benigna se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs628031/SNP/A/G/ variante con cambio de sentido/160139813/ M->V	Moderado/tolerada/ benigna/benigna							La variante rs628031 con impacto moderado y benigna se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs2297374/SNP/C/T/ variante intrónica/ 160154953	Modificador/---/---/---							La variante rs2297374 con impacto modificador se encontró en 3 pacientes.

rs4709400/SNP/C/G/ variante intrónica/ 160122578	Modificador/---/---/---							La variante rs4709400 con impacto modificador se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.
rs1867351/SNP/T/C/ variante sinónima/ 160122091/S	Bajo/---/---/---							La variante rs1867351 con impacto bajo se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.
rs4646272/SNP/T/G/ variante intrónica/ 160130061	Modificador/---/---/---							La variante rs4646272 con impacto modificador se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.
rs594709/SNP/G/A/ variante intrónica/ 160134722	Modificador/---/---/---							La variante rs594709 con impacto modificador se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs622342/SNP/C/A/ variante intrónica/ 160151834	Modificador/---/---/---							La variante rs622342 con impacto modificador se encontró en 4 pacientes y en la persona sin DMT2.
rs72552763/indel/CATGA/CA/variante de deleción del marco de lectura/160139848/ MI->I	Moderado/---/---/---							La variante rs72552763 con impacto moderado se encontró en todos los pacientes
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160139663/ S->A	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/160143567/ M->L	Moderado/deletérea benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/160139706/ S->I	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/--							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160134095/ L->R	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/160158538/ T->S	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160143633/ Y->D	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en la persona sin DMT2.

Las celdas en amarillo indican la presencia de la variante en el individuo evaluado.
*Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
**Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen SLC22A2 se encontraron las siguientes 3 variantes conocidas: rs316019, rs762903143 y rs1450284484 de impacto moderado. Además, se encontraron 8 variantes nuevas de impacto moderado, los pacientes 2 y 5 presentaron variantes probablemente dañinas y los pacientes 4 y 5 variantes posiblemente dañinas (Ver Tabla 5).

Tabla 5. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC22A2

Gen SLC22A2								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs316019/SNP/A/C/ variante con cambio de sentido/ 160249250/S->A	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante rs316019 con impacto moderado y benigna se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs762903143/SNP/G/A /variante con cambio de sentido/ 160250695/R->C	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante rs762903143 con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
rs1450284484/SNP/T/ G/variante con cambio de sentido/ 160242349/M->L	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante rs1450284484 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/160258708/ F->Y	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/160250633/ I->M	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 3 pacientes.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/160250700/ F->C	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/160245542/ L->M	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/--							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/160243748/ H->L	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/--							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/160245487/ V->D	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/160224750/ G->V	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en la persona sin DMT2.

---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/160241565/ C->W	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en la persona sin DMT2.

*Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
**Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen SLC22A3 se encontraron las siguientes 5 variantes conocidas: rs774978214, rs753918761 rs561346956 y rs144856002 de impacto moderado y rs12194182 de impacto modificador. Además, se encontraron 22 variantes nuevas de impacto moderado y alto, los pacientes 1, 3 y 4 presentaron variantes probablemente dañinas y los pacientes 2, 4 y 5 variantes posiblemente dañinas (Ver Tabla 6).

Tabla 6. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC22A3

Gen SLC22A3								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs774978214/SNP/ T/G/variante con cambio de sentido/ 160348481/V->G	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante rs774978214 con impacto moderado y benigna se encontró en 3 pacientes.
rs561346956/SNP/T/G /variante con cambio de sentido/ 160408899/F->V	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante rs561346956 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
rs12194182/SNP/T/C/ variante intrónica/ 160413483	Modificador/---/---/---							La variante rs12194182 con impacto modificador se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.
rs144856002/SNP/G/A /variante con cambio de sentido/ 160443701/R->Q	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante rs144856002 con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.

rs753918761/SNP/G/T /variante con cambio de sentido/ 160410800/ R->L	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante rs753918761 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160348429/ F->V	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160348459/ F->V	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/160436845/ M->I	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/160348700/ L->H	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160408900/ F->C	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160408905/ F->V	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.

---/SNP/A/G/variante con cambio de sentido/160408915/ Y->F	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160348468/ F->V	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/160348488/ L->F	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 2 pacientes.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160348499/ L->R	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160348519/ F->V	Moderado/tolerada /benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/160348639/ T->P	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/160408783/ R->M	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/160408896/ S->R	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/160408918/ Y->F	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160436998/ F->V	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/160443676/I->L	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante aceptora de splicing/160436779	Alto/---/---/---/							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/160348634/ N->T	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/A/variante con cambio de sentido/160348685/ R->H	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/160407058/ I->S	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido /160397979/ F->I	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/--							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en la persona sin DMT2.

*Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos

**Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen SLC47A1 se encontraron las siguientes 4 variantes conocidas: rs77474263 de impacto moderado y rs2289669, rs8065082 y rs2252281 de impacto modificador. Además, se encontraron 4 variantes nuevas de impacto moderado y alto, el paciente 1 presentó una variante probablemente dañina (Ver Tabla 7).

Tabla 7. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC47A1

Gen SLC47A1								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs2289669/SNP/G/A/ variante intrónica/ 19560030	Modificador/---/---/---							La variante rs2289669 con impacto modificador se encontró en 4 pacientes y la persona sin DMT2.
rs8065082/SNP/C/T/ variante intrónica/ 19561878	Modificador/---/---/---							La variante rs8065082 con impacto modificador se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs77474263/SNP/C/T/ variante con cambio de sentido/19548051/L->F	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante rs77474263 con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
rs2252281/SNP/T/C/ variante 5' UTR/ 19533874	Modificador/---/---/---							La variante rs2252281 con impacto modificador se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/19555814/ L->Q	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.

---/SNP/G/T/variante aceptora de splicing/ 19546434	Alto/---/---/---/							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/19572796/ N->T	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido /19560493/ R->L	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

*****Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
******Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen SLC47A2 se encontraron las siguientes 2 variantes conocidas: rs533190862 de impacto moderado y rs12943590 de impacto modificador. Además, se encontraron 3 variantes nuevas de impacto moderado, el paciente 4 presentó una variante probablemente dañina (Ver Tabla 8).

Tabla 8. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC47A2

Gen SLC47A2								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs12943590/SNP/G/A/ variante corriente arriba del gen/19716685	Modificador/---/---/---							La variante rs12943590 con impacto modificador se encontró en 3 pacientes y la persona sin DMT2.
rs533190862/indel/ GAGAAGAAGGG/ GAGAAGGG/variante de deleción del marco de lectura/19706719/ PFFS->PFS	Moderado/---/---/---							La variante rs533190862 con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido /19704177/I->S	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido /19703167/V->D	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/19715196/F->V	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.

*****Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
******Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen SLC29A4 se encontraron las siguientes 4 variantes conocidas: rs3889348, rs6958502, rs4299914 y rs4724512 de impacto modificador. Además, se encontraron 5 variantes nuevas de impacto alto y moderado, el paciente 2 presentó una variante probablemente dañina (Ver Tabla 9).

Tabla 9. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC29A4

Gen SLC29A4								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs3889348/SNP/A/G/ variante intrónica/5298844	Modificador/---/---/---							La variante rs3889348 con impacto modificador se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs6958502/SNP/A/G/ variante intrónica/5288798	Modificador/---/---/---							La variante rs6958502 con impacto modificador se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs4299914/SNP/A/G/ variante intrónica/5301939	Modificador/---/---/---							La variante rs4299914 con impacto modificador se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs4724512/SNP/A/G/ variante intrónica/ 5284572	Modificador/---/---/---							La variante rs4724512 con impacto modificador se encontró en 2 pacientes.
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/Consecuencia /Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Control**	**Comentarios**
--- /OTHER/GTTCCTCTC TCTCTCTCTTA/TTTC	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.

CTCTCTCTCTCTCTCTTA/variante aceptora de splicing&variante del tracto de polipirimidina de splicingt&variante intrónica/5294838								
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/5296942/A->E	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/5299329/F->V	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante aceptora de splicing/ 5302795	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/5300506/I->L	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.

*Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
**Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen ATM se encontraron las siguientes 23 variantes conocidas: rs768748099, rs34325032, rs373881770, rs2086432758 y rs786203404 de impacto alto, rs1057520445, rs773895161, rs1591128462, rs730881387, rs2079990831, rs786203667, rs1336509218, rs780303327, rs375798802, rs866521873, rs2080095349, rs786203404, rs587781391, rs15913522957, rs1166904824, rs587779840, rs1801516, rs1283172338 y rs923836140 de impacto moderado. Además, se encontraron 87 variantes nuevas de impacto alto y moderado, todos los pacientes presentaron variantes probablemente dañinas y los pacientes 2, 4 y 5 presentaron variantes posiblemente dañinas (Ver Tabla 10).

Tabla 10. Variantes conocidas y nuevas en el gen ATM

Gen ATM								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs768748099/indel/ ATTTTTTTTTTTTTT AAGAATTG/ ATTTTTTTTTTTTTTA AGAATTG/variante aceptora de splicing&variante intrónica/108243934	Alto/---/---/benigna& probablemente benigna							La variante rs768748099 con impacto alto y benigna se encontró en 4 pacientes y la persona sin DMT2.
rs34325032/indel/ CTTTTTTTTTTTTTT AGGC/ CTTTTTTTTTTTTTT TAGGC/variante	Alto/---/---/benigna& probablemente benigna							La variante rs34325032 con impacto alto y benigna se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.

aceptora de splicing/ 108250683								
rs373881770/indel/CTTTTTTTTTTTTTTACCAC/CTTTTTTTTTTTTTTTTACCAC/ variante aceptora de splicing&variante del tracto de polipirimidina de splicingt&variante intrónica/108271228	Alto/---/---/ benigna &probablemente benigna							La variante rs373881770 con impacto alto y benigna se encontró en todos los pacientes y la persona sin DMT2.
rs2086432758/SNP/T/G/variante donante de splicing/108332902	Alto/---/---/ probablemente patogénica							La variante rs2086432758 con impacto alto y altamente patogénica se encontró en 2 pacientes.
rs1057520445/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/ 108250731/K->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/---							La variante rs1057520445 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 3 pacientes y la persona sin DMT2.
rs773895161/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/ 108250784/S->Y	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante rs773895161 con impacto moderado y benigna se encontró en 2 pacientes
rs1591128462/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/ 108325333/S->Y	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ benigna/ significancia incierta							La variante rs1591128462 con impacto moderado y benigna se encontró en 3 pacientes.
rs730881387/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/ 108247081/A->D	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ significancia incierta							La variante rs730881387 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.

rs2079990831/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/ 108248967/S->Y	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ significancia incierta							La variante rs2079990831 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
rs786203667/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/ 108250707/Q->H	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/probablemente dañina/significancia incierta							La variante rs786203667 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente y la persona sin DMT2.
rs1336509218/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/ 108250752/N->K	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante rs1336509218 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 2 pacientes.
rs780303327/SNP/T/C/variante con cambio de sentido/ 108353835/I->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ significancia incierta							La variante rs780303327 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
rs375798802/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/ 108243982/L->M	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ significancia incierta							La variante rs375798802 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 2 pacientes.
rs866521873/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/ 108250705/Q->K	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/ significancia incierta							La variante rs866521873 con impacto moderado y benigna se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.
rs2080095349/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/ 108250781/L->Q	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/ significancia incierta							La variante rs2080095349 con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 2 pacientes.

rs786203404/SNP/G/T /variante con ganancia de terminación/ 108312463E->*	Alto/---/---/patogénica							La variante rs786203404 con impacto alto y patogénica se encontró en 1 paciente.
rs587781391/SNP/G/T /variante con cambio de sentido/ 108243975/R->S	Moderado/ tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/ significancia incierta							La variante rs587781391 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
rs1591522957/SNP/C/ A/variante con cambio de sentido/ 108250735/P->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/ significancia incierta							La variante rs1591522957 con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
rs1166904824/SNP/G/ T/variante con cambio de sentido/ 108271266/L->F	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/ significancia incierta							La variante rs1166904824 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
rs587779840/SNP/C/A /variante con cambio de sentido/ 108289785/H->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ significancia incierta							La variante rs587779840 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
rs1801516/SNP/G/A/ variante con cambio de sentido/ 108304735/D->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ benigna/benigna							La variante rs1801516 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
rs1283172338/SNP/C/ A/variante con cambio de sentido/N->K	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/ significancia incierta							La variante rs1283172338 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
rs923836140/SNP/G/A /variante con cambio de sentido/ 108287691/S->N	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante rs923836140 con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.

Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/C/A/variante con ganancia de terminación/ 108250727/S->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 3 pacientes.
---/SNP/T/G/variante con ganancia de terminación/ 108284437/Y->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con ganancia de terminación&variante en la región de splicing/108325312/ S->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 4 pacientes.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido /108229321/ R->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente y la persona sin DMT2.
--- /MNP/CTCTG/ATCTT/ variante con cambio de sentido /108243960/FSV->LSL	Moderado/---/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 3 pacientes.
---/SNP/C/A/ variante con cambio de sentido/108243972/ F->L	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente y la persona sin DMT2.

---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108250807/ H->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108267254/ E->D	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108282782/ L->M	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108325320/ H->N	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/108325322/ H->Q	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 3 pacientes y la persona sin DMT2.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/108325332/ S->T	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 2 pacientes.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108248997/ S->Y	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/ variante con cambio de sentido/108250742/ S->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108250747/ P->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 3 pacientes y la persona sin DMT2.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108250960/ Q->K	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/108268481/ L->V	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108271270/ R->S	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108271282/ D->Y	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/--							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 2 pacientes.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108271295/ T->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 2 pacientes.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido /108325544/ Q->H	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/ variante con cambio de	Moderado/deletérea con bajo nivel de							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.

sentido/108331944/ N->K	confianza/ posiblemente dañina/--							
---/SNP/G/T/ variante con cambio de sentido/108331988/ R->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido /108365217/ S->R	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108243962/ S->Y	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108250771/ L->M	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/C/ variante con cambio de sentido/108252893/ F->L	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108271262/ S->Y	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 2 pacientes.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108271289/ C->F	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 2 pacientes.

---/SNP/G/T/ variante con cambio de sentido/108325349/ K->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108332019/ Q->H	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con ganancia de terminación/ 108235693/E->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con ganancia de terminación/ 108250734/Y->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/ variante donante de splicing/ 108317522	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con ganancia de terminación/ 108345833/E->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/108227638/ L->H	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108244036/ V->F	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.

---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/108244862/ N->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/108247068/ F->V	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108250712/ A->E	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108250780/ L->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108250789/ L->I	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/ variante con cambio de sentido/108250790/ L->R	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/108251904/ I->L	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.

sentido/108256326/ F->V	posiblemente dañina/ ---							
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido /108256338/ K->Q	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108271279/ Q->K	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108271315/ H->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108271341/ S->R	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/108284433/ V->D	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/ variante con cambio de sentido/108289755/ V->F	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108289777/ T->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.

---/SNP/T/G/ variante con cambio de sentido/108293377/ I->S	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/108294937/ H->P	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/--							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/ variante con cambio de sentido/108317429/ D->E	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/ variante con cambio de sentido/108321366/ L->R	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/ variante con cambio de sentido/108321403/ I->M	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/ variante con cambio de sentido/108325330/ L->H	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 2 pacientes y en la persona sin DMT2.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido /108327758/ K->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/108343257/ E->D	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108343331/ P->Q	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108345858/ W->L	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con ganancia de terminación/ 108229301/Y->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante donante de splicing/108229324	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/MNP,SNP /CTTC/ATTA,ATTC/ /variante con ganancia de terminación/ 108243969/YF->*L	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con ganancia de terminación/ 108343263/C->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/ variante con cambio de sentido/108243979/ Y->N	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

sentido/108244043/ K->T								
---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/108267313/ N->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/108271402/ F->V	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108281041/ R->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/ variante con cambio de sentido/108281055/ L->M	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108292695/ A->S	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/ variante con cambio de sentido/108312470/ S->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/--							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/ variante con cambio de sentido/108317503/ D->A	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/--							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.

---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido /108319954/ S->R	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108325329/ L->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108347347 /L->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/108248957/ L->M	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108250717/ Q->K	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108250754/ C->F	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/108271330/ L->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/108281029/ E->V	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.

---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/108312481/ T->S	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/108316078/I->L	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/108325324/ R->I	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/108325362/ S->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.

*Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
**Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen SLC2A2 se encontraron las siguientes 5 variantes conocidas: rs71176588 de impacto alto, rs376064965, rs775283150 y rs5400 de impacto moderado y rs8192675 de impacto modificador. Además, se encontraron 20 variantes nuevas de impacto alto y moderado, los pacientes 1, 3 y 4 presentaron variantes probablemente dañinas y los pacientes 1 y 4 presentaron variantes de posiblemente dañinas (Ver Tabla 11).

Tabla 11. Variantes conocidas y nuevas en el gen SLC2A2

Gen SLC2A2								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs376064965/SNP/G/A /variante con cambio de sentido/ 171009997/L->F	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante rs376064965 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
rs71176588/indel/ GGTGTGTGTGTGTG TGTGTGTGTGTGTGT GTGTGTGTGTGA/ GGTGTGTGTGTGTG TGTGTGTGTGTGTGT GTGTGTGTGTGTGT GA/variante donante de splicing&variante intrónica/171009912	Alto/---/---/---							La variante rs71176588 con impacto alto se encontró en 3 pacientes y la persona sin DMT2.
rs8192675/SNP/T/C/ variante intrónica/ 171007094/	Modificador/---/--- /benigna							La variante rs8192675 con impacto modificador y benigna se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.

rs775283150/SNP/T/A/ variante con cambio de sentido/171010057/ I->F	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante rs775283150 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
rs5400/SNP/G/A/ variante con cambio de sentido/ 171014511/ T->I	Moderado/tolerada/ benigna/benigna							La variante rs5400 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
--- /MNP,SNP/TAC/AAA,TAA/variante donante de splicing&variante intrónica/171009955	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 4 pacientes.
---/SNP/C/A/variante con ganancia de terminación/ 171009970/G->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con ganancia de terminación/ 171010012/G->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 2 pacientes.
---/SNP/G/T/variante con ganancia de terminación/ 171010020/S->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 2 pacientes.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/171002596/ M->L	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/171005365/ F->V	Moderado/tolerada/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/ variante con cambio de sentido/171009977/ S->R	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/171009978/ S->I	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 4 pacientes y la persona sin DMT2.
---/MNP /TTCTT/TTATA/ variante con cambio de sentido/ 171009979/GRS->GIS	Moderado/---/---/---			,				La variante con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/ variante con cambio de sentido/171010005/ S->Y	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/171010030/ M->L	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con ganancia de terminación/ 171010068/L->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/ variante con cambio de sentido/171010033/ L->V	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.

---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/170998338/ F->C	Moderado/ deletérea/posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido /171009960/ C->F	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido/171009988/ A->S	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/171010008/ P->Q	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/171010038/ A->D	Moderado/ deletérea/posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante donante de splicing/ 171009957	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/G/T/ variante con cambio de sentido/170999089/ F->L	Moderado/tolerada/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.

*Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
**Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen CPA6 se encontraron las siguientes 3 variantes conocidas: rs571002336, rs10957393 y rs17853192 de impacto moderado. Además, se encontraron 6 variantes nuevas de impacto alto y moderado, los pacientes 3 y 4 presentaron variantes posiblemente dañinas (Ver Tabla 12).

Tabla 12. Variantes conocidas y nuevas en el gen CPA6

Gen CPA6								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs17853192/SNP/G/C/ variante con cambio de sentido/67509533/ S->C	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ benigna							La variante rs17853192 con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 2 pacientes.
rs571002336/SNP/T/G /variante con cambio de sentido/ 67624225/K->T	Moderado/tolerada/ benigna/benigna/---							La variante rs571002336 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
rs10957393/SNP/A/G/ variante con cambio de sentido/67624235/F->L	Moderado/tolerada/ benigna/benigna							La variante rs10957393 con impacto moderado y benigna se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.

Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido /67511572/Y->S	Moderado/deletérea/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/ 67624210/A->E	Moderado/ deletérea/posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con ganancia de terminación/67484774/ K->*	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante de pérdida de inicio /67746129/M->L	Alto/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto alto y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T variante con cambio de sentido /67509562/F->L	Moderado/tolerada/ posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/A/variante con cambio de sentido /67746122/C->F	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

*Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
**Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen STAT3 se encontró la siguiente variante conocida: rs747667389 de impacto moderado. Además, se encontraron 6 variantes nuevas de impacto alto y moderado, el paciente 2 presentó variantes probablemente dañinas (Ver Tabla 13).

Tabla 13. Variantes conocidas y nuevas en el gen STAT3

Gen STAT3								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs747667389/SNP/C/T /variante con cambio de sentido/42317222/ A->T	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/benigna/ probablemente benigna							La variante rs747667389 con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/A/C/variante donante de splicing/ 42322280	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/42329639/ K->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.

---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido /42333893/ K->N	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/A/variante con cambio de sentido/42339333/ D->V	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/42323076/ F->V	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/ benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/ variante con cambio de sentido/42339336/ Q->P	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en la persona sin DMT2.

*****Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
******Impacto: Efecto a nivel de la estructura y función de la proteína

En el gen STK11 se encontró las siguientes 2 variantes conocidas: rs741765 y rs2075604 de impacto modificador. Además, se encontraron 25 variantes nuevas de impacto alto y moderado, todos los pacientes presentaron variantes probablemente dañinas y los pacientes 1, 2, 3 y 4 presentaron variantes posiblemente dañinas (Ver Tabla 14).

Tabla 14. Variantes conocidas y nuevas en el gen STK11

Gen STK11								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs741765/SNP/C/T/ variante intrónica/1221546	Modificador/---/---/ benigna							La variante rs741765 con impacto modificador y benigna se encontró en 4 pacientes y la persona sin DMT2.
rs2075604/SNP/G/T/ variante intrónica/1218524	Modificador/---/---/ significancia incierta&benigna							La variante rs2075604 con impacto modificador y benigna se encontró en 4 pacientes y la persona sin DMT2.
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/Posición/ Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/T/G/variante donante de splicing/1219415	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente y la persona sin DMT2.

---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/1219383/E->V	Moderado/deletérea /benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1219386/K->T	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 3 pacientes.
---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/1219404/Q->L	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 3 pacientes.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1219410/H->P	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/G/variante con cambio de sentido /1219411/H->Q	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 3 pacientes.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1207098/K->T	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1221218/N->T	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente y la persona sin DMT2.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1218497/K->T	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/1219334/M->L	Moderado/tolerada /benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante de pérdida de inicio/1206914/M->L	Alto/deletérea con bajo nivel de confianza/ benigna/---							La variante con impacto alto y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante de pérdida de inicio/1206915/M->R	Alto/ deletérea con bajo nivel de confianza/ benigna/---							La variante con impacto alto y benigna se encontró en 1 paciente.

---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1207146/K->T	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1218420/E->D	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido /1218500/M->R	Moderado/deletérea /benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1219328/M->L	Moderado/tolerada /benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/1219365/M->R	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/C/G/variante con cambio de sentido/1219380/P->R	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/C/variante con cambio de sentido/1219392/F->S	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/1220654/I->S	Moderado/deletérea/ probablemente dañina/---							La variante con impacto moderado y probablemente dañina se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1226592/K->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/1207074/L->R	Moderado/deletérea /benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/T/variante con cambio de sentido/1219364/M->L	Moderado/tolerada /benigna/---							La variante con impacto moderado y benigna se encontró en 1 paciente.

---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/1219373/S->R	Moderado/deletérea/ posiblemente dañina/ ---							La variante con impacto moderado y posiblemente dañina se encontró en la persona sin DMT2.
--- /MNP/GTGTGCCA/GTGGGCCT/variante con cambio de sentido/1219397/ VCQ->VGL	Moderado/---/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en la persona sin DMT2.

*****Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
******Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

En el gen PRKAG2 se encontró las siguientes 3 variantes conocidas: rs918000213 de impacto moderado y rs2727528 y rs1105842 de impacto modificador. Además, se encontraron 16 variantes nuevas de impacto alto y moderado (Ver Tabla 15).

Tabla 15. Variantes conocidas y nuevas en el gen PRKAG2

Gen PRKAG2								
Variantes conocidas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
rs918000213/SNP/T/G /variante con cambio de sentido/ 151632106/E->D	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/---/---							La variante rs918000213 con impacto moderado se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.
rs2727528/SNP/C/A/ variante intrónica/151653366	Modificador/---/---/---							La variante rs2727528 con impacto modificador se encontró en 4 pacientes y la persona sin DMT2.
rs1105842/SNP/C/A/ variante intrónica/ 151667178	Modificador/---/---/---							La variante rs1105842 con impacto modificador se encontró en 2 pacientes y la persona sin DMT2.
Variantes nuevas								
Variante/tipo/Alelo Ref/ Alelo Alt/ Consecuencia/ Posición/Cambio de aa*	**Impacto**/ SIFT/PolyPhen/ClinVar**	**Paciente 1**	**Paciente 2**	**Paciente 3**	**Paciente 4**	**Paciente 5**	**Persona sin DMT2**	**Comentarios**
---/SNP/A/C/variante con ganancia de	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 1 paciente.

terminación/ 151675435/Y->*								
---/SNP/A/C/variante donante de splicing/ 151876505	Alto/---/---/---							La variante con impacto alto se encontró en 2 pacientes.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/151632089/ K->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/151675423/ K->N	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 3 pacientes y la persona sin DMT2.
---/SNP/A/C,T/variante con cambio de sentido/ 151876511/I->S	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 4 pacientes y la persona sin DMT2.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/151876527/ S->A	Moderado/tolerada con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 3 pacientes.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/151876553/ K->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido /151876509/ P->T	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 3 pacientes.
---/SNP/T/G/variante con cambio de sentido/151876614/ S->R	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 2 pacientes.

---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/151560607/ L->R	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/151632080/ F->C	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/151876523/ L->R	Moderado/deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/C/variante con cambio de sentido/ 151876526/S->W	Moderado/ deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
---/SNP/G/T/variante con cambio de sentido/151570207/ T->K	Moderado/ deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en 1 paciente.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/151595367/ V->G	Moderado/ deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en la persona sin DMT2.
---/SNP/A/C/variante con cambio de sentido/151781302/ F->V	Moderado/ deletérea con bajo nivel de confianza/---/---							La variante con impacto moderado se encontró en la persona sin DMT2.

*Ver Anexo 2: Lista de abreviaturas de aminoácidos
**Impacto: Efecto a nivel de estructura, función de la proteína

A continuación, se presenta el número total de variantes conocidas y nuevas encontradas por cada gen estudiado (Ver Tabla 16).

Tabla 16. Número de variantes totales reportadas por cada gen

Gen	N° total variantes conocidas	N° total variantes nuevas
SLC22A1	9	6
SLC22A2	3	8
SLC22A3	5	22
SLC47A1	4	4
SLC47A2	2	3
SLC29A4	4	5
ATM	23	87
SLC2A2	5	20
CPA6	3	6
STAT3	1	6
STK11	2	25
PRKAG2	3	16

Además, en la siguiente tabla se presenta el número de variantes conocidas y nuevas encontradas por cada paciente. Siendo el paciente 4 con el mayor número de variantes conocidas y nuevas (Ver Tabla 17).

Tabla 17. Número de variantes reportadas por cada paciente

Paciente/ Control	N° total variantes conocidas	N° total variantes nuevas	Número de variantes conocidas y nuevas por cada paciente																							
			SLC22A1		SLC22A2		SLC22A3		SLC47A1		SLC47A2		SLC29A4		ATM		SLC2A2		CPA6		STAT3		STK11		PRKAG2	
			C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
Paciente 1	30	43	8	0	1	1	2	3	2	1	1	1	3	1	7	12	2	11	1	0	0	0	0	6	3	7
Paciente 2	35	36	8	2	2	2	2	2	3	1	1	0	4	3	9	15	2	2	0	1	0	3	2	2	2	3
Paciente 3	26	25	4	1	1	1	1	2	3	0	1	1	3	1	8	9	1	3	2	1	0	1	2	4	0	1
Paciente 4	38	89	6	2	2	2	2	10	2	1	1	1	3	2	14	36	2	7	2	4	1	0	2	14	1	10
Paciente 5	22	43	4	0	1	2	1	5	2	0	0	0	4	1	5	23	1	3	0	0	0	1	2	3	2	4
Persona sin DMT2	31	32	7	1	1	2	1	1	3	0	1	0	3	2	7	14	2	3	1	0	0	1	2	4	3	4

C: Variante genéticas conocidas
N: Variantes genéticas nuevas

VI. DISCUSIÓN

Diversas variantes en genes relacionados con la farmacocinética y farmacodinamia de metformina han sido asociadas a la variabilidad en la respuesta de pacientes diabéticos de varias poblaciones al tratamiento con este medicamento de primera línea[12]. Sin embargo, en Perú no se han realizado investigaciones genómicas para identificar variantes conocidas y/o nuevas en pacientes con DMT2 tratados con metformina. En el presente estudio se secuenciaron los genomas de 05 pacientes con DMT2 tratados con metformina y de 01 persona sin DMT2 y mediante análisis bioinformático se identificaron variantes conocidas y nuevas en genes codificantes de proteínas relacionadas a farmacocinética y farmacodinamia de metformina. Para el análisis bioinformático también se tomaron en cuenta otros genes cuyas variantes fueron asociadas a la variabilidad de respuesta a metformina, pero aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual se relacionan a la respuesta a este medicamento[17,97].

Los genes SLC22A1 y SLC22A3 codifican las proteínas OCT1 y OCT3, respectivamente, que son responsables de la captación de metformina en el intestino y en el hígado (sitio donde la metformina ejerce su efecto farmacológico). Además, PMAT (codificado por el gen SLC29A4) también se encarga de la captación de metformina en el intestino. OCT2 (codificada por el gen SLC22A2) es el principal facilitador de la captación de metformina por las células epiteliales renales. Los transportadores MATE1 (codificada por el gen SLC47A1) y MATE2-K (codificada por el gen SLC47A2) contribuyen a la excreción hepática y renal de metformina. En ese sentido, se ha propuesto que las variantes en los referidos genes influyen en la farmacodinamia y la farmacocinética de la metformina, lo que afecta la respuesta de los pacientes a este fármaco[87].

En el gen SLC22A1 se encontraron 9 variantes conocidas presentes en los pacientes diabéticos peruanos con metformina como tratamiento. La variante **rs683369** (cambio de sentido) estuvo presente en todos los pacientes y la

persona sin DMT2, estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio con personas sanas estadounidenses que tomaron metformina para prevenir la diabetes, donde evaluaron la presencia de esta variante y el alelo C se asoció con una reducción del riesgo del 31 % en la incidencia de diabetes[97]. La variante **rs628031** (cambio de sentido) estuvo presente en todos los pacientes y la persona sin DMT2, estos resultados son similares a los obtenidos con diabéticos letoneses tratados con metformina, donde se asoció el alelo A con efectos adversos gástrico e intestinales. El OCT1 se expresa en los enterocitos, y es posible que las variantes en el gen SLC22A1 afecten la absorción intestinal del fármaco y el aumento localizado de metformina en el intestino inducen los efectos adversos gastrointestinales[98]. En pacientes diabéticos chinos Han, los que presentaron el GG mostraron una reducción significativa en los niveles de glucosa en plasma después del tratamiento, aquellos con genotipo AA mostraron la misma tendencia para HbA1c[99]. En diabéticos mexicanos en tratamiento se encontró una asociación significativa entre el genotipo AA y el aumento de los niveles de HbA1c[100]. Posiblemente, las variantes en el gen SLC22A1 disminuyan la absorción hepática, con una menor respuesta a la metformina, sin embargo, en un estudio *in vitro*, la variante rs628031 se asoció a una absorción normal de metformina[98]. Mientras que en pacientes diabéticos caucásicos e iraníes no se encontró asociación entre el polimorfismo y la respuesta a metformina[101,102]. La variante **rs72552763** (eliminación del marco de lectura) estuvo presente en los pacientes 4 y 5, estos resultados son similares a los obtenidos con pacientes diabéticos escoceses, donde se asoció el alelo de función reducida con la intolerancia a metformina[99], mientras que en pacientes diabéticos daneses e iraníes no hubo asociación entre esta variante y la respuesta a metformina[100,102,103]. La variante **rs2297374** (intrónica) estuvo presente en los pacientes 1, 2 y 4, estos resultados son similares a los obtenidos con diabéticos chinos Han en tratamiento con el fármaco, aquellos con genotipo CT mostraron mayores reducciones de los valores de HbA1c y FPG[104], al contrario en pacientes diabéticos caucásicos no hubo asociación entre esta variante y la respuesta a metformina[105]. La variante **rs4709400** (intrónica) estuvo presente en los pacientes 1 y 2 y la persona sin DMT2, estos resultados se parecen a los obtenidos con

diabéticos chinos Han en tratamiento, aquellos con genotipo GG mostraron una mayor reducción de los valores de FPG[104]. La variante **rs4646272** (intrónica) estuvo presente en los pacientes 1 y 2 y la persona sin DMT2, según un estudio in vitro fue un predictor negativo de la eficacia de metformina[91]. La variante **rs594709** (intrónica) estuvo presente en todos los pacientes y la persona sin DMT2, estos resultados son parecidos a los obtenidos en un estudio con pacientes diabéticos chinos, donde los portadores del alelo A mostraron una mejor respuesta a metformina en comparación con los pacientes con genotipo GG[106]. La variante **rs622342** (intrónica) estuvo presente en los pacientes 1, 2, 3 y 4 y en la persona sin DMT2, estos resultados son similares a pacientes diabéticos del sur de la India en tratamiento con metformina, donde se asoció el alelo A con la disminución de los valores de HbA1c, FPG y PPG[107]. En diabéticos caucásicos en tratamiento se asoció el alelo A con la disminución de los valores de HbA1c[105], mientras que en pacientes diabéticos daneses no hubo asociación con la respuesta a metformina[100]. La variante **rs1867351** (sinónima) estuvo presente en los pacientes 1 y 2 y la persona sin DMT2, estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio con diabéticos chinos Han en tratamiento, donde aquellos con genotipo TT mostraron mayores reducciones de los valores de HbA1c[104]. En este estudio se reportaron 6 variantes nuevas (cambio de sentido) de impacto moderado en el gen SLC22A1. El paciente 4 y la persona sin DMT2 presentaron variantes probablemente dañinas y el paciente 3 presentó una variante posiblemente dañina.

En un estudio realizado con pacientes diabéticos daneses se identificó la variante **rs34130495** (cambio de sentido) asociada a la respuesta a metformina en el gen SLC22A1 y en pacientes diabéticos escoceses se identificaron las variantes **rs12208357**, **rs55918055** y **rs34059508** (cambio de sentido) asociadas con la respuesta a metformina. Contrariamente, los resultados mencionados difieren con lo obtenido en esta investigación, ya que los pacientes diabéticos peruanos no presentaron estas variantes en el gen SLC22A1[99,100].

Se encontraron 3 variantes conocidas (cambio de sentido) ubicadas en el gen SLC22A2 de impacto moderado, como la variante **rs762903143** probablemente dañina presente en el paciente 2 y las variantes benignas **rs1450284484** y **rs316019**. La variante **rs316019** estuvo presente en todos los pacientes y en la persona sin DMT2, estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio con pacientes diabéticos chinos en tratamiento con metformina, donde evaluaron la presencia de esta variante. La disminución en los niveles de HbA1c en pacientes que presentaron el genotipo heterocigoto GT fue significativamente mayor que en aquellos con el homocigoto de tipo salvaje GG[108]. Además, los estudios en individuos y en estudios *in vitro* han demostrado que esta variante podría ejercer un efecto sobre la eliminación de metformina y algunas variantes en el gen SLC22A2 cambian el nivel de expresión o la actividad de la proteína y modifican la farmacocinética de los sustratos de SLC22A2, siendo uno de ellos la metformina[108]. En pacientes diabéticos daneses y letones esta variante no tuvo asociación con la eficacia de metformina ni con la presencia de efectos adversos gastrointestinales[89,100]. En este estudio se reportaron 8 variantes nuevas (cambio de sentido) de impacto moderado en el gen SLC22A2. Los pacientes 2 y 5 y la persona sin DMT2 presentaron variantes probablemente dañinas y los pacientes 4 y 5 presentaron variantes posiblemente dañinas.

Se encontraron 5 variantes conocidas ubicadas en el gen SLC22A3, como **rs774978214** (cambio de sentido) y **rs753918761** (cambio de sentido) de impacto moderado y benignas, **rs561346956** (cambio de sentido) posiblemente dañina presente en el paciente 1 y **rs144856002** (cambio de sentido) probablemente dañina presente en el paciente 3. La variante **rs12194182** (intrónica) de impacto modificador estuvo presente en los pacientes 2 y 5 y en la persona sin DMT2, estos resultados son parecidos a los obtenidos en pacientes diabéticos de Jordania en tratamiento con metformina, donde se verifica una asociación significativa con niveles medios más bajos de HbA1c. Aquellos que presentaron el genotipo CC exhibieron los niveles medios más bajos de HbA1c, mientras que los pacientes con los genotipos CT y TT exhibieron niveles más altos[109]. En este

estudio se reportaron 22 variantes nuevas en el gen SLC22A3. El paciente 5 presentó 1 variante (aceptora de splicing) de impacto alto y los pacientes 1, 3 y 4 presentaron variantes (cambio de sentido) probablemente dañinas, mientras que los pacientes 2, 4 y 5 y la persona sin DMT2 presentaron variantes posiblemente dañinas de impacto moderado.

Se encontraron 4 variantes conocidas ubicadas en el gen SLC47A1, como la variante **rs77474263** (cambio de sentido) probablemente dañina presente en el paciente 2, según estudio in vitro mostró una captación reducida de metformina[110]. La variante **rs2289669** (intrónica) estuvo presente en los pacientes 1, 2, 3 y 5 y en la persona sin DMT2, estos resultados son similares con pacientes diabéticos caucásicos en tratamiento con metformina, donde se asoció con una reducción en los niveles de HbA1c[111]. En otro estudio con diabéticos bajo tratamiento, esta variante se asoció con la reducción de los niveles de HbA1c, el 20% de los pacientes con genotipos homocigotos para el alelo A tuvieron una reducción del doble en los niveles de HbA1c en comparación con los pacientes portadores del alelo G. Estos resultados sugieren que MATE1 puede tener un papel importante en la farmacocinética y farmacodinamia de la metformina, sin embargo, el mecanismo por el cual esta variante afecta la acción de la metformina no está aclarado hasta el momento[112]. Además, en diabéticos chinos se encontró una interacción SNP-SNP significativa entre rs2289669 y rs594709 (gen SLC22A1), que disminuyó la resistencia a la insulina y disminuyó los lípidos en sangre inducidos por la terapia con metformina[106], mientras que en pacientes letones no hubo asociación con efectos adversos gastrointestinales, y en diabéticos daneses, mexicanos y del sur de la India no hubo asociación con la eficacia a metformina[89,113,100,114]. La variante **rs8065082** (intrónica) estuvo presente en todos los pacientes y la persona sin DMT2, estos resultados se parecen a los obtenidos en personas sanas estadounidenses que tomaron metformina para prevenir la diabetes, donde el alelo menor C se asoció con una menor incidencia de diabetes[97]. La variante **rs2252281** (variante 5'-UTR) de impacto modificador estuvo presente en los pacientes 3 y 4 y en la persona sin DMT2, siendo similares a los obtenidos en diabéticos caucásicos y afroamericanos en tratamiento, los que presentaron el genotipo

homocigoto para el alelo variante tuvieron una reducción mayor en los niveles de HbA1c (mayor respuesta a metformina) que los pacientes portadores de al menos un alelo de referencia. Se plantea que esta variante es determinante del aclaramiento renal de metformina y la respuesta antidiabética[90]. En pacientes diabéticos daneses no hubo asociación entre esta variante y la respuesta a metformina[100]. En este estudio se reportaron 4 variantes nuevas en el gen SLC47A1, el paciente 2 presentó 1 variante (aceptora de splicing) de impacto alto y el paciente 1 presentó 1 variante (cambio de sentido) de impacto moderado y probablemente dañina.

Se encontraron 2 variantes conocidas ubicadas en el gen SLC47A2, como **rs533190862** (variante de eliminación del marco de lectura) de impacto moderado y la variante **rs12943590** (variante corriente arriba del gen) de impacto modificador estuvo presente en los pacientes 1, 2 y 4 y en la persona sin DMT2, estos resultados son parecidos a los encontrados en pacientes diabéticos caucásicos y afroamericanos, donde los que presentaron el genotipo homocigoto AA tuvieron una respuesta significativamente menor al tratamiento con metformina, en comparación con los portadores del alelo de referencia (GA y GG)[115]. Mientras que en pacientes diabéticos del sur de la India no hubo asociación entre esta variante y la respuesta a metformina[114]. En nuestro estudio se reportaron 3 variantes nuevas (en la región de splicing y cambio de sentido) en el gen SLC47A2. El paciente 4 presentó una variante de impacto moderado probablemente dañina.

Se encontraron 4 variantes conocidas intrónicas ubicadas en el gen SLC29A4 de impacto modificador como **rs4299914** presente en todos los pacientes y en la persona sin DMT2. La variante **rs3889348** estuvo presente en todos los pacientes y la persona sin DMT2, estos resultados son similares a los obtenidos en pacientes diabéticos, donde la presencia de esta variante y el alelo G se asoció con intolerancia gastrointestinal durante el tratamiento con metformina. Además, el alelo G se asoció con una menor expresión de PMAT en el intestino y la intolerancia gastrointestinal puede reflejar altas concentraciones localizadas de metformina en el intestino, por lo que se propone que la reducción del transporte de metformina a través de PMAT

podría aumentar el riesgo de efectos adversos gastrointestinales[116]. Además, en un estudio con pacientes diabéticos se determinó que un grupo de SNPs en el gen SLC29A4 (rs3889348, rs2685753, rs4720572, rs4299914 y rs6971788) podría estar asociado a una disminución de la absorción de metformina[100]. En la presenta investigación, la variante **rs6958502** estuvo presente en todos los pacientes y la persona sin DMT2 y la variante **rs4724512** estuvo en los pacientes 2 y 5, estos resultados son similares a los obtenidos en diabéticos daneses, donde no se encontró asociación con la respuesta a metformina[100]. En este estudio se reportaron 5 variantes nuevas en el gen SLC29A4, todos los pacientes y la persona sin DMT2 presentaron variantes (aceptora de splicing) de impacto alto y el paciente 2 presentó una variante (con cambio de sentido) de impacto moderado y probablemente dañina.

Se encontraron 23 variantes conocidas ubicadas en el gen ATM, siendo 5 de impacto alto como **rs768748099** (aceptora de splicing) presente en los pacientes 1, 3, 4 y 5 y en la persona sin DMT2, **rs34325032** y **rs373881770** (aceptora de splicing) presentes en todos los pacientes y la persona sin DMT2, **rs2086432758** (donante de splicing) presente en los pacientes 1 y 2 y **rs786203404** (variante con ganancia de terminación) que es una variante patogénica presente en el paciente 4. Las demás variantes (cambio de sentido) fueron de impacto moderado, incluyendo 6 posiblemente dañinas como la variante **rs1057520445** presente en los pacientes 1, 3 y 4 y en la persona sin DMT2, las variantes **rs730881387**, **rs2079990831** y **rs780303327** presentes en el paciente 2, la variante **rs375798802** presente en los pacientes 3 y 5 y la variante **rs587779840** presente en el paciente 4. Además, 3 variantes fueron probablemente dañinas como **rs786203667** presente en el paciente 2 y la persona sin DMT2, **rs2080095349** presente en los pacientes 3 y 4 y **rs1591522957** presente en el paciente 4.

En un estudio con pacientes diabéticos escoceses y europeos, el alelo menor C de la variante **rs11212617** ubicado cerca al gen ATM se asoció con un tratamiento exitoso (valores más bajos de HbA1c)[15]. Mientras que en estudios con pacientes diabéticos iraníes no hubo asociación entre el

referido polimorfismo y la respuesta al fármaco de primera línea[117]. En este estudio se reportaron 87 variantes nuevas en el gen ATM. Todos los pacientes presentaron variantes de impacto alto (con ganancia de terminación y donador de splicing) y de impacto moderado, que incluyen variantes probablemente y posiblemente dañinas (cambio de sentido). El gen ATM fue el gen que presentó mayor número de variantes conocidas y nuevas (Ver Tabla 16).

El gen ATM codifica la proteína quinasa serina/treonina ATM que se activa en respuesta al daño del ADN y es responsable de la activación inicial de la señalización de reparación[118]. Se ha planteado que ATM actúa upstream (corriente arriba) de AMPK y la variación en este gen podría alterar la respuesta glucémica a la metformina[117]. Según lo propuesto en otro estudio, ATM podría modular la capacidad de respuesta de metformina al afectar su capacidad para activar la AMPK. ATM fosforila LKB1, que es un activador clave de AMPK. ATM también podría regular AMPK independientemente de LKB1 y la regulación de otros objetivos relevantes que son independientes de la AMPK[119]. También se ha propuesto que ATM está involucrada en la señalización de la insulina, lo cual podría influir en la acción de la metformina[120].

Se encontraron 5 variantes conocidas ubicadas en el gen SLC2A2, como **rs71176588** (donante de splicing) de impacto alto presente en los pacientes 1, 2 y 5 y en la persona sin DMT2, **rs376064965** (cambio de sentido), **rs775283150** (cambio de sentido) y **rs5400** (cambio de sentido) de impacto moderado y benignas. La variante **rs8192675** (intrónica) de impacto modificador estuvo presente en los pacientes 2 y 4 y en la persona sin DMT2, resultados similares a los obtenidos en diabéticos europeos y no europeos en tratamiento con metformina, donde los que presentaron el alelo C tuvieron una reducción mayor de los valores de HbA1c[16]. En el presente estudio se reportaron 20 variantes nuevas en el gen SLC2A2. Todos los pacientes y la persona sin DMT2 presentaron variantes de impacto alto (donantes de splicing y con ganancia de terminación). Los pacientes 1, 3 y 4 presentaron variantes (cambio de sentido) de impacto moderado y probablemente

dañinas, mientras que los pacientes 1 y 4 presentaron variantes de impacto moderado y posiblemente dañinas.

El gen SLC2A2 codifica a GLUT2 el cual se expresa mayormente en el hígado y páncreas, participa en el transporte de glucosa en el hígado y en la célula β pancreática, actúa como un sensor de glucosa que detecta pequeños cambios en los niveles de glucosa circulante en la sangre que conducen a una mayor secreción de insulina[121]. Se postula que las variantes en el gen SLC2A2 que codifican al GLUT2 podrían alterar la homeostasis de la glucosa[101]. En estudios con muestras de hígado, el alelo C de la variante rs8192675 se asoció con una menor expresión de GLUT2, por lo que esta variante puede afectar la acción de la metformina[16] .

En un estudio con pacientes diabéticos, la variante **rs254271** en el gen PRPF31 se asoció con una pobre respuesta a metformina. Contrariamente, estos resultados difieren con lo obtenido en esta investigación, ya que los pacientes diabéticos peruanos no presentaron esta variante ni tampoco se encontraron otras variantes conocidas o nuevas de impacto alto y moderado en el gen PRPF31[17].

El factor 31 de empalme de pre-ARNm (PRPF31) es un componente del spliceosoma, el complejo de ribonucleoproteína macromolecular (RNP) que cataliza el empalme de los pre-ARN mensajeros (pre-ARNm) para eliminar intrones y producir ARNm maduros[122]. Se ha determinado que las variaciones en el gen PRPF31 generan una disminución de la eficiencia de corte y empalme[123]. Algunas variaciones en el gen PRPF31 se han identificado como causantes de la retinitis pigmentosa[124]. Además, en un estudio de vinculación de todo el genoma con pacientes diabéticos mexicoamericanos, PRPF31 se identificó como un gen candidato de susceptibilidad a la retinopatía diabética[125]. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual PRPF31 se relaciona en la respuesta al fármaco metformina, por lo que se deben realizar más estudios.

Se encontraron 3 variantes conocidas ubicadas en el gen CPA6, como **rs571002336** (cambio de sentido) y **rs10957393** (cambio de sentido) de impacto moderado y benignas y **rs17853192** (cambio de sentido) de impacto moderado y posiblemente dañina presente en los pacientes 1 y 4. Además, se reportaron 6 variantes nuevas en el gen CPA6. El paciente 4 presentó 2 variantes (con ganancia de terminación y de pérdida de inicio) de impacto alto y los pacientes 3 y 4 presentaron variantes (cambio de sentido) de impacto moderado y posiblemente dañinas.

En un estudio con pacientes diabéticos, la variante **rs2162145** en el gen CPA6 se asoció con una mejor respuesta a metformina[17]. Contrariamente, estos resultados difieren con lo obtenido en esta investigación, ya que los pacientes diabéticos peruanos no presentaron esta variante en el gen CPA6. La carboxipeptidasa A6 (CPA6) es una peptidasa que elimina los aminoácidos hidrofóbicos C-terminales de péptidos y proteínas, las escisiones proteolíticas C-terminales son modificaciones postraduccionales importantes que pueden activar o degradar moléculas de señalización. CPA6 tiene funciones como la digestión de alimentos y la biosíntesis selectiva de péptidos neuroendocrinos. Las variaciones en el gen CPA6 se han relacionado con la epilepsia y convulsiones febriles, además, una translocación en este gen se ha relacionado con el síndrome de retracción de Duane[126]. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual CPA6 se relaciona en la respuesta al fármaco metformina.

Se encontró una variante conocida ubicada en el gen STAT3, la cual fue **rs747667389** de impacto moderado y benigna presente en el paciente 4. En un estudio con pacientes diabéticos afroamericanos, las variantes **rs140604473**, **rs149214040**, **rs114401618** y **rs17882069** en el gen STAT3 se asociaron con una pobre respuesta a metformina[17]. Los resultados mencionados difieren con lo obtenido en esta investigación, ya que los pacientes diabéticos peruanos no presentaron estas variantes en el gen STAT3. En este estudio se reportaron 6 variantes nuevas en el gen STAT3. El paciente 2 presentó 1 variante (donante de splicing) de impacto alto y 2

variantes (cambio de sentido) de impacto moderado y probablemente dañinas.

El transductor de señales y activador de la transcripción (STAT3) es una proteína de señalización que se activa por factores de crecimiento y citocinas y participa en el crecimiento, inmunidad y metabolismo celular[127]. En algunos estudios se ha encontrado que la metformina presenta propiedades antineoplásicas al inhibir la señalización de STAT3 y en un estudio de enfermedad inflamatoria intestinal se propuso que metformina puede reducir la inflamación intestinal mediante la inhibición de la fosforilación de STAT3[128,129,130]. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual STAT3 se relaciona en la respuesta al fármaco metformina, por lo que se deben realizar más investigaciones.

Se encontraron 2 variantes conocidas benignas ubicadas en el gen STK11. La variante **rs2075604** estuvo presente en los pacientes 2, 3, 4 y 5 y en la persona sin DMT2, estos resultados son parecidos a los encontrados en pacientes diabéticos chinos, donde se determinó que los genotipos GT y TT presentaron una mayor disminución de los niveles de HbA1c que el genotipo GG. Los portadores del alelo T tuvieron 2.133 veces mayor probabilidad de responder al tratamiento con metformina, es decir, los portadores del alelo T pueden obtener una mejor eficacia terapéutica con la metformina en comparación con el alelo G[131]. La variante **rs741765** estuvo presente en los pacientes 2, 3, 4 y 5 y en la persona sin DMT2, similares a los obtenidos en diabéticos caucásicos, donde no se evidencia relación con la respuesta a metformina[18]. En tanto, en un grupo de personas estadounidenses sanas portadoras de esta variante, a pesar que estuvieron consumiendo metformina como prevención, se reportaron mayor incidencia de diabetes[97]. En esta investigación se reportan 25 variantes nuevas en el gen STK11. El paciente 1, 4 y la persona sin DMT2 presentaron variantes (de pérdida de inicio y donante de splicing) de impacto alto. El resto de variantes (cambio de sentido) fueron de impacto moderado, todos los pacientes presentaron variantes probablemente dañinas y los pacientes 1, 2, 3 y 4 y la persona sin DMT2 presentaron variantes posiblemente dañinas.

La serina-treonina quinasa 11 (STK11), o también conocida como LKB1, es un activador corriente arriba de AMPK. Es por ello que se ha propuesto que STK11 también mediaría el efecto terapéutico de la metformina[132].

Se encontraron 3 variantes conocidas ubicadas en el gen PRKAG2, como **rs918000213** (cambio de sentido) de impacto moderado. Además, la variante **rs2727528** (intrónica) estuvo presente en los pacientes 1, 2, 4 y 5 y en la persona sin DMT2 y la variante **rs1105842** (intrónica) estuvo presente en los pacientes 1 y 5 y en la persona sin DMT2, resultados similares a los obtenidos en un estudio con pacientes diabéticos chinos, donde los portadores del alelo C de ambas variantes presentaron una mayor disminución de los valores de HbA1C y se relacionaron con la eficacia de metformina[20]. En este estudio se reportan 16 variantes nuevas en el gen PRKAG2. El paciente 1 y 4 presentaron 2 variantes de impacto alto (con ganancia de terminación y donante de splicing). El resto de variantes (cambio de sentido) fueron de impacto moderado.

El gen PRKAG2 codifica la subunidad γ2 de AMPK. La AMPK es una serina-treonina quinasa y un complejo heterotrimérico que contiene una subunidad α catalítica y subunidades β y γ reguladoras, con múltiples isoformas de cada una (dos α, dos β y tres γ). La subunidad γ tiene sitios de unión de nucleótidos y cumple un papel importante en la regulación de AMPK en respuesta a los niveles de energía celular. En un estudio se asoció la variación R302Q en γ2 con un aumento de la adiposidad y niveles aumentados de glucosa en ayunas posiblemente a la activación crónica de la AMPK, por lo que se plantea que esta variante podría cambiar el estado de activación de AMPK[133].

Según la Tabla 17, los pacientes 4 y 2 presentaron el mayor número de variantes conocidas (en total 38 y 35 variantes, respectivamente). Mientras que el paciente 4 presentó el mayor número de variantes nuevas (en total 87 variantes), luego de los pacientes 1 y 5 (cada uno presentó en total 43 variantes). Las limitaciones del presente estudio fueron el número reducido

de pacientes analizados debido al costo de la tecnología usada y el acceso a los datos de otras variables clínicas. De acuerdo a los resultados del estudio, se han encontrado variantes genéticas conocidas, es decir, que fueron reportadas anteriormente en otras poblaciones. Además, se encontraron variantes genéticas nuevas, que no habían sido reportadas y que pueden tener impacto en la farmacogenómica de la DMT2. De esta manera, bajo un enfoque genómico y considerando las características genéticas de nuestra población, se puede aportar al tratamiento personalizado de los pacientes y a las decisiones clínico-terapéuticas de la DMT2, una enfermedad altamente prevalente en el país.

VII. CONCLUSIONES

1. La tecnología de secuenciación genómica masiva permitió detectar la presencia de variantes genéticas conocidas y nuevas de respuesta a metformina en pacientes peruanos con DMT2.

2. Se identificaron 64 variantes conocidas y 208 variantes nuevas en los genes de respuesta a metformina SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC47A1, SLC47A2, SLC29A4, ATM, SLC2A2, CPA6, STAT3, STK11 y PRKAG2 en pacientes diabéticos peruanos.

3. Se identificaron variantes conocidas como SNPs e indels en regiones exónicas (cambio de sentido y sinónima), 5' UTR e intrónicas (aceptora y donante de splicing), siendo las más relevantes las consideradas probablemente dañinas: rs762903143 (gen SLC22A2), rs144856002 (gen SLC22A3), rs77474263 (gen SLC47A1) rs2080095349 (gen ATM) y rs17853192 (gen CPA6).

4. Se identificaron variantes nuevas como SNPs en regiones exónicas (cambio de sentido y ganancia de terminación) e intrónicas (aceptora y donante de splicing), siendo las más relevantes las consideradas probablemente dañinas y posiblemente dañinas presentes en todos los genes, excepto en el gen PRKAG2.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Secuenciar los genomas de mayor número de pacientes diabéticos peruanos bajo tratamiento con metformina.

2. Secuenciar los genomas de pacientes peruanos con DMT2 con respuesta diferencial a metformina.

3. Evaluar otros genes y regiones intergénicas de los genomas de pacientes peruanos con DMT2 para ver el impacto en la farmacogenómica de la enfermedad.

IX. REFERENCIAS

1. Escobar F, Tebar F. La diabetes mellitus en la práctica clínica. España: Editorial Médica Panamericana; 2009, pp.47-54.

2. Arce M. Endocrinología. España:Universidad Santiago de Compostels; 2006, pp.274.

3. Federación Internacional de Diabetes. Atlas de la Diabetes de la FID, 9a ed. Bruselas,Bélgica: Federación Internacional de Diabetes; 2021.

4. Ritter J, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang H. Rang y Dale. Farmacología. 9a ed. España: Elsevier; 2020, pp.415-416.

5. Gong L, Goswami S, Giacomini K, Altman R, Klein T. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Pharmacogenet Genomics 2012, 22(10): 820-827.

6. Pollastro C, Ziviello C, Costa V, Ciccodicola A. Pharmacogenomics of drug response in type 2 diabetes: toward the definition of tailored therapies?. PPAR Res 2015, 2015:415149.

7. Pawlyk AC, Giacomini KM, McKeon C, Shuldiner AR, Florez JC. Metformin pharmacogenomics: Current status and future directions. Diabetes.2014; 63(8):2590–2599.

8. Bloss CS, Jeste DV, Schork NJ. Genomics for disease treatment and prevention. Psychiatr Clin North Am. 2011;34(1):147-166.

9. Ombrello MJ, Sikora KA, Kastner DL. Genetics, genomics and their relevance to pathology and therapy. Best Pract. Res Clin Rheumatol. 2014;28(2):175-189.

10. Schwarz UI, Gulilat M, Kim RB. The role of next-generation sequencing in pharmacogenetics and pharmacogenomics. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019;9(2):a033027.

11. Olivares L, Villanueva M, Aparicio E, Yauri E, Medina R, *et al*. Polimorfismo Val/Met en gen OCT1 de respuesta a metformina en muestras de Lima y Puno. Enfoque farmacogenético de la diabetes. An Fac Med. 2017, 78:126–131.

12. Mofo Mato EP, Guewo-Fokeng M, Essop MF, Owira PMO. Genetic polymorphisms of organic cation transporter 1 (OCT1) and responses to metformin therapy in individuals with type 2 diabetes: A systematic review. Medicine (Baltimore). 2018, 97(27): e11349.

13. Mannino GC, Andreozzi F, Sesti G. Pharmacogenetics of type 2 diabetes mellitus, the route toward tailored medicine. Diabetes Metab Res Rev. 2019, 35(3): e3109.

14. Nasykhova YA, Barbitoff YA, Serebryakova EA, Katserov DS, Glotov AS. Recent advances and perspectives in next generation sequencing application to the genetic research of type 2 diabetes. World J Diabetes. 2019;10(7):376-395.

15. Zhou K, Bellenguez C, Spencer C, Bennett A, Coleman R, *et al*. Common variants near ATM are associated with glycemic response to metformin in type 2 diabetes. Nat Genet. 2011, 43(2): 117-120.

16. Zhou K, Yee S, Seiser E, van Leeuwen N, Tavendale R, *et al*. Variation in the glucose transporter gene SLC2A2 is associated with glycemic response to metformin. Nat Genet. 2016, 48(9): 1055-1059.

17. Rotroff D, Yee S, Zhou K, Marvel S, Shah HS, et al. Genetic variants in CPA6 and PRPF31 are associated with variation in response to metformin in individuals with type 2 diabetes. Diabetes 2018, 67(7): 1428-1440.

18. Tkac I, Javorsky M, Klimcakova L, Zidzik J, Gaa I, et al. A pharmacogenetic association between a variation in calpain 10 (CAPN10) gene and the response to metformin treatment in patients with type 2 diabetes. Eur J Clin Pharmacol. 2015, 71(1): 59-63.

19. Dong M, Gong Z, Dai X, Lei G, Lu HB, et al. Serine racemase rs391300 G/A polymorphism influences the therapeutic efficacy of metformin in Chinese patients with diabetes mellitus type 2. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011: 38(12): 824-9.

20. Xiao D, Liu JY, Zhang SM, Liu RR, Yin JY, Han XY, et al. A two-stage study identifies two novel polymorphisms in PRKAG2 affecting metformin response in chinese type 2 diabetes patients. Pharmgenomics Pers Med. 2021;14:745–755.

21. Dujic T, Bego T, Malenica M, Velija-Asimi Z, Ahlqvist E, Groop L, et al. Effects of TCF7L2 rs7903146 variant on metformin response in patients with type 2 diabetes. Bosn J Basic Med Sci. 2019;19(4):368-374.

22. Grossman S, Mattson C. Porth´s Pathopshysiology: Concepts of Altered Health State. 9th ed. USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

23. Díaz L, Delgado E. Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2016, 12(17): 935-946.

24. DeFronzo R. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. Ann Intern Med 1999, 131(4): 281-303.

25. Galicia U, Benito A, Jebari S, Larrea A, Siddiqi H, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. Int J Mol Sci. 2020, 21(17): 6275.

26. Pérez F. Epidemiología y fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2. Rev Med Clin Condes 2009, 20(5): 565-571.

27. Pérez M, De Ita D, Díaz M. Glucogénesis: Una visión contemporánea de una vía metabólica antigua. REB 2012, 31(1):10-20.

28. Divins MJ. Antidiabéticos orales. Farm Prof 2009, 23(6): 28-33.

29. Graham G, Punt J, Arora M, Day R, Doogue M, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. Clin Pharmacokinet 2011, 50(2): 81-98.

30. DrugBank.Metformin.[Internet]. 2005. Disponible en: https://go.drugbank.com/drugs/DB00331.

31. Markowicz M, Huttunen K, Mateusiak L, Mikiciuk E, Sikora J. Is metformin a perfect drug? Updates in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Curr Pharm Des 2017. 23(17): 2532-2550.

32. Riedmaier AE, Fisel P, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab, M. Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. Trends Pharmacol Sci 2013, 34(2): 126-35.

33. Scheen A. Clinical pharmacokinetics of metformin. Clin Pharmacokinet. 1996, 30(5): 359-71.

34. Pu R, Shi D, Gan T, Ren X, Ba Y, et al. Effects of metformin in obesity treatment in different populations: a meta-analysis. Ther Adv Endocrinol Metab. 2020, 11: 2042018820926000.

35. Siavash M, Tabbakhian M, Sabzghabaee A, Razavi N. Severity of gastrointestinal side effects of metformin tablet compared to metformin capsule in type 2 diabetes mellitus patients. J Res Pharm Pract. 2017, 6(2): 73-76.

36. McCreight L, Bailey C, Pearson E. Metformin and the gastrointestinal tract. Diabetologia 2016, 59(3):426-35.

37. Bouchoucha M, Uzzan B, Cohen R. Metformin and digestive disorders. Diabet Metab. 2011, 37(2): 90-96.

38. Florez JC. The pharmacogenetics of metformin. Diabetologia. 2017;60(9):1648–1655.

39. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. Diabetologia. 2017;60(9):1577–1585.

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.

41. Vial G, Detaille D, Guigas B. Role of Mitochondria in the Mechanism(s) of Action of Metformin. Front Endocrinol 2019, 10: 294.

42. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin Sci. 2012,

122(6): 253.

43. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. Mol Cell 2017, 66(6): 789.

44. Pernicova I, Korbonits M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat Rev Endocrinol 2014, 10(3):143–156.

45. Song A, Zhang C, Meng X. Mechanism and application of metformin in kidney diseases: an update. Biomed Pharmacother 2021, 138: 111454.

46. Rena G, Pearson E, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?, Diabetologia 2013, 56:1898–1906.

47. Gomez C, Hernandez G, Rojas A, Santacruz H, Uribe M. Psiquiatría clínica: diagnóstico y tratamiento en niños, adolescentes y adultos. Colombia: Ed. Médica Panamericana; 2008.

48. Benjeddou M. Solute carrier transporters: Pharmacogenomics research opportunities in Africa. Afr. J. Biotechnol. 2010, 9(54): 9191-9195.

49. Meier Y, Eloranta J, Darimont J, Ismair MG, Hiller C, et al. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. Drug Metab Dispos 2007, 35(4): 590-594.

50. He L, Vasiliou K, Nebert DW. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. Hum Genomics. 2009;3(2):195–205.

51. Bai X, Moraes TF, Reithmeier RAF. Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. Mol Membr Biol. 2017;34(1-2):1-32.

52. Lai Y. Membrane transporters and the diseases corresponding to functional defects. In: Transporters in Drug Discovery and Development. USA: Woodhead Publishing; 2013. pp. 29-89.

53. Nigam SK. What do drug transporters really do?. Nat Rev Drug Discov. 2015;14(1):29-44.

54. Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. Mol Aspects Med 2013, 34(2-3): 413-435.

55. Wagner D, Hu T, Wang J. Polyspecific organic cation transporters and their impact on drug intracellular levels and pharmacodynamics. Pharmacol Res 2016, 111: 237-246.

56. Misra A. Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics. USA: Elsevier, 2011.

57. Alsanosi S, Skiffington C, Padmanabhan S. Pharmacokinetic Pharmacogenomics. En: Padmanabhan S. Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. 1st Edition. USA: Elsevier;

2014. pp. 341-364.

58. Koepsell H. Organic cation transporters in health and disease. Pharmacol Rev 2020, 72(1): 253-319.

59. Wang J. The Plasma Membrane Monoamine Transporter (PMAT): Structure, function, and role in organic cation disposition. Clin Pharmacol Ther 2016, 100(5): 489-499.

60. NCBI. SLC22A1 solute carrier family 22 member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene. [Internet]. 2021. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6580.

61. GeneCards The Human Gene DataBase. SLC22A1 Gene. [Internet]. Disponible en: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC22A1.

62. Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. Handb Exp Pharmacol 2011, 201: 105-67.

63. GeneCards The Human Gene DataBase. SLC22A2 Gene. [Internet]. Disponible en: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC22A2&keywords=SLC22A1.

64. GeneCards The Human Gene DataBase. SLC22A3 Gene. [Internet]. Disponible en: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC22A3&keywords=SLC22A1.

65. GeneCards The Human Gene DataBase. SLC29A4 Gene. [Internet]. Disponible en: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC29A4&keywords=SLC29A4.

66. GeneCards The Human Gene DataBase. SLC47A1 Gene. [Internet]. Disponible en: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC47A1&keywords=SLC47A1.

67. GeneCards The Human Gene DataBase. SLC47A2 Gene. [Internet]. Disponible en: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC47A2&keywords=SLC47A1.

68. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson. Genética en medicina. España:Elsevier:2008. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/book/9788445818701/thompson-and-thompson-genetica-en-medicina#book-info.

69. Dhindsa RS, Wang Q, Vitsios D, Burren OS, DiCarlo JE, Kruglyak L, MacArthur DG, et al. A minimal role for synonymous variation in human disease. Am. J. Hum. Genet. 2022;109(12):2105-2109.

70. Reeskamp L, Balvers M, Pedro J, van de Kerkhof L, Klaaijsen L, Motazacker M, et al. Intronic variant screening with targeted next-

generation sequencing reveals first pseudoexon in LDLR in familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 2021;321:14–20.

71. Hertzog A, Selvanathan A, Farnsworth E, Tchan M, Adams L, Lewis K, et al. Intronic variants in inborn errors of metabolism: Beyond the exome. Front Genet. 2022;13:1031495.

72. Sallah SR, Sergouniotis PI, Hardcastle C, Ramsden S, Lotería AJ, Lench N, et al. Assessing the pathogenicity of In-frame CACNA1F indel variants using structural modeling. J Mol Diagn. 2022;24(12):1232-1239.

73. Ginsburg GS, Willard HF. Genomic and personalized medicine: foundations and applications. Transl Res. 2009;154(6):277-87.

74. Singh RR,Luthra R, Routbort MJ, Patel KP, Medeiros LJ. Implementation of next generation sequencing in clinical molecular diagnostic laboratories: advantages, challenges and potential. Expert Rev Precis Med Drug Dev. 2016;1(1):109-120.

75. Gupta AK, Gupta UD. Next generation sequencing and its applications. In: Verma A, Singh A. Animal biotechnology. Models in discovery and traslation. USA:Elsevier;2014. pp. 345-367.

76. Hess JF, Kohl TA, Kotrová M, Rönsch K, Paprotka T, Mohr V, et al. Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. Biotechnol Adv. 2020;41:107537.

77. Xia J, Wang Q, Jia P, Wang B, Pao W, Zhao Z. NGS catalog: A database of Next Generation Sequencing studies in humans. Hum Mutat. 2012;33(6):E2341 – E2355.

78. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. Cancer Biol Med. 2019;16(1):4-10.

79. Ulahannan D, Kovac M, Mulholland P, Cazier J, Tomlinson I. Technical and implementation issues in using next-generation sequencing of cancers in clinical practice. Br J Cancer 2013, 109(4): 827-835.

80. Mardis E. Next-generation DNA sequencing methods. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet 2008, 9(1): 387-402.

81. Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta. 2014;1842(10):1932-1941.

82. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin Chem. 2009;55(4):641–658.

83. Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High throughput sequencing: An overview of sequencing chemistry. Indian J Microbiol. 2016;56(4):394-404.

84. Kulkarni S, Pfeifer J. Clinical Genomics. USA: Academic Press;2015. pp. 8-10.

85. Pabinger S, Dander A, Fischer M, Snajder Rene, Sperk M, Efremova M, et al. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. Brief Bioinform. 2014;15(2):256-278.

86. Todd J, Florez J. An update on the pharmacogenomics of metformin: progress, problems and potential. Pharmacogenomics 2014, 15(4): 529-539.

87. Wang L, Weinshilboum R. Metformin pharmacogenomics: Biomarkers to mechanisms. Diabetes. 2014. 63(8):2609–2610.

88. Chen S, Zhou J, Xi M, Jia Y, Wong Y, Zhao J, et al. Pharmacogenetic variation and metformin response. Curr Drug Metab. 2013;14(10):1070-82.

89. Tarasova L, Kalnina I, Geldnere K, Bumbure A, Ritenberga R, 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): 659-66.

90. Stocker S, Morrissey K, Yee S, Castro R, Xu L, 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.

91. Chen L, Takizawa M, Chen E, Schlessinger A, Segenthelar J, et al. Genetic polymorphisms in organic cation transporter 1 (OCT1) in chinese and japanese populations exhibit altered function. J Pharmacol Exp Ther. 2010, 335: 42.

92. Salazar A. Distribución del polimorfismo Val408Met en el gen SLC22A1 (OCT1) en pacientes peruanos con DMT2 en tratamiento de primera línea-metformina y comparación con muestras poblacionales [Trabajo de investigación de bachiller]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, 2021.

93. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. N Engl J Med. 2014;370(25):2418-25.

94. Besser J, Carleton H, Gerner-Smidt P, Lindsey R, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. Clin Microbiol Infect 2018, 24(4): 335–341.

95. Aidar M, Peres S. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J 2007, 18(2): 148-152.

96. Promega. Quantus™ Fluorometer. [Internet]. 2021 [Accedido 01 Enero

2022]. Disponible en: https://worldwide.promega.com/products/microplate-readers-fluorometers-luminometers/fluorometers/quantus-fluorometer/?catNum=E6150#protocols.

97. Jablonski K, McAteer J, de Bakker P, Franks P, Pollin T, 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.

98. Shu Y, Sheardown S, Brown C, Owen R; Zhang S, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. J Clin Invest 2007, 117(5): 1422–1431.

99. Dujic T, Zhou K, Donnelly L, Tavendale R, Palmer C, Pearson E. Association of organic cation transporter 1 with intolerance to metformin in type 2 diabetes: A GoDARTS study. Diabetes 2015, 64(5): 1786-1793.

100. Christensen M, Brasch-Andersen C, Green H, Nielsen F, Damkier P, et al. The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c. Pharmacogenet Genomics 2011, 21(12): 837-50.

101. Zhou K, Donnelly L, Yang J, Li M, Deshmukh H, Van Z. Heritability of variation in glycaemic response to metformin: a genome-wide complex trait analysis. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014, 2(6): 481-487.

102. Mahrooz A, Parsanasab H, Hashemi-Soteh M, Kashi Z, Bahar A, et al. The role of clinical response to metformin in patients newly diagnosed with type 2 diabetes: a monotherapy study. Clin Exp Med. 2015, 15(2): 159-65.

103. Zhou K, Donnelly L, Kimber C, Donnan P, Doney A, Leese G, et al. Reduced-function SLC22A1 polymorphisms encoding organic cation transporter 1 and glycemic response to metformin: A GoDARTS study. Diabetes 2009, 58(6): 1434-1439.

104. Zhou Y, Ye W, Wang Y, Jiang Z, Meng X, 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.

105. Becker M, Visser L, van Schaik R, Hofman A, Uitterlinden A, Stricker B. 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.

106. Xiao D, Guo Y, Li X, Yin,JY, Zheng W, Qiu XW, et al. The Impacts of SLC22A1 rs594709 and SLC47A1 rs2289669 polymorphisms on metformin therapeutic efficacy in chinesetype 2 diabetes patients. Int J Endocrinol. 2016;2016:4350712.

107. Umamaheswaran G, Praveen RG, Damodaran SE, Das AK, Adithan C.

Influence of SLC22A1 rs622342 genetic polymorphism on metformin response in South Indian type 2 diabetes mellitus patients. Clin Exp Med. 2015;15(4):511-7.

108. Hou W, Zhang D, Lu W, Zheng T, Wan L, Li Q. Polymorphism of organic cation transporter 2 improves glucose-lowering effect of metformin via influencing its pharmacokinetics in Chinese type 2 diabetic patients. Mol Diagn Ther 2015, 19(1): 25-33.

109. AL-Eitan L, Almomani B, Nassar A, Elsaqa B, Saadeh N. Metformin pharmacogenetics: effects of SLC22A1, SLC22A2, and SLC22A3 polymorphisms on glycemic control and HbA1c levels. J Pers Med 2019, 9(1): 17.

110. Kroetz DL, Yee SW; Giacomini KM. The pharmacogenomics of membrane transporters project: research at the interface of genomics and transporter pharmacology. Clin Pharmacol Ther. 2010;87(1):109–116.

111. Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Interaction between polymorphisms in the OCT1 and MATE1 transporter and metformin response. Pharmacogenet. Genomics. 2010;20(1): 38-44.

112. Tkáč I, Klimčáková L, Javorský M, Fabianová M, Schroner Z, Hermanová H, 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):189-91.

113. Reséndiz C, Flores E, Suárez F, Cruz M, Valladares A, 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.

114. Raj GM, Mathaiyan J, Wyawahare M, Priyadarshini R. Lack of effect of the SLC47A1 and SLC47A2 gene polymorphisms on the glycemic response to metformin in type 2 diabetes mellitus patients. Drug Metab Pers Ther. 2018;33(4):175-185.

115. Choi J, Yee S, Ramirez A, Morrissey K, Jang G, Joski P. A common 5′-UTR variant in MATE2-K is associated with poor response to metformin. Clin Pharmacol Ther 2011, 90(5): 674-684.

116. Dawed A, Zhou K, van Leeuwen N, Mahajan A, Robertson N, et al. Variation in the Plasma Membrane Monoamine Transporter (PMAT) (Encoded by SLC29A4) and Organic Cation Transporter 1 (OCT1) (Encoded by SLC22A1) and gastrointestinal intolerance to metformin in type 2 diabetes: An IMI DIRECT study. Diabetes Care 2019, 42(6): 1027-1033.

117. Shokri F, Ghaedi H, Fard SG, Movafagh A, Abediankenari S, Mahrooz A. Impact of ATM and SLC22A1 polymorphisms on therapeutic response to metformin in iranian diabetic patients. Int J Mol Cell Med. 2016;5(1):1–7.

118. Hppe R, Phillips T, Roach M. Leibel and Phillips textbook of radiation oncology. 3rd ed. USA:Elsevier. 2010. pp. 31-39. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/book/9781416058977/leibel-and-phillips-textbook-of-radiation-oncology#book-info.

119. Birnbaum MJ, Shaw RJ. Drugs, diabetes and cancer. Nature. 2011;470:338-339.

120. Schneider JG, Finck BN, Ren J, Standley KN, Takagi M; Maclean KH, et al. ATM-dependent suppression of stress signaling reduces vascular disease in metabolic syndrome. Cell Metab. 2006;4(5):377-89.

121. Kovacs S, Trato C. Maternal-fetal and neonatal endocrinology physiology, pathophysiology, and clinical management. [Libro electrónico]. USA:Elsevier. 2019 [Citado 01 Ener 2023]. pp. 783-803. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/book/9780128148235/maternal-fetal-and-neonatal-endocrinology.

122. Wheway G, Douglas A, Baralle D, Guillot E. Mutation spectrum of PRPF31, genotype-phenotype correlation in retinitis pigmentosa, and opportunities for therapy. Exp Eye Res. 2020;192:107950.

123. Li J, Liu F, Lv Y, Sun K, Zhao Y, Reilly J, et al. Prpf31 is essential for the survival and differentiation of retinal progenitor cells by modulating alternative splicing. Nucleic Acids Res. 2021;49(4):2027–2043.

124. Waseem N, Vaclavik V, Webster A, Jenkins S, Bird AC, Bhattacharya S. Mutations in the gene coding for the pre-mRNA splicing factor, PRPF31, in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007, 48(3): 1330-1334.

125. Hallman DM, Boerwinkle E, Gonzalez VH, Klein BE, Klein R, Hanis CL. A genome-wide linkage scan for diabetic retinopathy susceptibility genes in Mexican Americans with type 2 diabetes from Starr County, Texas. Diabetes. 2007;56(4):1167-73.

126. NCBI. CPA6 carboxypeptidase A6 [Homo sapiens (human)] - Gene. [Internet]. 2023. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=57094.

127. NCBI. STAT3 signal transducer and activator of transcription 3 [Homo sapiens (human)] - Gene. [Internet]. 2021. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=6774.

128. Feng Y, Ke C, Tang Q, Dong H, Zheng X, Lin W, et al. Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. Cell Death Dis. 2014;5(2):e1088.

129. Lee S, Lee S, Yang E, Kim E, Kim J, et al. Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the STAT3 signaling

pathway and regulation of the between Th17/Treg balance. PLoS One. 2015, 10(9): e0135858.

130. Deng XS, Wang S, Deng A, Liu B, Edgerton SM, Lind SE, Wahdan-Alaswad R, et al. Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers. Cell Cycle. 2012;11(2):367-76.

131. Li Q, Li C, Li H, Zeng L, Kang Z, Mao Y, et al. STK11 rs2075604 Polymorphism Is Associated with Metformin Efficacy in Chinese Type 2 Diabetes Mellitus. Int J Endocrinol. 2017;2017:1-6.

132. Shaw R, Lamia K, Vasquez D, Koo S, Bardeesy N, et al. The Kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science 2005, 310(5754): 1642–1646.

133. Yavari A, Stocker CJ, Ghaffari S, Wargent ET, Steeples V, Czibik G, et al. Chronic activation of γ2 AMPK induces obesity and reduces β cell function. Cell Metab. 2016, 23(5): 821–836.

134. Makishima A. Biochemistry for Materials Science [Libro electrónico]. USA: Elsevier; 2019. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/book/9780128170540/biochemistry-for-materials-science#book-description.

X. ANEXOS

X.I Consentimiento informado



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO

MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL "DOS DE MAYO"

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE HISOPADO BUCAL, PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DE INVESTIGACIÓN TITULADA: "FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO MET420DEL EN EL GEN SLC22A1 Y SU IMPLICANCIA EN EL TRATAMIENTO CON METFORMINA EN PACIENTES DIABETICOS DEL HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO ENTRE ENERO Y MARZO DEL 2019"

Usted es un paciente perteneciente al servicio de Endocrinologia del Hospital Nacional Dos de Mayo, el cual cumple con los criterios de inclusión descritos en el presente estudio.

Se desea realizar otros estudios más completos con una amplia gama de genes para determinar la relación entre variaciones en estos con la respuesta a fármacos (Farmacogenomica) en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2, con la finalidad de tener una mejor comprensión su influencia en el tratamiento de la enfermedad y permitir la optimización del mismo, por lo que la muestra donada será almacenada en el banco de muestras de ADN del laboratorio GENOBIDC de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante un año, para los fines antes mencionados.

Su participación es confidencial, las muestras pasan a ser codificadas luego de ser colectadas. Sus datos personales, así como la muestra donada, tendrán un código y no su nombre.

La donación de su muestra no implica compensación económica sobre los posibles resultados derivados de esta investigación, así como ud tampoco realizara ningún pago por el procedimiento

DECLARACION

Yo,_____,
identificado con DNI No._____ declaro que he sido informado(a) por el investigador acerca de mi participación en el estudio, he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias, estoy satisfecho (a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que mi muestra sea guardada en el banco de muestras de ADN del laboratorio GENOBIDC de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para ser utilizado en otros estudios genéticos relacionados a susceptibilidad a enfermedades y a la respuesta a fármacos (Farmacogenenomica) del tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2.

SI ☐
NO ☐

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO

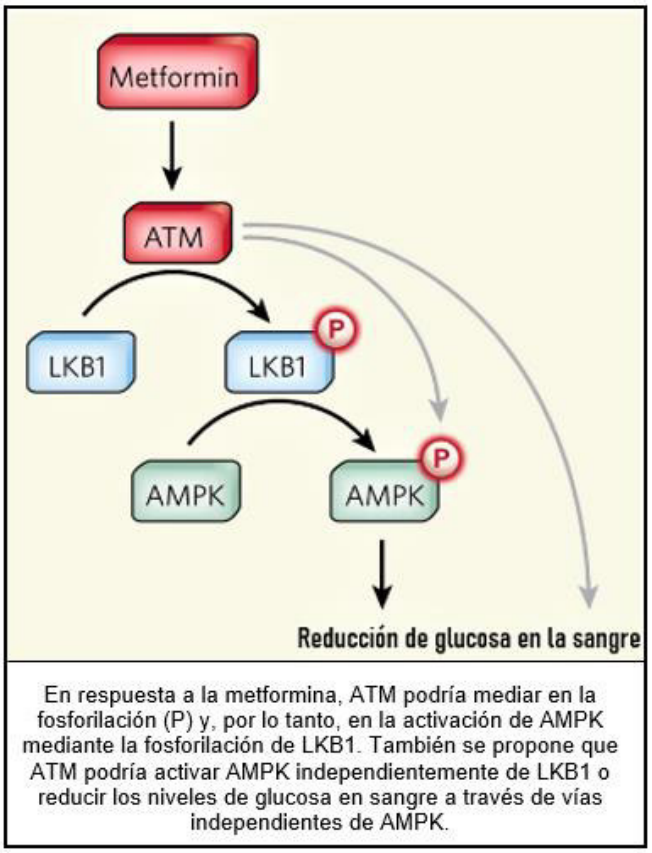
MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL "DOS DE MAYO"

X.II Lista de abreviaturas de aminoácidos

Lista de abreviaturas de aminoácidos			
A	Alanina	**M**	Metionina
C	Cisteína	**N**	Asparagina
D	Ácido aspártico	**P**	Prolina
E	Ácido glutámico	**Q**	Glutamina
F	Fenilalanina	**R**	Arginina
G	Glicina	**S**	Serina
H	Histidina	**T**	Treonina
I	Isoleucina	**V**	Valina
K	Lisina	**W**	Triptófano
L	Leucina	**Y**	Tirosina

Fuente: Makishima A[134].

X.III Posible mecanismo de la relación entre ATM y metformina



En respuesta a la metformina, ATM podría mediar en la fosforilación (P) y, por lo tanto, en la activación de AMPK mediante la fosforilación de LKB1. También se propone que ATM podría activar AMPK independientemente de LKB1 o reducir los niveles de glucosa en sangre a través de vías independientes de AMPK.

Fuente: Adaptado de Birnbaum MJ, *et al*[119].