

**Yang, Pablo**

## **El rol de marcadores genéticos en la personalización terapéutica de pacientes con diabetes mellitus tipo 2**

---

**Tesis para la obtención del título de posgrado de  
Doctor en Bioquímica**

Director: Soria, Néstor Walter.

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.





**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Químicas**



**EL ROL DE MARCADORES GENÉTICOS EN LA  
PERSONALIZACIÓN TERAPÉUTICA DE PACIENTES  
CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

**Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas  
de la Universidad Católica de Córdoba  
para obtener el título de DOCTOR en BIOQUÍMICA**

**Por:**

**YANG Pablo**

**Córdoba**

**2019**

## **Director de Tesis**

### **Dr. SORIA Néstor W.**

Unidad Asociada Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas y de la Salud (UA ÁREA CS. AGR. ING. BIO. Y S). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.

Cátedra de Biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.

## **Co-Director de Tesis**

### **Dr. BELTRAMO Dante M.**

Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba (CEPROCOR) - Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Prov. de Córdoba- Sede Santa María de Punilla, Córdoba.

Cátedra de Biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba.

## **Comisión de Tesis**

### **Dra. ANGARONI Celia**

Centro de Estudios de Metabolopatías Congénitas (CEMECO), Hospital de Niños de Córdoba

### **Dra. BIDINOST Carla**

Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Sanatorio Allende de Córdoba

### **Dra. PELLIZAS Claudia**

Dpto. Bioquímica Clínica. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba

### **Dr. FRECHTEL Gustavo Daniel**

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), Universidad de Buenos Aires



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi Director Dr. Néstor Soria, por haber confiado en mí desde que era un estudiante de grado, por su constante apoyo, por formarme, por su capacidad científica y humana, y por su infinita paciencia con que siempre me guió.

A mi Co-Director Dr. Dante Beltramo, por aceptar acompañarme y guiarme en este trabajo de tesis, por su humildad, su capacidad científica y humana, por estar siempre atento y preparado para darme una mano.

A los integrantes de la comisión asesora, Dra. Claudia Pellizas, Dra. Celia Angaroni, Dra. Carla Bidinost y Dr. Gustavo Frechtel por sus observaciones y consejos siempre constructivos, que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al Dr. José Luna Pinto, del Centro Privado de Ojos Romagosa - Fundación VER, quien me guió en el estudio de la retinopatía diabética. También no quiero olvidarme de los Med. Esp. Emilio Alcoba, Med. Esp. Cecilia Aylén Sein, Med. Esp. Ana Laura Gramajo, Med. Esp. Emilia Aucar, quienes reclutaban a los pacientes y les realizaron los estudios oftalmológicos necesarios, y sábado de por medio, se despertaban a las 8 de la mañana para abrirme el consultorio para que pueda tomar los datos de los pacientes.

A la Dra. Verónica Ojeda y a la Med. Esp. Cecilia Mejico, del Servicio de Diabetología del Hospital Nacional de Clínicas, quienes me abrieron las puertas de sus consultorios para que aprenda de la clínica de la Diabetes Mellitus y la nefropatía diabética, y permitieron el proceso de reclutamiento de pacientes para el estudio.

Al Dr. Gustavo Diserio, del Laboratorio Central del Hospital Nacional de Clínicas, quien nos permitió realizar las extracciones de los pacientes reclutados.

A la Bioq. Esp. Adriana Ruiz-Pecchio, de Laboratorio de Nefrología del Laboratorio Central del Hospital Nacional de Clínicas, quien siempre atenta y dispuesta a ayudar me enseñó sobre los aspectos bioquímicos de la enfermedad renal, y realizaba meticulosamente todo el proceso de extracción y toma de datos.

Al Dr. Gustavo Díaz, del Centro Médico “San Ricardo Pampurri”, quien nunca dudó en colaborar con nosotros para que este trabajo pudiera realizarse.

Al Dr. Cristian Galván, al Dr. Osvaldo Elbarcha y al Dr. Eduardo Fernández y a todos los bioquímicos y técnicos, del Laboratorio LACE, quienes me abrieron las puertas, y me permitieron realizar el trabajo de farmacogenética de la metformina.

Al Dr. Adrian Gabriel Torres, del Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), quien con su conocimiento en el área de la transcriptómica y sus brillantes ideas logramos realizar los estudios sobre el ARN de transferencia.

Al Dr. Hugo Lujan y al Dr. Pablo Gargantini, del Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades Infecciosas (CIDIE), quienes sin su contribución hubiese sido imposible realizar los experimentos de PCR en tiempo real.

A la Directora del Doctorado en Bioquímica, Dra. Sara Palacios, quien siempre me tuvo en cuenta y siempre estuvo presente cuando surgían problemas.

A la Universidad Católica de Córdoba y a la Facultad de Ciencias Químicas por haberme permitido crecer y desarrollarme como bioquímico y darme la oportunidad de realizar el trabajo de doctorado.

A todos los pacientes que participaron de este trabajo de investigación, que sin ellos este trabajo hubiese sido imposible de realizar.

Y finalmente, quiero agradecer a mis padres Esteban y Serena, a mi hermano Miguel, por la paciencia, por haber confiado en mí y todo el apoyo incondicional que me han brindado durante este viaje y en la vida, y que han sido fundamentales para poder llegar a esta instancia.

Tras haber llegado a este momento, vuelvo a reflexionar del esfuerzo que hicieron todos de una manera totalmente desinteresada para que pueda completar este trabajo de tesis doctoral. No hay palabras que puedan expresar este momento, pero para todas las personas que mencioné (y a los que no, también) solo puedo decirles “MUCHAS GRACIAS”.

# **ÍNDICE**

## **GENERAL**



## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>Índice General</b>	i
<b>Lista de Abreviaturas</b>	viii
<b>Lista de Figuras</b>	xi
<b>Lista de Tablas</b>	xii
<b>Resumen</b>	xiv
<b>Summary</b>	xvii
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 INTRODUCCIÓN	2
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	2
1.3 SALUD PÚBLICA	4
1.4 CLASIFICACIÓN	5
1.4.1 Diabetes Mellitus Tipo 1	6
1.4.2 Diabetes Gestacional	6
1.4.3 Otros tipos de Diabetes Mellitus	7
1.4.4 Diabetes Mellitus Tipo 2	9
1.5 CUADRO CLÍNICO	10
1.6 DIAGNÓSTICO	11
1.7 TRATAMIENTO DE LA DIABETES	11
1.7.1 Objetivo del tratamiento	13
1.7.2 Tratamiento no farmacológico	13
1.7.3 Tratamiento farmacológico con insulina	14
1.7.4 Tratamientos farmacológicos con agentes orales	15
1.7.4.1 Sulfonilureas	15
1.7.4.2 Meglitinidas	15
1.7.4.3 Agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)	16
1.7.4.4 Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)	16
1.7.4.5 Biguanidas	16
1.7.4.6 Tiazolidinedionas	17
1.7.4.7 Inhibidores de la $\alpha$ glucosidasa	18
1.7.4.8 Pramlintida	18
1.7.4.9 Resinas fijadoras de ácidos biliares	18
1.7.4.10 Fármacos basados en GLP-1	19
1.7.4.11 Agonistas de los receptores GLP-1	19
1.8 CONTROL CLÍNICO	19
1.9 COMPLICACIONES	20
1.9.1 Complicaciones Agudas	20
1.9.1.1 Hipoglucemia	20
1.9.1.2 Hiperglucemia severa	21
1.9.2 Complicaciones crónicas	22
1.10 GENÉTICA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2	23
1.10.1 Estudios de ligamiento	23
1.10.2 Estudios de genes candidatos	24
1.10.3 Estudios de asociación completa del genoma completo (GWAS)	24
1.11 GENÉTICA DE LAS COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS	25
1.11.1 Estudios de genes candidatos	26

1.11.2 Estudios GWAS	26
1.12 INSULINA	26
1.12.1 Traducción de la insulina	28
1.13 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	29
1.14 BIBLIOGRAFÍA	30
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
2. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	35
2.1 Objetivo General	35
2.2 Objetivos Específicos	35
<b>CAPÍTULO 3. FARMACOGENÉTICA DE LA METFORMINA</b>	<b>36</b>
3.1 RESUMEN	37
3.2 INTRODUCCIÓN A LA FARMACOGENÉTICA	39
3.2.1 Beneficios de la información aportada por la farmacogenética	40
3.3 APLICACIÓN DE LA FARMACOGENÉTICA	41
3.4 FARMACOGENÉTICA Y DM2	41
3.5 METFORMINA	42
3.5.1 Tratamiento y Dosificación	42
3.5.2 Farmacocinética	42
3.5.3 Distribución, metabolismo y eliminación	43
3.5.4 Mecanismos de acción	43
3.6 FARMACOGENÉTICA DE LA METFORMINA	44
3.6.1 Transportador de Cationes Orgánicos (OCT1)	44
3.7 OBJETIVO ESPECÍFICO	48
3.8 MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.8.1 Tipo de estudio	48
3.8.2 Pacientes	48
3.8.3.1 Criterios de inclusión	49
3.8.3.2 Criterios de exclusión	49
3.8.4 Muestras biológicas	49
3.8.5 Procedimientos	50
3.8.5.1 Formulario de preguntas	50
3.8.5.2 Procesamiento de Muestras	50
3.8.5.2.1 Parámetros bioquímicos	50
3.8.5.2.1.1 Hemoglobina Glicosilada (HbA1c): Inmunoturbidimetria	50
3.8.5.2.1.2 Glucosa: método colorimétrico enzimático según Trinder	51
3.8.5.2.1.3 Estudios de perfil hepático	51
3.8.5.2.1.3.1 Aspartato Amino Transferasa (AST): método cinético UV según la Federation International de Química Clínica (IFCC)	51
3.8.5.2.1.3.2 Alanino Amino Transferasa (ALT): método cinético UV según IFCC	52
3.8.5.2.1.4 Estudios de perfil lipídico	53
3.8.5.2.1.4.1 Colesterol Total: método colorimétrico enzimático según Trinder	53
3.8.5.2.1.4.2 Triglicéridos: método colorimétrico enzimático según Trinder	53
3.8.5.2.1.4.3 Colesterol-HDL: método colorimétrico homogéneo	54
3.8.5.2.1.4.4 Colesterol-LDL: método colorimétrico homogéneo	54
3.8.5.2.1.5 Estudios de función renal	55
3.8.5.2.1.5.1 Clearance de Creatinina	55
3.8.5.2.2 Índice de Masa Corporal (IMC)	55

3.8.5.2.3 Extracción de ADN	56
3.8.5.2.4 Amplificación del gen SLC22A1 mediante PCR	56
3.8.5.2.5 Digestión Enzimática de los productos de PCR amplificados	58
3.8.5.2.6 Electroforesis en gel de agarosa	59
3.8.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
3.9 RESULTADOS	60
3.10 DISCUSIÓN	65
3.11 BIBLIOGRAFÍA	68
<b>CAPÍTULO 4. RETINOPATÍA DIABÉTICA (RD)</b>	<b>72</b>
4.1 RESUMEN	73
4.2 COMPLICACIONES OFTALMOLÓGICAS	75
4.3 RETINOPATÍA DIABÉTICA	76
4.3.1 Retinopatía Diabética No Proliferativa (RDNP)	78
4.3.2 Retinopatía Diabética Preproliferativa (RDPP)	78
4.3.3 Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP)	79
4.3.4 Edema Macular Diabético (EMD)	80
4.4 FISIOPATOLOGÍA	80
4.5 EXAMEN OFTALMOLÓGICO	81
4.5.1 Agudeza visual	82
4.5.2 Fondo de ojo con pupila dilatada	83
4.5.3 Tonometría	84
4.5.4 Rejilla de Amsler	84
4.5.5 Angiografía con fluoresceína	85
4.5.6 Tomografía de Coherencia Óptica (OCT)	85
4.6 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	86
4.6.1 Tratamientos anti-Vascular Endothelial Growth Factor	86
4.6.2 Fotocoagulación laser	86
4.6.3 Vitrectomía	88
4.7 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE RETINOPATÍA DIABÉTICA	88
4.8 GENÉTICA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	89
4.9 GENES CANDIDATOS	90
4.9.1 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	91
4.9.2 Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)	93
4.9.3 Enzima convertidora de angiotensina (ECA)	93
4.9.4 Metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	94
4.9.5 Factor de Transcripción 7 – Tipo2 (TCF7L2)	96
4.9.6 Proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKAL1)	97
4.10 OBJETIVO ESPECÍFICO	99
4.11 MATERIALES Y MÉTODOS	99
4.11.1 Tipo de estudio	99
4.11.2 Pacientes	99
4.11.3.1 Criterios de inclusión	100
4.11.3.2 Criterios de exclusión	100
4.11.4 Muestras biológicas	100
4.11.5 Procedimientos	101
4.11.5.1 Evaluación oftalmológica	101

4.11.5.2	Formulario de preguntas	102
4.11.5.3	Procesamiento de Muestras	102
4.11.5.3.1	Parámetros bioquímicos	102
4.11.5.3.2	Extracción de ADN	103
4.11.5.3.3	Amplificación de los genes seleccionados para el estudio mediante PCR	103
4.11.5.3.4	Digestión Enzimática de los productos de PCR amplificados	105
4.11.5.3.5	Electroforesis en gel de agarosa	106
4.11.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	106
4.12	RESULTADOS	108
4.13	DISCUSIÓN	121
4.14	BIBLIOGRAFÍA	125
<b>CAPÍTULO 5. NEFROPATÍA DIABÉTICA (ND)</b>		<b>133</b>
5.1	RESUMEN	134
5.2	NEFROPATÍA DIABÉTICA	135
5.2.1	Clasificación de la Nefropatía Diabética	136
5.3	ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	137
5.4	FISIOPATOLOGÍA	139
5.5	EVALUACIÓN DE LA ND	141
5.6	FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA	143
5.6.1	Hiperglucemia	143
5.6.2	Hipertensión	143
5.6.3	Tabaquismo	144
5.7	PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO	144
5.8	GENÉTICA	147
5.9	GENES CANDIDATOS	148
5.9.1	Transportador facilitado por glucosa de la familia 2 de transportadores de solutos (SLC2A1)	149
5.9.2	Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)	149
5.9.3	Enzima convertidora de angiotensina (ECA)	150
5.9.4	Proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKAL1)	151
5.10	OBJETIVO ESPECÍFICO	153
5.11	MATERIALES Y MÉTODOS	153
5.11.1	Tipo de estudio	153
5.11.2	Pacientes	153
5.11.3.1	Criterios de inclusión	154
5.11.3.2	Criterios de exclusión	154
5.11.4	Muestras biológicas	154
5.11.5	Procedimientos	155
5.11.5.1	Formulario de preguntas	155
5.11.5.2	Procesamiento de Muestras	155
5.11.5.2.1	Parámetros bioquímicos	155
5.11.5.2.1.1	Microalbuminuria (MAU): Inmunoturbidimetría	156
5.11.5.2.1.2	Estimación del filtrado glomerular mediante la fórmula CKD-EPI	156
5.11.5.2.2	Extracción de ADN	156
5.11.5.2.3	Amplificación de los genes seleccionados para el estudio mediante	157

PCR	
5.11.5.2.4 Digestión Enzimática de los productos de PCR amplificados	158
5.11.5.2.5 Electroforesis en gel de agarosa	159
5.11.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	159
5.12 RESULTADOS	160
5.13 DISCUSIÓN	169
5.14 BIBLIOGRAFÍA	172
<b>CAPÍTULO 6. FACTORES ASOCIADOS A LA TRADUCCIÓN DE LA INSULINA</b>	<b>177</b>
6.1 RESUMEN	178
6.2 DIABETES MELLITUS E INSULINA	180
6.3 PÁNCREAS E INSULINA	180
6.4 BIOSÍNTESIS DE LA INSULINA	181
6.5 CLIVAJE DE LA INSULINA	182
6.6 MECANISMO DE TRADUCCIÓN	183
6.7 ARN DE TRANSFERENCIA (ARNt)	184
6.8 ARNt LISINA (ARNt-Lys)	184
6.9 VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS (VNC) DEL ARNt Lys(CUU) Cr11	185
6.10 GEN DE LA PROTEÍNA SIMILAR A LA PROTEÍNA REGULADORA ASOCIADA A LA SUBUNIDAD 1 DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA 5 (CDKAL1)	186
6.11 OBJETIVO ESPECÍFICO	188
6.12 MATERIALES Y MÉTODOS	188
6.12.1 Tipo de estudio	188
6.12.3 IDENTIFICACIÓN DE LA DELECIÓN PRESENTE DEL ARNt Lys(CUU) Cr11	188
6.12.3.1 Pacientes	188
6.12.3.2.1 Criterios de inclusión	189
6.12.3.2.2 Criterios de exclusión	189
6.12.3.3 Muestras biológicas	189
6.12.3.4 Procedimientos	190
6.12.3.4.1 Formulario de preguntas	190
6.12.3.4.2 Procesamiento de Muestras	190
6.12.3.4.2.1 Parámetros bioquímicos	190
6.12.3.4.2.2 Extracción de ADN	191
6.12.3.4.2.3 Técnicas para la amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11	191
6.12.3.4.2.4 Amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 mediante Duplex PCR semicuantitativa	191
6.12.3.4.2.5 Electroforesis en gel de agarosa	192
6.12.3.4.2.6 Amplificación y cuantificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 mediante Real Time PCR	193
6.12.3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	193
6.12.4 CUANTIFICACIÓN DE LA MODIFICACIÓN ms2 EN LA POSICIÓN 37 DEL ARNt Lys(UUU) Y EXPRESIÓN DEL ARNm DE CDKAL1 EN LEUCOCITOS HUMANOS	194
6.12.4.1 Pacientes	194
6.12.4.2.1 Criterios de inclusión	194

6.12.4.2.2 Criterios de exclusión	195
6.12.4.3 Muestras	195
6.12.4.4 Procedimientos	195
6.12.4.4.1 Procesamiento de Muestras	195
6.12.4.4.1.1 Purificación de Leucocitos	195
6.12.4.4.1.2 Extracción del ARN total	196
6.12.4.4.1.3 Determinación de la Concentración y Pureza del ARN	198
6.12.4.4.1.4 Tratamiento con ADNasa	198
6.12.4.4.1.5 Obtención del ADN copia mediante Retrotranscripción	199
6.12.4.4.1.6 Cuantificación de la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys(UUU) mediante Real Time PCR	200
6.12.4.4.1.7 Cuantificación de la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos humanos mediante Real Time PCR	202
6.12.4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	203
6.13 RESULTADOS	204
6.13.1 Identificación de la delección presente del ARNt Lys(CUU) Cr11	204
6.13.2 Cuantificación de la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys(UUU)	209
6.13.3 Cuantificación de la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos humanos	210
6.14 DISCUSIÓN	213
6.15 BIBLIOGRAFÍA	216
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES</b>	218
7.1 CONCLUSIONES	219
7.2 TRABAJOS PRESENTADOS	221
7.2.1 Artículos publicados en revistas especializadas	221
7.2.2 Comunicaciones orales	222
7.2.3 Pósters	222

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA: Asociación Americana de Diabetes

AGEs: Productos finales de glicación

ALT: Alanina aminotransferasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AST: Aspartato aminotransferasa

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico

CDKAL1: Proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5

dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database

DCCT: Diabetes Control and Complications Trial

DM: Diabetes Mellitus

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMD: Edema Macular Diabético

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ERC: Enfermedad Renal Crónica

ERT: Enfermedad Renal Terminal

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study

GOT: Glutamato-oxalacetato transaminasa

GPT: Glutamato-piruvato transaminasa

GWAS: Genome-wide association study

HbA1c: Hemoglobina Glicosilada

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HTA: Hipertensión arterial

I/D: Inserción / Delección

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IFG: Índice de Filtrado Glomerular

IFGe: Índice de Filtrado Glomerular Estimado

IMC: Índice de Masa Corporal

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

MTHFR: Metilen tetrahidrofolato reductasa

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ND: Nefropatía Diabética

NHGRI: National Human Genome Research Institute

OCT1: Proteína transportadora de cationes orgánicos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RAS: Sistema renina-angiotensina

RD: Retinopatía Diabética



RDNP: Retinopatía Diabética No Proliferativa

RDPP: Retinopatía Diabética Preproliferativa

RDP: Retinopatía Diabética Proliferativa

SLC22A1: Transportador de solutos tipo 1 de la familia 22

SLC2A1: Transportador facilitado por glucosa de la familia 2 de transportadores de solutos.

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido

TCF7L2: Factor de transcripción 7 – tipo2

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

TRR: Terapia de Reemplazo Renal

UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VNC: Variación en el número de copias

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Algoritmo para el tratamiento de la DM2	12
Figura 2. Localización y rol funcional de los OCT en la farmacogenética de la Metformina (Traducido)	45
Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa al 2,5% P/V de los productos de PCR para cada polimorfismo digeridos con la enzima de restricción correspondiente (Estudio farmacogenética de la metformina).	62
Figura 4. Diagrama de retinas con Retinopatía Diabética No Proliferativa y Retinopatía Diabética Proliferativa	76
Figura 5. Gráfica de Snellen para la prueba de agudeza visual	83
Figura 6. Rejilla de Amsler	84
Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa al 2,5% P/V de los productos de PCR para cada polimorfismo digeridos con la enzima de restricción, según correspondía (Estudio Retinopatía Diabética).	110
Figura 8. Alteraciones morfológicas y funcionales en el glomérulo renal entre un sujeto diabético y un sujeto sano (Traducido)	135
Figura 9. Algoritmo para el estudio de la nefropatía en la persona con diabetes	142
Figura 10. Electroforesis en geles de agarosa al 2,5% P/V de los productos de PCR para cada polimorfismo digeridos con la enzima de restricción, según correspondía (Estudio Nefropatía Diabética)	162
Figura 11. Estructura de la proinsulina humana (Traducido)	182
Figura 12. Estructura molecular de ARNt Lys(UUU) y ms2t6A (Traducido)	186
Figura 13. Esquema del proceso de traducción del codón AAG y la participación del ARNt Lys(UUU). Influencia de la modificación generada por el gen CDKAL1 en células beta pancreáticas (Traducido)	187
Figura 14. Descripción del método empleado para detectar la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys(UUU) (Traducido)	201
Figura 15. Amplificación de los genes Chr-11 ARNt Lys(CUU) y Chr-16 ARNt Lys(UUU) mediante Duplex PCR semicuantitativa y Real Time PCR	206
Figura 16. Muestras de ADNc analizadas de la cuantificación de la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys(UUU).	209
Figura 17. Cuantificación de la expresión del ARNm del CDKAL1 en leucocitos humanos	211

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla I. Secuencia de primers y tamaños de amplificación de los polimorfismos estudiados en el gen SLC22A1	57
Tabla II. Endonucleasas de restricción, reactivos y condiciones utilizadas y tamaños de los fragmentos de restricción esperados de los polimorfismos estudiados en el gen SLC22A1	58
Tabla III. Parámetros bioquímicos analizados en la población de estudio (Estudio farmacogenética de la metformina)	61
Tabla IV. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos en el gen SLC22A1	62
Tabla V. Relación entre los niveles de HbA1c y presencia de los polimorfismos en el gen SLC22A1	63
Tabla VI. Relación entre los niveles de glucemias y presencia de los polimorfismos en el gen SLC22A1	64
Tabla VII. Secuencia de primers y tamaños de amplificación de los polimorfismos estudiados (Estudio Retinopatía Diabética)	104
Tabla VIII. Endonucleasas de restricción, reactivos y condiciones utilizadas y tamaños de los fragmentos de restricción esperados de los polimorfismos estudiados (Estudio Retinopatía Diabética)	105
Tabla IX. Parámetros clínicos, bioquímicos y estilos de vida en la población estudiada (Estudio Retinopatía Diabética)	109
Tabla X. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos estudiados (Estudio Retinopatía Diabética)	111
Tabla XI. Asociación del SNP rs699947 presente en el gen VEGF con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa	112
Tabla XII. Asociación del SNP rs35569394 presente en el gen VEGF con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa	113
Tabla XIII. Asociación del SNP rs1801133 presente en el gen MTHFR con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa	114
Tabla XIV. Asociación del SNP rs4646994 presente en el gen ECA con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa	115
Tabla XV. Asociación del SNP rs7903146 presente en el gen TCF7L2 con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa	116
Tabla XVI. Asociación del SNP c.-553T>A presente en el gen bFGF con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa	117
Tabla XVII. Asociación del SNP rs4712527 presente en el gen CDKAL1 con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa	118
Tabla XVIII. Asociación del SNP rs4712527 presente en el gen CDKAL1 con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa ajustado con parámetros clínicos y bioquímicos	119
Tabla XIX. Pronóstico para la enfermedad renal crónica de acuerdo al filtrado glomerular estimado y albuminuria	138
Tabla XX. Secuencia de primers y tamaños de amplificación de los polimorfismos estudiados (Estudio Nefropatía Diabética)	157
Tabla XXI. Endonucleasas de restricción, reactivos y condiciones utilizadas y tamaños de los fragmentos de restricción esperados de los polimorfismos estudiados (Estudio Nefropatía Diabética)	158
Tabla XXII. Parámetros clínicos, bioquímicos y estilos de vida en la población	161

estudiada (Estudio Nefropatía Diabética)	
Tabla XXIII. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos estudiados (Estudio Nefropatía Diabética)	163
Tabla XXIV. Asociación del SNP rs841853 presente en el gen SLC2A1 con la presencia de Nefropatía Diabética	164
Tabla XXV. Asociación del SNP rs1799983 presente en el gen eNOS con la presencia de Nefropatía Diabética	165
Tabla XXVI. Asociación del SNP rs4646994 presente en el gen ECA con la presencia de Nefropatía Diabética	166
Tabla XXVII. Asociación del SNP rs7756992 presente en el gen CDKAL1 con la presencia de Nefropatía Diabética	167
Tabla XXVIII. Secuencia de primers y tamaños de amplificación obtenidos por PCR (Estudio VNC ARNt Lys(CUU) Cr11)	192
Tabla XXIX. Secuencia de primers (Estudio de la modificación m2 en la posición 37 del ARNt Lys(UUU))	201
Tabla XXX. Secuencia de primers (Estudio cuantificación del ARNm de CDKAL1 en leucocitos humanos)	203
Tabla XXXI. Parámetros clínicos, bioquímicos y estilos de vida en la población estudiada (cuantificación de la presencia de ARNt Lys (CUU) Cr 11).	205
Tabla XXXII. Distribución genotípica del locus ARNt Lys(CUU) Cr 11 en la población analizada	207
Tabla XXXIII. Asociación del genotipo del gen ARNt Lys(CUU) Cr11 con la presencia de DM2	208
Tabla XXXIV. Asociación entre la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys(UUU) (expresada mediante la relación R1/R2) en leucocitos y la presencia de DM2	210
Tabla XXXV. Asociación entre la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos y la presencia de DM2	212

## RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM), es un trastorno metabólico caracterizado principalmente por hiperglucemia de manera persistente, pudiendo ser causada por un defecto en la síntesis de insulina o por resistencia a la acción de la misma, pero también es acompañada por alteraciones en el metabolismo de lípidos, proteínas, sales minerales y electrolitos. Según la Federación Internacional de Diabetes se estima que en el año 2017 el número de afectados fue de aproximadamente 425 millones de pacientes

Dentro de la clasificación de la DM, la tipo 2 (DM2) se caracteriza por insulino-resistencia y deficiencia relativa de insulina. Afecta a un grupo heterogéneo de pacientes, por lo general son adultos mayores de 40 años de edad y con algún grado de obesidad. La DM2 es más frecuente que la de Tipo 1 (DM1) y representa alrededor del 90% de todos los casos de DM.

El tratamiento de la DM2 comienza con cambios en los estilos de vida. Cuando estas medidas no son suficientes, se añade el tratamiento farmacológico, siendo la Metformina uno de los agentes orales más empleados. La metformina es transportada al interior de los hepatocitos por el transportador codificado por el gen SLC22A1.

Durante la evolución de la enfermedad, la aparición de complicaciones es posible, especialmente en aquellos pacientes con mal control glucémico. Dentro de las mismas, se encuentra la Retinopatía Diabética (RD), que se define por la presencia de lesiones retinianas microvasculares.

Otra de las complicaciones es la Nefropatía Diabética (ND), caracterizada por la disminución progresiva de la función de nefronas causadas por el daño que genera la hiperglucemia crónica y otros factores como la hipertensión y la dislipemia.

El estudio de variaciones genéticas en pacientes con DM2, pretende asociar si la presencia de las mismas están o no asociadas a la efectividad del tratamiento farmacológico o a un mayor riesgo a desarrollar complicaciones.

Desde un punto de vista estructural, la insulina es un polipéptido producido y secretado por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. La misma, contiene 51 aminoácidos dispuestos en dos cadenas (una  $\alpha$  y una  $\beta$ ) unidas por puentes disulfuro. La proinsulina, un precursor de la insulina, es hidrolizada dentro de los gránulos de almacenamiento para formar insulina y un péptido residual, el péptido C. Problemas en el mecanismo de traducción de la proinsulina podrían estar asociados a la predisposición de desarrollar DM2.

Una diferencia entre individuos sanos y diabéticos podría deberse a una síntesis anormal de la insulina, posiblemente debido a alteraciones cuantitativas y cualitativas en los ARN de transferencia (ARNt). Por lo mencionado, una deleción en un locus que contiene al ARNt Lys (CUU) podría estar asociado al desarrollo de DM2.

El gen CDKAL1 codifica a una enzima que modifica al ARNt Lys (UUU), cuya función es estabilizar la interacción con el codón AAG. Alteraciones en este mecanismo podrían llevar a síntesis anormal de insulina. Por esta razón, se realizó la cuantificación de la modificación ms2 del ARNt Lys (UUU) y la cuantificación del ARNm de CDKAL1, en pacientes con DM2 y en sujetos sanos.

Este trabajo se gestó como un estudio integral de la DM2, por medio de tres sub-estudios integrales complementarios: 1) evaluación de la respuesta al tratamiento farmacológico con metformina según la presencia de polimorfismos en el gen SLC22A1 (rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495 y rs34059508), 2) estudio y valoración de las complicaciones oftalmológicas y renales en pacientes con DM2 de acuerdo a la presencia de polimorfismos en los genes MTHFR (rs1801133), VEGF (rs699947 y rs35569394), bFGF (c.-553T>A), TCF7L2 (rs7903146), ECA (rs4646994), CDKAL1 (rs4712527 y rs7756992), eNOS (rs1799983) y SLC2A1 (rs841853), y 3) estudio de factores asociados a la traducción de la insulina. Todo en su conjunto, podría contribuir a una mejor atención médica de estos pacientes mediante una terapia personalizada. En el trabajo participaron sujetos sanos y pacientes con DM2 reclutados en diversos centros asistenciales:

Para el estudio farmacogenético: 103 pacientes con DM2 que asistieron al Laboratorio LACE S.A.

Para el estudio de complicaciones oftalmológicas 231 pacientes con DM2 asistidos en la Clínica de Ojos Romagosa.

Para el estudio de complicaciones renales: 88 pacientes con DM2 asistidos en el Hospital Nacional de Clínicas.

Para el estudio de identificación de la delección en del gen ARNt Lys (CUU) Cr 11: 199 individuos provenientes de la Clínica de Ojos Romagosa, del Hospital Nacional de Clínicas y del Centro Médico Privado “San Ricardo Pampurri”.

Para el estudio de la modificación ms2 ARNt Lys (UUU) y la cuantificación de la expresión del ARNm CDKAL1: 67 individuos provenientes del Hospital Nacional de Clínicas y del Centro Médico Privado “San Ricardo Pampurri”.

Se utilizaron diversas técnicas de biología molecular para analizar diferentes: a) polimorfismos en los genes mencionados; b) delección en el gen ARNt Lys (CUU) Cr 11; c) modificación ms2 en el ARNt Lys (UUU) y d) expresión del ARNm de CDKAL1. Como conclusión general del trabajo podemos decir que:

La presencia de las variantes rs35191146 y rs34059508 en el gen SLC22A1 confieren menor capacidad de transporte para la metformina al interior del hepatocito lo cual podría explicar los niveles más elevados de HbA1c encontrados en pacientes con DM2 tratados con metformina.

Un menor riesgo a desarrollar RD proliferativa en pacientes con DM2 podría ser explicado debido a la presencia del alelo G del rs4712527 del gen CDKAL1.

De acuerdo a las variantes genéticas analizadas en el estudio de complicaciones renales, ninguna pudo ser asociada con el riesgo a desarrollar ND.

Con respecto a las posibles alteraciones en la traducción de la insulina, la presencia de la delección del gen ARNt Lys (CUU) Cr 11 y la cantidad de la modificación ms2 en el ARNt Lys (UUU) no mostraron estar asociadas con el desarrollo de la DM2.

Con relación a la expresión del ARNm de CDKAL1, podemos decir que se observaron mayores niveles de expresión de este ARNm en los pacientes con DM2 respecto de los sujetos sanos, lo cual podría estar relacionado con mecanismos compensatorios a nivel de la traducción del ARN.

Palabras claves: Diabetes Mellitus Tipo 2, polimorfismos, farmacogenética, complicaciones, traducción de la insulina.

## SUMMARY

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder mainly characterized by persistent hyperglycemia, which may be caused by a defect in the insulin synthesis or by insulin resistance; it is also accompanied by alterations in the metabolism of lipids, proteins, mineral salts and electrolytes. According to the International Diabetes Federation it is estimated that in 2017 the number of diabetic patients was approximately 425 million peoples.

Within the classification of DM, Type 2 DM (DM2) is characterized by insulin resistance and relative insulin deficiency. DM2 affects a heterogeneous group of patients; usually they are adults over 40 years old and with some degree of obesity. DM2 is more frequent than Type 1 DM (DM1) and represents about 90% of all cases of DM.

The treatment of DM2 starts with improving his lifestyle. When these measures are not enough, pharmacological treatment is added, with Metformin being one of the most used oral agents. Metformin is transported into the hepatocytes by a transporter encoded by the SLC22A1 gene.

During the evolution of the disease, the appearance of complications is possible, especially in those patients with poor glycemic control. Within these, Diabetic Retinopathy (DR) is found which is defined by the presence of microvascular retinal lesions.

Another complication is Diabetic Nephropathy (DN), characterized by a progressive function decrease of nephrons caused by the damage generated by chronic hyperglycemia and other factors such as hypertension and dyslipidemia.

The study of genetic variations in patients with DM2, aims to identify if the presence of certain variants in the genome of patients may be associated with the result of pharmacological treatment or a greater risk of complications development.

From a structural point of view, insulin is a polypeptide produced and secreted by the  $\beta$  cells of the islets of Langerhans of the pancreas. It contains 51 amino acids arranged in two chains ( $\alpha$  chain and  $\beta$  chain) joined by disulfide bridges. Proinsulin, a



precursor of insulin, is hydrolyzed within the storage granules to form insulin and a residual peptide, C-peptide. Problems in the translation mechanism of proinsulin could be associated with the predisposition to develop DM2.

A possible cause of the differences between healthy individuals and diabetics could be due to an abnormal synthesis of insulin, possibly due to quantitative and qualitative alterations in the transfer RNAs (tRNA). Based on the above, the deletion in tRNA Lys (CUU) could be associated with the predisposition to the development of DM2.

The CDKAL1 gene encodes an enzyme that modifies the tRNA Lys (UUU), whose function is to stabilize the interaction with the AAG codon. Alterations in this mechanism could lead to the abnormal synthesis of insulin. For this reason, the quantification of the ms2 modification of tRNA Lys (UUU) and the quantification of CDKAL1 mRNA was performed in patients with DM2 and in healthy subjects.

This work was conceived as a comprehensive study of DM2, through three complementary comprehensive sub-studies: 1) evaluation of the response to pharmacological treatment according to the presence of certain polymorphisms in the SLC22A1 gene (rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495 and rs34059508), 2) study and assessment of ophthalmological and renal complications in patients with DM2 according to the presence of polymorphisms in the MTHFR (rs1801133), VEGF (rs699947 and rs35569394), bFGF (c.-553T>A), TCF7L2 (rs7903146), ACE (rs4646994), CDKAL1 (rs4712527 and rs7756992), eNOS (rs1799983) and SLC2A1 (rs841853) genes, and 3) study of factors associated with the translation of insulin. All of them, could contribute to better medical care for these patients through personalized therapy. Healthy subjects and individuals with DM2 from different healthcare centers participated in this study:

For the pharmacogenetics of metformin study: 103 patients with DM2 who attended Laboratorio LACE S.A.

For the ophthalmological complications study: 231 patients with DM2 who attended Clínica de Ojos Romagosa.

For the renal complications study: 88 patients with DM2 who attended Hospital Nacional de Clínicas.

For the study of tRNA Lys (CUU) Chr11 gene deletion: 199 individuals who attended Clínica de Ojos Romagosa, Hospital Nacional de Clínicas and a Private Medical Center "San Ricardo Pampurri".

For the study of the ms2 modification of tRNA Lys (UUU) and quantification of the expression of CDKAL1 mRNA: 67 individuals who attended the Hospital Nacional de Clínicas and Private Medical Center "San Ricardo Pampurri".

Various molecular biology techniques were used to analyze different: a) polymorphisms in the mentioned genes; b) deletion in the tRNA Lys (CUU) Chr11 gene; c) ms2 modification of tRNA Lys (UUU) and d) expression of the mRNA of CDKAL1. As general conclusion of this work we can say that:

The presence of the variants rs35191146 and rs34059508 in the SLC22A1 gene confer lower transport capacity for metformin inside the hepatocyte, which could explain the higher levels of HbA1c found in patients with DM2 treated with metformin.

A lower risk of developing Proliferative DR in patients with DM2 could be explained due to the presence of the G allele of rs4712527 present in the CDKAL1 gene.

According to the genetic variants analyzed in the study of renal complications, none could be associated with the risk of developing DN.

With respect to possible alterations in the translation of insulin, the presence of the deletion of the tRNA Lys (CUU) Chr11 gene and the amount of the modification ms2 at position 37 of the tRNA Lys (UUU) did not show association with the development of DM2.

With regard to the expression of CDKAL1 mRNA, we can say that higher levels of expression of this mRNA were observed in patients with DM2 compared to healthy subjects, which could be related to compensatory mechanisms at the level of RNA translation.

Key words: Type 2 Diabetes Mellitus, polymorphisms, pharmacogenetics, complications, insulin translation.

# **CAPÍTULO 1**

# **INTRODUCCIÓN**

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM), es un trastorno metabólico caracterizado principalmente por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia) de manera persistente, pudiendo ser causado por un defecto en la síntesis de insulina o por resistencia a la acción de la misma en la utilización de la glucosa, pero también es acompañada por alteraciones en el metabolismo de lípidos, proteínas, sales minerales y electrolitos.(1)

La palabra “Diabetes” proviene del griego διαβήτης [Diabétes], cuyo significado es “sifón” y hacía alusión a la enfermedad que se caracterizaba por la eliminación de grandes cantidades de orina (poliuria). La palabra “Mellitus”, del latín mel (“miel”), fue agregada por Thomas Willis en 1675 por el sabor dulce que tenía la orina de los pacientes diabéticos; y así diferenciarla de la diabetes insípida (del latín insipidus (“sin sabor”)), la cual también se encontraba asociada a poliuria. (1)

Sintomáticamente, la DM se caracteriza por la emisión excesiva de orina (poliuria), aumento del apetito (polifagia), sed abundante (polidipsia) y pérdida de peso. En la evolución natural de la patología pueden presentarse distintas complicaciones características en distintos órganos como pueden ser ojos, riñones, vasos sanguíneos, sistema nervioso central y periférico. (1,2)

El control glucémico del paciente es el objetivo principal en el tratamiento de la DM, mantener valores de glucemia “normales” o cercanos a la normalidad durante el día es el primer paso para minimizar la evolución de la patología y las complicaciones que la acompañan (Valores Normales: 70-100 mg%)(3). Para ello, el tratamiento se basa en tres pilares: dieta, ejercicio y medicamentos (ya sea insulina u otros agentes orales/inyectables). (1,2)

## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La DM es una patología presente a nivel mundial, y no diferencia edad, sexo o estrato social. Tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS), como también la

Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) la consideran una epidemia mundial relacionada con distintos aspectos presentes en la actualidad: el aumento del sobrepeso, la obesidad y el sedentarismo, sumado además al crecimiento y envejecimiento de la población a nivel global. (4)

Según el último informe de la IDF se estima que en el año 2017 el número de pacientes diabéticos fue de aproximadamente 425 millones de personas, de los cuales casi un 50% desconocían de su condición, y se espera que este valor llegue a los 629 millones de pacientes en el año 2045, significando esto un aumento del 48% de pacientes.(5)

En la región de América Central y del Sur, el número de pacientes diabéticos fue de 26 millones de personas en el año 2017 y se prevé un aumento del 62% para el año 2045, cifra que rondaría los 42 millones de pacientes diabéticos. En el 2017, el país con mayor población adulta diabética de la región fue Brasil con 14 millones, seguido por Colombia y Argentina.(5)

En la III Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (III ENFR), estudio realizado en el año 2013 y publicado en el año 2015, se informó que la prevalencia de la DM en la población argentina fue del 9,8% (4), lo cual se traduce en más de 2,7 millones de personas con la patología de acuerdo al censo realizado en el año 2011, de las cuales una gran parte desconoce de su condición.(4,6)

Además, estas cifras van acompañadas de una alta prevalencia de sobrepeso u obesidad en la población, tanto joven como en adultos mayores a 18 años, siendo esto un factor de riesgo asociado a Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2). (7)

Según lo relevado por la Encuesta Mundial de Salud Escolar (EMSE) en el año 2012, la prevalencia de sobrepeso en una población argentina de estudiantes de 13 a 15 años fue del 28,6% (35,9% varones y 21,8% mujeres), mientras que la prevalencia de obesidad fue de 5,9% (8,3% en varones y 3,6% en mujeres).(7)

Con relación a la población mayor a 18 años, los datos de la III ENFR, la prevalencia de exceso de peso fue de 57,9% (66,2% en varones y 50,1% en mujeres) cuyo valor aumentó con respecto al año 2009 (53,5%) y la prevalencia de obesidad fue del 20,8% (22,9% en varones y 18,8% en mujeres).(7)

La DM constituye el tercer factor de riesgo en importancia como causa de muerte a nivel global y el octavo en relación con la pérdida de años de vida ajustados por discapacidad (5). Se estima que en 2017 la diabetes le costó la vida a más de 270.000 diabéticos, mayores de 18 años, en la región de América Central y del Sur; y en Argentina serían cerca de 20.000 diabéticos mayores a 18 años los que fallecieron.(4,5)

Las complicaciones microvasculares afectan a los vasos sanguíneos pequeños, generando problemas a nivel ocular (retinopatía), renal (nefropatía) y de nervios (neuropatía)(2). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Retinopatía Diabética (RD) causa el 7% de los casos de ceguera en nuestra región, y la Nefropatía Diabética (ND) es la principal causa de diálisis siendo responsable del 34,7% de los casos.(4)

La complicación macrovascular, constituye la principal causa de mortalidad en los pacientes diabéticos por la afección de grandes vasos debido a procesos ateroscleróticos (1). En el estudio INTERHEART realizado entre 1999 y 2003, cuyo objetivo fue determinar la asociación entre distintos factores de riesgo y el infarto agudo de miocardio, se evaluaron más de 29.000 individuos de 52 países; el cual atribuyó a la diabetes el 12,9% de los infartos de miocardio ocurridos en Latinoamérica.(4,8)

En el estudio INTERSTROKE, realizado entre 2007 y 2015, tuvo como objetivo cuantificar la importancia de factores de riesgo potencialmente modificables para prevenir los accidentes cerebrovasculares. En este estudio participaron más de 26.000 pacientes, provenientes de 32 países diferentes y los autores observaron que la DM era un factor de riesgo, la cual se encontraba asociada a los accidentes cerebrovasculares (OR= 1,16 (1,05-1,30)).(9,10)

### **1.3 SALUD PÚBLICA**

La diabetes tiene un alto impacto económico y social; produce defunciones y discapacidades, impone una enorme carga no solo para el paciente y su familia, sino

también para el Estado y las empresas, por reducción de productividad y también por la gran demanda del sistema sanitario.(4)

La carga económica asociada a los pacientes diabéticos incluye tanto los costos relacionados a la patología (consultas médicas, visitas al hospital, tratamientos y pruebas de laboratorio, medicamentos, equipamientos, internaciones, etc), como también costos indirectos como puede ser la jubilación anticipada por incapacidad u horas de trabajo perdidas debido a la enfermedad (5). En la región de América Central y del Sur el costo total de la diabetes en la Salud Pública fue de aproximadamente 33 billones de dólares en el año 2017 y se estima que para el año 2045 esta cifra alcance los 52 billones de dólares anuales.(4,5)

Por esta razón el interés en la DM como un problema de Salud Pública es muy importante, tanto en nuestra región como en todo el mundo, y por ello la prevención y el tratamiento temprano de la DM y sus factores de riesgo (hipertensión arterial, dislipemia, obesidad, entre otros) son considerados prioritarios.(2)

## **1.4 CLASIFICACIÓN**

En los Estándares de Atención Médica en Diabetes (Standards of Medical Care in Diabetes) publicados por la Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association, ADA), propone una clasificación, en la cual se categoriza a los pacientes en 5 grupos.(3,11–13)

Clasificación etiológica de la DM:(2)

- Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)
- Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)
- Diabetes Gestacional (DG)
- Otros tipos específicos de Diabetes
- Intolerancia a la glucosa y glucemia alterada en ayunas

### **1.4.1 Diabetes Mellitus Tipo 1**

La DM1, también conocida como insulino dependiente, se da un déficit absoluto de insulina dado por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, por procesos autoinmunitarios o idiopáticos (de causa desconocida).(1,12)

Debido a que la patología no se hace visible hasta cuando ya no hay reserva insulínica, la DM1 es de aparición brusca y los pacientes necesitan insulina para sobrevivir, generalmente aparece en la niñez con un episodio de cetoacidosis que hace el diagnóstico y es necesario su tratamiento de manera urgente (14). Cerca del 40% de las personas con DM1 presentan neuropatías severas e insuficiencia renal antes de los 50 años de edad.(1,12)

### **1.4.2 Diabetes Gestacional**

La DG, o también llamada diabetes del embarazo; aparece durante la gestación en un porcentaje del 1 al 14% de las pacientes, y suele debutar en las semanas 24 a 28 del embarazo; ocasionalmente persiste después del parto y es asociada a un incremento de trastornos en la madre (hipertensión arterial, infecciones vaginales, o en vías urinarias, parto prematuro o cesárea) y daño grave en el bebé.(2,12,15)

La principal causa de DG es debido al efecto de las hormonas placentarias. Durante el embarazo se producen altos niveles de hormona lactógeno placentario humano (hPL) y hormona de crecimiento placentario humano (hPGH), las cuales son de gran importancia para el crecimiento del bebé. Estas hormonas, en particular la hPL, reducen la efectividad de la insulina. A medida que el bebé crece, hay mayor necesidad de esta hormona, y como resultado hay mayor riesgo a desarrollar resistencia a la insulina y DG.(12,16–18)

Los factores de riesgo a la DG son: antecedentes de embarazo con DG, antecedentes familiares de DM2 o DG, embarazos previos con niños macrosómicos, obesidad, alteraciones en la tolerancia a la glucosa.(16,18)



Si la elevación de glucosa se presenta desde los inicios del embarazo, existen posibilidades de que se presenten malformaciones en el feto, como malformaciones cardiovasculares, renales, del sistema nervioso o del sistema musculoesquelético, así como muerte fetal, o macrosomía.(2,12,19)

### 1.4.3 Otros tipos de Diabetes Mellitus

Se pueden mencionar los siguientes tipos de DM:(12)

- Defectos genéticos de la función de las células  $\beta$  y sus localizaciones cromosómicas
  - Cromosoma 12, HNF-1 $\alpha$  (MODY3)
  - Cromosoma 7, glucoquinasa (MODY2)
  - Cromosoma 20, HNF-4 (MODY1)
  - Cromosoma 13, factor promotor de la insulina 1 (IPF-1; MODY4)
  - Cromosoma 17, HNF-1 $\beta$  (MODY5)
  - Cromosoma 2, NeuroD1 (MODY6)
  - ADN mitocondrial
- Defectos genéticos en la acción de la insulina
  - Resistencia a la insulina tipo A
  - Leprechaunismo
  - Síndrome de Rabson-Mendenhall
  - Diabetes lipoatrófica
- Enfermedades del páncreas exócrino
  - Pancreatitis
  - Trauma/pancreatectomía
  - Neoplasia
  - Fibrosis quística
  - Hemocromatosis
  - Pancreatopatía fibrocalculosa
- Endocrinopatías
  - Acromegalia
  - Síndrome de Cushing

- Glucagonoma
- Feocromocitoma
- Hipertiroidismo
- Somatostatina
- Aldosteronoma
- Inducida por drogas o químicos
  - Vacor
  - Pentamidina
  - Ácido nicotínico
  - Glucocorticoides
  - Hormona tiroidea
  - Diazóxido
  - Agonistas  $\beta$ -adrenérgicos
  - Tiazidas
  - Fenitoína
  - $\alpha$ -Interferon
- Infecciones
  - Rubeola congénita
  - Citomegalovirus
- Formas no comunes de diabetes inmunomediada
  - Síndrome de “persona rígida” (Stiff-man)
  - Anticuerpos anti-receptores de insulina
- Otros síndromes genéticos asociados a veces con la diabetes
  - Síndrome de Down
  - Síndrome de Klinefelter
  - Síndrome de Turner
  - Síndrome de Wolfram
  - Ataxia de Friedreich
  - Corea de Huntington
  - Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
  - Distrofia miotónica
  - Porfiria
  - Síndrome de Prader-Willi

#### 1.4.4 Diabetes Mellitus Tipo 2

La DM2, anteriormente conocida como DM no insulino dependiente, está caracterizada por insulino-resistencia y deficiencia relativa de insulina (esto último ocurre hasta el agotamiento de las reservas insulínicas, luego se convierten en pacientes insulino dependientes) y se presenta a menudo en adultos. Es un grupo heterogéneo de pacientes, por lo general son adultos mayores de 40 años de edad y con algún grado de obesidad. (2,12)

Los pacientes con DM2 con niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglucemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control glucémico (11,20). Algunas personas que padecen esta patología controlan la concentración sanguínea de glucosa realizando una dieta adecuada y haciendo ejercicio, mientras que otras deben tomar fármacos que estimulen la producción de insulina, y así disminuir la resistencia a la misma, o fármacos que reduzcan la velocidad de absorción de los hidratos de carbono en el tracto gastrointestinal.(12)

La DM2 es más frecuente que la DM1 y representa alrededor del 90% de todos los casos de DM. En la mayoría de los pacientes, se manifiesta después de los 30 años, sobre todo entre los 50 y 60 años, y se desarrolla de manera gradual. Sin embargo desde hace unos años hay un aumento progresivo del número de pacientes menores de 20 años. Esta tendencia obedece sobre todo a la creciente prevalencia de la obesidad, el factor de riesgo más importante de la DM2.(12,20)

El desarrollo de la DM2 suele ir precedido de obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico. Al contrario de la DM1, la DM2 se asocia a un aumento en la concentración plasmática de insulina (dependiendo del estadio de evolución de la enfermedad), que es la respuesta compensadora de las células  $\beta$  del páncreas a la disminución de la sensibilidad de los tejidos blancos a los efectos metabólicos de la insulina, un fenómeno conocido como resistencia a la insulina.(12,20)

Esta reducción de la sensibilidad a la insulina altera la utilización y el almacenamiento de los hidratos de carbono, eleva la glucemia e induce un

incremento compensador de la secreción de la insulina. El desarrollo de resistencia a la insulina y la alteración del metabolismo de la glucosa suelen ser procesos graduales que comienzan con la ganancia de peso que conduce a la obesidad.(12)

En un comienzo, la DM2 puede ser asintomática o sus síntomas pueden ser leves o estar enmascarados por los de otras enfermedades crónicas como insuficiencia cardíaca, artritis o enfermedad vascular periférica. Pero también pueden presentar todos los síntomas típicos de la hiperglucemia como la poliuria, polidipsia, apetito excesivo y fatiga.(12)

## **1.5 CUADRO CLÍNICO**

Los signos y síntomas más frecuentes de la DM son:(11)

- Poliuria
- Polidipsia
- Polifagia
- Pérdida de peso
- Fatiga
- Cambios en la agudeza visual

También pueden presentarse signos y síntomas menos frecuentes:(11)

- Vaginitis en mujeres y balanitis en hombres
- Aparición de glucosa en la orina
- Ausencia de la menstruación en mujeres
- Aparición de impotencia en los hombres
- Dolor abdominal
- Hormigueo o adormecimiento de manos y pies, piel seca, úlceras o heridas que cicatrizan lentamente
- Debilidad
- Irritabilidad
- Cambios de ánimo
- Náuseas y vómitos

- Halitosis

## 1.6 DIAGNÓSTICO

Según la revisión del año 2019 de los Estándares de Atención Médica en Diabetes de la ADA, el diagnóstico de la DM se basa en los siguientes criterios (3):

1. Glucemia en ayunas medida en plasma venoso igual o mayor a 126 mg/dl. En ayunas se define como un período sin ingesta calórica de por lo menos ocho horas (3) o,
2. Glucemia medida en plasma venoso que sea igual o mayor a 200 mg/dl dos horas después de una carga de glucosa durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). La PTOG consiste en la medición de la glucemia dos horas después de dar una carga oral de 75 gramos de glucosa (3) o,
3. Hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayor o igual a 6,5% (Para utilizar este ensayo, el laboratorio debería tener una metodología certificada por el Programa Nacional de Estandarización de Hemoglobina Glicosilada (NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program)).(3)

## 1.7 TRATAMIENTO DE LA DIABETES

En el algoritmo para el tratamiento de la DM2 sugerido por la Sociedad Argentina de Diabetes (SAD) (Figura 1), en consenso con la ADA y la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD, European Association for Study of Diabetes), se recomienda como primer paso mejorar la condición metabólica del paciente con cambios en la dieta y otras modificaciones en el estilo de vida, incluyendo el ejercicio (el cual aumenta la sensibilidad a la acción de la insulina).

Si el paciente tiene valores de HbA1c menores a 8% al comienzo de su tratamiento, se recomienda que el mismo mantenga las modificaciones en el estilo de vida y vuelva a controlar los valores de HbA1c a los 3 meses, si este último valor es mayor a 7% se comienza con un tratamiento basado en metformina a menos que

ésta sea contraindicada o no tolerada, en este caso la alternativa es recurrir a otros antidiabéticos (sulfonilureas, tiazolidinedionas, inhibidores de la DPP-4, inhibidores del SGLT2, agonistas del GLP-1, meglitinidas o acarbosa). Si luego de 3 meses el valor de HbA1c sigue siendo mayor a 7% se recurre a terapias duales con alguno de los antidiabéticos mencionados anteriormente, y pasado este período de tiempo si no se logran los objetivos, se recomienda la terapia triple y posteriormente el tratamiento con insulina y antidiabéticos.(20)

Si el paciente posee al comienzo del tratamiento valores de HbA1c mayores a 8% pero menores a 9%, se recomienda que directamente comience una terapia dual con antidiabéticos y controle su HbA1c pasado 3 meses.(20)

Otra posibilidad es que el paciente posea, al comienzo del tratamiento, valores de HbA1c mayores a 9% y no presente síntomas de descompensación metabólica, como adelgazamiento y cetosis, se recomienda comenzar con una terapia triple de antidiabéticos. En cambio si presenta síntomas de descompensación metabólica, se recomienda el tratamiento con insulino terapia y antidiabéticos.(20)

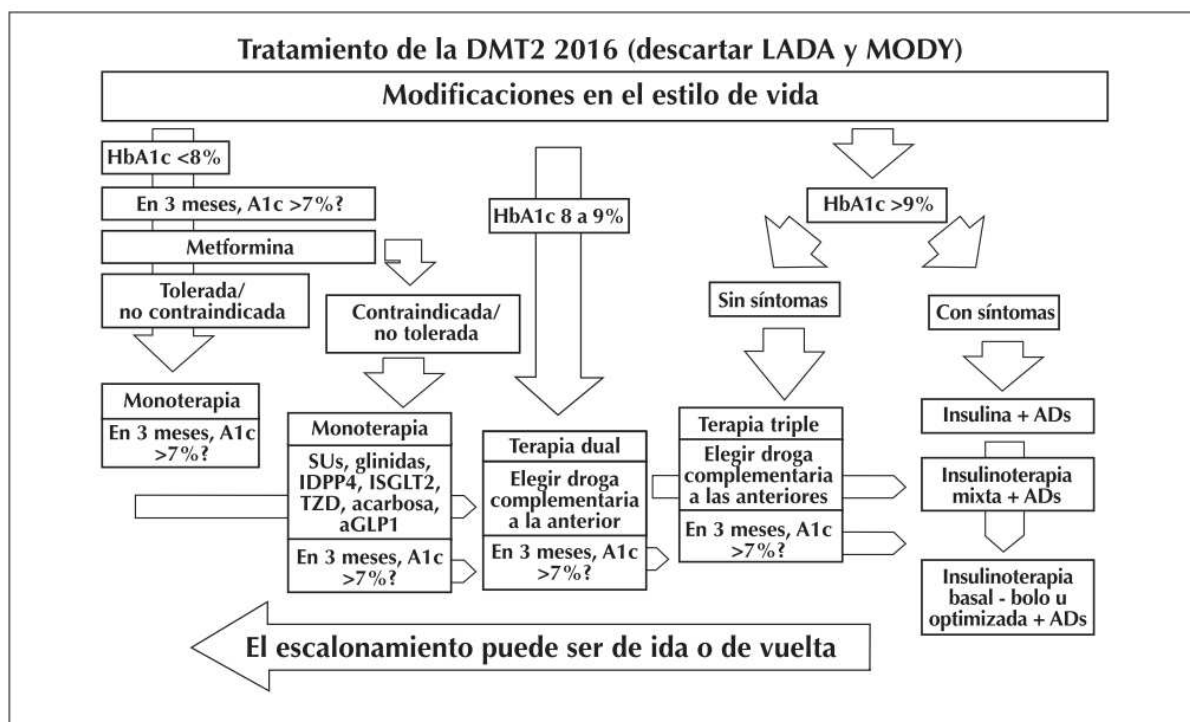


Figura 1. Algoritmo para el tratamiento de la DM2 (20)

El aumento en la utilización de agentes orales se ve favorecido, sobre todo, gracias al uso de sulfonilureas inicialmente y de biguanidas en los últimos años. Los fármacos que mayor consumo han experimentado han sido la metformina y la glimepirida, que son, además, los dos antidiabéticos orales más utilizados desde 2006.(2)

### **1.7.1 Objetivo del tratamiento**

Los objetivos del tratamiento contra la diabetes son aliviar los síntomas relacionados con la hiperglucemia (fatiga, poliuria, etc.) y prevenir o reducir las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes. El logro de los objetivos requiere de un tratamiento multidisciplinario (médicos, enfermeras, farmacéuticos, bioquímicos), con experiencia en farmacología, nutrición y educación del paciente. En la estrategia terapéutica es fundamental que el paciente participe en forma activa en la control de su diabetes.(2)

Se valora el control glucémico al utilizar mecanismos para la medición a corto plazo (medición de la glucosa en sangre por el propio paciente) y mediciones a largo plazo (HbA1c y fructosamina).(2)

Utilizando las mediciones de glucosa en sangre capilar, el paciente valora su glucemia en forma regular (en ayuno, antes de consumir alimentos o en el periodo posprandial) y reporta las cifras a su médico para el control de la diabetes.(2)

### **1.7.2 Tratamiento no farmacológico**

Hace referencia a una nutrición saludable y ejercicio físico. Además es de gran importancia la participación de educadores certificados y de personal sanitario (enfermera, nutricionista o farmacéutico) especializados en educación de pacientes.(2,20)

En términos de régimen alimentario, la ADA utiliza el término tratamiento médico nutricional para describir el régimen alimentario que coordina el consumo de calorías y otros aspectos de la diabetes como fármacos y ejercicios. En la DM1 es de gran importancia equilibrar el consumo de calorías con la dosis de insulina. En la DM2, la dieta se dirige a perder peso, disminuir los riesgos de hipertensión arterial y de aterosclerosis. El ejercicio proporciona múltiples beneficios para pacientes con diabetes, pero la dosificación del tratamiento hipoglucemiante puede requerir ajustes para evitar la hipoglucemia relacionada con el ejercicio.(2,20)

Además de las modificaciones en el estilo de vida, los principales métodos no farmacológicos incluyen descenso de la progresión del metabolismo normal de la glucosa con cirugía bariátrica.(2,20)

Varios procedimientos, que incluyen la colocación de bandas gástricas, derivación gástrica y derivación biliopancreática mejoran la tolerancia a la glucosa y previenen o corrigen la DM2.(2,20)

### **1.7.3 Tratamiento farmacológico con insulina**

La insulina es la base para el tratamiento de casi todos los individuos con DM1 y algunos de los individuos con DM2. La misma puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. El tratamiento a largo plazo se realiza principalmente con inyecciones subcutáneas.(2,20)

La administración subcutánea de insulina difiere de la secreción fisiológica en dos formas principales:

1. La insulina inyectada, no produce el incremento rápido de la insulina endógena en respuesta a la administración de glucosa después de la administración oral o intravenosa.(2)
2. La insulina inyectada se administra a la circulación periférica en lugar de liberarse hacia la circulación portal. Así, la proporción de insulina portal/periférica no es fisiológica y esto puede alterar la influencia de la insulina en el metabolismo hepático. No obstante, la insulina



suministrada a la circulación periférica puede llevar a una glucemia normal o casi normal. (2)

#### **1.7.4 Tratamientos farmacológicos con agentes orales (2,20)**

- Sulfonilureas
- Meglitinidas
- Agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)
- Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)
- Biguanidas
- Tiazolidinedionas
- Inhibidores de la  $\alpha$  glucosidasa
- Pramlintida
- Resinas fijadoras de ácidos biliares
- Fármacos basados en GLP-1

##### **1.7.4.1 Sulfonilureas**

Las sulfonilureas estimulan la liberación de insulina al unirse a un sitio específico en el complejo de conductos  $K_{ATP}$  en las células  $\beta$  (receptor de sulfonilureas, SUR) e inhiben su actividad. La inhibición del conducto  $K_{ATP}$  causa despolarización de la membrana celular y una serie de eventos que conducen a la secreción de insulina. Este grupo de fármacos se utiliza en pacientes con DM2.(21)

##### **1.7.4.2 Meglitinidas**

Las meglitinidas, al igual que las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina al cerrar los conductos de  $K_{ATP}$  en las células  $\beta$  del páncreas.(21)

#### **1.7.4.3 Agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)**

Los fármacos de esta familia actúan como agonistas sobre los receptores GLP-1. Estos receptores se expresan en células  $\beta$ , células del sistema nervioso central y periférico, corazón y vasos sanguíneos, riñón, pulmón y mucosa gastrointestinal.(21)

#### **1.7.4.4 Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (iDPP-4)**

Los iDPP-4 son fármacos de acción incretina que bloquean la enzima DPP-4, prolongando la acción del GLP-1. La DPP-4 es una serina proteasa que tiene distribución amplia en todo el cuerpo y se expresa como ectoenzima en las células endoteliales, en la superficie de los linfocitos T y en forma circulante. Desdobla los aminoácidos del extremo amino terminal de péptidos con prolina o alanina en la segunda posición.(21)

#### **1.7.4.5 Biguanidas**

La metformina (N'-dimetilguanilguanidina), cuyo preparado comercial se comercializa como clorhidrato de metformina, es la biguanida más utilizada en la actualidad para el tratamiento de la DM2. Las biguanidas tienen la particularidad de que no requieren células pancreáticas  $\beta$  funcionales para la reducción de la hiperglucemia. Es uno de los dos hipoglucemiantes orales que pertenecen a la lista modelo de medicamentos esenciales de la OMS, junto con la glibenclamida, lo cual significa que es un medicamento que satisface las necesidades prioritarias en la salud de la población. (21)

Es notable el incremento en el uso de metformina a partir de 1998, año en el que se publicaron los resultados del United Kingdom Prospective Diabetes Study

(UKPDS), ensayo clínico que demostraba la eficacia de la metformina para reducir tanto las complicaciones cardiovasculares de la diabetes como la mortalidad en pacientes con sobrepeso.(22)

La metformina reduce la glucemia postprandial y basal actuando por 3 mecanismos: 1) reduciendo la producción hepática de glucosa por inhibición de la gluconeogénesis y glucógenolisis; 2) incrementando la sensibilidad a la insulina en músculo, mejorando la captación y utilización de la glucosa periférica; y 3) retrasando la absorción intestinal de glucosa.(21)

La metformina se absorbe principalmente en el intestino delgado, no se une a proteínas plasmáticas y se excreta sin cambios en la orina. Tiene una semivida en circulación de casi dos horas.(21)

Los efectos secundarios más comunes son gastrointestinales como náuseas, indigestión, dolor abdominal cólico, distensión, diarrea o alguna combinación de estos síntomas. La acidosis láctica causada por la Metformina es rara, pero los casos notificados incluyen personas con factores relacionados de riesgo que deberían haber sido contraindicado su uso (insuficiencias renal, o hepática o cardiorrespiratoria y alcoholismo).(21)

#### **1.7.4.6 Tiazolidinedionas**

Las tiazolidinedionas son ligandos del receptor activador de la proliferación del peroxisoma gamma (PPARG), un grupo de receptores hormonales nucleares que participan en la regulación de los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y de los lípidos.(21)

#### **1.7.4.7 Inhibidores de la $\alpha$ glucosidasa**

La acarbosa y el miglitol reducen la absorción intestinal del almidón, dextrinas y disacáridos al inhibir la acción de la  $\alpha$  glucosidasa en el borde intestinal en cepillo. La inhibición de esta enzima hace más lenta la absorción de carbohidratos en el tubo digestivo y evita el incremento súbito de las concentraciones plasmáticas posprandiales de glucosa. Dichos fármacos también incrementan la liberación de la hormona glucoreguladora GLP-1 hacia la circulación, lo que puede contribuir a sus efectos hipoglucemiantes.(21)

#### **1.7.4.8 Pramlintida**

El péptido amiloide de los islotes (amilina) es un péptido de 37 aminoácidos producidos en las células  $\beta$  del páncreas y se secreta junto con la insulina. Se ha desarrollado una forma sintética de amilina con varias modificaciones de aminoácidos para mejorar la biodisponibilidad, denominada pramlintida como fármaco para el tratamiento para la DM1 y DM2.(21)

#### **1.7.4.9 Resinas fijadoras de ácidos biliares**

Las resinas fijadoras de ácidos biliares reducen las concentraciones plasmáticas de glucosa en individuos diabéticos, estimulando la gluconeogénesis hepática. El único fijador de ácidos biliares aprobado específicamente para el tratamiento de la DM2 es el colesevelam.(21)

#### **1.7.4.10 Fármacos basados en GLP-1**

Las incretinas son hormonas gastrointestinales que se liberan después de los alimentos y estimulan la secreción de insulina. Las dos incretinas mejor conocidas son GLP-1 y GIP, ambas estimulan la liberación de insulina y reducen la glucemia en personas con DM2.(21,23)

#### **1.7.4.11 Agonistas de los receptores GLP-1**

Existen dos agonistas de receptores de GLP-1: exenatina y liraglutida.(21) El mecanismo de acción de ambas es la activación del receptor de GLP-1, en las células  $\beta$ , el resultado final de esta activación es el incremento en la biosíntesis de insulina y la exocitosis en una forma dependiente de la glucosa.(21)

### **1.8 CONTROL CLÍNICO**

Para lograr un buen control de la DM2, se deben alcanzar metas establecidas para cada uno de los parámetros que contribuyen al riesgo de desarrollo de complicaciones crónicas: la glucemia y la hemoglobina glicosilada, los lípidos, la presión arterial y las medidas antropométricas relacionadas con la adiposidad.(2)

Estudios como el Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) y el United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) mostraron que la relación entre la hemoglobina glicosilada estable (HbA1c) y el riesgo de complicaciones es lineal, sin que se pueda identificar un nivel donde el riesgo desaparezca.(11,22,24)

El DCCT fue un estudio clínico conducido desde 1983 hasta 1993, en Estados Unidos y Canadá, en el que participaron 1441 pacientes, provenientes de 29 centros de salud diferentes, que presentaban DM1 y que tenían una duración mínima de la enfermedad de 1 año pero no mayor a 15 años (24). El estudio mostró que mantener

niveles de glucemia cercanos a los normales enlentecen la aparición y progresión de las complicaciones en ojos, riñones y nervios, todas estas causadas por la diabetes.(24)

EL UKPDS fue un estudio clínico realizado entre los años 1977 hasta 1997, en Reino Unido, en el que participaron 5102 pacientes, provenientes de 23 centros de salud diferentes de Reino Unido, con DM2 recién diagnosticada con una edad media de 54 años (48-60 años) y seguidos durante un período de 10 años (25). El estudio demostró concluyentemente que las complicaciones de la DM2, antes consideradas inevitables, pueden ser reducidas mejorando el control glucémico y/o la presión arterial.(22)

## **1.9 COMPLICACIONES**

Las complicaciones en la DM se pueden clasificar en complicaciones agudas y crónicas.

### **1.9.1 Complicaciones Agudas**

#### **1.9.1.1 Hipoglucemia**

La hipoglucemia severa en la persona con DM2 es más frecuente cuando se busca un control estricto de la glucemia, sobre todo en los que reciben sulfonilureas o se aplican insulina. El aumento en la frecuencia de hipoglucemias puede indicar el comienzo o empeoramiento de una falla renal que tiende a prolongar la vida media de la insulina circulante. (12)

Hay situaciones que aumentan el riesgo de hipoglucemia en la persona con DM: (2)

1. Retrasar u omitir una comida
2. Beber alcohol en exceso o sin ingerir alimentos simultáneamente
3. Hacer ejercicio intenso sin haber ingerido una colación apropiada
4. Equivocarse en la dosis del hipoglucemiante, como le puede ocurrir a personas de edad avanzada que olvidan si ya tomaron la medicina o que no ven bien la dosis de la insulina colocada.

### 1.9.1.2 Hiperglucemia severa

Las dos formas de presentación de la descompensación hiperglucémica severa son:

**Cetoacidosis Diabética (CAD):** es una complicación metabólica aguda de la diabetes que se caracteriza por hiperglucemia (superiores a 250 mg/dL), hipercetonemia y acidosis metabólica. La cetoacidosis diabética se identifica con mayor frecuencia en pacientes con DM1 y provoca náuseas, vómitos y dolor abdominal, que pueden progresar al edema cerebral, el coma y la muerte (12). La deficiencia de insulina trae aparejado, un aumento de la lipólisis, y liberación de ácidos grasos que serán usados como sustratos para obtener energía alternativa para los tejidos. La oxidación beta de estos últimos, lleva a la producción de cuerpos cetónicos: acetona, acetoacetato y ácido beta oxibutírico.(26)

**Estado Hiperosmolar Hiperglucémico No Cetósico (EHHNC):** es una complicación metabólica de la DM caracterizada por hiperglucemia (superiores a 600 mg/dL), deshidratación extrema, hiperosmolaridad del plasma y alteración del nivel de conciencia. Este cuadro se detecta con mayor frecuencia en pacientes con DM2, a menudo en circunstancias de estrés fisiológico (12). A pesar de la hiperglucemia, la producción de cuerpos cetónicos es escasa en el EHHNC debido a que las células  $\beta$  del páncreas aún siguen produciendo insulina, lo cual produce una inhibición de la cetogénesis.(26)

## 1.9.2 Complicaciones crónicas

Las complicaciones crónicas tienden a surgir con el transcurso de los años de la DM y el control glucémico del paciente.

**Complicaciones oftalmológicas:** La hiperglucemia crónica daña a los vasos sanguíneos de la retina, condición conocida como retinopatía diabética (RD). Entre un 20 y 80% de los pacientes las padecen a lo largo de la evolución de la enfermedad. La diabetes es la segunda causa de ceguera en el mundo. (2,12)

**Complicaciones renales:** La hiperglucemia crónica daña los vasos sanguíneos y unidades de filtrado en los riñones. Esta condición se conoce como nefropatía diabética (ND). La nefropatía puede estar presente entre el 10 al 25% de los pacientes con DM2 al momento del diagnóstico. Un 20 a 40% de los pacientes con microalbuminuria progresa a nefropatía clínica y de éstos, un 20% llega a insuficiencia renal terminal al cabo de 20 años.(2)

**Complicaciones neurológicas:** La hiperglucemia puede dañar a los vasos sanguíneos que llevan el suministro a los nervios periféricos, lo que los irrita y daña en este proceso. Tal daño acumulado en los nervios se denomina neuropatía diabética. La neuropatía diabética es la complicación más frecuente y precoz de la diabetes. Su evolución y gravedad se correlacionan con la duración de la enfermedad y el mal control metabólico.(12)

**Pie diabético:** Se denomina pie diabético al pie que tiene al menos una lesión con pérdida de continuidad de la piel (úlceras). El pie diabético a su vez se constituye en el principal factor de riesgo para la amputación de la extremidad.(12)

**Complicaciones Cardiovasculares:** La enfermedad vascular puede afectar todos los vasos sanguíneos del cuerpo. Las arterias bloqueadas en el cerebro pueden llevar a un Ataque Isquémico Transitorio (AIT) o Accidente Cerebro Vascular (ACV). Las arterias bloqueadas en el corazón pueden conducir a dolor en el pecho (angina) o a un ataque cardíaco. Las arterias bloqueadas en las piernas pueden provocar problemas con la circulación y con la capacidad de caminar. Los problemas eréctiles también pueden deberse a arterias bloqueadas.(12)



**Hipertensión arterial (HTA):** La HTA afecta a un 20% de la población general, pero compromete hasta el 50% de las personas con DM2.(2) La HTA forma parte del síndrome metabólico y puede presentarse antes de que la DM sea diagnosticada y aún en niveles normales de glucemia, por lo cual alrededor de una tercera parte de las personas con DM2 recién diagnosticadas ya tienen HTA. La coexistencia de HTA y DM multiplica de manera exponencial el riesgo de morbilidad y mortalidad por problemas relacionados con macroangiopatía y microangiopatía. (12)

## **1.10 GENÉTICA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Se piensa que la DM2 es un trastorno multifactorial y poligénico que se desarrolla debido a la compleja interacción entre múltiples genes y factores ambientales. La forma en que estos genes interactúan entre sí y con el medio ambiente para producir la DM2 es aún poco conocida.(27–29)

A diferencia de la DM1, donde el riesgo genético se concentra principalmente en la región del Antígeno Leucocitario Humano (HLA), el componente genético de la DM2 no se concentra en una región particular del genoma y parece ser el resultado de la interacción de múltiples genes. Es posible, que el componente genético de la DM2 se deba a múltiples variantes genéticas con un efecto individual pequeño.(27–29)

### **1.10.1 Estudios de ligamiento**

El ligamiento genético es la tendencia de los genes y otros marcadores genéticos a heredarse juntos debido a su ubicación cercana en el mismo cromosoma. Si bien estos métodos fueron bastante exitosos en la detección de algunas variantes raras, resultaron ineficientes en la identificación de genes que estén implicados en trastornos poligénicos complejos. Estos estudios solo revelaron dos genes, Calpaína 10 (CAPN10) y el Factor de Transcripción 7-tipo 2 (TCF7L2) que se identificaron de manera confiable como asociados con la DM2.(27)

### **1.10.2 Estudios de genes candidatos**

En los estudios de genes candidatos, se estudiaron genes que ya se sospechaban que desempeñaban un papel en la patogénesis de la DM2, mediante las secuencias nucleotídicas de los mismos. La estrategia era centrarse en los genes que ya se conocían su implicancia en el metabolismo de la glucosa, en la secreción de insulina, en los receptores de insulina, en la señalización posterior al receptor y en el metabolismo de los lípidos. La mayoría de los genes que se pensaban que estaban involucrados en la secreción y acción de la insulina no se asociaron con la DM2.(27)

Los genes que se encontraron asociados con DM2 incluyen al Receptor Gamma Activado por el Proliferador de Peroxisoma (PPARG), el Sustrato Receptor de Insulina 1 (IRS1) y el Sustrato Receptor de Insulina 2 (IRS-2), el Canal de Rectificación interna del Potasio, subfamilia J, miembro 11 (KCNJ11); Wolframina 1 (WFS1), HNF1 homeobox A (HNF1A), HNF1 homeobox B (HNF1B) y HNF4A.(27)

### **1.10.3 Estudios de asociación del genoma completo (GWAS)**

Con el desarrollo de la tecnología de genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de alto rendimiento y la disponibilidad de los datos de la base de datos del International HapMap Project (HapMap), se hizo posible escanear cientos de miles de SNPs que estaban en desequilibrio de ligamiento con millones de SNPs en todo el genoma.(27)

El gen TCF7L2, ya identificado a través de estudios de ligamiento, fue la señal más significativa y más replicada encontrada en los estudios de GWAS, pero estos estudios también ayudaron a identificar otros loci genéticos que parecen estar relacionados con la DM2 (27). Se conocen más de 80 variantes asociadas a DM2; incluida la confirmación de las variantes identificadas anteriormente por estudios de genes candidatos y los estudios de ligamiento.(30,31)

Dado que la obesidad es un importante contribuyente al desarrollo de DM2, los genes que aumentan el riesgo de obesidad también aparecen en GWAS asociados a la DM2. Estos incluyen algunos genes frecuentemente replicados como el gen de la dioxigenasa dependiente del alfa-cetoglutarato (FTO) y el gen del receptor de la melanocortina 4 (MC4R). Estos genes parecen tener un impacto primario sobre el riesgo de obesidad y afectan al riesgo de desarrollar DM2 principalmente a través de su efecto sobre la obesidad.(27)

## **1.11 GENÉTICA DE LAS COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS**

El estudio de complicaciones micro y macrovasculares en familias de pacientes con diabetes sugiere una fuerte susceptibilidad genética. Un estudio de familias con DM1 demostró que si un hermano tiene ND avanzada, el riesgo de ND aumenta entre un 72 a 83% en el otro hermano, en comparación con el 17 a 22% entre hermanos con DM1 sin ND (32,33).

El ensayo Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) informó un riesgo incrementado de 5,4 veces más elevado para desarrollar RD en parientes diabéticos de pacientes con RD en comparación con aquellos sin RD (24). El estudio FIND-Eye realizado en familias mexicoamericanas demostró que la heredabilidad de RD era del 24 al 27%. La heredabilidad de la cardiopatía isquémica es aproximadamente del 50% en pacientes DM1.(33,34)

Además, algunos pacientes diabéticos desarrollan complicaciones a pesar de tener un buen control glucémico (35), lo que sugiere que la susceptibilidad genética puede ser la base de este fenómeno. Se han utilizado varios enfoques para estudiar los factores de riesgo genéticos para las complicaciones diabéticas, incluido el enfoque del gen candidato, los estudios de vinculación y los estudios de asociación de genoma completo.(33,35)

### **1.11.1 Estudios de genes candidatos**

Existen genes candidatos seleccionados en base a su rol en las vías celulares que unen la glucosa al daño tisular. Los genes candidatos que se han estudiado se centraron principalmente en genes implicados en las vías que regulan la producción de toxinas celulares en respuesta a la hiperglucemia, por ejemplo, especies reactivas del oxígeno, sorbitol, productos finales de glicosilación avanzada y genes implicados en el daño inducido en el tejido del órgano específico por estas toxinas.(33)

### **1.11.2 Estudios GWAS**

Se han identificado más de 80 regiones en el genoma asociadas a complicaciones diabéticas. La mayoría de estas regiones se correlacionan con loci intergénicos y pocas de ellas involucran genes previamente implicados en la enfermedad.(35)

## **1.12 INSULINA**

La insulina es un polipéptido producido y secretado por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. Contiene 51 aminoácidos dispuestos en dos cadenas (una  $\alpha$  y una  $\beta$ ) unidas por puentes disulfuro, y su correcta producción es muy importante para el correcto funcionamiento de la insulina. Un precursor, llamado proinsulina es hidrolizado dentro de los gránulos de almacenamiento para formar insulina y un péptido residual, el péptido C. Los gránulos almacenan insulina en forma de cristales que contienen zinc e insulina.(1,36,37)

Los efectos endócrinos de la insulina son varios: (1,36,37)

- Aumenta la captación de glucosa por los tejidos periféricos
- Aumenta la actividad de todas las vías de consumo de glucosa
  - Aumenta la glucólisis
  - Aumenta la vía de las pentosas
  - Aumenta la oxidación total de la glucosa
- Aumenta la glucogenogénesis
- Disminuye la glucogenólisis
- Disminuye la gluconeogénesis
- Disminuye la glucemia
- Disminuye la lipólisis
- Disminuye los ácidos libres en plasma
- Aumenta la lipogénesis a partir de la glucosa
- Aumenta la captación de aminoácidos en los tejidos
- Aumenta la síntesis de proteínas
- Disminuye la producción de urea

La glucosa es el estímulo más potente para la liberación de insulina de las células  $\beta$  de los islotes. Hay una continua secreción basal que se manifiesta en los momentos de la alimentación. Las células  $\beta$  poseen canales de  $K^+$  que son regulados por el ATP intracelular (canales de  $K_{ATP}$ ). Cuando la glucosa en sangre aumenta, ingresa más glucosa a las células  $\beta$  y su metabolismo produce un aumento del ATP intracelular, lo cual cierra los canales de  $K_{ATP}$ . La despolarización de las células  $\beta$  resultante, inicia un influjo de iones  $Ca^{2+}$  sensible al voltaje, y esto dispara la liberación de insulina.(1,36,37)

Los receptores insulínicos son glicoproteínas que atraviesan la membrana y que consisten en dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas de forma covalente por uniones disulfuro. Después que la insulina se fija a la subunidad  $\alpha$  del receptor, el complejo receptor-insulina entra a las células donde es eventualmente degradado por enzimas lisosomales.(1,36,37)

### 1.12.1 Traducción de la insulina

La insulina madura está constituida de dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, codificado por el gen localizado en el cromosoma humano 11p15.5, quien da origen a un precursor de cadena única altamente conservado, la preproinsulina.(36–38)

Todas las proteínas necesitan para su síntesis la participación de los ARN de transferencia (ARNt). Para cumplir su función los ARNt deben madurar, siendo modificados de manera post-transcripcional y cargados con su aminoácido específico por las aminoacil-ARNt sintetetasas. El ARNm de la preproinsulina posee dos codones de lisina, ambos AAG, uno localizado en la región de la cadena  $\beta$  y el otro en la unión del péptido C y la cadena  $\alpha$ .(36–38)

Trabajos realizados por Iben, J. R. & Maraia, R. J observaron la existencia en algunos individuos la presencia de una delección de un locus en el cromosoma 11, el cual contiene una secuencia compatible con un gen que codifica a un ARNt Lys (CUU).(39)

También se conoce que algunos ARNt, deben ser modificados para cumplir correctamente su función en el momento de la traducción. En este sentido, el ARNt Lys (UUU) debe ser modificado por una metiltiottransferasa. El gen que codifica a esta metiltiottransferasa es el gen CDKAL1. Esta enzima cataliza las modificaciones 2-metiltio (ms2) de varios substratos, incluyendo la adición del ms2 al N6-treonil-cabamoidenosida en la posición 37 del ARNt Lys (UUU)(40,41). Esta modificación m2 del ARNt Lys (UUU) estabiliza la interacción con el codón, permitiendo una traducción eficiente del codón AAG (ambos codones, AAA y AAG, codifican al aminoácido Lisina).(40,41)

## 1.13 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El estudio de variaciones genéticas en pacientes con DM2, pretende identificar si la presencia de ciertas variantes en el genoma de los pacientes pueden estar asociadas al resultado del tratamiento farmacológico o a un mayor riesgo a desarrollar complicaciones, con la expectativa de que la identificación de estas variantes nos lleven a conocer las vías moleculares y metabólicas involucradas. Este enfoque genético también podría generar algoritmos para la identificación temprana de personas diabéticas que necesiten un tratamiento diferente o tengan un alto riesgo de complicaciones que pueden beneficiarse con programas de prevención tempranos.

En este trabajo de investigación se analizaron pacientes con DM2, donde se planteó una evaluación integral de dicha patología. Para ello se realizaron; estudios genéticos para analizar la presencia de polimorfismos, evaluación de parámetros bioquímicos, evaluación de las respuestas al tratamiento farmacológico y, valoración de las complicaciones micro vasculares (retinopatía diabética y nefropatía diabética), finalizando con análisis de posibles alteraciones en la traducción de la insulina.

En los próximos capítulos se desarrollarán cada uno de los temas que forman parte de la presente tesis doctoral, que incluyen los siguientes estudios: a) Farmacogenética de la Metformina, b) Predisposición genética al desarrollo de Retinopatía Diabética, c) Predisposición genética al desarrollo de Nefropatía Diabética y d) Posibles alteraciones en la traducción de la insulina.

## 1.14 BIBLIOGRAFÍA

1. Guyton A, Hall J. Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica. Vol. 12, ELSEVIER. 2010. p. 961–976
2. Varios. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Rev Asoc Latinoam Diabetes. 2013
3. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. Diabetes Care. 2019 Jan 17;42(Supplement 1):S13–28.
4. Ministerio de Salud de la Nación. Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para Enfermedades No Transmisibles. 2015.
5. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 8th Edition. 2017;155.
6. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. Segunda Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. 2011
7. Ministerio de Salud de la Nación. Enfermedades No Transmisibles y Factores de Riesgo. Boletín Vigil Enfermedades No Transm y Factores Riesgo Nro 8. 2016;41.
8. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case control study. Lancet. 2004;364(9438):937–52.
9. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, et al. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. Lancet (London, England). 2016 Aug 20;388(10046):761–75.
10. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. Lancet. 2010 Jul



10;376(9735):112–23.

11. Varios. Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Diabetes Mellitus Tipo 2 con Control y Tratamiento de la Medicina Basada en Evidencia. Rev Asoc Latinoam Diabetes. 2013
12. Gardner D, Shoback D. Greenspan: endocrinología básica y clínica. In: Greenspan Endocrinología básica y clínica. 2012. p. 695–778.
13. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. Diabetes Care. 2018 Jan 8;41(Supplement 1):S13–27.
14. Farinha JB, Krause M, Rodrigues-Krause J, Reischak-Oliveira A. Exercise for type 1 diabetes mellitus management: General considerations and new directions. Med Hypotheses. 2017 Jul;104:147–53.
15. Salzberg S, Alvariñas J, López G, Lapertosa SG de, Linari MA, Falcón E, et al. Guías de diagnóstico y tratamiento de diabetes gestacional. ALAD 2016. Vol. 6, Revista ALAD. ALAD; 2016.
16. Spaight C, Gross J, Horsch A, Puder JJ. Gestational Diabetes Mellitus. In: Endocrine development. 2016. p. 163–78.
17. Coustan DR. Gestational Diabetes Mellitus. Clin Chem. 2013 Sep 1;59(9):1310–21.
18. Dickens LT, Thomas CC. Updates in Gestational Diabetes Prevalence, Treatment, and Health Policy. Curr Diab Rep. 2019 Jun 9;19(6):33.
19. Simko M, Totka A, Vondrova D, Samohyl M, Jurkovicova J, Trnka M, et al. Maternal Body Mass Index and Gestational Weight Gain and Their Association with Pregnancy Complications and Perinatal Conditions. Int J Environ Res Public Health. 2019 May 17;16(10):1751.
20. Cristina Faingold M, Commendatore Secretarios V, Vázquez F, de Dios Expertos A, González C, Commendatore V, et al. Guías para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. Sociedad Argentina de Diabetes. Vol. 50, Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes. 2016.

21. Lorenzo Fernández P, Alfaro Ramos MJ, Lizasoain Hernández I, Leza Cerro JC, Moro Sánchez MÁ, Portolés Pérez A. Velazquez; Farmacología Básica y Clínica. Farmacología Básica y Clínica. 2008. p. 621-640
22. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(5):643–8.
23. Nauck MA, Meier JJ. GIP and GLP-1: Stepsiblings Rather Than Monozygotic Twins Within the Incretin Family. *Diabetes.* 2019 May 22;68(5):897–900.
24. Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: Overview. *Diabetes Care.* 2014;37(1):9–16.
25. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2008 Oct 9;359(15):1577–89.
26. Adeyinka A, Kondamudi NP. Hyperosmolar Hyperglycemic Nonketotic Coma (HHNC, Hyperosmolar Hyperglycemic Nonketotic Syndrome). *StatPearls.* StatPearls Publishing; 2019.
27. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes.* 2013;4(4):114.
28. Franks PW, Merino J. Gene-lifestyle interplay in type 2 diabetes. *Curr Opin Genet Dev.* 2018 Jun;50:35–40.
29. Morris AP. Progress in defining the genetic contribution to type 2 diabetes susceptibility. *Curr Opin Genet Dev.* 2018 Jun;50:41–51.
30. Pranavchand R, Reddy M. Genomics era and complex disorders: Implications of GWAS with special reference to coronary artery disease, type 2 diabetes mellitus, and cancers. *J Postgrad Med.* 2016;62(3):188.
31. Stančáková A, Laakso M. Genetics of type 2 diabetes. *Endocr Dev.* 2016;31:203–20.
32. Holt RIG, Cockram CS, Flyvbjerg A, Goldstein BJ. Textbook of diabetes.

33. Alkayyali S, Lyssenko V. Genetics of diabetes complications. *Mamm Genome*. 2014 Oct;25(9–10):384–400.
34. Arar NH, Freedman BI, Adler SG, Iyengar SK, Chew EY, Davis MD, et al. Heritability of the Severity of Diabetic Retinopathy: The FIND-Eye Study. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2008 Sep;49(9):3839.
35. Ahlqvist E, Van Zuydam NR, Groop LC, McCarthy MI. The genetics of diabetic complications. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(5):277–87.
36. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2013 Jan 1;9(1):25–53.
37. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2;217(7):2273–89.
38. Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of insulin gene transcription. 2002;
39. Iben JR, Maraia RJ. tRNA gene copy number variation in humans. *Gene*. 2014 Feb;536(2):376–84.
40. Wei F, Tomizawa K. Measurement of 2-methylthio Modifications in Mitochondrial Transfer RNAs by Reverse-transcription Quantitative PCR. *bio-protocol*. 2016;6:1–7.
41. Wei F-Y, Nagashima K, Ohshima T, Saheki Y, Lu Y-F, Matsushita M, et al. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat Med*. 2005;11(10):1104–8.

# **CAPÍTULO 2**

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS**

### **2.1 Objetivo General**

- Identificar la presencia de variantes genéticas en el ADN de pacientes con DM2 y relacionarlas con parámetros bioquímicos, farmacológicos y clínicos según la evolución de la patología y la respuesta al tratamiento.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Analizar los niveles de parámetros bioquímicos, clínicos y antropométricos de pacientes con DM2 y cotejarlos con las variantes genéticas encontradas en el gen SLC22A1 de acuerdo a la efectividad del tratamiento con Metformina.
- Valorar la asociación entre la presencia de diversos polimorfismos genéticos y la retinopatía diabética de pacientes con DM2.
- Valorar la asociación entre la presencia de diversos polimorfismos genéticos y la nefropatía diabética de pacientes con DM2.
- Estudiar la existencia de posibles alteraciones en los mecanismos involucrados en la traducción de la insulina debido a variantes genéticas y eventualmente asociarlos al desarrollo de DM2.

# **CAPÍTULO 3**

# **FARMACOGENÉTICA DE LA METFORMINA**

### 3.1 RESUMEN

La DM2 es una enfermedad crónica que afecta a gran cantidad de individuos en todo el mundo. Uno de los medicamentos empleados para su tratamiento es la metformina, también usada en pacientes con sobrepeso. La metformina es transportada al interior de los hepatocitos por el transportador codificado por el gen SLC22A1. Variantes con menor actividad pueden llevar a una disminución en la cantidad de metformina disponible en hígado y por ende menor respuesta terapéutica.

El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar los niveles de diferentes parámetros bioquímicos en relación a la dosis de metformina y a la presencia de variantes genéticas en el transportador SLC22A1.

Materiales y métodos: se extrajo sangre de 103 pacientes que asistieron al laboratorio LACE S.A. de Córdoba Capital (44 hombres y 59 mujeres) con diagnóstico de DM2, que estaban tratados con 1.700 mg/día de metformina por más de 6 meses. Se estudiaron cinco polimorfismos diferentes en el gen SLC22A1 (rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495 y rs34059508), los cuales se analizaron mediante la técnica de PCR-RFLP y posterior corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5% P/V. Se evaluaron valores de glucemia, HbA1c, función hepática (Aspartato Amino Transferasa: AST, Alanino Amino Transferasa: ALT), perfiles lipídicos (Colesterol Total, Triglicéridos, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL) y renal (Albúmina y Creatinina urinarias).

Resultados: se encontraron variantes polimórficas en el gen SLC22A1 (1 o más) en 33 de los 56 pacientes. Los niveles de HbA1c y de glucemia tendieron a ser más elevados en los pacientes que presentaban el alelo T del rs12208357, el alelo T del rs2282143 y el alelo A del rs34130495 aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,4823$ ,  $p=0,7336$  y  $p=0,2545$ , respectivamente). Se observó diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de HbA1c en los pacientes que presentaban la delección del nucleótido G en el rs35191146 y el alelo A del rs34059508 con respecto a los pacientes sin dichos polimorfismos ( $p=0,0273$  y  $p=0,0018$ , respectivamente). No hubo diferencia significativa en los otros parámetros bioquímicos analizados.

Conclusión: la presencia de ciertos polimorfismos en el gen SLC22A1 podrían afectar a los niveles de glucemia y de HbA1c en pacientes con DM2.

Palabras clave: Diabetes Mellitus tipo 2, polimorfismos, metformina



### 3.2 INTRODUCCIÓN A LA FARMACOGENÉTICA

La farmacogenética estudia el aporte que tienen las variaciones en el ADN dentro del genoma humano y su influencia en la respuesta al medicamento y/o a la toxicidad del mismo. El genoma humano consta de aproximadamente 30.000 genes, cada uno compuesto de una secuencia de cientos a miles de nucleótidos. Cada persona hereda dos copias de la mayoría de los genes, un alelo de cada progenitor. A pesar de que entre dos individuos el ADN idéntico en más del 99%, el porcentaje restante es el que nos diferencia uno del otro.(1)

Las variantes encontradas en más del 1% de la población se llaman polimorfismos. El tipo de variante más abundante es el polimorfismo de un único nucleótido (SNP); también podemos encontrar otras variaciones como son deleciones, inserciones y repeticiones en tándem. La secuencia de nucleótidos que posee un gen codifica generalmente para una proteína. La variación de la secuencia en el ADN puede causar alteraciones en la proteína sintetizada a partir de un determinado gen, dando así un determinado fenotipo (en este caso, una respuesta diferente a un fármaco, y/o toxicidad del mismo).(2)

Teóricamente, la consecuencia de las variaciones genéticas dependerá de la ubicación del SNP dentro del gen, si el SNP se encuentra en una región codificante del gen, podría alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, afectando su estructura y, por lo tanto, su función. Si en cambio el SNP se encuentra en la región reguladora, puede alterar la capacidad de unión de factores de transcripción, y por ende afectando a la expresión del mismo. Por último, si el SNP se encuentra en la región no codificante, la consecuencia puede ser más difícil de prever, uno de los efectos que podría causar es la pérdida o aparición de un sitio de corte y empalme (conocido también como splicing).(3)

Como se mencionó, los polimorfismos más característicos son los SNP. La Base de Datos de Polimorfismo de Nucleótido Único (dbSNP, Single Nucleotide Polymorphism Database), es una base de datos pública y gratuita de variación genética de diferentes especies (incluyendo la humana) desarrollada y hospedada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, National Center for Biotechnology Information), en colaboración con el Instituto Nacional de

Investigación del Genoma Humano (NHGRI, National Human Genome Research Institute) que contiene todas las variaciones genéticas identificadas y se pueden utilizar para investigar una gran variedad de fenómenos de origen genético.(4)

Tradicionalmente, la farmacogenética ha estudiado el papel de la variación genética en la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos) y farmacodinamia (receptores, canales y transportadores) de diversos fármacos. Sin embargo, los estudios de genes candidatos y, más recientemente, estudios de asociación de genoma completo (GWAS, Genome Wide-Association Study) han ayudado a identificar nuevas variantes genéticas antes no estudiadas.(1,3)

### **3.2.1 Beneficios de la información aportada por la farmacogenética**

Algunos beneficios que pueden generar la aplicación de la farmacogenética en la personalización terapéutica son:

- a) Administración y dosificación correcta del fármaco que necesita un paciente según su perfil genético, evitando así la práctica habitual de “prueba y error” hasta encontrar el fármaco y la dosis correcta para el paciente.(1)
- b) Diseño de fármacos específicamente dirigida contra una enfermedad específica para un paciente o para un grupo de pacientes con un cierto perfil genético, maximizando no solo su efecto terapéutico sino también disminuyendo los efectos secundarios o no deseados.(1)
- c) Reducción de gastos en la Salud Pública ya que reduciría el uso de tratamientos ineficaces y/o las posibles internaciones por el mal uso de un fármaco (intoxicaciones, sobredosis, reacciones alérgicas, etc).(1)

### **3.3 APLICACIÓN DE LA FARMACOGENÉTICA**

Actualmente se puede aplicar la farmacogenética a distintos tratamientos farmacológicos, se pueden mencionar algunas como de genotipificación de la Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT) antes de la medicación con azatioprina para el tratamiento de la enfermedad de Crohn o trasplante de órganos sólidos (5), o la 6-mercaptopurina para el tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica (3). Se conocen 3 SNPs, los cuales pueden predecir la actividad de la enzima TPMT con un 95% de precisión. La prescripción de dosis normales de azatioprina o de 6-mercaptopurina a pacientes con deficiencia de TPMT puede ser letal.(3)

Ciertos genotipos del citocromo P450 CYP2C9 y de la vitamina K epóxido reductasa 1 (VKORC1) han sido asociados con la dosis óptima necesaria de warfarina en pacientes anticoagulados, y el uso de algoritmos de dosificación que incorporan información genética y clínica son predictivos de la dosis estable de warfarina recomendada (6). Otro citocromo de la misma familia, el CYP2D6 debería ser estudiado de acuerdo a sus variantes genéticas, ya que según el resultado de las mismas ayudaría a la implementación de una dosificación apropiada de antidepresivos y antipsicóticos.(5)

### **3.4 FARMACOGENÉTICA Y DM2**

Actualmente hay una gran batería de agentes antidiabéticos orales disponibles para el tratamiento de la DM2, a pesar de eso, hay pacientes que no logran regular su glucemia por distintas causas, entre otras, debido a la presencia de otra enfermedad, falta de adherencia al tratamiento, interacciones farmacológicas, o a la presencia de variantes genéticas. Los SNPs que afecten a genes que codifican para enzimas metabolizadoras, transportadores o receptores podrían afectar la absorción, distribución, metabolismo y la eliminación de fármacos que consecuentemente alterarían la eficacia del fármaco y/o causar efectos tóxicos.(7)

### **3.5 METFORMINA**

Como mencionamos en el capítulo anterior, la metformina es el principal fármaco biguanida utilizado en todo el mundo como agente oral antidiabético en pacientes con DM2, y es el fármaco de primera línea en el tratamiento de la DM2.(8,9)

#### **3.5.1 Tratamiento y Dosificación**

Según las recomendaciones de la SAD, se sugiere comenzar con el siguiente tratamiento de metformina:(9)

- Comenzar con una dosis de 500 a 850 mg, 1 o 2 veces por día con las comidas principales.
- Luego de 5 a 7 días, si se tolera sin molestias gastrointestinales y la hiperglucemia persiste, se aumenta a 850 o 1.000 mg 2 veces al día. De aparecer intolerancia se regresa a la dosis anterior.
- Luego de una semana, se intenta aumentar la dosis nuevamente o se cambia a la forma XR (formulación de liberación prolongada), que se ofrece en dosis de 500, 750 y 1.000 mg.

La dosis máxima recomendada es de 2.000 mg/día.(8–11)

#### **3.5.2 Farmacocinética**

Después de su administración por vía oral, la concentración (C<sub>máx.</sub>) es detectada a las 2,5 horas (T<sub>máx.</sub>). Su biodisponibilidad es de aproximadamente 50-60 % en sujetos sanos y la fracción no absorbida se recupera en las heces (20 a 30 %).(12)

Con los esquemas de dosificación usuales se alcanzan concentraciones plasmáticas estables dentro de las primeras 24 a 48 horas y resultan generalmente menores de 1 µg/ml. La concentración plasmática máxima es de 1,5 µg/ml y se alcanza 1 a 3 horas después de su administración. Hay que tener en cuenta que los alimentos retrasan ligeramente la absorción de la metformina.(12)

### **3.5.3 Distribución, metabolismo y eliminación**

La unión de la metformina a proteínas plasmáticas es insignificante. La concentración máxima en sangre es más baja que en plasma y aparecen aproximadamente al mismo tiempo. Los eritrocitos parecen representar un compartimiento de distribución secundario. El volumen medio de distribución se encuentra entre 63 a 276 L. (12)

El clorhidrato de metformina se excreta en la orina sin cambios. En humanos no se han identificado metabolitos.(12)

La depuración renal de la metformina es > 400 ml/min, lo cual indica que la metformina es eliminada por filtración glomerular y por secreción tubular. Siguiendo una dosis oral, la vida media de eliminación es de aproximadamente 6,5 horas. En pacientes con deterioro de la función renal (basada en la depuración de creatinina) la vida media plasmática de la metformina se prolonga y la depuración renal disminuye en forma proporcional a la depuración de creatinina.(12)

### **3.5.4 Mecanismos de acción**

La metformina reduce tanto la glucemia basal como la glucemia post-prandial. Funciona principalmente a través de la supresión de la producción excesiva de glucosa hepática mediante la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), inhibiendo la gluconeogénesis. Otros efectos potenciales de la metformina incluyen un aumento en la captación de glucosa, un aumento en la señalización de

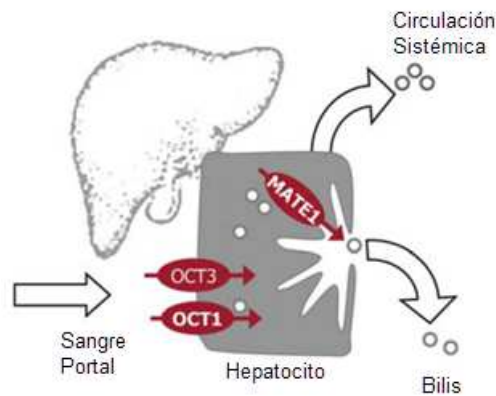
insulina, una disminución en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y un aumento en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. La metformina también puede aumentar la utilización de glucosa en los tejidos periféricos y posiblemente reducir la ingesta de alimentos y la absorción de glucosa intestinal.(12)

La metformina no estimula la secreción de insulina endógena, por lo que no causa hipoglucemia o hiperinsulinemia, que son efectos secundarios comunes asociados con otros medicamentos antidiabéticos.(12)

### **3.6 FARMACOGENÉTICA DE LA METFORMINA**

#### **3.6.1 Transportador de Cationes Orgánicos (OCT1)**

La proteína transportadora de cationes orgánicos 1 (OCT1) es codificada por el gen del transportador de solutos tipo 1 de la familia 22 (SLC22A1, Solute carrier family 22 member 1) localizado en el cromosoma 6q26 humano, el cual se expresa en los hepatocitos, en el lado baso-lateral de la membrana sinusoidal y cumple la función de introducir a los sustratos desde la circulación portal al hígado. La proteína transportadora de cationes orgánicos 3 (OCT3) también se expresa en el lado baso-lateral de la membrana sinusoidal y cumple la función de transportador de solutos. Dentro del hepatocito, la metformina puede volver a circulación sistémica o es transportada por la proteína de extrusión de toxinas y multidroga 1 (MATE1) a la bilis (Figura 2)(13). El OCT1 puede mediar la eliminación hepática de distintos compuestos, tales como aciclovir, desipramina y compuestos endógenos como la serotonina y la prostaglandina E2.(13)



**Figura 2. Localización y rol funcional de los OCT en la farmacogenética de la Metformina (Traducido) (13).**

La importancia de este transportador en el correcto funcionamiento de la metformina se debe a que la absorción hepática es un paso esencial para reducir la producción de glucosa hepática y la aparición de efectos secundarios potencialmente mortales, como la acidosis láctica. (14)

Distintos trabajos realizados por varios investigadores intentaron descubrir si la OCT1 desempeña un papel en las acciones de la metformina y las implicaciones asociadas en la respuesta al fármaco.(15–18)

En el estudio de Wang y colaboradores, observaron una disminución de 30 veces de la captación en el hígado y una disminución de 3 a 7 veces en la captación de metformina intestinal (duodeno, yeyuno, íleon) en ratones OCT1 knockout (OCT1  $-/-$ ) en comparación con ratones OCT1  $+/+$  (19). Sin embargo, se encontró que la distribución renal y la eliminación de metformina fueron casi iguales cuando se compararon los dos grupos de ratones. Estos resultados demostraron que la OCT1 está involucrada en la captación de metformina en hepatocitos y enterocitos.(19)

En el trabajo de Shu y colaboradores, estudiaron si la activación de AMPK estaba asociada con la expresión de OCT1 (15). Para evaluar esto, se comparó la activación de AMPK estimulada por metformina en células transfectadas con OCT1 humano (células HEK-OCT1) y en células controles (células transfectadas con el vector vacío). La metformina se acumuló considerablemente más en las células

HEK-OCT1, que también se correspondía con una activación de AMPK más alta que en aquellas con el vector vacío de las células controles. Esto demuestra que la OCT1 es necesaria para la captación de metformina y las acciones farmacológicas realizadas en el hígado, al menos *in vitro*. (15)

Cuando compararon la captación *in vivo* de metformina en ratones OCT1 knockout (OCT1 -/-) con células que contienen al menos un alelo OCT1 funcional (OCT1 +/+ y OCT1 +/-) después de una dosis oral única de metformina observaron que los resultados de este experimento fueron consistentes con los resultados obtenidos por el grupo de Wang, mostrando que la captación hepática en ratones wild type y heterocigotas (OCT1 +/+ y OCT1 +/-) fue significativamente mayor (4,2 veces) en comparación con los ratones OCT1 -/- (15). Además, la metformina suprimió la producción de glucosa estimulada por glucagón en los ratones de tipo salvaje, pero no en los ratones OCT1 -/-. Posteriormente, los ratones OCT1 -/- y wild type fueron alimentados con la misma dieta alta en grasas durante ocho semanas para aumentar los niveles de glucemia en ayunas y se sometieron a un tratamiento de cinco días con solución salina o metformina. Los ratones wild type que recibieron terapia con metformina mostraron una reducción en los niveles de glucemia en ayunas en más del 30 %, pero los ratones OCT1 -/- que recibieron metformina no tuvieron una reducción marcada en los niveles de glucemia en ayunas. (15)

En resumen, Shu y sus colaboradores revelaron que la acumulación de metformina y la activación de AMPK dependen de la expresión funcional de OCT1 y que el nivel de activación de AMPK correspondía a la supresión en la producción de glucosa estimulada por glucagón y los niveles de glucemia en ayunas reducidos. (15)

Los polimorfismos en los genes transportadores de fármacos han sido reconocidos como un posible mecanismo que explicaría la variación en la respuesta al fármaco. (20,21)

Shu y colaboradores, encontraron que algunos polimorfismos de OCT1 alteran la respuesta a la metformina en humanos. Esto lo hicieron midiendo la captación de metformina en 7 variantes conocidas de OCT1 con actividad reducida (rs34447885, rs12208357, rs34104736, rs36103319, rs34130495, rs35191146, rs34059508). Se evaluaron sujetos sanos que expresan algunos de estos polimorfismos (y registrando el genotipo) midiendo los niveles de glucosa en plasma



mediante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (POTG) durante 3 horas, después de recibir tratamiento con glucosa oral y metformina. Los resultados mostraron que la acción de la metformina en sujetos que presentaban los genotipos wild type en el gen SLC22A1 (C/C para el rs34447885; C/C para el rs12208357; C/C para el rs34104736; G/G para el rs36103319, G/G para el rs34130495, G/G para el rs35191146, G/G para el rs34059508) produjeron una reducción significativa en los niveles de glucosa en plasma en relación con los genotipos de función reducida. Además, los genotipos wild type se asociaron con niveles de insulina significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) 2 horas después de la POTG en comparación con los genotipos de función reducida.(16)

En este trabajo de tesis se analizaron en pacientes con DM2 la presencia de portadores de variantes de pérdida de función de SLC22A1: rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495 y rs34059508, y si los mismos veían reducida la actividad del transportador OCT1 y por ende la efectividad terapéutica de la metformina, monitoreándolos según los valores de HbA1c o glucemia en ayunas (si éstos eran elevados).

### **3.7 OBJETIVO ESPECÍFICO**

En base a los estudios mencionados previamente, el objetivo planteado en esta etapa fue:

- Analizar los niveles de parámetros bioquímicos, clínicos y antropométricos de pacientes con DM2 y cotejarlos con las variantes genéticas encontradas en el gen SLC22A1 de acuerdo a la efectividad del tratamiento con metformina.

### **3.8 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.8.1 Tipo de estudio**

Este es un estudio de tipo descriptivo y de carácter observacional, prospectivo y transversal.

#### **3.8.2 Pacientes**

En este estudio se incluyó un total de 103 individuos de entre 20 a 80 años de edad (44 hombres y 59 mujeres) que asistieron al Laboratorio LACE S.A. de Córdoba Capital, para realizarse los análisis bioquímicos de control de diabetes. Todos estaban recibiendo 1.700 mg/día de metformina por lo menos durante los 6 meses previos a la extracción de sangre. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Oulton-Romagosa y el Ministerio de Salud de Córdoba y estuvo sujeto a los acuerdos establecidos en la declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados y su consentimiento fue obtenido.

### **3.8.3.1 Criterios de inclusión**

- Individuos entre 20 y 80 años
- Pacientes con DM2
- Pacientes medicados con Metformina.

### **3.8.3.2 Criterios de exclusión**

- Individuos menores de 20 años y mayores de 80 años,
- Pacientes sin DM2
- Mujeres embarazadas.

### **3.8.4 Muestras biológicas**

Las muestras analizadas consistieron en:

- Sangre entera tratada con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® K<sub>2</sub>-EDTA.
- Suero obtenido de sangre, obtenido por venipuntura en tubos BD Vacutainer® SST™ con gel separador y acelerador de la coagulación. La muestra se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se la centrifugó a 3.800 rpm por 10 minutos.
- Muestras de orina aisladas en frascos estériles comerciales y/o recolecciones de orina de 24 horas en botellas.
- Los pacientes se presentaron con 12 horas de ayuno.

### **3.8.5 Procedimientos**

#### **3.8.5.1 Formulario de preguntas**

A los pacientes se les preguntó cuál era la dosis prescrita de Metformina, peso y altura.

#### **3.8.5.2 Procesamiento de Muestras**

##### **3.8.5.2.1 Parámetros bioquímicos**

Los parámetros bioquímicos fueron cuantificados en un autoanalizador COBAS® 6000 de Roche™.

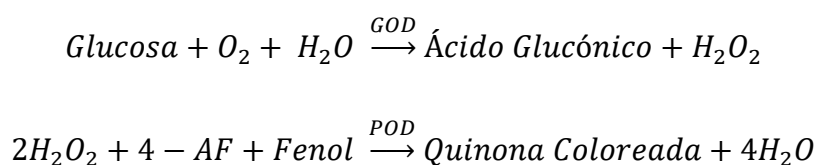
##### **3.8.5.2.1.1 Hemoglobina Glicosilada (HbA1c): Inmunoturbidimetria**

Se utilizó un método de inhibición inmunoturbidimétrica para determinar la concentración de hemoglobina A1c (HbA1c) como un porcentaje de la hemoglobina total en sangre entera humana (% HbA1c) (22). Para ello, fue necesario liberar la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos, mediante hemólisis de la muestra. La sangre del paciente se puso en contacto con el Reactivo Hemolizante que contiene un detergente (bromuro de tetradeciltrimetilamonio - TTAB) que lisa a los glóbulos rojos específicamente. A partir del hemolizado obtenido, se determinó mediante dos reacciones independientes, el nivel de HbA1c y Hb de la muestra.(22)

### 3.8.5.2.1.2 Glucosa: método colorimétrico enzimático según Trinder

En la reacción de Trinder, la glucosa es oxidada a D-gluconato por la glucosa oxidasa (GOD), con formación de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD), el fenol y la 4 aminoantipirina (4-AF) se condensan por acción del peróxido de hidrógeno, formando una quinoamina roja proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Se cuantifica en espectrofotómetro a 505 nm.(23,24)

El esquema de reacción es el siguiente (23,24):

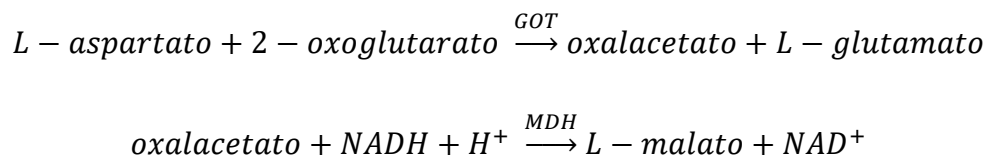


### 3.8.5.2.1.3 Estudios de perfil hepático

#### 3.8.5.2.1.3.1 Aspartato Amino Transferasa (AST): método cinético UV según la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC)

La aspartato aminotransferasa (AST) o glutamato-piruvato transaminasa (GOT) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al cetoglutarato con la formación de glutamato y oxalacetato. Este último es reducido a malato por la malato deshidrogenasa (MDH) en presencia de nicotinamido adenin dinucleótido reducido (NADH). La reacción se controla cinéticamente a 340 nm a través de la disminución de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>, proporcional a la actividad AST presente en la muestra.(25)

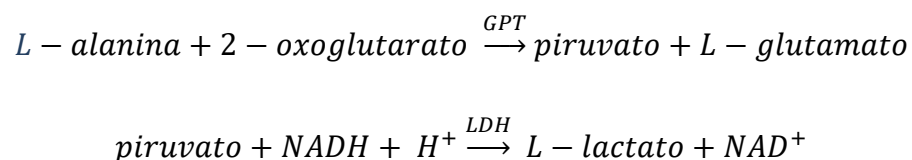
El esquema de reacción es el siguiente (25):



### 3.8.5.2.1.3.2 Alanino Amino Transferasa (ALT): método cinético UV según IFCC

La alanina aminotransferasa (ALT) o glutamato-piruvato transaminasa (GPT) cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al cetoglutarato con la formación de glutamato y piruvato. Este último es reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de nicotinamido adenin dinucleótido reducido (NADH). La reacción se controla cinéticamente a 340 nm a través de la disminución de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>, proporcional a la actividad ALT presente en la muestra.(25)

El esquema de reacción es el siguiente (25):

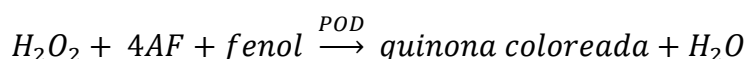
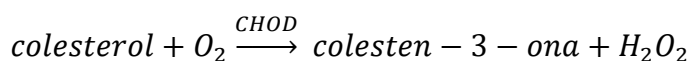
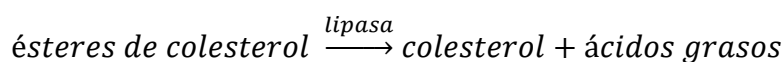


### 3.8.5.2.1.4 Estudios de perfil lipídico

#### 3.8.5.2.1.4.1 Colesterol Total: método colorimétrico enzimático según Trinder

Este método para la determinación de colesterol total en suero se basa en el uso de tres enzimas: colesterol esterasa (lipasa), colesterol oxidasa (CHOD) y peroxidasa (POD). En presencia de esta última la mezcla de fenol y 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del peróxido de hidrógeno, formando una quinoneimina coloreada proporcional a la concentración de colesterol en la muestra. Se cuantifica en espectrofotómetro a 505 nm.(26)

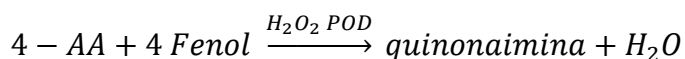
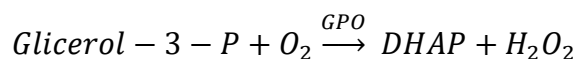
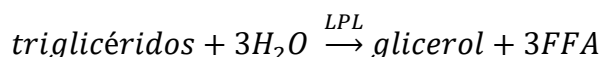
El esquema de reacción es el siguiente (26):



#### 3.8.5.2.1.4.2 Triglicéridos: método colorimétrico enzimático según Trinder

El método está basado en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos séricos a glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipoprotein lipasa (LPL). El glicerol es fosforilado por el adenosin trifosfato (ATP) en presencia de glicerolquinasa (GK) para formar glicerol-3-fosfato (G-3-P) y adenosin difosfato (ADP). El G-3-P es oxidado por la glicerofosfato oxidasa (GPO) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y peróxido de hidrógeno. En presencia de la peroxidasa (POD) el fenol y la 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formándose un cromógeno rojo proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra. Se cuantifica en espectrofotómetro a 505 nm.(26)

El esquema de reacción es el siguiente (26):



#### 3.8.5.2.1.4.3 Colesterol-HDL: método colorimétrico homogéneo

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se separan precipitando selectivamente las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) mediante el agregado de ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. Las HDL quedan en el sobrenadante separado por centrifugación, donde se realiza la determinación del colesterol ligado a las mismas, empleando el sistema enzimático Colesterol oxidasa/Peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol/4-AF). Se cuantifica en espectrofotómetro a 505 nm.(27)

#### 3.8.5.2.1.4.4 Colesterol-LDL: método colorimétrico homogéneo

Este método es un ensayo homogéneo sin precipitación, en dos pasos. En el primero, se agrega un agente tensioactivo (Reactivo A) que solubiliza las partículas lipoproteicas no-LDL. El colesterol liberado es consumido por la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa en una reacción sin desarrollo de color. Un segundo agente tensioactivo (Reactivo B) solubiliza las partículas de LDL formándose, por la presencia de enzimas y un Reactivo cromogénico, un color proporcional a la cantidad de LDL colesterol presente en la muestra. Se cuantifica en espectrofotómetro a 505 nm. (27)



### 3.8.5.2.1.5 Estudios de función renal

#### 3.8.5.2.1.5.1 Clearance de Creatinina

El Clearance de Creatinina se estimó mediante el uso de la fórmula de *Cockcroft-Gault*(28)

$$Cl. Creatinina = \frac{(140 - Edad) \times Peso [en kg]}{72 \times Creatinina plasmática [en mg/dl]} \times 0.85 \text{ si es mujer}$$

#### 3.8.5.2.2 Índice de Masa Corporal (IMC)

Mediante la asociación entre el peso y la talla del paciente se calculó el Índice de Masa Corporal o Índice de Quetelet y se utilizó la clasificación de la OMS. Se calculó mediante la fórmula matemática:

$$IMC = \frac{peso [en kg]}{altura^2 [en m]}$$

### 3.8.5.2.3 Extracción de ADN

Para obtener ADN a partir de sangre entera, se utilizó el kit comercial "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" (Cat. #A1120, Promega).

El kit Wizard® Genomic DNA Purification está diseñado para la separación de ADN de los glóbulos blancos, tejidos de cultivos celulares, tejido animal y vegetal, levaduras y bacterias Gram positivas y negativas.(20)

Este kit se basa en un proceso de 4 pasos: lisis celular, lisis nuclear, remoción de proteínas celulares mediante un precipitante y, concentración y desalinización del ADN mediante precipitación con isopropanol y lavado con etanol 70 % v/v.(20)

**Procedimiento:** Se lisaron 150 µl de sangre anticoagulada con "Cell Lysis Solution" y "Nucleic Lysis Solution". Luego, se centrifugó la muestra y se descartó el sobrenadante. Para la extracción del ADN se utilizaron distintas soluciones provistas por el fabricante ("RNAse Solution", "Protein Precipitation Solution") tras posteriores centrifugaciones breves a 13.000 r.p.m. se precipitó el ADN utilizando Isopropanol y se realizó un lavado con Etanol 70 % v/v. Por último, el ADN extraído se resuspendió con "DNA Rehydration Solution".(29)

### 3.8.5.2.4 Amplificación del gen SLC22A1 mediante PCR

A una alícuota del ADN extraído se le realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Se tomaron 1 µl de muestra de ADN; 3 µl de "Colorless Reaction Buffer Taq 5x" (Promega™); 0,12 µl de dNTPs (10 mM, Promega™); 0,12 µl de GoTaq Polimerasa® (5 U/µl, Promega™); 1 µl de Primer Forward (10 pmol/µl, Operon™) y 1 µl de Primer Reverse (10 pmol/µl, Operon™) correspondiente (ver Tabla I) y se llevó a volumen final de 15 µl con Agua MiliQ.

**Tabla I. Secuencia de primers y tamaños amplificados por PCR de los polimorfismos estudiados en el gen SLC22A1**

<b>Polimorfismo en el gen SLC22A1</b>	<b>Secuencia del Primer (5'-3')</b>	<b>Tamaño del fragmento (pb)</b>
<b>rs12208357</b>	F: TGATCAGATGGCCACGTGCATT	607
	R: GAGCCGGGCGTGTACATACAC	
<b>rs2282143</b>	F: TGCCCCTTGTCATGGGTGTGAAGC	267
	R: AGCGTGCTGATTCTGCCTGGA	
<b>rs35191146</b>	F: CTCAGGTTACGGACTCTGTGCT	381
	R: CACTGTGCACGGCCCCTCAAT	
<b>rs34130495</b>	Idem F rs35191146	381
	Idem R rs35191146	
<b>rs34059508</b>	F: TGTTGCCCTGTGCTGCAAATCTC	870
	R: GCCCACTGCCGAGCTGCAAAA	

pb: pares de base  
 F: Forward  
 R: Reverse

Las PCR se realizaron de las siguientes condiciones de ciclado:

- a) Inicio: a 94° C por 2 minutos
- b) Desnaturalización: a 94° C por 50 segundos
- c) Hibridación: a 58° C por 50 segundos
- d) Extensión: a 72° C por 1 minuto
- e) Elongación Final: a 72° C por 5 minutos
- f) Conservación: a -20° C

Se repitió cíclicamente las fases b-c-d por 35 veces.

Se utilizó un termociclador Biometra UNO II® (Göttingen, Alemania).

### 3.8.5.2.5 Digestión Enzimática de los productos de PCR

A los productos de PCR (15 µl) se les realizó la digestión enzimática con las endonucleasas de restricción y condiciones detalladas en la Tabla II.

**Tabla II. Endonucleasas de restricción, reactivos y condiciones utilizadas y tamaños de los fragmentos de restricción esperados a partir de los productos obtenidos de los polimorfismos estudiados en el gen SLC22A1**

Polimorfismo en el gen SLC22A1	Endonucleasa de Restricción	Buffer	Temperatura y Tiempo de Incubación	Tamaño del Fragmento digerido (pb)	
	Volumen (µl)	Volumen (µl)		N	M
rs12208357	HhaI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® Buffer 4 (10x, Biolabs™)	37° C	26, 83, 87, 100 y 311	26, 100, 170 y 311
	0,3	2*	3 horas		
rs2282143	TseI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® Buffer 3 (10x, Biolabs™)	75° C	267	86 y 181
	0,3	1,7	3 horas		
rs35191146	NlaIII (5 UI/mL, Fermentas™)	Buffer G (10x, Fermentas™)	37° C	6, 36, 48, 114 y 177	6, 48, 114 y 213
	0,3	1,7	3 horas		
rs34130495	Sau96I (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® Buffer 4 (10x, Biolabs™)	37° C	14, 34, 110 y 223	14, 110 y 257
	0,3	1,7	3 horas		
rs34059508	BsaXI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® Buffer 4 (10x, Biolabs™)	37° C	166, 346 y 358	346 y 524
	0,3	1,7	3 horas		

N: alelo normal, M: alelo mutado, pb: pares de base.

\*Adicionalmente se recomienda el agregado de 1 µl Albúmina Sérica Bovina (20x, Biolabs™) y 1,7 µl de Agua MiliQ para mejorar el rendimiento

### **3.8.5.2.6 Electroforesis en gel de agarosa**

Para la electroforesis en gel de agarosa, el producto de digestión se sembró en un gel de agarosa (Agarosa MAX D1 Max Biología Molecular® 100 g, Biodynamics™ SRL) al 2,5% P/V en buffer TAE (1X) y tinción con 2 µl de Solución de Bromuro de Etidio de calidad biología molecular (10 mg/ml, Promega™). En la separación electroforética se utilizaron marcadores de peso molecular (MPM) de 100 pb (CienMarker® 250uL, Biodynamics™), fuente de poder BioRAD® (PowerPac Basic™) a 70 V durante 40 minutos. El gel fue observado en un transluminador UV (Modelo TM-26, Labnet™).

### **3.8.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los datos obtenidos se analizaron mediante el uso de la prueba para calcular el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ), considerando una diferencia significativa un valor de  $p < 0,05$ .

Las frecuencias genotípicas y alélicas fueron calculadas y comparadas para ver si estaban en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg, para determinar la aleatoriedad de la población estudiada.

Los softwares utilizados para el tratamiento de los datos estadísticos fueron el GraphPad Prism 5® (Version 5.03, Diciembre 10 2009. GraphPad Software™) para Windows 10 x64® (2015. Microsoft Corporation™) y el software Infostat (versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### 3.9 RESULTADOS

Para este estudio farmacogenético, participó una población de 103 pacientes (44 hombres y 69 mujeres) diagnosticados con DM2 que asistieron al Laboratorio LACE S.A, para realizarse los análisis de control de diabetes. En ellos, la frecuencia de los 5 polimorfismos en el gen SLC22A1, con capacidad reducida para el transporte de metformina, fue calculada rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495 y rs34059508.

En la Tabla III se analizaron parámetros bioquímicos de los individuos clasificándolos según el sexo. Se observaron en la población estudiada que los niveles de HbA1c y glucemia se encontraban elevados con respecto a los valores normales (HbA1c: 4,8-6% y glucemia: 70-110 mg%).

Cuando se analizó el perfil lipídico de los pacientes se observó que los valores de colesterol total y trigliceridemia se encontraban levemente aumentados (valores normales: CT: menor a 200 mg/dL y TG: menor a 150 mg/dL), mientras que el colesterol HDL y colesterol LDL se encontraban dentro de niveles normales (colesterol HDL: 35-55 mg/dL y colesterol LDL: menor a 150 mg/dL). Los pacientes presentaban función renal normal (clearance de creatinina: 80-120 mg/min), valores de creatinina normal (hombres: 0,5-1,3 mg% y mujeres: 0,5-1,1 mg%) y valores de AST y ALT dentro de la normalidad (entre 5-38 mUI/mL).

Para los resultados de la Tabla III, se realizó un análisis estadístico entre hombres y mujeres; donde se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucemia ( $p=0,0195$ ), creatininemia ( $p=0,0006$ ) y enzimas hepáticas en suero ALT y AST ( $p= 0,0026$  y  $p< 0,0001$ , respectivamente).

**Tabla III. Parámetros bioquímicos analizados en la población de estudio (Estudio farmacogenética de la metformina)**

	<b>Mujeres</b> <b>(Media; DE)</b>	<b>Hombres</b> <b>(Media; DE)</b>	<b>Media Total;</b> <b>DE</b>	<b>p valor</b>
<b>HbA1c (%)</b>	6,84 ± 1,01	6,97 ± 0,96	6,9 ± 0,99	0,54
<b>Glucemia (mg%)</b>	122,4 ± 30,96	136,2 ± 26,79	128,3 ± 29,92	0,0195
<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	203,2 ± 43,44	208,8 ± 74,52	205,6 ± 58,49	0,6613
<b>Colesterol HDL (mg/dL)</b>	44,32 ± 12,32	41,05 ± 9,79	42,92 ± 11,37	0,1489
<b>Colesterol LDL (mg/dL)</b>	120,2 ± 34,55	123,5 ± 29,08	121,6 ± 32,22	0,6066
<b>TG (mg/dL)</b>	170 ± 102,7	192,8 ± 107,8	179,7 ± 105	0,2768
<b>Creatinina (mg%)</b>	0,79 ± 0,18	0,92 ± 0,16	0,86 ± 0,18	0,0006
<b>Clearance de creatinina (ml/min)</b>	95,47 ± 17,7	91,66 ± 12,1	93,84 ± 15,61	0,198
<b>GPT/ALT (mUI/mL)</b>	18,42 ± 8,15	28,43 ± 19,85	22,7 ± 15,12	0,0026
<b>GOT/AST (mUI/mL)</b>	17,69 ± 4,21	24,13 ± 9,28	20,57 ± 7,59	<0,0001

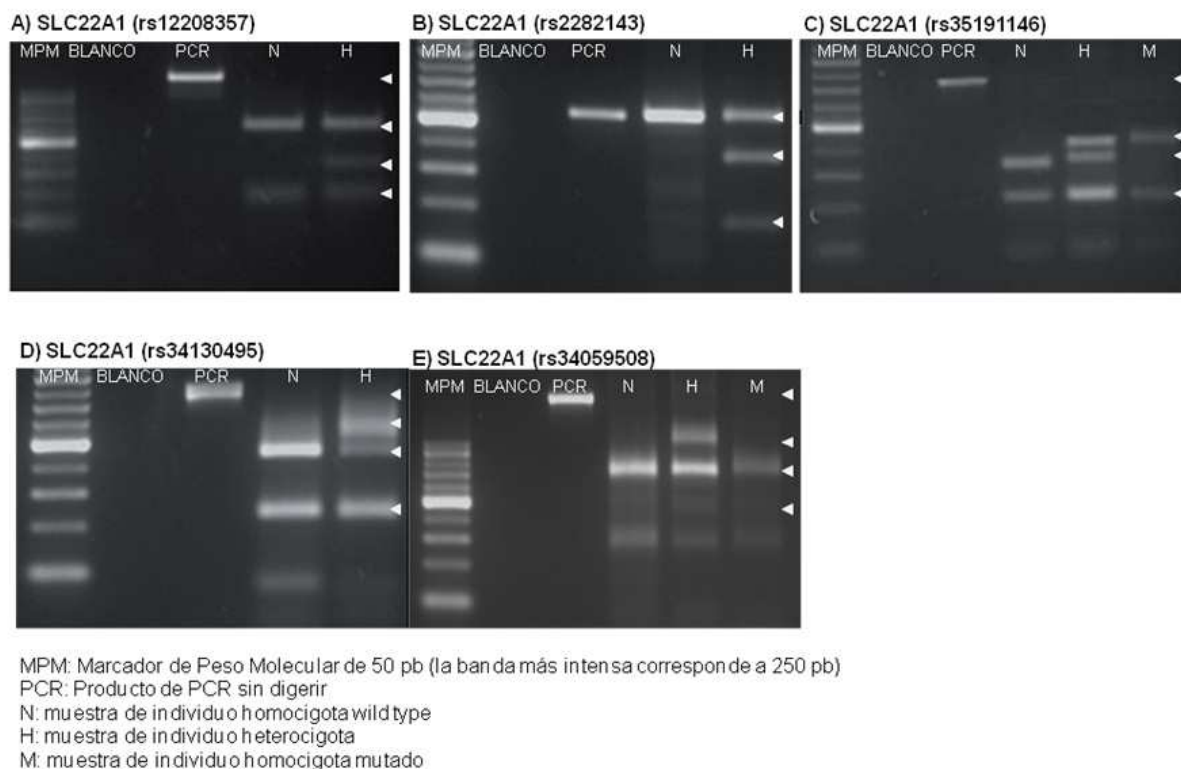
DE: Desviación Estándar

En la Figura 3 se pueden observar los resultados de electroforesis en geles de agarosa con muestras de ADN con genotipos homocigotas wild type, heterocigotas y, en el caso que se hayan encontrado, homocigotas mutadas, amplificadas mediante PCR y posterior digestión enzimática con las endonucleasas de restricción correspondientes (Tabla II) de los distintos polimorfismos estudiados, (A) rs12208357, B) rs2282143, C) rs35191146, D) rs34130495 y E) rs34059508) en el gen SLC22A1. Como se puede observar, luego de la digestión enzimática, cada polimorfismo presenta fragmentos de distintos tamaños (señalados con Flechas Blancas) permitiendo así la distinción del genotipo (mencionados en la Tabla II).

En cada carril en las electroforesis en geles de agarosa se pueden observar (de izquierda a derecha):

- Marcador de Peso Molecular (MPM) de 50 pb
- Blanco de Reacción
- Producto de PCR sin digerir (fragmentos mencionados en la Tabla I)
- Producto de PCR de un individuo Homocigota Wild Type (N)
- Producto de PCR de un individuo Heterocigota (H)

- Producto de PCR de un Homocigota Mutado (M) (solamente C y E)



**Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa al 2,5% P/V de los productos de PCR para cada polimorfismo digeridos con la enzima de restricción correspondiente (Estudio farmacogenética de la metformina).**

Para determinar la aleatoriedad de la población estudiada, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos para ver si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla IV).

**Tabla IV. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos en el gen SLC22A1**

	Frecuencia Genotípica (n/frecuencia)						Frecuencia Alélica		HWE	
	wt/wt		wt/mut		mut/mut		wt	mt	X <sup>2</sup>	valor p
rs12208357	92	0,89	11	0,11	0	0,00	0,95	0,05	0,33	0,57
rs2282143	98	0,95	5	0,05	0	0,00	0,98	0,02	0,06	0,80
rs35191146	65	0,63	36	0,35	2	0,02	0,81	0,19	1,41	0,24
rs34130495	86	0,83	15	0,15	2	0,02	0,91	0,09	1,75	0,19
rs34059508	92	0,89	10	0,10	1	0,01	0,94	0,06	1,37	0,24

n: Número de pacientes; wt: alelo salvaje (wild type); mut: alelo mutado; HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg



Como se puede observar en la Tabla IV, en la población estudiada las frecuencias de los alelos mutados para los distintos polimorfismos fueron: 5% para el rs12208357; 2% para el rs2282143; 19% para el rs35191146; 9% para el rs34130495; y 6% para el rs34059508. Los genotipos de los diferentes polimorfismos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ), asegurando la aleatoriedad de la población estudiada.

Por otra parte, se analizaron si en los pacientes diabéticos medicados con metformina, la presencia de los polimorfismos rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495 y rs34059508 en el gen SLC22A1 estaban asociadas a los niveles más elevados de HbA1c (Tabla V).

**Tabla V. Relación entre los niveles de HbA1c y la presencia de los polimorfismos en el gen SLC22A1**

	HbA1c (%) (media, DE, n)		
	wt/wt	wt/mut+mut/mut	valor p
<b>rs12208357</b>	6,872 ± 0,1033 (92)	7,095 ± 0,3032 (11)	0,4823
<b>rs2282143</b>	6,904 ± 0,1000 (98)	6,748 ± 0,4894 (5)	0,7336
<b>rs35191146</b>	6,732 ± 0,1123 (65)	7,176 ± 0,1745 (38)	0,0273
<b>rs34130495</b>	6,846 ± 0,1074 (86)	7,147 ± 0,2296 (17)	0,2545
<b>rs34059508</b>	6,792 ± 0,09696 (92)	7,764 ± 0,3301 (11)	0,0018

DE: desviación estándar; n: Número de pacientes;

wt: alelo salvaje (wild type); mut: alelo mutado

Como se puede observar en la Tabla V, los pacientes con los alelos mutados de los polimorfismos rs35191146 y rs34059508 presentan niveles más elevados de HbA1c ( $p=0,0273$  y  $p=0,0018$ ). Los niveles de HbA1c fueron más elevados en los pacientes que presentaban los polimorfismos rs12208357 y rs34130495 aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,4823$  y  $p=0,2545$ , respectivamente).

Además, se analizaron si en los pacientes diabéticos medicados con metformina, la presencia estos polimorfismos estaban asociadas a niveles más elevados de glucemia en ayunas (Tabla VI).

**Tabla VI. Relación entre los niveles de glucemias y la presencia de los polimorfismos en el gen SLC22A1**

	Glucemia (mg%) (media, DE, n)		
	wt/wt	wt/mut+mut/mut	valor p
<b>rs12208357</b>	127,4 ± 3,060 (92)	135,5 ± 10,56 (11)	0,4028
<b>rs2282143</b>	128,8 ± 3,062 (98)	117,2 ± 8,749 (5)	0,3985
<b>rs35191146</b>	124,6 ± 3,482 (65)	134,6 ± 5,231 (38)	0,1041
<b>rs34130495</b>	127,8 ± 3,177 (86)	130,8 ± 7,995 (17)	0,7034
<b>rs34059508</b>	126,3 ± 3,099 (92)	144,6 ± 8,304 (11)	0,0546

DE: desviación estándar; n: Número de pacientes;

wt: alelo salvaje (wild type); mut: alelo mutado

En la Tabla VI se puede observar que los niveles de glucemia fueron más elevados en los pacientes que presentaban los polimorfismos rs12208357, rs35191146, rs34130495 y rs34059508, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,4028$ ;  $p=0,1041$ ;  $p=0,7034$  y  $p=0,0546$  respectivamente).

En resumen, en este estudio farmacogenético, los niveles séricos de HbA1c y de glucemia fueron más elevados en los pacientes con DM2 tratados con metformina que presentaban los alelos: T en el rs12208357, A en el rs34130495, la delección del nucleótido G en el rs35191146 y el alelo A en el rs34059508, pero solamente se observó diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de HbA1c en los pacientes que presentaban la delección del nucleótido G del rs35191146 y el alelo A en el rs34059508.

### 3.10 DISCUSIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica establecida mundialmente, con una cifra que afectaba a 451 millones de personas en todo el mundo en el año 2017 y tiene una proyección estimada para el año 2045 de 693 millones de pacientes, esta es una de las razones por la cual la Salud Pública está tan preocupada por la prevención y el tratamiento de esta patología.(30)

La metformina se ha usado en el tratamiento de la DM2 desde el año 1959, y se considera actualmente como el agente antidiabético oral de primera línea en la mayoría, si no en todas las guías clínicas sobre el tratamiento de la DM2.(31)

La medicación con Metformina es, sin duda, un agente hipoglucemiante eficaz, que generalmente reduce los niveles de HbA1c en aproximadamente 1,0 a 1,5 % en pacientes con DM2 (31). Sin embargo, la realidad demuestra que no todos los pacientes responden por igual al medicamento y que la efectividad puede verse afectada por la presencia de variaciones genéticas.(31)

A diferencia de las formas monogénicas de la diabetes, donde la información farmacogenética ha llevado a tratamientos más efectivos (por ejemplo, la terapia con sulfonilureas a corto plazo para los pacientes con diabetes causada por mutaciones en el gen KCNJ11(32), la presencia de polimorfismos en la secuencia del ADN y su posible uso como marcadores genotípicos en la DM2 todavía están lejos de tener una aplicación clínica rutinaria.(33)

El objetivo de la farmacogenética es maximizar la probabilidad de eficacia terapéutica y minimizar el riesgo de toxicidad del fármaco para lograr una terapia personalizada. La variación genética interindividual contribuye tanto a la susceptibilidad a desarrollar ciertas enfermedades como también a la respuesta a determinados fármacos (33). Aunque la farmacogenética no es una ciencia nueva, la aplicación en la práctica clínica no se ha llevado a cabo al mismo ritmo que avanza esta la ciencia, en especial en la Argentina.(34)

En esta tesis, se estudiaron cinco polimorfismos diferentes en el gen SLC22A1 (rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495 y rs34059508), el cual codifica a un transportador involucrado en la absorción hepática de la metformina, el

OCT1. La presencia de los polimorfismos anteriormente señalados, conllevan a una función reducida del transportador (33). Para ello, una población de 103 pacientes (44 hombres y 59 mujeres) con diagnóstico de DM2 tratados con 1.700 mg/día de Metformina fueron evaluados. La presencia de al menos un polimorfismo en el gen SLC22A1 pudo observarse en el 63 % de la población estudiada (Tabla IV).

Cuando se compararon las frecuencias de los alelos mutados con otras poblaciones caucásicas provenientes de la base de datos "1000genomes" ([www.internationalgenome.org](http://www.internationalgenome.org)), pudimos observar los siguientes valores a) alelo T del rs12208357 (población del presente estudio= 5,3% vs 1000genomes= 6,3%), b) alelo T del rs2282143 (2,4% vs 1,4%), c) delección del nucleótido G del rs35191146 (19% vs 10%), d) alelo A del rs34130495 (9,2% vs 2,5%) y e) alelo A del rs34059508 (5,8% vs 2%). Estas diferencias podrían deberse a la variación étnica que hay en la población estudiada, ya que la población argentina además de tener una gran historia de inmigrantes de origen caucásico (mayormente español e italiano), no podemos olvidarnos de la presencia de otras etnias, como pueden ser la nativa, medio oriente, etc.

En los trabajos desarrollados por Shu y sus colaboradores, se llevaron a cabo diferentes estudios para ver si el transportador OCT1 desempeña un papel importante en la acción de la metformina y si variantes del gen SLC22A1 tanto *in vitro* como *in vivo*, en ratones y en humanos tenían actividad transportadora reducida del fármaco (15,16). Evaluaron 15 polimorfismos diferentes, de los cuales 5 polimorfismos estaban asociados a una menor actividad del OCT1 con diferencias estadísticamente significativas (rs12208357  $p= 0,031$ , rs36103319  $p= 0,002$ , rs2282143  $p= 0,047$ , rs34130495  $p= 0,008$ , rs34059508  $p= 0,016$ ). (16)

En el trabajo realizado por el grupo de Zhou y sus colaboradores, en donde se estudiaron un total de 1.531 pacientes tratados con metformina, las variantes de rs12208357 y rs35191146 no afectaron la reducción inicial de HbA1c ( $p= 0,47$  y  $p=0,92$ , respectivamente), y llegaron a la conclusión de que las variantes de pérdida de función en el gen SLC22A1, es decir, rs12208357 y rs35191146, no atenúan la reducción de HbA1c lograda por la metformina en pacientes con DM2.(35)

En los pacientes con DM2 de nuestro estudio, hubo una tendencia a presentar niveles más elevados de glucemia y de HbA1c en aquellos sujetos que tenían el

alelo T del rs12208357, la delección del nucleótido G del rs35191146, el alelo A del rs34130495 y el alelo A del rs34059508, coincidiendo con los resultados obtenidos en los trabajos de Shu y colaboradores. Además, los pacientes con la delección del nucleótido G del rs35191146 y del alelo A del rs34059508 tenían valores más altos de HbA1c con significación estadística ( $p= 0,0273$  y  $p= 0,0018$ , respectivamente) respecto a los sujetos con los genotipos salvajes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con los alelos T del rs12208357, el alelo T del rs2282143 y el alelo A del rs34130495 cuando se analizaban los niveles de glucemia o HbA1c respecto a los sujetos con genotipos salvajes (Tabla V-VI).

También es importante descartar las diferencias observadas en las frecuencias de los alelos de diferentes poblaciones, como las encontradas en los estudios de Chen y sus colaboradores (36), en los que se identificaron variantes en el gen que codifica para OCT1 en el ADN de pacientes de origen chino y Japonés.(36)

### 3.11 BIBLIOGRAFÍA

1. Xie H-G, Frueh FW. Pharmacogenomics steps toward personalized medicine. *Per Med.* 2005;2(4):325–37.
2. Christensen MMH, Brasch-Andersen C, Green H, Nielsen F, Damkier P, Beck-Nielsen H, et al. The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Dec;21(12):837–50.
3. Rodríguez-Vicente AE, Lumbreras E, Hernández JM, Martín M, Calles A, Otín CL, et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics as tools in cancer therapy. *Drug Metab Pers Ther.* 2016;0(0).
4. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan 3;35(Database):D5–12.
5. van Schaik RH, IFCC Task Force on Pharmacogenetics: Prof. Dr. Maurizio Ferrari (IT), Prof. Dr. Michael Neumaier (GER), Prof. Dr. Munir Pirmohamed (UK), Prof. Dr. Henk-Jan Guchelaar (NL) PDR van S (NL). Clinical Application of Pharmacogenetics: Where are We Now? *EJIFCC.* 2013 Feb;24(3):105–12.
6. Guerrero F, Posada A, Caballero A, García G. Farmacogenética de Warfarina. *Rev Medica Sanitas.* 2009;12(2):8–12.
7. Yang P, Heredia VO, Beltramo DM, Soria NW. Pharmacogenetics and personalized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Int J Diabetes Dev Ctries.* 2016 Dec 16;36(4):508–18.
8. Varios. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Asoc Latinoam Diabetes.* 2006
9. Cristina Faingold M, Commendatore Secretarios V, Vázquez F, de Dios Expertos A, González C, Commendatore V, et al. Guías para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. Sociedad Argentina de Diabetes. Vol. 50, Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes. 2016.

10. Medicines E. WHO Model List of Essential Medicines. WHO Med. 2007
11. Sanchez-Rangel E, Inzucchi SE. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2017 Sep 2;60(9):1586–93.
12. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med*. 2002 Jul 2;137(1):25–33.
13. Zolk O. Disposition of metformin: variability due to polymorphisms of organic cation transporters. *Ann Med*. 2012 Mar;44(2):119–29.
14. Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, et al. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *J Hum Genet*. 2007 Jan;52(2):117–22.
15. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest*. 2007 May;117(5):1422–31.
16. Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, et al. Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5902–7.
17. Tzvetkov M V, Vormfelde S V, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehr D, et al. The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther*. 2009 Sep;86(3):299–306.
18. Tarasova L, Kalnina I, Geldnere K, Bumbure A, Ritenberga R, Nikitina-Zake L, 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 Sep;22(9):659–66.
19. Wang D-S, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Aug;302(2):510–5.

20. Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, Carlson EJ, Taylor TR, de la Cruz M, et al. Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5896–901.
21. Becker ML, Visser LE, van Schaik RHN, Hofman a, Uitterlinden a G, Stricker BHC. Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes mellitus. *Pharmacogenomics J*. 2009 Aug;9(4):242–7.
22. Hamwi A, Schweiger CR, Veitl M, Schmid R. Quantitative Measurement of HbA<sub>1c</sub> by an Immunoturbidimetric Assay Compared to a Standard HPLC Method. *Am J Clin Pathol*. 1995 Jul 1;104(1):89–95.
23. Richardson T. A Modification of the Trinder AutoAnalyzer Method for Glucose. *Ann Clin Biochem An Int J Biochem Lab Med*. 1977 Jan 1;14(1–6):223–6.
24. Lott JA, Turner K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin Chem*. 1975 Nov;21(12):1754–60.
25. Huang X-J, Choi Y-K, Im H-S, Yarimaga O, Yoon E, Kim H-S. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors (Basel)*. 2006;6(7):756.
26. Barbour HM. Enzymatic determination of cholesterol and triglyceride with the Abbott Bichromatic Analyser. *Ann Clin Biochem*. 1977;14(1):22–8.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory procedure manual: total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, and LDL-cholesterol. 2004;1–23.
28. Cockcroft DW, Gault H. Prediction of Creatinine Clearance from Serum Creatinine. *Nephron*. 1976;16(1):31–41.
29. Corporation P. Wizard® Genomic DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit.
30. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 8th Edition*. 2017;155.



31. Varios. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Rev Asoc Latinoam Diabetes. 2013
32. Pearson ER, Flechtner I, Njølstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, et al. Switching from Insulin to Oral Sulfonylureas in Patients with Diabetes Due to Kir6.2 Mutations. N Engl J Med. 2006 Aug 3;355(5):467–77.
33. Avery P, Mousa SS, Mousa S a. Pharmacogenomics in type II diabetes mellitus management: Steps toward personalized medicine. Pharmgenomics Pers Med. 2009 Jan;2:79–91.
34. Rodeiro I, Remírez-Figuero D, García-Mesa M, Dorado P, LLerena A, CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEF. Pharmacogenetics in Latin American populations: regulatory aspects, application to herbal medicine, cardiovascular and psychiatric disorders. Drug Metabol Drug Interact. 2012 Jan 1;27(1):57–60.
35. Zhou K, Donnelly LA, Kimber CH, Donnan PT, Doney ASF, Leese G, et al. Reduced-function SLC22A1 polymorphisms encoding organic cation transporter 1 and glycemic response to metformin: a GoDARTS study. Diabetes. 2009 Jun;58(6):1434–9.
36. Chen L, Takizawa M, Chen E, Schlessinger A, Segenthelar J, Choi JH, et al. Genetic polymorphisms in organic cation transporter 1 (OCT1) in Chinese and Japanese populations exhibit altered function. J Pharmacol Exp Ther. 2010 Oct;335(1):42–50.

# **CAPÍTULO 4**

# **RETINOPATÍA**

# **DIABÉTICA (RD)**

## 4.1 RESUMEN

La retinopatía diabética (DR) es uno de los trastornos crónicos de la retina relacionados con la diabetes y es una de las principales causas de ceguera en personas de edad trabajadora. Diferentes polimorfismos en muchos genes han sido asociados consistentemente con la Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP), la forma más avanzada de la enfermedad. La retinopatía diabética se define por la presencia de lesiones retinianas microvasculares, microaneurismas, hemorragias, exudados duros, exudados algodonosos, alteraciones intrarretinianas microvasculares y rosarios venosos. Con la evolución de la patología puede aparecer crecimiento de nuevos vasos sanguíneos anormales que con frecuencia conducen a la hemorragia vítrea y prerretiniana. Un 10 a 25% de los pacientes pueden tener retinopatía desde el momento del diagnóstico de la DM2.

El objetivo de esta parte del trabajo fue valorar la relación entre la presencia de marcadores genéticos con el desarrollo de retinopatía diabética y la clínica que presentan los pacientes con DM2.

**Materiales y Métodos:** 231 pacientes con DM2 (126 sujetos con RDP y 105 sujetos sin RDP) que asistieron al Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación Ver de Córdoba Capital con diagnóstico de DM2 participaron de este estudio. Se les realizó un examen oftalmológico completo que incluyó un examen externo del ojo y los anexos, sensibilidad de la pupila y examen biomicroscópico con una lámpara de hendidura. Se realizó el genotipado de variantes en los genes MTHFR (rs1801133), VEGF (rs699947 y rs35569394), bFGF (c.-553T>A), TCF7L2 (rs4753146), ECA (rs4646994) y CDKAL1 (rs4712527) mediante la técnica de PCR-RFLP.

**Resultados:** se encontró una asociación entre la variante G en el polimorfismo rs4712527 del gen CDKAL1 y menor riesgo a desarrollar RDP en la población analizada en los modelos Codominante (OR= 0,31 (0,17-0,57 IC 95%); p= 0,003), Dominante (OR= 0,34 (0,19-0,58 IC 95%); p=0,0001), Sobredominante (OR= 0,35 (0,20-0,64 IC 95%); p= 0,0004), y log-additivo (OR=0,49 (0,33-0,75 IC 95%); p=0,0006). No hubo diferencias significativas en el riesgo de desarrollar neovascularización retiniana entre pacientes sin RDP y pacientes con RDP respecto a la presencia de los polimorfismos estudiados.

Conclusiones: Nuestros hallazgos sugieren que el polimorfismo rs4712527 en el gen CDKAL1 podría estar involucrado en la protección contra el desarrollo de RDP en pacientes con DM2.

Palabras claves: Diabetes Mellitus tipo 2, polimorfismos, retinopatía diabética

## 4.2 COMPLICACIONES OFTALMOLÓGICAS

Dentro de las complicaciones microvasculares crónicas de la DM, las complicaciones oftalmológicas son de alta prevalencia y severidad en el paciente con DM, y es la segunda causa de ceguera en el mundo luego del glaucoma (1). La realización de un examen oftalmológico en el momento del diagnóstico de DM es de suma importancia ya que entre un 10 al 25% de los pacientes recién diagnosticados con DM ya tienen retinopatía. Entre un 20 y 80% de los pacientes las padecen a lo largo de la evolución de la enfermedad, por lo cual un control periódico es importante.(2)

La DM no solo puede afectar a todas las estructuras del globo ocular, sino también a aquellas de origen extraoculares, como es el caso de las neuropatías de los oculomotores, las neuritis del trigémino o del segundo par craneano.(3)

Las infecciones oftalmológicas siempre deben ser una consideración prioritaria en el paciente diabético, se han informado que las infecciones de los párpados, conducto nasolagrimal, conjuntiva y superficie corneal y queratitis infecciosa son más frecuentes en los pacientes con DM.(3)

En el estudio realizado por Ansali y colaboradores, se estudió un grupo de 938.440 personas sin DM, y 48.548 pacientes con DM, incluyendo un total de 3.273 pacientes con DM1 y 45.311 pacientes con DM2. Los pacientes con DM1 tenían más del 60% de probabilidad de contraer conjuntivitis que los que no tenían la enfermedad, mientras que las personas con DM2 tenían un riesgo 11 % mayor de infección ocular.(4)

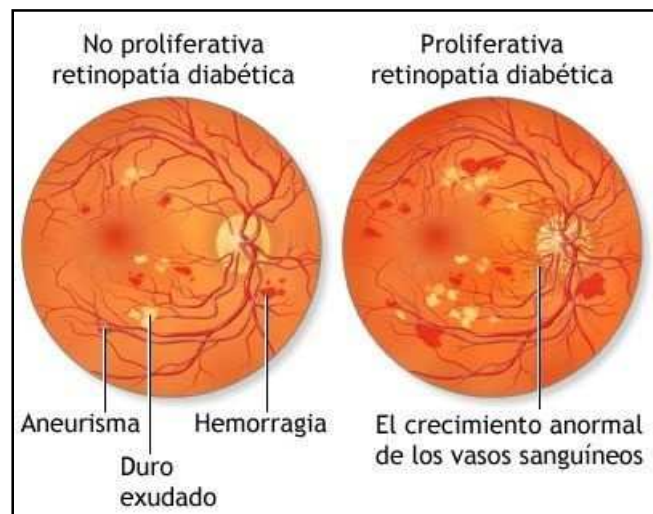
Dentro de las complicaciones oftalmológicas que pueden sufrir los pacientes con DM podemos mencionar.(2)

- Retinopatía diabética
  - Retinopatía No Proliferativa (RDNP)
  - Retinopatía Preproliferativa (RDPP)
  - Retinopatía Proliferativa (RDP)
  - Edema Macular Diabético (EMD)
- Maculopatía

- Catarata
- Glaucoma
- Lesiones de la córnea

### 4.3 RETINOPATÍA DIABÉTICA

La Retinopatía Diabética (RD) es una de las complicaciones microvasculares más comunes de la DM2. Se define por la presencia de lesiones retinianas microvasculares, las cuales incluyen microaneurismas, hemorragias, exudados duros, exudados algodonosos, alteraciones microvasculares intravasculares y rosarios venosos (observados en la RDNP), además de ello en la RDP hay crecimiento de nuevos vasos sanguíneos anormales (angiogénesis) que a menudo conducen a hemorragia vítrea y preretinal (Figura 4).(5)



**Figura 4. Diagrama de retinas con Retinopatía Diabética No Proliferativa y Retinopatía Diabética Proliferativa (Adaptado de la Asociación Macula-Retina, España. <http://www.macula-retina.es>)**

La RD es una de las principales causas de ceguera en la población trabajadora, la prevalencia en los pacientes con DM es del 34,6% y afecta a alrededor de 93 millones de adultos a nivel global.(6,7)

En el estudio UKPDS, se evidenció que la prevalencia de la RD es mayor en pacientes con DM1 (2,5 veces más frecuente), que en aquellos con DM2 y que amenaza la visión. A la inversa, la incidencia de edema macular se ha informado de hasta dos veces mayor entre las personas con DM2.(8)

En pacientes con DM1, alrededor del 25%-50% tienen signos de retinopatía después de 10-15 años, el 75% -95% a los 15 años, y 100% después de 30 años de evolución de la patología. De manera similar, los individuos con DM2 muestran una mayor incidencia de RD mientras mayor es la duración de la enfermedad.(9)

La RDNP se observa en el 23% de los pacientes con DM2 después de 11-13 años del comienzo de la patología. Este número aumenta al 41% con la RDNP después de 14-16 años y al 60% después de 16 años de evolución.(9)

El Estudio del Tratamiento Temprano de la Retinopatía Diabética (ETDRS, Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) fue un ensayo clínico aleatorizado, multicéntrico, diseñado para evaluar la fotocoagulación con láser de argón y el tratamiento con aspirina en el tratamiento de pacientes con RDNP, realizado desde el año 1999 al 2006. Un total de 3.711 pacientes fueron reclutados para ser seguidos durante un mínimo de 4 años para proporcionar información a largo plazo sobre los riesgos y beneficios de los tratamientos en estudio.(9)

El ETDRS clasifica a los pacientes con esta patología en (9):

- Retinopatía Diabética No Proliferativa (RDNP)
- Retinopatía Diabética Preproliferativa (RDPP)
- Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP)

### **4.3.1 Retinopatía Diabética No Proliferativa (RDNP)**

La RDNP, antes llamada retinopatía de fondo, es la etapa más temprana de la enfermedad ocular diabética. Se producen cambios a niveles microscópicos en los vasos sanguíneos del ojo, sin embargo, en las pruebas de agudeza visual los pacientes tienen una visión de 20/20 (visión normal) y los cambios generalmente no producen síntomas y no son visibles a simple vista, la única forma de detectar NPDR es a través del fondo de ojo, en el cual se pueden observar microaneurismas. La RDNP progresa de leve a moderada y grave.(5)

La RDNP se caracteriza inicialmente por microaneurismas (dilataciones de capilares) que pueden dañarse y filtrarse en la retina. Las manchas pequeñas o manchas de sangre pueden acumularse en la retina, pero generalmente no producen síntomas notables en las primeras etapas de la enfermedad. A medida que avanza la enfermedad, pueden producirse exudados duros (acumulaciones de líquido que se han escapado de los vasos sanguíneos), crecimientos anormales de los vasos sanguíneos microscópicos en la retina y sangrado de las venas que alimentan la retina.(5)

Aunque la RDNP no es en sí misma una condición que amenaza la visión, puede desencadenar edema macular o isquemia macular, que son otras complicaciones que pueden causar una rápida pérdida de la visión en cualquier etapa de la RDNP. Además, los cambios vasculares que se producen en la RDNP conducen a la isquemia retiniana (falta de flujo sanguíneo a la retina) y desencadenan la progresión a una enfermedad proliferativa que amenaza la visión. A medida que aumenta la gravedad de la RDNP, también aumenta el riesgo de desarrollar RDP que amenaza la visión.(5)

### **4.3.2 Retinopatía Diabética Preproliferativa (RDPP)**

La RDPP es una etapa más avanzada de daños en el ojo que los signos inicialmente encontrados en la RDNP. Una vez que esta etapa está presente, la



visión puede empeorar rápidamente si la progresión del daño no se monitorea y trata regularmente cuando progresa. Los cambios en la estructura ocular se documentan con fotografías de la retina o con una prueba de angiografía con fluoresceína más precisa. Los cambios en esta etapa incluyen anomalías microvasculares intrarretinianas (IRMA), dilataciones irregulares de los vasos sanguíneos de la retina en respuesta a la mala circulación sanguínea, y exudados algodonosos, áreas blancas pálidas en la retina donde los vasos sanguíneos se han bloqueado y los nervios se han dañado.(5)

### **4.3.3 Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP)**

En la RDP se puede observar neovascularizaciones, es decir, un crecimiento proliferativo de nuevos vasos sanguíneos anormales y este crecimiento puede ir fuera de la retina hacia el humor vítreo.(5)

Debido a la fragilidad de los vasos al crecer más allá de la estructura de soporte de la retina, los mismos pueden dañarse causando hemorragias, especialmente cuando ocurren cerca del disco, el área donde los vasos sanguíneos y los nervios entran en el ojo. Movimientos repentinos o incluso un aumento en la presión arterial puede causar la ruptura de uno de estos vasos anormales y causar una hemorragia.(5,10)

El sangrado en el vítreo detiene la transmisión de la luz al ojo y puede verse como manchas rojas, grises o negras en el campo visual. Si el sangrado es extenso, hay un ennegrecimiento rápido e indoloro de la visión, y al cabo de algunas semanas, la sangre se limpia lentamente de la cavidad vítrea y la visión regresa. En ese momento, un oftalmólogo puede comenzar a ver la retina y usar tratamientos con láser para sellar los vasos dañados.(5,10)

Si se produce una hemorragia extensa o repetida, se puede formar tejido fibroso o cicatrización de la retina. Debido a la fragilidad de la retina, estas cicatrices pueden separar fácilmente la retina de la coroides. El desprendimiento de retina se puede ver como líneas onduladas o como un efecto de cortina que aparece en un

área de visión, produciendo así una mayor pérdida de la visión si la misma no se trata oportunamente.(5)

#### **4.3.4 Edema Macular Diabético (EMD)**

El edema macular diabético (EMD) es una acumulación de líquido en la mácula, parte de la retina que controla nuestras capacidades de visión más detalladas, debido al aumento de la presión ocular y la fuga de vasos sanguíneos causados por la RD. El EMD puede surgir en cualquier estadio durante la evolución de la RD. El EMD se presenta de dos formas: EMD focal, que se produce debido a anomalías en los vasos sanguíneos del ojo, y EMD difuso, que se produce debido a la edematización de los capilares de la retina.(5)

#### **4.4 FISIOPATOLOGÍA**

El riesgo a desarrollar RD u otras complicaciones microvasculares de la DM dependen principalmente de la duración de la evolución de la patología y de la hiperglucemia. Existen varios mecanismos patológicos propuestos por los cuales la diabetes puede conducir al desarrollo de la retinopatía. (10)

Dentro de ellos, la aldosa reductasa es la enzima inicial en la vía del poliol intracelular y está involucrada en el desarrollo de complicaciones de la diabetes. Esta ruta implica la conversión de glucosa en sorbitol. La hiperglucemia aumenta el flujo de glucosa a través de la ruta del poliol, lo que provoca la acumulación de sorbitol en las células. El estrés osmótico debido a la acumulación de sorbitol se ha postulado como un mecanismo subyacente en el desarrollo de complicaciones microvasculares diabéticas, incluida la RD. En modelos animales, la acumulación de glucosa se ha relacionado con la formación de microaneurismas, el engrosamiento de las membranas basales y la pérdida de pericitos.(10)

También, las glicoproteínas que se depositan en las paredes vasculares producen daño en las células, las altas concentraciones de glucosa pueden promover la formación no enzimática de productos finales de glicación (AGES). En modelos animales, estos AGES se han asociado con la formación de microaneurismas y pérdida de pericitos. (10,11)

El estrés oxidativo también puede desempeñar un papel importante en el daño celular causado por la hiperglucemia. La hiperglucemia puede estimular a la producción de radicales libres y a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los estudios en animales han sugerido que el tratamiento con antioxidantes, como la vitamina E, pueden atenuar algunas disfunciones vasculares asociadas con la diabetes, pero aún no se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes altere el desarrollo o la progresión de la retinopatía u otras complicaciones microvasculares.(10)

Distintos factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la hormona del crecimiento y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), desempeñan funciones importantes en el desarrollo de la RD. La producción de VEGF aumenta en la RD, posiblemente en respuesta a la hipoxia. En modelos animales, la supresión de la producción de VEGF se asocia con una menor progresión de la retinopatía.(5,10)

#### **4.5 EXAMEN OFTALMOLÓGICO**

El control de los ojos es de suma importancia para el paciente diabético, el médico oftalmólogo puede detectar de manera temprana cambios en la visión del paciente si se realizan exámenes oftalmológicos regularmente. Esto es importante ya que en las etapas iniciales de la RD, los pacientes no tienen síntomas ni causan cambios en la visión, por ello el médico oftalmólogo recurre a una serie de exámenes y técnicas para el diagnóstico.(2)

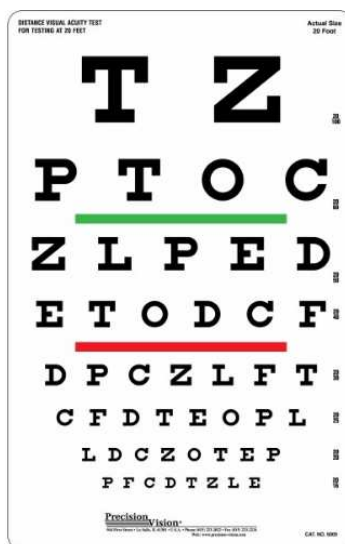
### 4.5.1 Agudeza visual

Una prueba de agudeza visual es un examen ocular que verifica la capacidad para discernir las formas y detalles de las cosas que ve el paciente. Siempre debe tenerse en cuenta que es necesario evaluar la agudeza visual cuando el paciente está compensado metabólicamente, ya que la hiperglucemia produce cambios reversibles en la refracción de la luz.(2)

Para la realización de la prueba mencionada anteriormente, el paciente observa la Gráfica de Snellen (Figura 5) la cual presenta varias líneas de letras mayúsculas de distintos tamaños. La primera línea consta de letras grandes, y las filas subsiguientes disminuyen de tamaño y aumento el número de letras. El paciente se cubre un ojo a una distancia predeterminada y lee en voz altas las letras de cada fila. La fila más pequeña que puede leer con precisión indica la agudeza visual de ese ojo.(2)

La agudeza visual se expresa como una fracción, una visión de 20/20 (considerada visión normal) significa que su agudeza visual a 20 pies (6 metros, donde 1 pie equivale a 30,48 cm) de distancia de un objeto es normal. Si tiene una visión de 20/40, por ejemplo, eso significa que debe estar a 20 pies de distancia para ver un objeto que las personas normalmente pueden ver desde 40 pies de distancia.(2,5)

Tener una visión 20/20 no significa necesariamente tener una visión perfecta, solo indica la claridad o claridad de la visión a distancia. Otras habilidades de visión importantes, como la percepción periférica o la visión lateral, la coordinación ocular, la percepción de profundidad, la capacidad de enfoque y la visión del color, contribuyen a la capacidad de visual general.(2)



**Figura 5. Gráfica de Snellen para la prueba de agudeza visual (Adaptado de “Precision-Vision”, Estados Unidos)**

#### **4.5.2 Fondo de ojo con pupila dilatada**

El examen del fondo de ojo dilatado es un procedimiento de diagnóstico que usa gotas para el ojo midriático (como la tropicamida) para dilatar la pupila a fin de obtener una mejor vista del fondo del ojo. Una vez que la pupila está dilatada, mediante el uso de la oftalmoscopia para ver el interior del ojo, permite la evaluación de la retina, la cabeza del nervio óptico, los vasos sanguíneos y otras particularidades.(5)

Las pruebas de agudeza visual por sí solas no son suficientes para detectar la RD en sus etapas iniciales, ya que en ella no hay reducción de la visión. La prevención de la ceguera debida a la RD se basa en la detección temprana de la enfermedad asintomática mediante un examen exhaustivo.(5)

El fondo de ojo puede examinarse mediante oftalmoscopia, utilizando una lámpara de hendidura y una lente de contacto o una lente 78D, o mediante fotografía de retina. Se ha demostrado que la fotografía de fondo es el medio más preciso para detectar la retinopatía.(5)

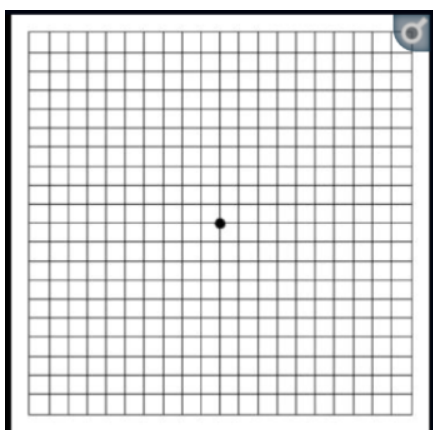
### 4.5.3 Tonometría

La tonometría es una prueba de diagnóstico que mide la presión intraocular. Esta medición permite determinar el riesgo de glaucoma. El glaucoma es una enfermedad ocular en la que hay una mayor presión de líquidos dentro del ojo. Este aumento de presión puede dañar al nervio óptico y causar ceguera.(5)

La tonometría puede detectar cambios en la presión ocular mucho antes de que el paciente pueda notarlo. La prueba de tonometría gold estándar es la prueba de tonometría de aplanación de Goldmann.(5)

### 4.5.4 Rejilla de Amsler

La rejilla de Amsler (Figura 6) es una herramienta utilizada para detectar problemas de visión que resultan del daño que presenta la mácula o el nervio óptico, el paciente mira con un ojo el punto central de la rejilla e informa como ve esas líneas. El daño puede ser causado por la degeneración macular u otras enfermedades oculares. Un diagnóstico temprano permite ayudar a limitar o al menos reducir la pérdida de visión que experimentan los pacientes.(4)



**Figura 6. Rejilla de Amsler (12)**

#### **4.5.5 Angiografía con fluoresceína**

En la prueba de angiografía con fluoresceína (AF) se inyecta un colorante de fluoresceína en un vaso sanguíneo en el brazo y se toman fotografías de la retina para detectar la pérdida de colorante de fluoresceína en los vasos sanguíneos dañados.(5)

La AF es el gold estándar para evaluar la vasculatura retiniana, la parte de la retina más afectada por la diabetes y es una técnica de imagen importante en la evaluación de la RDNP y RDP.(5)

En los pacientes con RD, las imágenes de AF pueden mostrar microaneurismas, que se manifiestan como áreas puntiformes de hiperfluorescencia. Las áreas irregulares de hipofluorescencia pueden significar isquemia de los capilares retinianos no perfundidos. Se puede observar un aumento en la zona avascular foveolar debido a la isquemia macular utilizando la AF, lo que puede ayudar a explicar la pérdida de visión en algunos pacientes diabéticos.(5)

La visualización de la fuga de tinte de fluoresceína a lo largo del tiempo es útil para mostrar la ruptura de la barrera retiniana en la sangre. La neovascularización retiniana en el EMD pueden causar una fuga de fluoresceína, y la AF es una prueba útil para confirmar el diagnóstico de neovascularización del disco y otras partes de la RDP.(5)

#### **4.5.6 Tomografía de Coherencia Óptica (OCT)**

La tomografía de coherencia óptica (OCT, Optical Coherence Tomography) es una prueba de imagen no invasiva, en donde se utilizan ondas de luz para tomar imágenes de la sección transversal de la retina, permitiendo la observación de las capas distintivas de la retina. Esto le permite al oftalmólogo hacer un mapa y medir su grosor, los cuales ayudan con el diagnóstico y propician una orientación terapéutica.(5)

## **4.6 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA**

El control óptimo de la glucemia y de la presión arterial han demostrado ser de gran utilidad en la prevención primaria y secundaria de la retinopatía diabética. El hábito tabáquico, la hipertensión arterial y las dislipidemias son patologías asociadas frecuentemente, las cuales incrementan el riesgo de morbilidad ocular.(2)

Según el criterio del oftalmólogo, se pueden recurrir a distintos tratamientos:

### **4.6.1 Tratamientos anti-Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)**

Los medicamentos anti-Factor de crecimiento vascular endotelial (anti Vascular Endothelial Growth Factor) ayudan a reducir el edema macular, disminuyendo la pérdida de visión y mejorando la visión. Este medicamento se administra mediante inyecciones intravitreales. Otra opción para reducir el edema macular es la son los antiinflamatorios corticoesteroides (dexametasona), también administrada como inyecciones intravitreales.(13)

El tratamiento se realiza con anticuerpos monoclonales como el Bevacizumab (Avastin), derivados de anticuerpos tales como Ranibizumab (Lucentis), o pequeñas moléculas orales disponibles que inhiben las tirosinas quinasas estimuladas por VEGF: Lapatinib (Tykerb), Sunitinib (Sutent), Sorafenib (Nexavar), Axitinib y Pazopanib.(13)

### **4.6.2 Fotocoagulación laser**

La terapia con láser en la retina es beneficiosa para minimizar la pérdida de líquido de los vasos sanguíneos que se escapan hacia la mácula, mediante la cauterización de los vasos con pérdidas. En el estudio ETDRS demostró que la terapia con láser en la retina, aplicada a la mácula, reduce el riesgo de



empeoramiento de la visión (por edema macular diabético) en un 50% si se realiza de manera oportuna, incluso en pacientes que tienen una visión excelente cuando se les diagnostica.(14)

Además, la terapia con láser causa la regresión (encogimiento) de los vasos sanguíneos anormales que se encuentran en la RDP. El ETDRS demostró que de uno a varios miles de quemaduras con láser aplicadas fuera de la mácula reduce el riesgo de pérdida severa de la visión debido a la RDP en un 50-75%, si se realiza de manera oportuna, incluso en pacientes con visión 20/20 en el momento del diagnóstico. Se cree que al sacrificar parte de la retina periférica, mediante quemaduras con láser, se desactivan los mensajeros químicos que causan la proliferación anormal de los vasos sanguíneos, protegiendo así la mácula y la visión de lesiones más graves debidas a RDP.(14)

Es importante entender que la terapia con láser en la retina no previene la RD, ni se usa para tratar la RD leve o moderada (para estas etapas menos graves, mejorar el control glucémico y la presión arterial son los pilares de un tratamiento eficaz); solamente se utiliza para tratar la RD que amenaza la visión, es decir, EMD, RDP; y, a veces las RDNP graves en personas con DM2. También es esencial saber que la terapia con láser en la retina para la RD funciona mejor solo cuando se realiza antes de perder la visión, idealmente antes de que el paciente tenga algún síntoma. (14)

La fotocoagulación con láser tiene efectos secundarios. Puede reducir la visión nocturna de un paciente o su capacidad para ver bien cuando se pasa de un entorno iluminado a uno oscuro (por ejemplo, en un cine). Puede causar una pérdida de la visión periférica o puntos ciegos en la visión central de una persona, dependiendo de dónde se colocan las quemaduras con láser. Las quemaduras con láser en sí mismas, pueden (rara vez) convertirse en un lugar para el desarrollo de vasos sanguíneos anormales debajo de la retina, lo que lleva a la pérdida de la visión. Finalmente, y lo más importante, a veces, la terapia con láser no funciona, y los pacientes pierden la visión a pesar de recibir un tratamiento oportuno.(14)

### **4.6.3 Vitrectomía**

La vitrectomía es un procedimiento quirúrgico para eliminar parte o la totalidad del humor vítreo. La vitrectomía anterior consiste en extraer pequeñas porciones del humor vítreo de las estructuras frontales del ojo, a menudo porque están enredadas en una lente intraocular u otras estructuras. La vitrectomía por pars plana es un término general para un grupo de operaciones realizadas en la parte más profunda del ojo, todas las cuales implican la eliminación parcial o total del humor vítreo.(14)

En caso de una PDR avanzada, se puede retirar el humor vítreo y la hemorragia causada por los vasos dañados en la retina. Esto permite que los rayos de luz se enfoquen correctamente en la retina nuevamente.(14)

## **4.7 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE RETINOPATÍA DIABÉTICA**

Se pueden mencionar distintos factores de riesgo al desarrollo de RD (2):

- Duración de la diabetes
- Diabetes precoz
- DM1
- Hiperglucemia
- Hipertensión Arterial (HTA)
- Dislipemia
- Embarazo
- Insuficiencia renal
- Susceptibilidad genética
- Cirugía de cataratas
- Tabaquismo

Factores como la duración de la enfermedad, el mal control metabólico y la HTA, han sido considerados responsables del comienzo y/o progresión a RD (15). El factor de riesgo primario es la duración de la diabetes, aumentando con los años de duración de la enfermedad, por esta razón una diabetes diagnosticada antes de la pubertad o antes de los 30 años se asocia con un mayor riesgo a desarrollar RD durante la vida del paciente.(5)

Sin embargo, estos factores no son completamente determinantes en la evolución y aparición de la RD. Se han estudiado múltiples factores que contribuyen a esta variabilidad en la expresión de la complicación ocular microvascular (16). Se ha propuesto que, además de los factores ambientales y metabólicos, la composición genética de los pacientes puede desempeñar un papel en dicha variabilidad.(16)

Estudios de gemelos y diversos ensayos clínicos, como el estudio de control y complicaciones de la diabetes (DCCT) sugieren que polimorfismos genéticos pueden desempeñar un papel importante en las manifestaciones de la RD, encontrando agrupaciones de familiares de RDP en la diabetes. Al respecto, sólo alrededor de la mitad del número de pacientes diagnosticados con RDNP evolucionó a la enfermedad proliferativa.(17)

#### **4.8 GENÉTICA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA**

La frecuencia y la severidad de la RD es muy heterogénea dentro y entre los distintos grupos étnicos, aun ajustando con distintos factores de riesgo como la duración de la diabetes y el control glucémico. Hay pacientes con muchos años de evolución de la patología y buen control glucémico sin RD, pero otros en condiciones similares manifiestan una RD severa.(18)

Los estudios clínicos en humanos con DM revelan una variación sustancial en el inicio y la gravedad de la retinopatía, que no se explica completamente por factores de riesgo conocidos, como son la duración de la enfermedad, control glucémico y la HTA. De hecho, en el ensayo clínico “Acción en Diabetes y Enfermedades Vasculares” (ADVANCE, Action in Diabetes and Vascular Disease),

donde se buscaba el control intensivo de la glucosa para reducir la hemoglobina glicosilada al 6,5% o menos, no tuvo ningún efecto sobre la incidencia de DR a 5 años.(18)

En el mismo estudio, la disminución de la presión arterial a niveles cercanos a lo normal no logró una reducción adicional en la progresión de la RD. Además, algunos pacientes con control glucémico deficiente o presión arterial no desarrollaron RD.(18)

Estos datos sugieren que los factores genéticos desempeñan un papel esencial en la susceptibilidad al desarrollo de esta complicación diabética tardía.(18)

Los factores genéticos pueden influir en la aparición o en la severidad de la RD. De hecho, se han reportado estimaciones de heredabilidad que van del 25% al 50% para la RDP. El estudio de gemelos idénticos también encontró una concordancia para RD (68 % en DM1 y 95 % en DM2) y en la cohorte de DCCT, la probabilidad de retinopatía grave era mayor cuando un familiar tenía retinopatía.(17)

La susceptibilidad genética al desarrollo de retinopatía también fue sugerida por los hallazgos en algunos estudios, donde una mayor prevalencia de retinopatía fue observada en ciertos grupos étnicos (19). En el Ensayo de Diabetes de Asuntos de Veteranos (VATS, Veterans Affairs Diabetes Trial), se encontró que la prevalencia de RD moderada a severa fue mayor para los hispanos y para los afroamericanos que para los blancos no hispánicos.(19)

#### **4.9 GENES CANDIDATOS**

Como se mencionó, los factores genéticos son uno de los pilares por donde se estudia esta, y otras, complicaciones. Existe una gran interacción entre genes (PAI-1, NAT1, VEGF, bFGF, eNOS3, ECA, MTHFR, TCF7L2, PPARG, CDKAL1, MnSOD) y factores ambientales / de comportamiento en el desarrollo de la DM2 y las complicaciones vasculares relacionadas. Muchos genes candidatos asociados a la presencia o evolución de la RD han sido identificados, los mismos no siempre han podido ser corroborados / replicados en todas las poblaciones estudiadas.(18–21)

En este trabajo de tesis se realizó una selección de genes candidatos, los cuales se encontrarían asociados al desarrollo de la RDP. Estos genes fueron seleccionados mediante un análisis bibliográfico previo donde los genes seleccionados mostraban estar asociados en otras poblaciones.

Los genes asociados al desarrollo de la RDP seleccionados fueron:

- Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)
- Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)
- Enzima convertidora de angiotensina (ECA)
- Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)
- Factor de transcripción 7 – tipo2 (TCF7L2)
- Proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKAL1)

#### **4.9.1 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)**

Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) son una subfamilia de factores de crecimiento que funcionan como proteínas de señalización tanto para la formación de novo del sistema circulatorio embrionario (vasculogénesis) como para el crecimiento de los vasos sanguíneos de la vasculatura preexistente (angiogénesis) (4,12). El VEGF se secreta principalmente a partir de células epiteliales pigmentadas de la retina, pericitos, astrocitos, células de Müller, células gliales y células endoteliales.(12)

La producción de VEGF se induce en respuesta a isquemia o hipoxia. La hipoxia tisular conduce a la producción de una proteína de unión al ADN llamada Factor Inducible por Hipoxia-1 (HIF-1). HIF-1 es una proteína heterodimérica básica de hélice-bucle que consiste en dos subunidades: la subunidad beta de HIF-1 expresada de forma constitutiva y la subunidad alfa de HIF-1 regulada por factores de crecimiento. Además de jugar un papel crucial en la producción de VEGF, HIF-1 también es responsable de la regulación positiva del gen de la eritropoyetina humana en las células hipóxicas, que es otra adaptación a la hipoxia tisular. HIF-1

se une al gen VEGF y comienza el proceso de transcripción (22). Esto conduce a la generación y acumulación de ARNm de VEGF tanto por el aumento de la transcripción del ARNm como por la disminución de la degradación del mismo, lo que finalmente conduce a la acumulación intracelular de moléculas de VEGF. Una proteína chaperona llamada Proteína Regulada por el Oxígeno, de 150 kDa (ORP150), es responsable de la transferencia de VEGF desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi. La expresión de ARNm de ORP150, también es inducida por la hipoxia.(22)

Todos los miembros de la familia VEGF estimulan las respuestas celulares al unirse a los receptores de tirosina quinasa en la superficie de las células endoteliales, lo que lleva a la dimerización y activación a través de la transfosforilación. VEGF-A tiene dos tipos de receptores, el receptor tipo 1 de VEGF (VEGFR-1 o Flt-1) y el de tipo 2 (VEGFR-2 o KDR). En los seres humanos, VEGFR-1 es una proteína que está codificada por el gen Flt-1 y VEGFR-2 es un receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR, una tirosina quinasa de tipo III) codificada por el gen KDR. El VEGFR-2 es el receptor primario que media casi todas las respuestas celulares al VEGF-A.(22)

El VEGF es un factor importante en el desarrollo de la proliferación en la RD y EMD, ya que altera la permeabilidad de los capilares retinianos al aumentar la fosforilación de las proteínas involucradas en las uniones estrechas del epitelio. La inducción de VEGF activa a la Proteína Activada por Mitógeno (MAP), lo que resulta en la proliferación de células endoteliales.(22)

La proliferación y migración de las células endoteliales es seguida por la síntesis de las membranas basales para los capilares recién formados. La estabilidad de estos capilares se logra mediante el reclutamiento de pericitos y células del músculo liso que están reguladas por el Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF).(22)

El gen VEGF humano se encuentra en el cromosoma 6p21.3 y consta de 8 exones. Se sugiere que algunas variantes genéticas en el gen VEGF influyen en los niveles de expresión de la proteína VEGF (23). Varios estudios han demostrado que la expresión desregulada de VEGF está involucrada en la RD. Las variantes del gen

VEGF rs699947 (-2578 C / A)(24) y rs35569394 (I / D) (25) presentes en la región promotora del gen, podrían ser factores de riesgo para el desarrollo de RD. (25).

#### **4.9.2 Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)**

El Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF), también conocido como Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo 2 (FGF2), codificado por el gen FGF2 y presente en el cromosoma 4q28.1, traduce una proteína de 146 aminoácidos ampliamente expresada en tejidos, la cual desempeña un papel esencial en la mediación de la proliferación celular, el desarrollo y la migración de diversos procesos biológicos, incluido el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, el crecimiento de tumores y la angiogénesis.(26)

El bFGF es un potente factor de crecimiento para células endoteliales y del músculo liso, cuya proliferación está involucrada en procesos patológicos como la neovascularización. bFGF estimula la angiogénesis y tiene efectos antiapoptóticos. La expresión de bFGF está regulada positivamente en la DM y está involucrada en las complicaciones vasculares inducidas por la diabetes, como la RDP.(27)

La variante NC\_000004.12:g.122826208T>A, conocida como c.-553T>A, localizada en la región promotora del gen bFGF se asocia a PDR en pacientes caucásicos con DM2.(26–29)

#### **4.9.3 Enzima convertidora de angiotensina (ECA)**

El sistema renina-angiotensina (RAS) es un sistema hormonal involucrado en la regulación de la presión arterial, el volumen corporal extracelular y el equilibrio de sodio y potasio. La renina es una enzima secretada por las células del aparato yuxtaglomerular del riñón y cataliza la conversión de angiotensinógeno en angiotensina I, y ésta por la acción de la Enzima Convertidora de Angiotensina

(ECA), se convierte en angiotensina II produciendo la liberación de aldosterona desde el córtex de la glándula suprarrenal.(4)

El gen que codifica para ECA desempeña un papel clave en la modulación del tono vascular al hidrolizar la angiotensina I a angiotensina II, un potente vasoconstrictor en una forma dependiente de la concentración de sustrato. La angiotensina II se une al receptor de angiotensina tipo 1 (AT1), que desencadena una serie de acciones que producen vasoconstricción y, por lo tanto, un aumento de la presión arterial.(4)

La actividad de la ECA tiene una gran importancia desde el punto de vista biológico y clínico de la diabetes. Estudios han informado que los pacientes con RD tienen altos niveles circulantes de ECA, lo que implica que los niveles séricos elevados de ECA podrían ser un posible factor de riesgo para destruir el aparato vascular de la retina en sujetos con diabetes.(4,30,31)

El gen que codifica para ECA se encuentra en el cromosoma 17q23, y tiene un frecuente polimorfismo (rs4646994) de Inserción / Deleción (I / D), caracterizado por la presencia o ausencia de una secuencia Alu repetitiva de 287 pb en el intrón 16 de dicho gen. El polimorfismo D se asoció con los niveles circulantes más elevados de ECA y el aumento de la actividad plasmática y tisular de esta enzima.(30,32)

Debido al papel central de ECA, el polimorfismo I/D de la ECA se asocia al desarrollo de la RD, ya que tiene un efecto adverso sobre el flujo sanguíneo de la retina y la estructura vascular y también promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos en la retina, encontrándose numerosos estudios que han abordado el papel de esta variación en la etiología de la RD.(30)

#### **4.9.4 Metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)**

El gen de la Metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) codifica la síntesis de una enzima llamada MTHFR y es la enzima que cataliza el pasaje de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato permitiendo la transformación de



homocisteína a metionina, a través de la vía de remetilación, siendo este último un aminoácido esencial para el correcto funcionamiento del sistema biológico.(33)

Mutaciones en el gen MTHFR que se traduzcan en una actividad enzimática disminuida, producen hiperhomocisteinemia. La variante más común en el gen MTHFR, es una mutación puntual C677T (rs1801133), la cual produce una sustitución del aminoácido Alanina por Valina en la posición 222 de la cadena peptídica, que se traduce en una enzima con un 50% menos de actividad y un aumento de la termolabilidad de la misma.(33)

La hiperhomocisteinemia se ha asociado con la retinopatía diabética. El estudio Hoorn (The Hoorn Study) tuvo el objetivo de investigar la prevalencia y los factores de riesgo en la alteración del metabolismo de la glucosa, la diabetes y las complicaciones relacionadas con la diabetes en una población predominantemente caucásica (34). Además, observaba si las tasas de longevidad, inactividad física y obesidad aumentaban la prevalencia y los factores de riesgo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa. En este estudio, se asoció la hiperhomocisteinemia con retinopatía en sujetos con DM2, pero no en sujetos sin DM.(34)

En estudios *in vitro*, se observó que la hiperhomocisteinemia afecta la función nerviosa por efectos citotóxicos directos o por el daño oxidativo de las células endoteliales, lo que conduce a una arteriosclerosis oclusiva en vasos pequeños. Este daño macro y microvascular asociado con los niveles más altos de hiperhomocisteinemia en plasma podría estar asociado con la RD.(4)

También en los estudios *in vitro* de Maeda y colaboradores, se observó que la homocisteína aumentaba la expresión del VEGF en cultivos celulares mediante la activación de su transcripción, y como mencionamos anteriormente, el VEGF es un factor proangiogénico que desempeña un papel clave en el desarrollo y la progresión de la RD.(35)

#### 4.9.5 Factor de Transcripción 7 – Tipo2 (TCF7L2)

El Factor de Transcripción 7 – Tipo2 (TCF7L2) es un factor de transcripción presente en la vía de señalización de Wnt, la cual es una vía que regula aspectos cruciales de la determinación del destino celular, la migración celular, la polaridad celular, los patrones neurales y la organogénesis durante el desarrollo embrionario. Este factor se expresa en muchos tejidos, incluidos los islotes de Langerhans, tejido graso y en el hígado. La mayoría de las variantes de riesgo asociadas con DM2 analizadas por GWAS, parecen afectar la función del islote de Langerhans.(36)

El TCF7L2 es un miembro de la familia de los factores de transcripción (TCF) que puede producir un factor de transcripción bipartito junto con  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -catenina / TCF), que estimula la vía de señalización Wnt involucrada en el metabolismo de los lípidos y en la homeostasis de la glucosa.(36)

El papel de TCF7L2 en el metabolismo de la glucosa, se manifiesta en muchos tejidos, como el intestino, el cerebro, el hígado y el músculo esquelético. Sin embargo, TCF7L2 no regula directamente el metabolismo de la glucosa en las células  $\beta$  del páncreas, sino que regula el metabolismo de la glucosa en tejidos de los páncreas exócrino y hepáticos. El TCF7L2 tiene sitios de unión en el promotor del proglucagón y puede regular la expresión del péptido similar al glucagón (GLP-1), el cual estimula la secreción de glucosa inducida por la insulina y la proliferación celular  $\beta$ , y retrasa el vaciamiento gástrico.(36)

El polimorfismo rs7903146 presente en el gen TCF7L2 se ha asociado con la DM2, debido a su capacidad para regular la expresión de GLP-1(37). Estudios en humanos han demostrado que los portadores del alelo de riesgo T mostraban una respuesta más débil a la glucosa intravenosa y una tolerancia a la glucosa reducida estimulada por el GLP-1 en el estado de hiperglucemia. Además, el riesgo del alelo T podía afectar el procesamiento de la insulina al reducir la conversión de proinsulina en insulina. La disminución en la secreción y el procesamiento de la insulina conduce a un estado de hiperglucemia y progresión de la RD.(38)

#### **4.9.6 Proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKAL1)**

El gen que codifica para la Proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKAL1) traduce a una metiltiotransferasa que cataliza las modificaciones de 2-metilatio (m<sup>2</sup>) de varios sustratos, incluida la adición de m<sup>2</sup> a N<sup>6</sup>-treonil-carbamoil adenósido en la posición 37 del ARN de transferencia Lys (UUU).(39)

Esta modificación m<sup>2</sup> del ARNt Lys (UUU) estabiliza la interacción con el codón, permitiendo una traducción eficiente del codón AAG (ambos codones, AAA y AAG, reconocen al aminoácido Lisina). La relevancia que podría tener esta modificación es en el proceso de traducción, cuando se lee el ARNm de la insulina, el cual posee 2 aminoácidos lisina, ambos codificados por el codón AAG, y alteraciones en este mecanismo podría llevar a una síntesis anormal de la proteína. (39)

El gen CDKAL1 fue identificado como un gen de susceptibilidad para la DM2 a través de estudios de GWAS en distintas poblaciones europeas y asiáticas (40). Los individuos que portan el alelo G del rs7756992 del gen CDKAL1 se vieron asociados con DM2 y podrían tener alteraciones en la secreción de insulina, y por ende, un mayor riesgo a desarrollar DM2 y sus complicaciones.(40,41)

Varios polimorfismos del gen CDKAL1 se encuentran en las regiones intrónicas profundas (42), las cuales son regiones que no se conservan entre especies, ni contienen elementos reguladores predecibles (43). Las mutaciones en regiones intrónicas profundas con efectos patológicos no son frecuentes, pero en el estudio realizado por el grupo de Nozu y colaboradores, informaron un polimorfismo en la región intrónica profunda en el gen SLC12A3, el cual crea un sitio de splicing y conduce al Síndrome de Gitelman (44).

Varios polimorfismos en la región intrónica profunda del gen CDKAL1 han sido asociados con la DM2, rs4712523 (45), rs4712524, rs10440833 (46), rs6931514 (47), rs9465871 (48), rs9295474 (49), rs9356744, rs7773318 y rs9465994 (50).

También varios polimorfismos en la región intrónica profunda del gen CDKAL1 han sido estudiados para ver su asociación con las complicaciones diabéticas, en el trabajo realizado por Liu y sus colaboradores, quienes observaron que el alelo C del rs10946398 era un factor de riesgo para el desarrollo de RD en una población china (51). En el trabajo realizado por Lasram y colaboradores, sugirieron que el alelo G del rs7756992 tiene un efecto protector contra la nefropatía diabética en la población tunecina (52).

La variante rs4712527 del gen CDKAL1, la cual también se encuentra en la región intrónica profunda, fue estudiada por el grupo de Fu y colaboradores como posible polimorfismo asociado a complicaciones microvasculares, tanto en la RD como en nefropatía diabética (ND), pero en la población estudiada (china), no observaron asociación estadísticamente significativa.(53)

## **4.10 OBJETIVO ESPECÍFICO**

En base a los estudios mencionados previamente, el objetivo planteado en esta etapa fue:

- Valorar la asociación entre la presencia de diversos polimorfismos genéticos y la retinopatía diabética de pacientes con DM2.

## **4.11 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.11.1 Tipo de estudio**

Este es un estudio de tipo descriptivo y de carácter observacional, prospectivo y transversal.

### **4.11.2 Pacientes**

En este estudio se incluyó un total de 231 individuos con DM2 mayores de 21 años (126 pacientes con RDP y 105 pacientes sin RD) que asistieron al Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación Ver, de Córdoba Capital, para realizarse los análisis de control oftalmológico. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Oulton-Romagosa y el Ministerio de Salud de Córdoba y estuvo sujeto a los acuerdos establecidos en la declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados y su consentimiento fue obtenido.

#### **4.11.3.1 Criterios de inclusión**

- Individuos mayores a 21 años
- Pacientes con DM2 con más de 5 años de diagnóstico de la enfermedad

#### **4.11.3.2 Criterios de exclusión**

- Individuos menores de 21 años
- Pacientes sin DM2
- Pacientes con otro tipo de diabetes
- Mujeres embarazadas

#### **4.11.4 Muestras biológicas**

Las muestras analizadas consistieron en:

- Sangre entera tratada con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® K<sub>2</sub>-EDTA.
- Suero obtenido de sangre, obtenido por venipuntura en tubos BD Vacutainer® SST™ con gel separador y acelerador de la coagulación. La muestra se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se la centrifugó a 3.800 rpm por 10 minutos.
- Los pacientes se presentaron con 12 horas de ayuno.

## **4.11.5 Procedimientos**

### **4.11.5.1 Evaluación oftalmológica**

Un examen oftalmológico completo incluyó un examen externo del ojo y anexos, sensibilidad de la pupila y examen biomicroscópico con lámpara de hendidura.

Las mediciones de la presión intraocular se realizaron antes de la dilatación de la pupila utilizando un tonómetro de aplanación Goldmann (Haag-Streit AT 900, Koeniz, Suiza).

La evaluación también incluyó un examen oftalmoscópico indirecto dilatado (incluida la evaluación del segmento posterior y el vítreo, el nervio óptico, la vasculatura retiniana, la retina periférica y la mácula), fotografía de fondo de dilatación, todo realizado por especialistas en retina.

Se tomaron fotografías a color del fondo con imágenes estereoscópicas del disco óptico y la mácula a través de las pupilas dilatadas de cada paciente, utilizando una cámara digital de fondo (Zeiss Visucam Pro, Oberkochen, Alemania).

La tomografía de coherencia óptica (OCT) también se obtuvo al momento de la inscripción de los pacientes. Dos especialistas en retina determinaron nuevamente la presencia o ausencia de DR y clasificaron el estadio de la patología.

Se clasificaron en 2 formas extremas de pacientes con DM2 según la gravedad de la afección retiniana, siguiendo el sistema de clasificación gold standard para definir la gravedad de la DR, según el ETDRS. Un grupo incluyó pacientes que no mostraban signos de DR en absoluto, y el otro grupo incluyó pacientes con neovascularización retiniana con o sin tratamiento previo para la RDP.

#### **4.11.5.2 Formulario de preguntas**

Todos los pacientes completaron un cuestionario que reveló información esencial (edad y sexo), tabaquismo, estado de salud, uso de insulina y/o terapia con agentes orales antidiabéticos y cualquier antecedente de otras enfermedades sistémicas, y antecedentes de enfermedades familiares.

#### **4.11.5.3 Procesamiento de Muestras**

##### **4.11.5.3.1 Parámetros bioquímicos**

Los pacientes acudieron al laboratorio clínico después de un ayuno de 12 horas durante la noche y se obtuvieron muestras de sangre venosa. Las muestras de sangre venosa en ayunas se recolectaron para medir los parámetros bioquímicos, que se estudiaron como ensayos de seguimiento de rutina para pacientes diabéticos. Estas mediciones incluyeron glucosa en ayunas, hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol total, triglicéridos, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), determinadas por un sistema automatizado con reactivos para biomarcadores de rutina con un analizador Roche COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza).

Los detalles de las pruebas bioquímicas se encuentran descriptos en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina-“Parámetros Bioquímicos”).



#### **4.11.5.3.2 Extracción de ADN**

Se utilizó el kit "Wizard® DNA Purification Kit" (Cat. #A1120, Promega). Remitirse al protocolo presente en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina- "Extracción de ADN").

#### **4.11.5.3.3 Amplificación de los genes seleccionados para el estudio mediante PCR**

Los polimorfismos seleccionados para el estudio fueron los siguientes:

- rs699947 del gen VEGF
- rs35569394 del gen VEGF
- rs4646994 del gen ECA
- rs7903146 del gen TCF7L2
- rs1801133 del gen MTHFR
- c.-553T>A del gen bFGF
- rs4712527 del gen CDKAL1

La amplificación mediante PCR de los polimorfismos seleccionados fueron realizados mediante el protocolo presente en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina- "Amplificación del gen SLC22A1 mediante PCR"). Los primers utilizados se encuentran detallados en la Tabla VII.

**Tabla VII. Secuencia de primers y tamaños de amplificación obtenidos por PCR de los polimorfismos estudiados (Estudio Retinopatía Diabética)**

Polimorfismos	Secuencia del Primer (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)
<b>VEGF-rs699947</b>	F:AAAGACCTTGTCCCTGCTGC	730
	R:AAGGAACGTCTGTAGGCCAG	
<b>VEGF-rs35569394</b>	F:GAGGATGGGGCTGACTAGGTA	I: 388
	R:TACTTCTCCAGGCTCACAGC	D: 370
<b>ECA-rs4646994</b>	F:CTGGAGACCCCATCCTTTCT	I: 490
	R:GATGTGGCCATCACATTCGTCAGA	D:190
<b>TCF7L2- rs7903146</b>	F:GAGAGCTAAGCACTTTTTAGGTA	113
	R:CTGACATTGACTAAGTTACTTGC	
<b>MTHFR-rs1801133</b>	F:TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	198
	R:AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	
<b>bFGF-c.-553T&gt;A</b>	F:CTTTCTGCGTCGTCTAATTCCAG	170
	R:CCAAAAGACGAGGGGTACAA	
<b>CDKAL1-rs4712527</b>	F:GGGTGTGAGGATTGAAGTCGG	343
	R:AAACATTAGCCCCATCTCCCT	

pb: pares de base.

F: Forward / R: Reverse

Las PCR se realizaron de acuerdo a las siguientes condiciones de ciclado:

- a) Inicio: a 94° C por 2 minutos
- b) Desnaturalización: a 94° C por 50 segundos
- c) Hibridación: a 58° C por 50 segundos
- d) Extensión: a 72° C por 1 minuto
- e) Elongación Final: a 72° C por 5 minutos
- f) Conservación: a - 20° C

Se repitieron cíclicamente las fases b-c-d por 35 veces.

Se utilizó un termociclador Biometra UNO II® (Göttingen, Alemania).

#### 4.11.5.3.4 Digestión Enzimática de los productos de PCR amplificados

A los productos de PCR amplificados (15 µl) se les realizó la digestión enzimática con las endonucleasas de restricción correspondientes según las condiciones detalladas en la Tabla VIII.

**Tabla VIII. Endonucleasas de restricción, reactivos y condiciones utilizadas y tamaños de los fragmentos de restricción esperados a partir de los productos obtenidos de los polimorfismos estudiados (Estudio Retinopatía Diabética)**

Polimorfismos	Endonucleasa de Restricción	Buffer	Temperatura y Tiempo de Incubación	Tamaño del Fragmento digerido (pb)	
	Volumen (µl)	Volumen (µl)		N	M
<b>VEGF-rs699947</b>	Enzima BstYI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® Buffer 2.1 (10x, Biolabs™)	60° C	321, 269 y 140	590 y 140
	0,3	1,7	3 horas		
<b>VEGF-rs35569394</b>	Enzima Sau96I (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® CutSmart (10x, Biolabs™)	37° C	152, 123 y 113	257 y 113
	0,3	1,7	3 horas		
<b>TCF7L2-rs7903146</b>	Enzima RsaI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® CutSmart (10x, Biolabs™)	37° C	91 y 22	113
	0,3	1,7	3 horas		
<b>MTHFR-rs1801133</b>	Enzima HinfI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® CutSmart (10x, Biolabs™)	37° C	198	23 y 175
	0,3	1,7	3 horas		
<b>bFGF c.-553T&gt;A</b>	Enzima BseNI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® Buffer 3.1 (10x, Biolabs™)	65° C	18 y 152	170
	0,3	1,7	3 horas		
<b>CDKAL1-rs4712527</b>	Enzima AluI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® CutSmart (10x, Biolabs™)	37° C	189, 26 y 128	189 y 154
	0,3	1,7	3 horas		

N: alelo normal, M: alelo mutado, pb: pares de base.

#### 4.11.5.3.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para la electroforesis en gel de agarosa se utilizó el protocolo descrito en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina -“Electroforesis en gel de agarosa”).

#### 4.11.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) y se realizó un modelo de regresión logística múltiple para obtener los odds ratios (ORs), considerando una diferencia significativa a un valor de  $p < 0,05$ , con un Intervalo de Confianza (IC) del 95 %.(52)

Para el análisis estadístico se utilizaron los modelos de herencia codominante, dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo.

1. Modelo codominante: Supone que cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se consideran los tres genotipos por separado suponiendo que cada uno proporciona un riesgo de enfermedad diferente.(53)
2. Modelo dominante: Supone que una única copia del alelo mutado es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, los heterocigotos y homocigotos mutados tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos salvajes.(53)
3. Modelo recesivo: Supone que son necesarias 2 copias del alelo mutado para modificar el riesgo; por lo tanto, los heterocigotos y homocigotos salvajes tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo mutado.(53)
4. Modelo sobredominante: Supone que el genotipo heterocigoto tienen el mayor riesgo, y se compara los homocigotos (salvajes y mutados) contra los heterocigotos.(53)

5. Modelo log-aditivo: Supone que cada copia del alelo mutado modifica el riesgo en una cantidad aditiva; por tanto, los homocigotos mutados tienen el doble de riesgo que los heterocigotos. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos y peso 2 a los homocigotos mutados.(53)

Las frecuencias genóticas y alélicas fueron calculadas y comparadas para ver si estaban en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg, para determinar la aleatoriedad de la población estudiada.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el uso de la prueba para calcular el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y t de Student, considerando una diferencia significativa a un valor de  $p < 0,05$ .

El software utilizado para el tratamiento de los datos estadísticos fue el Infostat (versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## 4.12 RESULTADOS

Para el estudio de variantes genéticas asociadas a la RD, la población del estudio consistió en 231 pacientes con DM2, 126 pacientes Con RPD (C/RDP) y 105 pacientes con Sin RD (S/RD).

En la Tabla IX se muestran las características clínicas y bioquímicas de los individuos clasificados según la presencia o ausencia de la RDP (S/RD y C/RDP). En la población estudiada hay una diferencia significativa en la proporción de hombres y mujeres, con un mayor número de mujeres en el grupo S/RD (81 mujeres y 24 hombres) que en el grupo C/RDP (36 mujeres y 90 hombres).

Mientras que el promedio de edades entre los dos grupos fueron similares, se observó que los pacientes C/RDP tenían más años de duración de diabetes, pero también su edad de comienzo fue más temprana. La mayor parte de los pacientes presentaban HTA, reflejándose en valores aumentados de presión sistólica (mayor a 120 mmHg).

Cuando se analizaron los parámetros bioquímicos de los individuos, se observó que en la población estudiada los niveles de HbA1c y glucemia se encontraban elevados respecto a los valores normales (HbA1c: 4,8-6% y glucemia: 70-110 mg%). Cuando se analizó el perfil lipídico de los pacientes se pudieron observar que los niveles de colesterol total y trigliceridemia se encontraban en los valores normales (CT: menor a 200 mg/dL y TG: menor a 150 mg/dL), como así también el colesterol HDL y colesterol LDL (colesterol HDL: 35-55 mg/dL y colesterol LDL: menor a 150 mg/dL).

Los resultados de la Tabla IX se analizaron estadísticamente para los pacientes S/RD y C/RDP; donde se observaron diferencias estadísticamente significativas en la duración de la diabetes ( $p < 0,0001$ ), el tiempo de aparición de la diabetes ( $p = 0,0001$ ) y también los niveles de HbA1c ( $p = 0,035$ ). Mayor número de pacientes C/RDP estaban siendo tratados con insulina ( $p < 0,0001$ ). Finalmente, el IMC fue significativamente mayor en el grupo S/RD en comparación con el grupo C/RDP ( $p = 0,04$ ).

**Tabla IX. Parámetros clínicos, bioquímicos y estilos de vida en la población estudiada (Estudio Retinopatía Diabética)**

	<b>S/RD (n= 105 )</b>	<b>C/RDP (n=126 )</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Sexo (F/M)</b>	81/24	36/90	<0,0001
<b>Edad (Años)</b>	67,29 ± 8,42	67,07 ± 6,36	0,9001
<b>Duración de la diabetes (Años)</b>	10,34 ± 6,68	19,52 ± 8,82	<0,0001
<b>Edad de comienzo de diabetes (Años)</b>	56,94 ± 9,04	47,55 ± 10,84	0,0001
<b>Hipertensión (Si/No)</b>	81/24	108/18	0,0926
<b>Fumador (Si/No)</b>	27/78	39/87	0,3802
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	31,69 ± 5,97	29,24 ± 3,58	0,0400
<b>Terapia con Insulina (Si/No)</b>	6/99	84/42	<0,0001
<b>Glucemia (mg %)</b>	120,46 ± 35,87	129,52 ± 41,03	0,3144
<b>HbA1c (%)</b>	7,02 ± 1,13	7,85 ± 1,24	0,0035
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	175,94 ± 39,31	186,64 ± 32,54	0,1992
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	154,14 ± 67,49	148,00 ± 51,58	0,6552
<b>HDL colesterol (mg/dl)</b>	48,37 ± 11,85	45,53 ± 11,82	0,3019
<b>LDL colesterol (mg/dl)</b>	108,60 ± 40,30	113,21 ± 41,96	0,6292
<b>Presión sistólica (mm Hg)</b>	126,57 ± 8,97	130,48 ± 11,99	0,119
<b>Presión diastólica (mm Hg)</b>	76,86 ± 10,68	76,90 ± 11,28	0,9851

Los datos están expresados como la media ± la desviación estándar (DE) o número de pacientes. Las diferencias entre los grupos de pacientes Sin Retinopatía Diabética (S/RD) y Con Retinopatía Diabética Proliferativa (C/RDP) fueron comparados usando el t test o el del Chi-cuadrado. IMC, índice de masa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad.

En la Figura 7 se pueden observar los resultados de electroforesis en geles de agarosa con muestras de ADN y, de ser necesario, posterior digestión enzimática con las endonucleasas de restricción correspondientes (Tabla VII) de los distintos polimorfismos estudiados, (A) rs699947 y B) rs35569394 del gen VEGF, C) rs7903146 del gen TCF7L2, D) rs1801133 del gen MTHFR, E) c.-553T>A del gen bFGF, F) rs4712527 del gen CDKAL1 y G) rs4646994 del gen ECA). Como se puede observar, luego de la digestión enzimática, cada polimorfismo presenta fragmentos de distintos tamaños (señaladas con Flechas Blancas) permitiendo así la distinción del genotipo, el polimorfismo rs4646994 del gen ECA no requiere digestión enzimática, los fragmentos esperados se detallan en la Tabla VII.

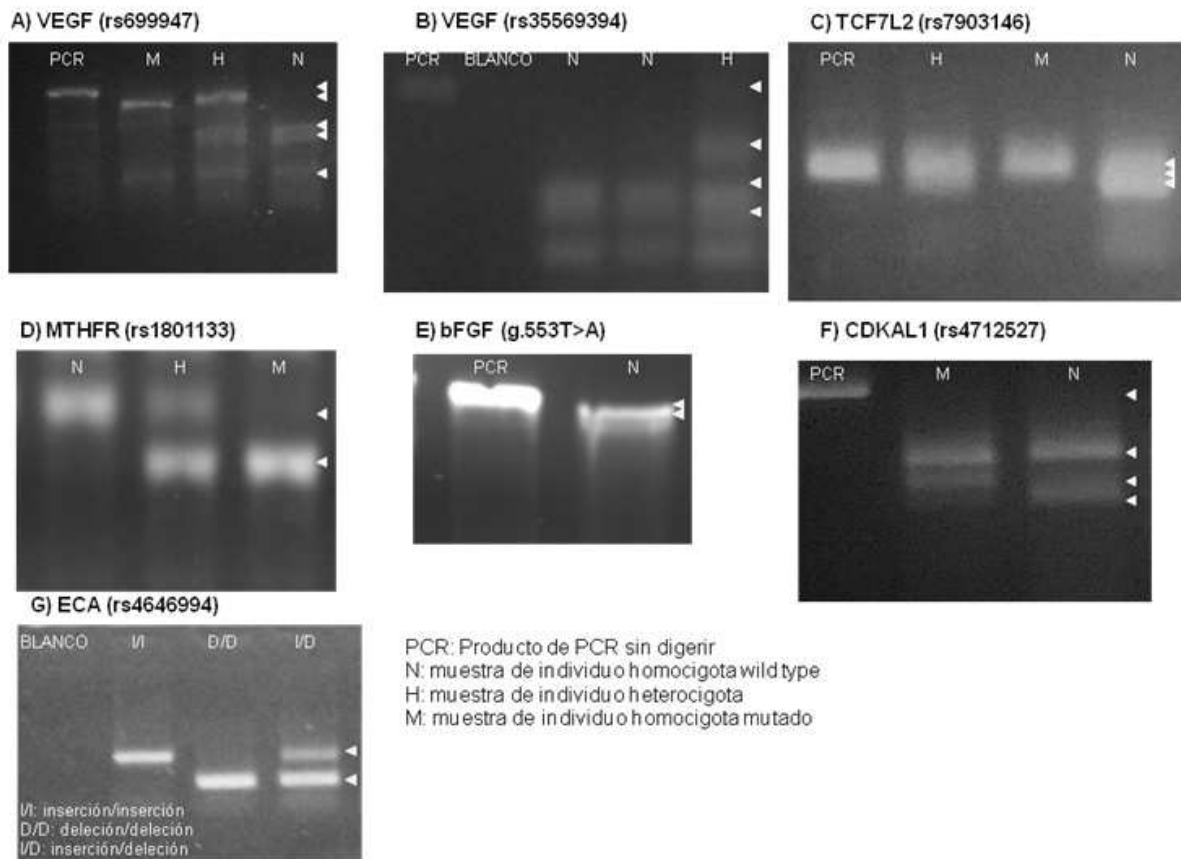
En cada carril en las electroforesis en geles de agarosa se pueden observar:

- Producto de PCR sin digerir (fragmentos mencionados en la Tabla VII)
- Blanco de Reacción (solamente B)
- Producto de PCR de un individuo Homocigota Wild Type (N)

- Producto de PCR de un individuo Heterocigota (H)
- Producto de PCR de un individuo Homocigota Mutado (M)

En la electroforesis en gel de agarosa para visualizar el rs4646994 del gen ECA (Figura 7- G) se puede observar:

- Blanco de Reacción
- Producto de PCR de un individuo con genotipo I/I
- Producto de PCR de un individuo con genotipo D/D
- Producto de PCR de un individuo con genotipo I/D



**Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa al 2,5% P/V de los productos de PCR para cada polimorfismo digeridos con la enzima de restricción, según correspondía (Estudio Retinopatía Diabética).**



Para determinar la aleatoriedad de la población estudiada, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos para ver si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla X).

Como se puede observar en la Tabla X al menos un SNP de cada gen analizado fue encontrado en los pacientes estudiados. En la población estudiada la frecuencia de pacientes con al menos 1 alelo mutado para los distintos polimorfismos fueron: 60% para el rs699947; 37% para el rs35569394; 10% para el rs1801133; 53% para el rs4646994; 36% para el rs7903146; 1% para el c.-553T>A; y 74% para el rs4712527. Los genotipos de los diferentes polimorfismos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ), asegurando la aleatoriedad de la población estudiada.

**Tabla X. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos estudiados**

	Frecuencia Genotípica (n/frecuencia)						Frecuencia Alélica		HWE
	wt/wt		wt/mut		mut/mut		wt	mt	valor p
<b>VEGF (rs699947)</b>	27	0,13	111	0,54	66	0,32	0,40	0,60	0,081
<b>VEGF (rs35569394)</b>	75	0,37	106	0,52	23	0,11	0,63	0,37	0,14
<b>MTHFR (rs1801133)</b>	188	0,81	38	0,16	5	0,02	0,90	0,10	0,079
<b>ECA (rs4646994)</b>	56	0,25	103	0,45	69	0,30	0,47	0,53	0,18
<b>TCF7L2 (rs7903146)</b>	101	0,44	93	0,40	37	0,16	0,64	0,36	0,063
<b>bFGF (c.-553 T&gt;A)</b>	201	0,99	3	0,01	0	0,00	0,99	0,01	1
<b>CDKAL1 (rs4712527)</b>	21	0,09	78	0,34	132	0,57	0,26	0,74	0,085

Wt: Wild type

Mut: mutado

n: número de pacientes

HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para el análisis de asociación entre los polimorfismos estudiados y la presencia o ausencia de RDP, se utilizó un modelo de regresión logística múltiple (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo) y en los casos donde se observaran diferencias significativas entre la presencia de variantes genéticas con la RDP, las variables fueron ajustadas según la duración de la

diabetes, edad de inicio de la misma, IMC, glucemia, tratamiento con insulina y niveles de HbA1c, para obtener los ORs ajustados con dichas variables.

El VEGF es un factor importante en el desarrollo de la proliferación de la RD. Se analizó la relación entre el SNP rs699947, ubicada en la zona promotora del gen, y la presencia de RDP (22) (Tabla XI).

**Tabla XI. Asociación del SNP rs699947 presente en el gen VEGF con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa**

Modelo	Genotipo	S/RD	C/RDP	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	C/C	27 (26,5)	30 (29,4)	1,00	0,78
	A/C	60 (58,8)	60 (58,8)	0,90 (0,48-1,69)	
	A/A	15 (14,7)	12 (11,8)	0,72 (0,29-1,81)	
Dominante	C/C	27 (26,5)	30 (29,4)	1,00	0,64
	A/C-A/A	75 (73,5)	72 (70,6)	0,86 (0,47-1,59)	
Recesivo	C/C-A/C	87 (85,3)	90 (88,2)	1,00	0,54
	A/A	15 (14,7)	12 (11,8)	0,77 (0,34-1,75)	
Sobredominante	C/C-A/A	42 (41,2)	42 (41,2)	1,00	1
	A/C	60 (58,8)	60 (58,8)	1,00 (0,57-1,75)	
Log-aditivo	---	---	---	0,86 (0,55-1,34)	0,50

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

S/RD, Sin Retinopatía Diabética; C/RDP, Con Retinopatía Diabética Proliferativa.

n: número de pacientes

%; porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo C/C del rs699947 del gen VEGF fue del 26,5% en los pacientes S/RD y 29,4% en los pacientes C/RDP; mientras que para genotipo A/A fue del 14,7% en los pacientes S/RD y 11,8% en los pacientes C/RDP; y para el genotipo A/C fue del 58,8% tanto para los pacientes S/RD como los pacientes C/RDP (Tabla XI).

En el análisis realizado entre el rs699947 del gen VEGF y la presencia de RDP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos estudiados: Codominante (OR= 0,90 (0,48-1,69); p=0,78), Dominante (OR= 0,86 (0,47-1,59); p=0,64), Recesivo (OR= 0,77 (0,34-1,75); p=0,54), Sobredominante (OR= 1,00 (0,57-1,75); p=1) y Log-aditivo (OR= 0,86 (0,55-1,34); p=0,50)(Tabla XI).

Otro SNP estudiado en el mismo gen fué el rs35569394, también ubicado en la zona promotora del gen (23). Se analizó la relación entre el SNP rs35569394 y la presencia de RDP (Tabla XII).

**Tabla XII. Asociación del SNP rs35569394 presente en el gen VEGF con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa**

Modelo	Genotipo	S/RD	C/RDP	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	D/D	36 (35,3)	39 (38,2)	1,00	0,87
	I/D	51 (50)	60 (58,8)	1,02 (0,45-2,27)	
	I/I	15 (14,7)	3 (2,9)	0,71 (0,16-3,05)	
Dominante	D/D	36 (35,3)	39 (38,2)	1,00	0,93
	I/D-I/I	66 (64,7)	63 (61,8)	0,96 (0,44-2,10)	
Recesivo	D/D-I/D	87 (85,3)	99 (97,1)	1,00	0,61
	I/I	15 (14,7)	3 (2,9)	0,70 (0,17-2,81)	
Sobredominante	D/D-I/I	51 (50)	42 (41,2)	1,00	0,84
	I/D	51 (50)	60 (58,8)	1,08 (0,51-2,32)	
Log-aditivo	---	---	---	0,91 (0,49-1,67)	0,76

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

S/RD, Sin Retinopatía Diabética; CRDP, Con Retinopatía Diabética Proliferativa.

n: número de pacientes

%: porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo D/D del rs35569394 del gen VEGF fue del 35,3% en los pacientes S/RD y 38,2% en los pacientes C/RDP; mientras que para genotipo I/I fue del 14,7% en los pacientes S/RD y 2,9% en los pacientes C/RDP; y para el genotipo I/D fue 50% en los pacientes S/RD y 58,8% en los pacientes C/RDP. (Tabla XII)

El análisis realizado entre el rs35569394 del gen VEGF y la presencia de RDP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos estudiados: Codominante (OR= 1,02 (0,45-2,27); p=0,87), Dominante (OR= 0,96 (0,44-2,10); p=0,93), Recesivo (OR= 0,70 (0,17-2,81); p=0,61), Sobredominante (OR= 1,08 (0,51-2,32); p=0,84) y Log-aditivo (OR= 0,91 (0,49-1,67); p=0,76) (Tabla XII).

La MTHFR es una enzima muy importante en el metabolismo del folato, la mutación causada por el rs1801133 traduce una proteína con actividad reducida causando hiperhomocisteinemia, la cual se encuentra asociada a RD (31). Se analizó si existe asociación entre la presencia del SNP rs1801133 y la RDP (Tabla XIII).

**Tabla XIII. Asociación del SNP rs1801133 presente en el gen MTHFR con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa**

Modelo	Genotipo	S/RD	C/RDP	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	C/C	87 (82,9)	114 (90,5)	1,00	0,200
	C/T	15 (14,3)	9 (7,1)	0,46 (0,19-1,10)	
	T/T	3 (2,9)	3 (2,4)	0,76 (0,15-3,87)	
Dominante	C/C	87 (82,9)	114 (90,5)	1,00	0,087
	C/T-T/T	18 (17,1)	12 (9,5)	0,51 (0,23-1,11)	
Recesivo	C/C-C/T	102 (97,1)	123 (97,6)	1,00	0,820
	T/T	3 (2,9)	3 (2,4)	0,83 (0,16-4,20)	
Sobredominante	C/C-T/T	90 (85,7)	117 (92,9)	1,00	0,077
	C/T	15 (14,3)	9 (7,1)	0,46 (0,19-1,10)	
Log-aditivo	---	---	---	0,64 (0,35-1,19)	0,150

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

S/RD, Sin Retinopatía Diabética; C/RDP, Con Retinopatía Diabética Proliferativa.

n: número de pacientes

%; porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo C/C del rs1801133 del gen MTHFR fue del 82,9% en los pacientes S/RD y 90,5% en los pacientes C/RDP; mientras que para genotipo T/T fue del 2,9% en los pacientes S/RD y 2,4% en los pacientes C/RDP; y para el genotipo C/T fue 14,3% en los pacientes S/RD y 7,1% en los pacientes C/RDP. (Tabla XIII)

En el análisis realizado entre el rs1801133 del gen MTHFR y la presencia de RDP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos estudiados: Codominante (OR= 0,46 (0,19-1,10); p=0,20), Dominante (OR= 0,51 (0,23-1,11); p=0,087), Recesivo (OR= 0,83 (0,16-4,20); p=0,82), Sobredominante (OR= 0,46 (0,19-1,10); p=0,077) y Log-aditivo (OR= 0,64 (0,35-1,19); p=0,15) (Tabla XIII).

La ECA es una enzima que cumple la función de hidrolizar la angiotensina I a angiotensina II y desempeña un papel clave en la modulación del tono vascular. Estudios han informado que los pacientes con RD tienen altos niveles circulantes de ECA, lo que implica que los niveles séricos elevados de ECA podrían ser un posible factor de riesgo para destruir el aparato vascular de la retina en sujetos con diabetes (5,28,29). El polimorfismo rs4646994 del ECA se asocia al desarrollo de la RD (28). Se analizó la relación entre el SNP rs4646994 y la presencia de RDP (Tabla XIV).

**Tabla XIV. Asociación del SNP rs4646994 presente en el gen ECA con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa**

Modelo	Genotipo	S/RD	C/RDP	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	D/D	39 (37,1)	30 (24,4)	1,00	0,85
	I/D	36 (34,3)	66 (53,7)	1,25 (0,53-2,97)	
	I/I	30 (28,6)	27 (21,9)	1,28 (0,47-3,51)	
Dominante	D/D	39 (37,1)	30 (24,4)	1,00	0,57
	I/D-I/I	66 (62,9)	93 (75,6)	1,26 (0,57-2,78)	
Recesivo	D/D-I/D	75 (71,4)	96 (78)	1,00	0,79
	I/I	30 (28,6)	27 (21,9)	1,13 (0,46-2,77)	
Sobredominante	D/D-I/I	69 (65,7)	57 (46,3)	1,00	0,75
	I/D	36 (34,3)	66 (53,7)	1,13 (0,53-2,43)	
Log-aditivo	---	---	---	1,14 (0,69-1,88)	0,61

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

S/RD, Sin Retinopatía Diabética; C/RDP, Con Retinopatía Diabética Proliferativa.

n: número de pacientes

%; porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo D/D del rs4646994 del gen ECA fue del 37,1% en los pacientes S/RD y 24,4% en los pacientes C/RDP; mientras que para genotipo I/I fue del 28,6% en los pacientes S/RD y 21,9% en los pacientes C/RDP; y para el genotipo I/D fue 34,3% en los pacientes S/RD y 53,7% en los pacientes C/RDP. (Tabla XIV)

En el análisis realizado entre el rs4646994 del gen ECA y la presencia de RDP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos estudiados: Codominante (OR= 1,25 (0,53-2,97); p=0,85), Dominante (OR= 1,26 (0,57-2,78); p=0,57), Recesivo (OR= 1,13 (0,46-2,77); p=0,79), Sobredominante

(OR= 1,13 (0,53-2,43); p=0,75) y Log-aditivo (OR= 1,14 (0,69-1,88); p=0,61) (Tabla XIV).

El TCF7L2 es un factor de transcripción que estimula la vía de señalización Wnt involucrada en el metabolismo de los lípidos y en la homeostasis de la glucosa. El polimorfismo rs7903146 se ha asociado con la DM2; la disminución en la secreción y el procesamiento de la insulina conduciría a un estado de hiperglucemia y progresión de la RD (36). Se analizó la relación entre el SNP rs7903146 y la presencia de RDP (Tabla XV).

**Tabla XV. Asociación del SNP rs7903146 presente en el gen TCF7L2 con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa**

Modelo	Genotipo	S/RD	C/RDP	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	C/C	57 (54,3)	54 (42,9)	1,00	0,140
	C/T	30 (28,6)	51 (40,5)	1,79 (1,00-3,22)	
	T/T	18 (17,1)	21 (16,7)	1,23 (0,59-2,56)	
Dominante	C/C	57 (54,3)	54 (42,9)	1,00	0,083
	C/T-T/T	48 (45,7)	72 (57,1)	1,58 (0,94-2,67)	
Recesivo	C/C-C/T	87 (82,9)	105 (83,3)	1,00	0,920
	T/T	18 (17,1)	21 (16,7)	0,97 (0,48-1,93)	
Sobredominante	C/C-T/T	75 (71,4)	75 (59,5)	1,00	0,058
	C/T	30 (28,6)	51 (40,5)	1,70 (0,98-2,96)	
Log-aditivo	---	---	---	1,22 (0,86-1,74)	0,260

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

S/RD, Sin Retinopatía Diabética; C/RDP, Con Retinopatía Diabética Proliferativa.

n: número de pacientes

%; porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo C/C del rs7903146 del gen TCF7L2 fue del 54,3% en los pacientes S/RD y 42,9% en los pacientes C/RDP; mientras que para genotipo T/T fue del 17,1% en los pacientes S/RD y 16,7% en los pacientes C/RDP; y para el genotipo C/T fue 28,6% en los pacientes S/RD y 40,5% en los pacientes C/RDP. (Tabla XV).

En el análisis realizado entre el rs7903146 del gen TCF7L2 y la presencia de RDP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los

modelos estudiados: Codominante (OR= 1,79 (1,00-3,22); p=0,14), Dominante (OR= 1,58 (0,94-2,67); p=0,083), Recesivo (OR= 0,97 (0,48-1,93); p=0,92), Sobredominante (OR= 1,70 (0,98-2,96); p=0,058) y Log-aditivo (OR= 1,22 (0,86-1,74); p=0,26) (Tabla XV).

El bFGF es un factor de crecimiento para células endoteliales y del músculo liso, estimulando la angiogénesis. La expresión de bFGF está regulada positivamente en la DM y está involucrada en las complicaciones vasculares inducidas por la diabetes, como la RDP (25). La variante genética c.-553T>A en la región promotora del gen bFGF se asocia a PDR en pacientes caucásicos con DM2 (25). Se analizó la relación entre la variante c.-553T>A y la presencia de RDP (Tabla XVI).

**Tabla XVI. Asociación del SNP c.-553T>A presente en el gen bFGF con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa**

Modelo	Genotipo	S/RD	C/RDP	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
---	T/T	99 (97,1)	102 (100)	1,00	0,04
	T/A	3 (2,9)	0 (0)	0,00 (0,00-NA)	

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

S/RD, Sin Retinopatía Diabética; CRDP, Con Retinopatía Diabética Proliferativa.

n: número de pacientes

?: porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo T/T del c.-553T> A del gen bFGF fue del 97,1% en los pacientes S/RD y 100% en los pacientes C/RDP; mientras que para genotipo T/A fue del 2,9% en los pacientes S/RD. No se encontraron pacientes C/RDP con el genotipo T/A, y tampoco se encontraron pacientes con el genotipo A/A. (Tabla XVI)

Como se puede observar de los resultados de la Tabla XVI, en nuestra población de estudio, el polimorfismo c.-553T>A presente en el gen bFGF no pudo ser analizado estadísticamente debido a la ausencia de pacientes con el alelo mutado, haciendo que ninguno de los modelos empleados pudiera ser calculado. (Tabla XVI)

El gen que codifica para CDKAL1 traduce a una metiltiotransferasa que cataliza las modificaciones de 2-metilto (ms2) de varios sustratos, incluida la adición de ms2 a N6-treonil-carbamoil adenósido en la posición 37 del ARN de transferencia Lys (UUU)(37). La variante rs4712527 del gen CDKAL1 fue estudiada como posible polimorfismo asociado a RD (51). Se analizó la relación entre el SNP rs4712527 y la presencia de RDP (Tabla XVII).

**Tabla XVII. Asociación del SNP rs4712527 presente en el gen CDKAL1 con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa**

Modelo	Genotipo	S/RD	C/RDP	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	A/A	51 (48)	93 (73,8)	1,00	0,0003
	A/G	42 (40)	24 (19,1)	0,31 (0,17-0,57)	
	G/G	12 (11,4)	9 (7,1)	0,41 (0,16-1,04)	
Dominante	A/A	51 (48,6)	93 (73,8)	1,00	0,0001
	A/G-G/G	54 (51,4)	33 (26,2)	0,34 (0,19-0,58)	
Recesivo	A/A-A/G	93 (88,6)	117 (92,9)	1,00	0,2600
	G/G	12 (11,4)	9 (7,1)	0,60 (0,24-1,48)	
Sobredominante	A/A-G/G	63 (60)	102 (81)	1,00	0,0004
	A/G	42 (40)	24 (19,1)	0,35 (0,20-0,64)	
Log-aditivo	---	---	---	0,49 (0,33-0,75)	0,0006

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

S/RD, Sin Retinopatía Diabética; C/RDP, Con Retinopatía Diabética Proliferativa.

n: número de pacientes

%; porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo A/A del rs4712527 del gen CDKAL1 fue del 48% en los pacientes S/RD y 73,8% en los pacientes C/RDP; mientras que para genotipo G/G fue del 11,4% en los pacientes S/RD y 7,1% en los pacientes C/RDP; y para el genotipo A/G fue 40% en los pacientes S/RD y 19,1% en los pacientes C/RDP. (Tabla XVII)

La Tabla XVII muestra los resultados obtenidos para el rs4712527 presente en el gen CDKAL1, siendo ésta la única variante estudiada que muestra una asociación con la retinopatía.



La presencia de la variante G para el polimorfismo A> G (rs4712527) en el gen CDKAL1 demuestra ser un factor protector para el desarrollo de RDP en retinas de pacientes diabéticos en los modelos Codominante (OR= 0,31 (0,17-0,57); p= 0,003), Dominante (OR= 0,34 (0,19-0,58); p=0,0001), Sobredominante (OR= 0,35 (0,20-0,64); p= 0,0004), y log-aditivo (OR=0,49 (0,33-0,75); p=0,0006) con un IC 95% (Tabla XVII).

Posteriormente, los análisis de regresión logística para la variante rs4712527 del gen CDKAL1 fueron ajustados con parámetros bioquímicos y clínicos (duración de la diabetes, IMC, terapia con insulina; niveles de: HbA1c, Colesterol, HDL Colesterol, LDL Colesterol, Triglicéridos, y finalmente Presiones Diastólicas y Sistólicas) (Tabla XVIII).

**Tabla XVIII. Asociación del SNP rs4712527 presente en el gen CDKAL1 con la presencia de Retinopatía Diabética Proliferativa ajustado con parámetros clínicos y bioquímicos**

Modelo	Genotipo	S/RD	C/RDP	OR ajustado (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	A/A	51 (48)	93 (73,8)	1,00	0,0015
	A/G	42 (40)	24 (19,1)	0,22 (0,09-0,54)	
	G/G	12 (11,4)	9 (7,1)	0,31 (0,07-1,48)	
Dominante	A/A	51 (48,6)	93 (73,8)	1,00	0,0003
	A/G-G/G	54 (51,4)	33 (26,2)	0,23 (0,10-0,54)	
Recesivo	A/A-A/G	93 (88,6)	117 (92,9)	1,00	0,3000
	G/G	12 (11,4)	9 (7,1)	0,46 (0,10-2,05)	
Sobredominante	A/A-G/G	63 (60)	102 (81)	1,00	0,0010
	A/G	42 (40)	24 (19,1)	0,24 (0,10-0,59)	
Log-aditivo	---	---	---	0,37 (0,20-0,71)	0,0015

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

S/RD, Sin Retinopatía Diabética; C/RDP, Con Retinopatía Diabética Proliferativa.

n: número de pacientes

%: porcentaje de pacientes

Ajustado con la duración de la diabetes, IMC, terapia con insulina, HbA1c, Colesterol, HDL Colesterol, LDL Colesterol, Triglicéridos, Presiones Diastólicas y Sistólica.

La variante G del rs4712527 del gen CDKAL1 demostró ser un factor protector contra la RDP en los modelos Codominante (OR= 0,22 (0,09-0,54);

p=0,0015), Dominante (OR=0,23 (0,10-0,54); p= 0,0003), Sobredominante (OR= 0,24 (0,10-0,59); p=0,001), y log-aditivo (OR=0,37 (0,20-0,71); p=0,0015) con un IC 95% (Tabla XVIII).

En resumen, en este estudio se analizó la posible asociación entre distintos polimorfismos y la presencia o ausencia de RDP. Se observó que la presencia del polimorfismo G en el rs4712527 del gen CDKAL1 confiere un menor riesgo a desarrollar RDP. La relación entre la presencia de los polimorfismos rs699947 y rs35569394 (gen VEGF); rs1801133 (gen MTHFR); rs4646994 (gen ECA); rs7903146 (gen TCF7L2) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes S/RD y C/RDP clínicas y el riesgo a desarrollar RDP.

#### 4.13 DISCUSIÓN

Por la creciente prevalencia de la DM y el aumento de la expectativa de vida de las personas, entre ellas las que presentan diabetes, se especula que la retinopatía diabética será la principal causa mundial de pérdida de la visión en sujetos de muchos países. Pearce y sus colaboradores, sugieren que la presencia de RD esta íntimamente relacionada con la posibilidad de presentar otras complicaciones, razón podría cual un diagnóstico temprano de la RD favorecería la calidad de vida del paciente (56). Por lo tanto, es importante conocer cuáles son los factores de riesgo que pueden contribuir al desarrollo de la RD y, lo que es más importante, lo que lleva a la progresión a la RDP. La forma más avanzada y agresiva de esta complicación, debido a la neovascularización retiniana y a la contracción vascular produce hemorragia preretinal y hemorragias vítreas, pudiendo generar hasta el desprendimiento de la retina, una complicación muy severa que puede hacer perder la visión del paciente.(4)

Muchos factores influyen en la gravedad de la RD, los más reconocidos son los años de evolución de la DM y el mal control glucémico, pero se sabe que la asociación familiar y la etnia son factores importantes a tener en cuenta en la progresión de la enfermedad en la retina de los pacientes (57). Como se ha visto en la Veterans Affairs Diabetes Trial las personas de origen hispánico con diabetes desarrollarán una retinopatía más grave en una etapa temprana de la vida que progresará más rápidamente, esto en comparación con la de los individuos afroamericanos o europeos.(18)

Nuestros grupos de estudio fueron clasificados en dos formas extremas según la gravedad de la condición de la retina (en pacientes con DM2), siguiendo el sistema de clasificación del Estudio temprano del tratamiento de la retinopatía diabética (ETDRS), el cual es el gold standard a la hora de definir la gravedad de la RD (8). En uno de los grupos se incluyó a los pacientes que no mostraron signos de RD y en el otro grupo se incluyeron pacientes con neovascularización retiniana, pudiendo haber o no recibido tratamiento previo para la RDP.

Entre los dos grupos de pacientes, se encontró que la diferencia de la duración de la enfermedad y los niveles de HbA1c eran estadísticamente

significativas, dos factores de riesgo ampliamente reconocidos y aceptados en el desarrollo de la RD, tal como lo indican estudios como el UKPDS (7) y el ETDRS (8).

Otra diferencia fue la mayor presencia de hombres en el grupo con RDP y más mujeres en los grupos de pacientes sin RDP, datos que concuerdan con lo reportado en el estudio FIND-eye, donde observaron que los hombres tenían RD más graves que las mujeres.(57)

Debido a la influencia de los factores ambientales y genéticos en la DM2 y sus complicaciones, se han realizado varios estudios para detectar si la presencia de variantes genéticas podrían estar asociadas con el desarrollo de la RD. Se han realizado diversos estudios independientes para encontrar una posible asociación entre los polimorfismos analizados en este estudio y el desarrollo de RDP, y los resultados son muy variados.(58–60)

El VEGF es un factor importante en el desarrollo de RDP y EMD, debido a su gran poder proliferativo. Muchos estudios se han realizado para tratar de vislumbrar los mecanismos en los cuales está involucrado el VEGF con la esperanza de poder interferir con aquellos tendientes a reducir la neovascularización y la pérdida de vasos mediante el bloqueo de sus efectos.(24,61,62)

Nuestros resultados, no mostraron ninguna relación entre los polimorfismos presentes en el gen VEGF (rs699947 y rs35569394) y la presencia o el desarrollo de RD. En poblaciones chinas se asoció la presencia del rs699947 en el gen VEGF con el desarrollo de la RD (63) pero no en otras poblaciones como la europea o japonesa.(64)

La MTHFR es la enzima que permite la transformación de homocisteína a metionina a través de la vía de remetilación.

La presencia del polimorfismo rs1801133 en el gen MTHFR ha sido ampliamente estudiado, por ejemplo, en distintas complicaciones de la DM como la nefropatía y la neuropatía diabética (33,65), y también en estudios farmacogenéticos contra el cáncer colorrectal o la leucemia linfoblástica aguda.(66,67)

La hiperhomocisteinemia, consecuencia de una disminución de la actividad de la MTHFR, ha sido relacionada con la RD, en estudios de Brazionis y colaboradores, donde observaron niveles más elevados de homocisteinemia en los pacientes con

RD (68). Mientras que en el meta-análisis realizado por Luo y colaboradores, encontraron una asociación entre el polimorfismo rs1801133 del gen MTHFR y la RD en algunas poblaciones asiáticas (69), en el metanálisis realizado por Abhary no encontró asociación entre la presencia del alelo T del rs1801133 y la RD (58). En nuestro estudio, no encontramos una relación significativa entre la presencia del alelo T del rs1801133 con la RDP, coincidiendo con los resultados obtenidos por Abhary.

El gen ECA ha sido un gen muy estudiado, no solo en la RD sino también en otras complicaciones como la nefropatía diabética o cardiopatías asociadas a DM (70,71). Se ha informado que los pacientes con RDP tienen altos niveles circulantes de ECA, y esto podría ser un posible factor de riesgo para dañar los lechos vasculares de la retina en sujetos que padecen diabetes (32). En los estudios de Saleem y colaboradores, encontraron una asociación entre el polimorfismo rs4646994 de la ECA con la susceptibilidad de RD y la RDNP en pacientes diabéticos y sujetos sanos, pero no encontraron asociación con la RDP (30). En el estudio realizado por Nagi y colaboradores, analizaron la presencia de la inserción/delección del rs4646994 en el gen ECA en aproximadamente 600 sujetos, y no observaron asociación entre la presencia o ausencia de la inserción/delección y la RD o el progreso de la misma (32). En nuestro estudio no se observó ninguna asociación entre la inserción/delección (rs4646994) y la presencia de RD.

En el estudio de Kariz y colaboradores, encontraron una asociación entre la presencia de un polimorfismo en el gen bFGF y los niveles séricos de bFGF, siendo significativamente más altos estos niveles en pacientes con diabetes que presentaban el genotipo TA del polimorfismo c.-553T>A en comparación con pacientes con diabetes con el genotipo salvaje TT (72). En nuestra población de estudio, si bien obtuvimos resultados, los mismos no pudieron ser analizados estadísticamente debido a la ausencia de pacientes con el alelo mutado homocigota, haciendo que ninguno de los modelos empleados pueda calcularse.

El gen TCF7L2 codifica para un receptor nuclear para  $\beta$ -catenina, que media la vía de señalización Wnt, involucrada en el metabolismo de los lípidos y la homeostasis de la glucosa, y también regula el desarrollo vascular y media la neovascularización patológica en la RDP. En el estudio de Ciccacci y colaboradores, observaron que además de confirmar la participación del polimorfismo rs7903146 del

gen TCF7L2 en la susceptibilidad a la DM2, demostraron que la variabilidad genética del TCF7L2 también contribuye al desarrollo de la retinopatía diabética y a la neuropatía cardiovascular autonómica (73). En el estudio realizado por Yan y colaboradores, en un total de 2.199 afroamericanos y 8.121 caucásicos, no observaron una relación entre el rs7903146 y la RD (74). En nuestro estudio, no encontramos una relación significativa entre la variante T del polimorfismo rs7903146 del TCF7L2 y la RD, coincidiendo con los resultados obtenidos por el grupo de Yan.

Desde hace poco tiempo, muchos genes fueron asociados con la DM2 gracias a estudios de asociación del genoma completo (GWAS). A partir de algunos de éstos estudios, el gen CDKAL1 fue identificado como gen de predisposición para la DM2 a través de GWAS en poblaciones blancas europeas y asiáticas.(75)

El gen CDKAL1 codifica para una metiltiotransferasa de gran importancia para una correcta síntesis de proteínas, entre ellas la insulina, y puede afectar otras funciones en las células  $\beta$  de la glándula pancreática. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados con la susceptibilidad al desarrollo de DM2 por las interacciones entre esta proteína no son del todo conocidos.(75)

Se han estudiado polimorfismos del gen CDKAL1 asociados a complicaciones de la DM. En el estudio de Liu y colaboradores, mostraron asociación entre la variante C del rs10946398 del gen CDKAL1 y la susceptibilidad de desarrollar RD (51), mientras que en el estudio de Lasram y colaboradores, observaron una asociación entre la presencia de la variante G del rs7756992 y un riesgo reducido a nefropatía diabética.(52)

En nuestro estudio observamos que la presencia del polimorfismo G en el rs4712527 del gen CDKAL1 confiere un menor riesgo a desarrollar RDP. Este polimorfismo se ha estudiado en pacientes diabéticos de otras poblaciones pero no se encontraron asociaciones entre su presencia y la RDP.(53)

#### 4.14 BIBLIOGRAFÍA

1. Negi A, Vernon S a. An overview of the eye in diabetes. *JRSM*. 2003 Jun 1;96(6):266–72.
2. Varios. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Asoc Latinoam Diabetes*. 2013
3. Ansari AS, de Lusignan S, Arrowsmith B, Hinton W, Munro N, McGovern A. Association Between Diabetes, Level of Glycemic Control, and Eye Infection: A Cohort Study. *Diabetes Care*. 2017 Mar 1;40(3):e30–1.
4. Browning DJ. Diabetic Retinopathy. Browning DJ, editor. *Vasa*. New York, NY: Springer New York; 2010. 31–53 p.
5. Leasher JL, Bourne RRA, Flaxman SR, Jonas JB, Keeffe J, Naidoo K, et al. Global Estimates on the Number of People Blind or Visually Impaired by Diabetic Retinopathy: A Meta-analysis From 1990 to 2010. *Diabetes Care*. 2016 Sep;39(9):1643–9.
6. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2012 Mar 1;35(3):556–64.
7. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(5):643–8.
8. Royle P, Mistry H, Auguste P, Shyangdan D, Freeman K, Lois N, et al. The landmark trials: Diabetic Retinopathy Study and Early Treatment Diabetic Retinopathy Study. 2015
9. Fong DS, Aiello L, King TWGGL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL, et al. Diabetic Retinopathy (2003). 2003;26.
10. Bek T, Ledet T. Glycoprotein deposition in vascular walls of diabetic retinopathy. A histopathological and immunohistochemical study. *Acta*

Ophthalmol Scand. 1996 Aug;74(4):385–90.

11. Crossland M, Rubin G. The Amsler chart: absence of evidence is not evidence of absence. *Br J Ophthalmol*. 2007 Mar;91(3):391–3.
12. Gupta N, Mansoor S, Sharma A, Sapkal A, Sheth J, Falatoonzadeh P, et al. Diabetic retinopathy and VEGF. *Open Ophthalmol J*. 2013 Jan;7:4–10.
13. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. 2003;26(9):2653–64.
14. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2012 Mar 1;35(3):556–64.
15. Looker HC, Krakoff J, Knowler WC, Bennett PH, Klein R, Hanson RL. Longitudinal Studies of Incidence and Progression of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2003;26(2).
16. Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: Overview. *Diabetes Care*. 2014;37(1):9–16.
17. Heller SR. A Summary of the ADVANCE Trial. *Diabetes Care*. 2009 Nov 1;32(suppl\_2):S357–61.
18. Emanuele N, Sacks J, Klein R, Reda D, Anderson R, Duckworth W, et al. Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. *Diabetes Care*. 2005 Aug;28(8):1954–8.
19. Priščáková P, Minárik G, Repiská V. Candidate gene studies of diabetic retinopathy in human. *Mol Biol Rep*. 2016;43(12):1327–45.
20. Pollack S, Igo RP, Jensen RA, Christiansen M, Li X, Cheng C-Y, et al. Multiethnic Genome-Wide Association Study of Diabetic Retinopathy Using Liability Threshold Modeling of Duration of Diabetes and Glycemic Control. *Diabetes*. 2019 Feb;68(2):441–56.
21. Ung C, Sanchez A V, Shen L, Davoudi S, Ahmadi T, Navarro-Gomez D, et al.



Whole Exome Sequencing Identification of Novel Candidate Genes in Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy.

22. Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359–71.
23. Alkayyali S, Lyssenko V. Genetics of diabetes complications. *Mamm Genome.* 2014 Oct;25(9–10):384–400.
24. Lu Y, Ge Y, Shi Y, Yin J, Huang Z. Two polymorphisms (rs699947, rs2010963) in the VEGFA gene and diabetic retinopathy: an updated meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 2013 Jan;13(1):56.
25. Kuo JZ, Wong TY, Rotter JI. Challenges in elucidating the genetics of diabetic retinopathy. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(1):96–107.
26. Beránek M, Tschöplová S, Kaňková K, Kuhrová V, Vácha J. Genetic variation in the promoter region of the basic fibroblast growth factor gene. *Hum Immunol.* 2003;64(3):374–7.
27. Petrovič MG, Krkovič M, Osredkar J, Hawlina M, Petrovič D. Polymorphisms in the promoter region of the basic fibroblast growth factor gene and proliferative diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2008 Mar;36(2):168–72.
28. Song E, Dong Y, Han L, Sui D, Xu Q, Wang X, et al. Diabetic retinopathy: VEGF, bFGF and retinal vascular pathology. *Chin Med J (Engl).* 2004 Feb;117(2):247–51.
29. Khan ZA, Chakrabarti S. Growth factors in proliferative diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res.* 2003;4(4):287–301.
30. Saleem S, Azam A, Maqsood SI, Muslim I, Bashir S, Fazal N, et al. Role of ACE and PAI-1 Polymorphisms in the Development and Progression of Diabetic Retinopathy. Ljubimov A V., editor. *PLoS One.* 2015 Dec;10(12):e0144557.
31. Baris N, Akdeniz B, Ozerkan F, Onder RM, Akarca U, Guneri S. The

- relationship between hypertensive retinopathy and Angiotensin converting enzyme gene polymorphism. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2006 Mar;6(1):57–61.
32. Nagi DK, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism, and diabetic retinopathy in subjects with IDDM and NIDDM. *Diabet Med*. 1995 Nov;12(11):997–1001.
  33. Yigit S, Karakus N, Inanir A. Association of MTHFR gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2013;19(1090-0535 (Electronic)):1626–30.
  34. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Eysink PED, Polak BCP, Beks PJ, Jakobs C, et al. Hyperhomocysteinemia Is Associated With the Presence of Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med*. 2000 Oct 23;160(19):2984.
  35. Maeda M, Yamamoto I, Fujio Y, Azuma J. Homocysteine induces vascular endothelial growth factor expression in differentiated THP-1 macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Sep 8;1623(1):41–6.
  36. Sudchada P, Scarpace K. Transcription factor 7-like 2 polymorphisms and diabetic retinopathy: a systematic review. *Genet Mol Res*. 2014;13(3):5865–72.
  37. Cho YM. Incretin physiology and pathophysiology from an Asian perspective. *J Diabetes Investig*. 2014;4:n/a-n/a.
  38. Ip W, Chiang Y-TA, Jin T. The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. *Cell Biosci*. 2012;2(1):28.
  39. Locke JM, Wei FY, Tomizawa K, Weedon MN, Harries LW. A cautionary tale: the non-causal association between type 2 diabetes risk SNP, rs7756992, and levels of non-coding RNA, CDKAL1-v1. *Diabetologia*. 2015;58(4):745–8.
  40. Dehwah MAS, Wang M, Huang Q-Y. CDKAL1 and type 2 diabetes: a global meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2010;9(2):1109–20.
  41. Li Y, Wang L, Lu X, Yang Z, Wang X, Zhou C, et al. CDKAL1 gene rs7756992 A/G polymorphism and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 62,567

- subjects. *Sci Rep*. 2013;3:3131.
42. McCarthy MI. Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. Feero WG, Guttmacher AE, editors. *N Engl J Med*. 2010 Dec 9;363(24):2339–50.
  43. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2007;39(6):770–5.
  44. Nozu K, Iijima K, Nozu Y, Ikegami EI, Imai T, Fu XJ, et al. A deep intronic mutation in the SLC12A3 gene leads to gitelman syndrome. *Pediatr Res*. 2009;66(5):590–3.
  45. Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proença C, et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet*. 2009 Oct 6;41(10):1110–5.
  46. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet*. 2010 Jul 27;42(7):579–89.
  47. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2008 May 30;40(5):638–45.
  48. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):661–78.
  49. Sim X, Ong RT-H, Suo C, Tay W-T, Liu J, Ng DP-K, et al. Transferability of Type 2 Diabetes Implicated Loci in Multi-Ethnic Cohorts from Southeast Asia. Gibson G, editor. *PLoS Genet*. 2011 Apr 7;7(4):e1001363.
  50. Kuo JZ, Sheu WH-H, Assimes TL, Hung Y-J, Absher D, Chiu Y-F, et al. Trans-ethnic fine mapping identifies a novel independent locus at the 3' end of CDKAL1 and novel variants of several susceptibility loci for type 2 diabetes in a Han Chinese population. *Diabetologia*. 2013 Dec 8;56(12):2619–28.

51. Liu NJ, Wu HH, Li YL, Yang Z, Tao XM, Du YP, et al. The association analysis polymorphism of CDKAL1 and diabetic retinopathy in Chinese Han population. *Int J Ophthalmol*. 2016 May 18;92(3):707–12.
52. Lasram K, Ben Halim N, Benrahma H, Mediene-Benchekor S, Arfa I, Hsouna S, et al. Contribution of CDKAL1 rs7756992 and IGF2BP2 rs4402960 polymorphisms in type 2 diabetes, diabetic complications, obesity risk and hypertension in the tunisian population. *Journal of Diabetes*. 2014;102–13.
53. Fu L, Lin Y, Yang Z, Yin Y. Association analysis of genetic polymorphisms of TCF7L2, CDKAL1, SLC30A8, HHEX genes and microvascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2012 May;29(2):194–9.
54. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928–9.
55. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Andrew P. Europe PMC Funders Group Basic statistical analysis in genetic case-control studies. 2011;6(2):121–33.
56. Pearce I, Simó R, Lövestam-Adrian M, Wong DT, Evans M. Association between diabetic eye disease and other complications of diabetes: Implications for care. A systematic review. *Diabetes, Obes Metab*. 2019 Mar 1;21(3):467–78.
57. Arar NH, Freedman BI, Adler SG, Iyengar SK, Chew EY, Davis MD, et al. Heritability of the Severity of Diabetic Retinopathy: The FIND-Eye Study. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2008 Sep;49(9):3839.
58. Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE. A Systematic Meta-Analysis of Genetic Association Studies for Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 2009 Sep 1;58(9):2137–47.
59. Sobrin L, Green T, Sim X, Jensen R a., Tai ES, Tay WT, et al. Candidate gene association study for diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Candidate gene Association Resource (CARE). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Sep 29;52(10):7593–602.
60. Hosseini SM, Boright AP, Sun L, Canty AJ, Bull SB, Klein BEK, et al. The

- association of previously reported polymorphisms for microvascular complications in a meta-analysis of diabetic retinopathy. *Hum Genet.* 2015;134(2):247–57.
61. Buraczynska M, Ksiazek P, Baranowicz-Gaszczyk I, Jozwiak L. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Mar 1;22(3):827–32.
  62. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 Jan;247(1):21–6.
  63. Yang X, Deng Y, Gu H, Ren X, Li N. Candidate gene association study for diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol ....* 2014;1(February 2013):200–14.
  64. Schwartz S, Hampton B, Brantley M, Flynn H. Update on genetics and diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol.* 2015 Nov;Volume 9:2175.
  65. Zintzaras E, Uhlig K, Koukoulis GN, Papathanasiou AA, Stefanidis I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy: a meta-analysis. *J Hum Genet.* 2007 Jan;52(11):881–90.
  66. Rodríguez-Vicente AE, Lumbreras E, Hernández JM, Martín M, Calles A, Otín CL, et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics as tools in cancer therapy. *Drug Metab Pers Ther.* 2016;0(0).
  67. Araoz HV, D’Aloi K, Foncuberta ME, Sanchez La Rosa CG, Alonso CN, Chertkoff L, et al. Pharmacogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia in Argentina. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(5):1370–8.
  68. Brazionis L, Rowley K, Itsiopoulos C, Harper CA, O’Dea K. Homocysteine and diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2008;31(1):50–6.
  69. Liew S-C, Gupta E Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015;58(1):1–10.
  70. Freedman BI, Bostrom M, Daeihagh P, Bowden DW. Genetic factors in diabetic

nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol. 2007;2(6):1306–16.

71. Uemura K, Nakura J, Kohara K, Miki T. Association of ACE I/D polymorphism with cardiovascular risk factors. Hum Genet. 2000 Sep;107(3):239–42.
72. Kariž S, Grabar D, Krkovič M. Polymorphisms in the promoter region of the basic fibroblast growth factor gene are not associated with myocardial infarction in a Slovene population with type 2. J Int Med Res. 2009;37(5):1596–603.
73. Ciccacci C, Di Fusco D, Cacciotti L, Morganti R, D'Amato C, Novelli G, et al. TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. Acta Diabetol. 2013 Oct;50(5):789–99.
74. Yan Y, Klein R, Heiss G, Girman CJ, Lange EM, Klein BE, et al. The transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) polymorphism may be associated with focal arteriolar narrowing in Caucasians with hypertension or without diabetes: the ARIC Study. BMC Endocr Disord. 2010 Dec 17;10(1):9.
75. Mansoori Y, Daraei A, Naghizadeh MM, Salehi R. Significance of a common variant in the CDKAL1 gene with susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Iranian population. Adv Biomed Res. 2015 Jan;4:45.

# **CAPÍTULO 5**

## **NEFROPATÍA**

### **DIABÉTICA (ND)**

## 5.1 RESUMEN

La nefropatía diabética (ND) representa la principal causa de insuficiencia renal terminal en las sociedades occidentales. Clínicamente, se caracteriza por el desarrollo de proteinuria con una disminución subsiguiente en la tasa de filtración glomerular, que progresa durante un largo período de tiempo, generalmente durante los 10 a 20 años de evolución de la enfermedad.

El objetivo del trabajo fue valorar la relación entre la presencia de marcadores genéticos que pudieran estar asociados a la nefropatía diabética y a la clínica que presentaban los pacientes.

**Materiales y Métodos:** 88 pacientes con DM2 (40 sujetos con ND y 48 sujetos sin ND) que asistieron al Servicio de Diabetología del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba Capital con diagnóstico de DM2 participaron de este estudio. Se evaluaron criterios clínicos, bioquímicos y moleculares. Se realizó el genotipado de variantes en los genes SLC2A1 (rs841853), eNOS (rs1799983), ECA (rs4646994) y CDKAL1 (rs7756992) mediante la técnica de PCR-RFLP.

**Resultados:** No hubo diferencias significativas en la frecuencia genotípica de los polimorfismos analizados de los genes SLC2A1, eNOS, ECA y CDKAL1 con el riesgo a desarrollar nefropatía diabética entre pacientes sin ND y pacientes con ND ( $p > 0,05$ ).

**Conclusiones:** Nuestros hallazgos sugieren que ninguna de las variantes evaluadas muestra asociaciones positivas o negativas con el riesgo a desarrollar ND en la población analizada de pacientes con DM2.

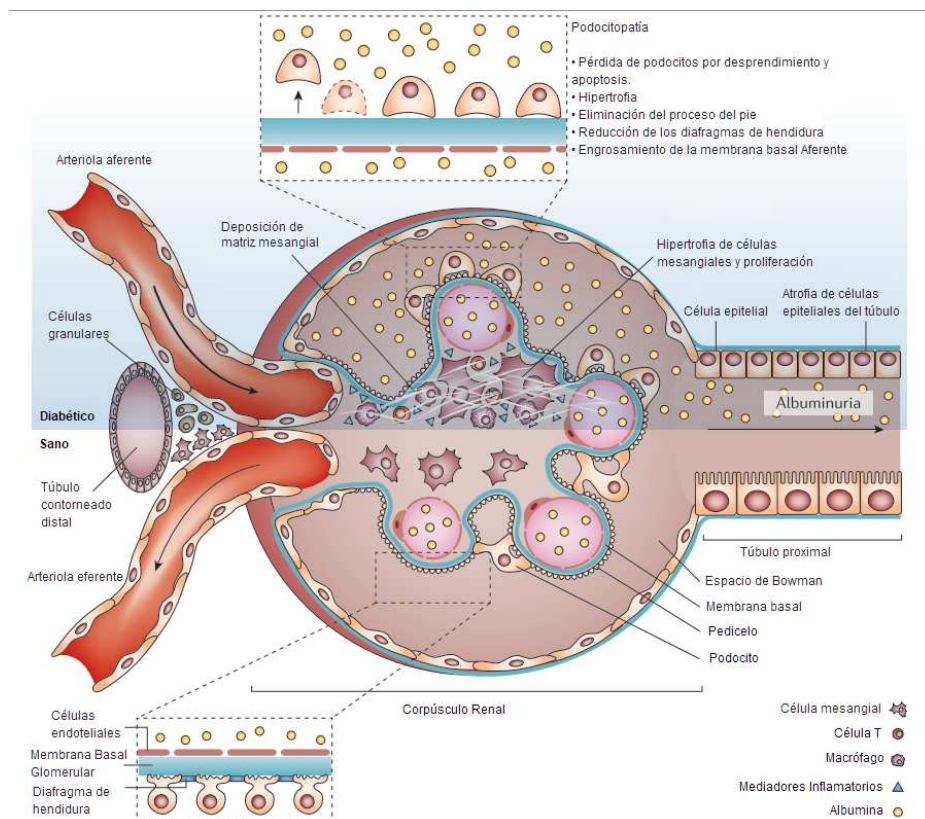
**Palabras claves:** Diabetes Mellitus tipo 2, polimorfismos, nefropatía diabética



## 5.2 NEFROPATÍA DIABÉTICA

Nefropatía es el término utilizado cuando los riñones comienzan a sufrir daños, lo que en última instancia puede conducir a una insuficiencia renal. Las nefropatías se encuentran entre las causas más importantes de muerte e incapacidad en muchos países del mundo.(1)

La Nefropatía Diabética (ND) se define como alteraciones morfológicas y funcionales en el glomérulo renal en el paciente diabético. Entre ellas, se presentan expansión e hipertrofia mesangial, engrosamiento de la membrana basal glomerular y esclerosis glomerular (Figura 8). Las alteraciones incluyen un aumento de la presión arterial, hiperfiltración, microalbuminuria, macroalbuminuria con proteinuria progresiva incipiente, la cual a menudo es seguida por una disminución progresiva del Índice de Filtrado Glomerular (IFG) y; con el tiempo, termina en Enfermedad Renal Terminal (ERT) que lleva a la necesidad de una Terapia de Reemplazo Renal (TRR).(2,3)



**Figura 8. Alteraciones morfológicas y funcionales en el glomérulo renal entre un sujeto diabético y un sujeto sano (Traducido) (3).**

La ND es la principal causa de Enfermedad Renal Crónica (ERC) y la segunda causa más común de ERT que requiere TRR o trasplante de riñón. Este grupo de pacientes tienen un riesgo cardiovascular importante y, por lo general, sucumben a esto, en lugar de progresar hacia la ERT, especialmente los pacientes con DM2. La ND puede estar presente en el 10 a 25% de los pacientes con DM2 en el momento del diagnóstico. Aunque existen cambios tempranos relacionados con la hiperglucemia, como la hiperfiltración glomerular, el riesgo a desarrollar insuficiencia renal también se produce cuando hay una presencia constante de albúmina en una cantidad significativa. Los pacientes con microalbuminuria progresan a nefropatía clínica y 20% alcanzan la ERT después de 20 años de evolución de la enfermedad.(2)

### 5.2.1 Clasificación de la Nefropatía Diabética

1. **Nefropatía incipiente:** Caracterizada por la presencia de microalbuminuria persistente en dos o más muestras tomadas durante un intervalo de tres meses.(2)
2. **Nefropatía clínica:** Caracterizada por la presencia de proteinuria detectable mediante métodos químicos de rutina y aumento de la presión arterial, en pacientes con HTA antes de la nefropatía, considerándose este último un factor de riesgo. Esta etapa puede subdividirse en leve a moderada cuando sólo hay proteinuria; y severa cuando hay deterioro de la función renal determinada por un IFG inferior a 70 ml/min con elevación de la creatinina sérica.(2)
3. **ERC avanzada:** Se caracteriza por una disminución del IFG por debajo de 25-30 ml/min. Se presentan alteraciones en el metabolismo del calcio y fósforo, el paciente presenta anemia y en algunos casos insuficiencia cardíaca.(2)
4. **ERT:** Se considera que el paciente ha alcanzado la etapa de ERT cuando el IFG es igual o inferior a 10 ml/min y/o la creatinina sérica igual o mayor a 3,4 mg/dl. En esta etapa el paciente requiere diálisis y eventualmente un trasplante de riñón.(2)

### 5.3 ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Según la guía Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) se ha definido a la ERC como la presencia durante al menos 3 meses de Índice de Filtrado Glomerular Estimado (IFGe) inferior a  $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  o lesión renal.(4)

La lesión renal se puede hacer presente a partir de alteraciones histológicas en la biopsia renal, o por la presencia de albuminuria, alteraciones en el sedimento urinario o a través de técnicas de imagen (ecografía o radiografías).(4)

Se han establecido categorías de la ERC según el pronóstico de la enfermedad renal crónica de acuerdo al filtrado glomerular estimado y albuminuria (Tabla XIX). Los estadios según el FG se clasifican de G1 a G5, donde el estadio 3 se divide en 2 subgrupos: G3a y G3b, división también útil para determinar la prioridad de la derivación y las diferencias de riesgo. Los colores (verde, amarillo, naranja y rojo) que se pueden observar en la Tabla XIX muestran el riesgo relativo ajustado para 5 eventos (mortalidad global, mortalidad cardiovascular, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal).(5)

**Tabla XIX. Pronóstico para la enfermedad renal crónica de acuerdo al filtrado glomerular estimado y albuminuria (5)**

Pronóstico de la ERC según FGe y albuminuria: KDIGO 2012				Categorías por albuminuria, descripción e intervalo		
				A1	A2	A3
				Normal o aumento leve	Aumento moderado	Aumento grave
				< 30 mg/g < 3 mg/mmol	30-299 mg/g 3-29 mg/mmol	≥ 300 mg/g ≥ 30 mg/mmol
Categorías por FGe,	G1	Normal o alto	> 90			
	G2	Levemente disminuido	60-89			
	G3a	Descenso leve-moderado	45-59			
	G3b	Descenso moderado-grave	30-44			
	G4	Descenso grave	15-29			
	G5	Fallo renal	< 15			

Los colores expresan riesgos crecientes a presentar 5 eventos en la ERC (mortalidad global, mortalidad cardiovascular, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal). El color verde corresponde a menor riesgo, el color amarillo riesgo moderadamente aumentado, el naranja alto riesgo y el rojo a muy alto riesgo. ERC: enfermedad renal crónica; FGe: filtrado glomerular estimado; KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes.

## 5.4 FISIOPATOLOGÍA

En los pacientes con DM, las células de todos los tejidos están expuestas a la hiperglucemia. Si bien no todas son igualmente susceptibles, las células mesangiales son extremadamente sensibles a los efectos de la hiperglucemia. Sin embargo, no todos los pacientes con diabetes desarrollan ND, por lo tanto, otros factores deben ser importantes en el desarrollo de ND, y se cree que incluyen los siguientes factores (6):

**Familiares:** Se conoce la asociación entre el grupo familiar y la ND, con una mayor incidencia entre hermanos de sujetos con DM1 y nefropatía en comparación con hermanos del probando (término referido a la primera persona afectada en la familia) sin nefropatía.(6)

**Hemodinámicos:** La hiperperfusión renal y la hiperfiltración pueden ocurrir en la diabetes recién diagnosticada. Sin embargo, varias observaciones en pacientes con DM1 apoyan la idea de que la hiperperfusión renal y la hiperfiltración contribuyen al daño renal. La evidencia de que las anomalías hemodinámicas glomerulares contribuyen al desarrollo de ND es proporcionada por estudios que han manipulado la presión intra-glomerular independientemente del control metabólico.(6)

**Bioquímicos:** La hiperglucemia es fundamental para la patogenia de la ND. La hiperglucemia intracelular conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), un mediador común de la fisiopatología de la hiperglucemia y la nefropatía. El estrés oxidativo activa la glicación y la formación de productos finales de la glicación (AGEs), citoquinas y factores de crecimiento a través de mecanismos que incluyen (6):

- a) Aumento del flujo de la vía del poliol,
- b) Producción intracelular de AGEs,
- c) Activación de la proteína quinasa C (PKC)

**a) Aumento del flujo de la vía del poliol:** La hiperglucemia aumenta el flujo de glucosa a través de la ruta del poliol. Este proceso consume al cofactor NADPH, que es esencial para regenerar la reducción de glutatión del antioxidante intracelular. Al

reducir la cantidad de glutatión, la ruta del poliol aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo.(6)

**b) Producción intracelular de AGE:** Los AGE son el resultado de la unión covalente no enzimática de la glucosa a las proteínas, que no solo cambia la estructura terciaria de las proteínas sino que también produce una reticulación intra e intermolecular. Las proteínas de muchos tipos se ven afectadas por este proceso, y se ha demostrado que los niveles de AGE en los tejidos y en la circulación se correlacionan con la microalbuminuria en pacientes diabéticos.(7)

En los pacientes con DM, los niveles de AGE en suero y tejido son más elevados en comparación con los sujetos no diabéticos. Además, los pacientes diabéticos con ERT tienen casi el doble de AGE en los tejidos que los diabéticos sin enfermedad renal, lo que sugiere que los niveles de AGE en los tejidos aumentan en paralelo a la severidad de la ND.(7)

La acumulación de AGE en el riñón puede contribuir a la alteración progresiva de la arquitectura renal y a la pérdida de la función renal en los pacientes con DM. Se cree que tanto la formación aumentada de AGEs como la disminución en el clearance de AGE debido a la disfunción renal son responsables de la acumulación de AGEs en la ND. Dado que los AGEs circulantes y tisulares son catabolizados por macrófagos, filtrados por el riñón y luego reabsorbidos por las células tubulares proximales, el daño a las células tubulointersticiales también puede estar involucrado en la acumulación de AGEs en pacientes diabéticos con nefropatía.(7)

**c) Activación de la PKC:** La hiperglucemia intracelular aumenta la actividad de la PKC, la cual es un mediador corriente abajo del factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1), altamente expresado en riñón y tiene un papel central en el proceso esclerótico de la glomerulopatía.(6)

## 5.5 EVALUACIÓN DE LA ND

La evaluación del estadio de la ND se basa en la medición de la microalbuminuria, la proteinuria y la filtración glomerular.

Como se observa en la Figura 9, a un paciente sin controles renales previos, se recomienda realizar la detección de proteinuria en muestra aislada de orina por método semicuantitativo (tiras reactivas).(1)

- Si la proteinuria es positiva, y se descarta la presencia de una infección urinaria o contaminación por sangre menstrual, se procede a la cuantificación de proteinuria en orina de 24 horas.(1)
- Si la proteinuria es negativa, se procede a la medición de microalbuminuria en muestra de 24 horas o muestra aislada. Debido a la variabilidad de la excreción de albumina, si el primer resultado es positivo, se recomienda una segunda medición antes de realizar el diagnóstico. Si los dos resultados no coinciden, se debe realizar una tercera determinación. Dos resultados positivos de tres tomados en un intervalo de 3 meses hacen el diagnóstico de microalbuminuria.(1)

Los rangos de microalbuminuria que se usan para identificar las diferentes etapas de la ND son los siguientes (1):

- Sin nefropatía: <30 mg/g (muestra aislada) o <30 mg/24 horas (muestra de 24 horas)
- Nefropatía temprana (microalbuminuria): 30-300 mg/g (muestra aislada) o 30-300 mg/24 horas (muestra de 24 horas)
- Nefropatía clínica (proteinuria): >300 mg/g (muestra aislada) o >300 mg/24 horas (muestra de 24 horas)

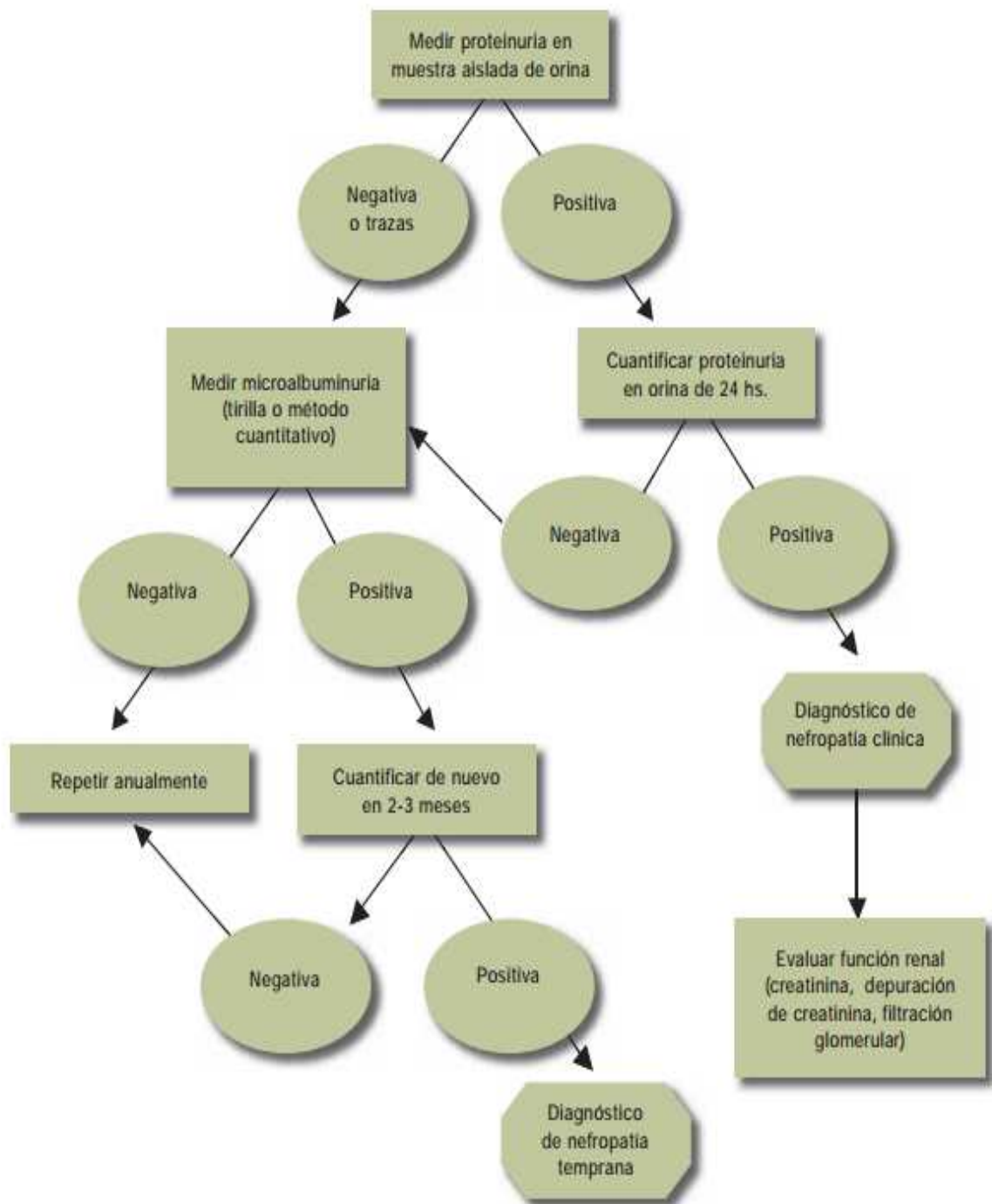


Figura 9. Algoritmo para el estudio de la nefropatía en la persona con diabetes.

(1)



## **5.6 FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA**

Una variedad de factores contribuyen al daño renal observado en la diabetes. Por definición, la hiperglucemia es un factor etiológico común en pacientes diabéticos con nefropatía, pero también contribuye la predisposición genética y el tabaquismo. Sin embargo, lo más significativo es la presencia de hipertensión arterial, no solo antes y después del inicio de la microalbuminuria, sino también probablemente como otro marcador familiar de riesgo, ya que los pacientes con diabetes y antecedentes familiares de hipertensión tienen un mayor riesgo de nefropatía.(8)

### **5.6.1 Hiperglucemia**

Un control metabólico deficiente es uno de los factores que favorecen al progreso de la ND (9). La nefropatía es infrecuente en pacientes con niveles de HbA1c constantemente por debajo de 7,58%. La glucosa es un marcador significativo y clínicamente relevante para la anomalía metabólica que conduce a la nefropatía, como se muestra en el estudio DCCT y otros estudios como el UKPDS que correlacionan bajas glucemias con bajo riesgo de nefropatía (2,10). Otras anomalías metabólicas dependientes de la hiperglucemia pueden desempeñar un papel en el desarrollo de la nefropatía, los cuales incluyen a los AGEs y polioles, como previamente habíamos mencionado.(7)

### **5.6.2 Hipertensión**

La hipertensión es probablemente tanto una causa como un efecto de la ND. En el glomérulo, un efecto temprano de la hipertensión sistémica es la dilatación de la arteriola aferente, que contribuye a la hipertensión intraglomerular, la hiperfiltración y el daño mediado hemodinámicamente. La respuesta renal al sistema

renina-angiotensina puede ser anormal en el riñón diabético. Por estas razones, los agentes que ayudan a corregir las presiones intraglomerulares anormales se seleccionan preferentemente para el tratamiento de la hipertensión en la diabetes. Los Inhibidores de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (IECA) reducen específicamente la presión arteriolar eferente, disminuyendo así la presión intraglomerular y ayudando a proteger el glomérulo de un daño mayor, como se observa en su efecto beneficioso sobre la microalbuminuria.(8)

En particular, después de la presencia de microalbuminuria, el control metabólico es solo un factor en la prevención de la progresión de la enfermedad renal, la hipertensión en esta etapa predice una progresión más rápida del daño renal. El control de la presión arterial es cada vez más importante una vez que la lesión renal está presente y a medida que avanza el daño renal.(8)

### **5.6.3 Tabaquismo**

Varias líneas de evidencia han demostrado que fumar aumenta tanto el riesgo como la progresión de la ND. En el Estudio de la Presión Sanguínea Adecuada en Pacientes con Diabetes (ABCD, Appropriate Blood Pressure in Diabetes Trial) y en otros estudios de meta análisis, se visualizó un mayor riesgo de ND en pacientes fumadores respecto a los no fumadores.(11–13)

## **5.7 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO**

Se pueden mencionar tres niveles para la prevención del desarrollo de la nefropatía:

- a) Primaria
- b) Secundaria
- c) Terciaria

**a) Primaria o Preventiva:** Consiste en la adopción de medidas para evitar la aparición de la nefropatía, como adecuados controles glucémicos y de tensión arterial.(1)

**b) Secundaria o Terapia Activa:** Consiste en detener la progresión de la nefropatía ya existente. Esto se logra mediante un buen control glucémico, y de la HTA.(1) La disminución de la ingesta de proteínas ha demostrado ser útil para retardar el deterioro renal en personas con DM1. Según las recomendaciones de las guías para la práctica clínica KDIGO, el total de proteínas ingerido no debe ser mayor de 0,8 g/kg y la mitad debe ser de origen vegetal (granos, etcétera) (4). La hipercolesterolemia, la anemia y la insuficiencia cardíaca también son factores que aceleran el proceso de lesión renal y deben en lo posible ser corregidos.(14)

**c) Terciaria:** Consiste en adoptar medidas como diálisis y trasplante con el objeto de preservar la vida y optimizar la calidad de vida del paciente con ERT. Las opciones son la diálisis peritoneal crónica ambulatoria (DPCA) y la hemodiálisis. El mejor tratamiento es el trasplante renal, que actualmente tiene un buen pronóstico tanto para el paciente como para el órgano trasplantado.(1)

Para el tratamiento de la nefropatía diabética se pueden mencionar:

- a) Control Glucémico
- b) Uso de Agente orales antidiabéticos
- c) Tratamiento con Insulina
- d) Tratamiento de la Hipertensión
- e) Tratamiento de la Proteinuria

**a) Control Glucémico:** En el “Estudio de Control y Complicaciones de la Diabetes” (DCCT), realizado en pacientes con DM1 y con niveles de excreción de albumina urinarias normales, mostró que después de 9 años de seguimiento el control estricto de la glucemia disminuye el riesgo de nefropatía en un 39% en los pacientes con microalbuminuria de inicio reciente. Después de 16 años, el grupo de tratamiento intensivo tuvo una tasa significativamente más baja de insuficiencia renal.(9)

En el estudio UKPDS, se propuso observar si el control intensivo de la glucemia reducía el riesgo de complicaciones micro y macrovasculares en pacientes con DM2 recién diagnosticados. Se observó una reducción del riesgo del 25% de las complicaciones microvasculares en el grupo con tratamiento intensivo. Esto incluyó una reducción del riesgo del 34% para la progresión a albuminuria y del 67% en la proporción de pacientes que duplicaron los niveles de creatinina sérica (15). Diez años después, se realizó un estudio observacional de seguimiento a los participantes de UKPDS, donde se demostró que los beneficios del control glucémico intensivo temprano persisten después del período de intervención más estricto, observándose una tasa más baja de complicaciones microvasculares.(16)

**b) Uso de agentes orales antidiabéticos:** Existen múltiples opciones terapéuticas para el tratamiento de la hiperglucemia en pacientes con diabetes. La función renal debe evaluarse antes de comenzar cualquier terapia antidiabética, ya que la enfermedad renal determinará la elección y la dosis de los medicamentos. Los pacientes con ERC en estadio 3 a 5 son particularmente susceptibles a la hipoglucemia, especialmente cuando toman medicamentos excretados a través de los riñones. Los pacientes con ERC deben controlar los niveles de glucemia con más frecuencia y pueden necesitar una reducción de la dosis de la medicación.(1)

**c) Tratamiento con Insulina:** La mayoría de los antidiabéticos orales tienen limitaciones en la ERC, ya sea debido al ajuste de la dosis o por razones de seguridad, dando como resultado una mayor tendencia a iniciar la insulino terapia para superar este problema. Más del 50% de los pacientes con estadios 4 y 5 de ERC reciben tratamiento con insulina. La insulina exógena se metaboliza principalmente por el riñón (30-80%) en los pacientes con DM, a diferencia de lo que ocurre en individuos no diabéticos, lo cual ocurre en hígado (17). Debido al alto peso molecular (5734 Da), aproximadamente el 65% de la insulina se filtra en el glomérulo y luego se metaboliza en las células tubulares proximales. Diferentes tipos de insulina han sido utilizadas en el manejo de la ERC (insulinas de acción rápida, intermedia y larga).(17)

**d) Tratamiento de la Hipertensión:** La hipertensión acelera la progresión de la nefropatía, y se ha demostrado que el control estricto de la presión arterial reduce la IFG. Reducir la presión arterial en cierta medida no solo mejora el resultado renal, sino que también tiene un efecto positivo sobre la morbilidad y la mortalidad cardiovascular. Las pautas actuales sugieren lograr una presión arterial sistólica de 130 mm Hg y una presión arterial diastólica de 80 mm Hg en pacientes diabéticos con enfermedad renal.(1)

El uso de IECAs y/o bloqueadores de canales de calcio son utilizados para prevenir el desarrollo de nefropatía clínica (y eventos cardiovasculares) y de algún otro factor de riesgo cardiovascular asociado, aún sin microalbuminuria ni HTA.(14)

**e) Tratamiento de la Proteinuria:** La proteinuria se considera un factor de riesgo independiente para la enfermedad renal progresiva. Los agentes que atenúan la proteinuria son esenciales para el tratamiento de la nefropatía diabética. Los IECA producen la mayor reducción en la excreción de proteínas en la orina, independientemente de la reducción de la presión arterial promedio.(18)

## 5.8 GENÉTICA

Además de los riesgos al desarrollo de ND causado por controles glucémicos deficientes y la presencia de hipertensión, un subconjunto de pacientes puede tener un riesgo mayor de nefropatía en función de factores hereditarios.(19)

Los hermanos diabéticos de pacientes con diabetes y enfermedad renal tienen cinco veces más probabilidades de desarrollar nefropatía que los hermanos diabéticos de pacientes diabéticos sin enfermedad renal. Existe una alta concordancia de nefropatía renal e histopatología en gemelos con DM1.(19)

Se sabe que la ERT es más prevalente en ciertos grupos étnicos (nativos americanos, estadounidenses de origen mexicano y afroamericanos) que en los estadounidenses caucásicos. Ciertamente, hay una razón para la vigilancia especial de los signos tempranos de nefropatía en estas poblaciones de alto riesgo, cuyos miembros presumiblemente tienen una predisposición genética a la nefropatía.(19)

Aún no está claro si las variantes genéticas que contribuyen a la predisposición a la ND tienen efectos que son específicos de la ND, o si, en cambio, modulan el riesgo general de la enfermedad renal generalizada. Los esfuerzos en el uso de estudios de asociación de genoma (GWAS) dirigidos hacia el estudio de la ERC han sido considerablemente más exitosos en la identificación de la asociación genética que los dirigidos específicamente a la ND.(20)

## 5.9 GENES CANDIDATOS

Existe una gran interacción entre genes (ejemplo: SLC2A1, EPO, RAGE, eNOS, ECA, CDKAL1, VEGF) y factores ambientales / de comportamiento que incrementan el riesgo a desarrollar DM2 y sus complicaciones vasculares asociadas (19,21–25). Muchos genes candidatos asociados a ND han sido identificados, los mismos no siempre han podido ser corroborados / replicados en todas las poblaciones estudiadas.(19)

En este trabajo de tesis se realizó una selección de genes candidatos, los cuales se encontrarían asociados al desarrollo de la ND. Estos genes fueron seleccionados mediante un análisis bibliográfico previo donde los genes seleccionados manifestaban estar asociados en otras poblaciones.

Los genes asociados al desarrollo de la ND seleccionados fueron:

- Transportador facilitado por glucosa de la familia 2 de transportadores de solutos (SLC2A1)
- Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)
- Enzima convertidora de angiotensina (ECA)
- Proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKAL1)

### **5.9.1 Transportador facilitado por glucosa de la familia 2 de transportadores de solutos (SLC2A1)**

El gen del transportador facilitado por glucosa de la familia 2 de transportadores de solutos (SLC2A1), o también conocido como transportador de glucosa 1 (GLUT1), se encuentra en el cromosoma 1p34.2 humano y codifica a la proteína GLUT1, la cual facilita el transporte de glucosa en condiciones basales a través de las membranas plasmáticas en células de riñón, colon, barrera hematoencefálica y eritrocitos de mamíferos.(26)

El GLUT1 media el flujo de glucosa de las células mesangiales que conduce a la activación de las cascadas de señalización que favorecen la glomeruloesclerosis, incluidas las vías mediadas por la angiotensina II (Ang II), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).(26)

En varios estudios se observó la asociación entre el polimorfismo rs841853 del gen SLC2A1, también conocido como Xbal, y el riesgo de ND tanto en la DM1 como en la DM2. Un metaanálisis y análisis de sensibilidad posteriores apoyaron una asociación entre la variante T de este polimorfismo y la ND.(27)

Es de destacar, que el polimorfismo rs841853 se encuentra en el segundo intrón del gen SLC2A1, no causando cambios en la secuencia de la proteína. Por lo tanto, podría estar en desequilibrio de enlace con otro locus, que tendría implicaciones funcionales a nivel de la proteína y podría desempeñar un papel etiopatogénico en la enfermedad.(28)

### **5.9.2 Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)**

El endotelio vascular modula la homeostasis de las paredes de los vasos sanguíneos mediante la producción de factores que regulan el estado de coagulación del tono de los vasos, el crecimiento celular, la muerte celular y el tráfico de leucocitos. Uno de los productos de células endoteliales más importantes es el óxido nítrico (NO), que se sintetiza a partir de L-arginina por la enzima endotelial

óxido nítrico sintasa (eNOS), codificada por el gen eNOS en el cromosoma 7q36.1 humano.(26)

El eNOS produce NO a partir de la L-arginina. El NO tiene diversas funciones reguladoras fisiológicas y participa en la relajación del músculo liso, la inhibición de la agregación plaquetaria, la regulación inmune, la neurotransmisión y la regulación de la presión arterial (8). Un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluido el anión superóxido, puede contribuir a las complicaciones diabéticas. El anión superóxido reacciona con NO con gran afinidad para producir peroxinitrito, que es un agonista débil para la activación del monofosfato de guanosina cíclica (cGMP). Por lo tanto, el anión superóxido inactiva efectivamente el NO. Se postula que la activación de la NADPH oxidasa en la DM podría suprimir la acción de NO, aumentando la expresión del ARNm del Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) y la fibronectina en el glomérulo. Esto conduciría a disminuir la expresión de las metaloproteinasas de la matriz, y aumentar la expresión del inhibidor tisular de las metaloproteinasas en el riñón. Estos mecanismos podrían contribuir a la fisiopatología de la ND.(26)

Se ha demostrado que la inhibición de la eNOS acelera la aterosclerosis en modelos animales y que las anomalías de la vía endotelial de NO están presentes en los humanos con aterosclerosis, esta evidencia sugiere que el NO puede inhibir varios pasos claves en el proceso aterosclerótico y que una alteración de la producción de NO dentro del endotelio vascular podría contribuir a la patogénesis de la aterosclerosis.(20)

El polimorfismo rs1799983 presente en el exón 7 del gen eNOS, da como resultado una sustitución Glu>Asp en el residuo 298 de la proteína codificada por el gen eNOS, el cual ha sido relacionado con una actividad enzimática reducida en sujetos que presentaban la variante homocigota Asp/Asp.(29)

### **5.9.3 Enzima convertidora de angiotensina (ECA)**

Como se mencionó en el Capítulo 4, la ECA es un componente clave del sistema renina angiotensina (RAS) que desempeña un papel importante en la



homeostasis de la presión arterial al generar el péptido vasoconstrictor angiotensina II y al inactivar los péptidos vasodilatadores bradiquinina y angiotensina.(30)

La importancia fisiológica del polimorfismo rs4646994 del gen ECA es su relación directa con la actividad de la ECA en plasma, la presencia del genotipo DD de este polimorfismo se asocia con un aumento al doble de la actividad de la ECA, mientras que aquellos con el genotipo II tienen la expresión más baja de la misma.(30)

En pacientes diabéticos, la hiperglucemia aumenta la angiotensina II en los tejidos, lo que induce estrés oxidativo, hiperfiltración glomerular, daño endotelial, trombosis, inflamación y remodelación vascular. La ECA regula la microcirculación dentro del riñón a través de la generación de angiotensina II y, en presencia del alelo D de ECA, el IFG se aumenta en correlación con los niveles plasmáticos de ECA.(30)

#### **5.9.4 Proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKAL1)**

Como se mencionó en el Capítulo 4, el gen de la proteína similar a la proteína reguladora asociada a la subunidad 1 de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKAL1) codifica a una metiltiotransferasa que cataliza las modificaciones de 2-metiltio (ms2) de varios sustratos, esta modificación m2 del ARNt Lys (UUU) estabiliza la interacción con el codón, permitiendo una traducción eficiente del codón AAG (ambos codones, AAA y AAG, reconocen el aminoácido Lisina).(31)

La asociación entre el rs7756992 del gen CDKAL1 y la DM2 se mencionó por primera vez a través de un estudio de GWAS. Se detectó una asociación en la población total cuando estaba presente la variante G del rs7756992 del gen CDKAL1 y la DM2.(32)

En el meta-análisis realizado por Dehwah y colaboradores, tras analizar 21 estudios que investigan la asociación del rs7756992 y la DM2, llegaron a la conclusión de que la variante G es un factor de riesgo al desarrollo de DM2 (OR=1,15 (1,07-1,23 IC 95%); p<0,0001).(33)

En un estudio de asociación de casos y controles realizado por Lasram y colaboradores, que incluyó 200 pacientes tunecinos con DM2 y 208 controles no diabéticos, sugirió que la variante G del rs7756992 presente en el gen CDKAL1 tendría un efecto protector contra la ND (OR=0,44 (0,27-0,73 IC 95%); p=0,001).(25)

En el meta-análisis realizado por Dehwah y colaboradores, tras analizar 21 estudios que investigan la asociación del rs7756992 y la DM2, llegaron a la conclusión de que la variante G es un factor de riesgo al desarrollo de DM2 (OR=1,15 (1,07-1,23 IC 95%); p<0,0001).(27)

En un estudio de asociación de casos y controles realizado por Lasram y colaboradores, que incluyó 200 pacientes tunecinos con DM2 y 208 controles no diabéticos, sugirió que la variante G del rs7756992 presente en el gen CDKAL1 tendría un efecto protector contra la ND (OR=0,44 (0,27-0,73 IC 95%); p=0,001).(28)

## **5.10 OBJETIVO ESPECÍFICO**

En base a los estudios mencionados previamente, el objetivo planteado en esta etapa fue:

- Valorar la asociación entre la presencia de diversos polimorfismos genéticos y la nefropatía diabética de pacientes con DM2.

## **5.11 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.11.1 Tipo de estudio**

Este es un estudio de tipo descriptivo y de carácter observacional, prospectivo y transversal.

### **5.11.2 Pacientes**

En este estudio se incluyó un total de 88 individuos con DM2 mayores de 21 años (40 pacientes con ND y 48 pacientes sin ND) que asistieron al Servicio de Diabetología del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba Capital, para realizarse el control de diabetes. El estudio fue aprobado por el Comité del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba y el Ministerio de Salud de Córdoba y estuvo sujeto a los acuerdos establecidos en la declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados y su consentimiento fue obtenido.

### **5.11.3.1 Criterios de inclusión**

- Individuos mayores a 21 años
- Pacientes con DM2

### **5.11.3.2 Criterios de exclusión**

- Individuos menores de 21 años
- Pacientes sin DM2
- Pacientes con otro tipo de diabetes
- Pacientes con algún tipo de complicación renal
- Mujeres embarazadas

### **5.11.4 Muestras biológicas**

Las muestras analizadas consistieron en:

- Sangre entera tratada con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® K<sub>2</sub>-EDTA.
- Suero obtenido de sangre, obtenido por venipuntura en tubos BD Vacutainer® SST™ con gel separador y acelerador de la coagulación. La muestra se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se la centrifugó a 3.800 rpm por 10 minutos.
- Los pacientes se presentaron con 12 horas de ayuno.

## **5.11.5 Procedimientos**

### **5.11.5.1 Formulario de preguntas**

Todos los pacientes completaron un cuestionario que reveló información esencial (edad y sexo), tabaquismo, estado de salud, uso de insulina y/o terapia con agentes orales antidiabéticos y cualquier antecedente de otras enfermedades sistémicas, y antecedentes familiares de enfermedades.

### **5.11.5.2 Procesamiento de Muestras**

#### **5.11.5.2.1 Parámetros bioquímicos**

Los pacientes acudieron al laboratorio clínico después de un ayuno de 12 horas y se obtuvieron muestras de sangre venosa. Las muestras de sangre venosa en ayunas se recolectaron para medir los parámetros bioquímicos, que se estudiaron como ensayos de seguimiento de rutina para pacientes diabéticos. Estas mediciones incluyeron glucosa en ayunas, hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol total, triglicéridos, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), determinadas por un sistema automatizado con reactivos para biomarcadores de rutina con un analizador Roche COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza).

Los detalles de las pruebas bioquímicas se encuentran descritos en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina-“Parámetros Bioquímicos”).

#### 5.11.5.2.1.1 Microalbuminuria (MAU): Inmunoturbidimetría

Para la detección de microalbuminuria se utilizaron técnicas inmunoturbidimétricas. La albúmina de la muestra de orina, reacciona con el anticuerpo específico anti-albumina humana formando inmunocomplejos insolubles. La turbidez causada por estos inmunocomplejos es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra y puede ser medida espectrofotométricamente a 340 nm. (34)

#### 5.11.5.2.1.2 Estimación del filtrado glomerular mediante la fórmula CKD-EPI

La ecuación utilizada para estimar el Índice de Filtrado Glomerular (IFGe) en los pacientes con DM2 fué la fórmula establecida por la Colaboración Epidemiológica de la Enfermedad Renal Crónica (CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration).(35)

$$IFGe = 141 \times \min\left(\frac{CrS}{\kappa, 1}\right)^\alpha \times \max\left(\frac{CrS}{\kappa, 1}\right)^{-1,209} \times 0,993^{edad} \times 1,018 \text{ si es mujer} \\ \times 1,159 \text{ si es de raza negra}$$

CrS= creatininemia (mg/dL)

$\kappa = 0,7$  mujeres /  $0,9$  hombres

$\alpha = -0,329$  mujeres /  $-0,411$  hombre

min indica el mínimo de  $Scr / \kappa$  o  $1$ , y max indica el máximo de  $Scr / \kappa$  o  $1$ .

#### 5.11.5.2.2 Extracción de ADN

Se utilizó el kit "Wizard® DNA Purification Kit" (Cat. #A1120, Promega). Remitirse al protocolo presente en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina- "Extracción de ADN").

### 5.11.5.2.3 Amplificación de los genes seleccionados para el estudio mediante PCR

Los polimorfismos seleccionados para el estudio fueron los siguientes:

- rs841853 del gen SLC2A1
- rs1799983 del gen eNOS
- rs4646994 del gen ECA
- rs7756992 del gen CDKAL1

La amplificación mediante PCR de los polimorfismos seleccionados fueron realizados mediante el protocolo presente en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina- “Amplificación del gen SLC22A1 mediante PCR”). Los primers utilizados se encuentran detallados en la Tabla XX.

**Tabla XX. Secuencia de primers y tamaños de amplificación obtenidos por PCR de los polimorfismos estudiados (Estudio Nefropatía Diabética)**

Polimorfismos	Secuencia del Primer (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)
SLC2A1-rs841853	F:AAAGACCTTGTCCTGCTGC	1100
	R:AAGGAACGTCTGTAGGCCAG	
eNOS-rs1799983	F:GAGGATGGGGCTGACTAGGTA	248
	R:TACTTCTCCAGGCTCACAGC	
ECA-rs4646994	F:CTGGAGACCCCATCCTTTCT	I: 490
	R:GATGTGGCCATCACATTCGTCAGA	D:190
CDKAL1-rs7756992	F:GGGTGTGAGGATTGAAGTCGG	279
	R:AAACATTAGCCCCATCTCCCT	

pb: pares de base. F: Forward / R: Reverse

Las PCR se realizaron empleando las siguientes condiciones de ciclado:

- Inicio: a 94° C por 2 minutos
- Desnaturalización: a 94° C por 50 segundos
- Hibridación: a 58° C por 50 segundos

- d) Extensión: a 72° C por 1 minuto
- e) Elongación Final: a 72° C por 5 minutos
- f) Conservación: a - 20° C

Se repitieron cíclicamente las fases b-c-d por 35 veces.

Se utilizó un termociclador Biometra UNO II® (Göttingen, Alemania).

#### 5.11.5.2.4 Digestión Enzimática de los productos de PCR amplificados

A los productos de PCR amplificados (15 µl) se les realizó la digestión enzimática con las endonucleasas de restricción según las condiciones detalladas en la Tabla XXI.

**Tabla XXI. Endonucleasas de restricción, reactivos y condiciones utilizadas y tamaños de los fragmentos de restricción esperados a partir de los productos obtenidos de los polimorfismos estudiados (Estudio Nefropatía Diabética)**

Polimorfismos	Endonucleasa de Restricción	Buffer	Temperatura y Tiempo de Incubación	Tamaño del Fragmento digerido (pb)	
	Volumen (µl)	Volumen (µl)		N	M
<b>SLC2A1-rs841853</b>	Enzima XbaI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® CutSmart (10x, Biolabs™)	37° C	1100	900 y 200
	0,3	2*	3 horas		
<b>eNOS-rs1799983</b>	Enzima MboI (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® CutSmart (10x, Biolabs™)	37° C	248	85 y 163
	0,3	1,7	3 horas		
<b>CDKAL1-rs7756992</b>	Enzima BglII (20.000 UI/mL, Biolabs™)	NEBuffer® Buffer 3.1 (10x, Biolabs™)	37° C	201 y 78	279
	0,3	1,7	3 horas		

N: alelo normal, M: alelo mutado, pb: pares de base.



### **5.11.5.2.5 Electroforesis en gel de agarosa**

Para la electroforesis en gel de agarosa se utilizó el protocolo descrito en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina -“Electroforesis en gel de agarosa”).

### **5.11.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el software SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) y se empleó un modelo de regresión logística múltiple (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo) para obtener los odds ratios (ORs), considerando una significativa diferencia a un valor de  $p < 0,05$ , con un IC del 95 %.(30)

Las frecuencias genotípicas y alélicas fueron calculadas y comparadas para ver si estaban en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg, para determinar la aleatoriedad de la población tomada.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el uso de la prueba para calcular el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y t de Student, considerando una diferencia significativa un valor de  $p < 0,05$ .

El software utilizado para el tratamiento de los datos estadísticos fue el Infostat (versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## 5.12 RESULTADOS

Para el estudio de variantes genéticas asociadas a la ND, la población del estudio consistió en 88 pacientes con DM2, 48 pacientes sin ND (S/ND) y 40 pacientes con ND (C/ND).

En la Tabla XXII se muestran las características clínicas y bioquímicas de los individuos clasificados según la presencia o ausencia de la ND (S/ND y C/ND). En la población estudiada no hubo diferencia significativa en la proporción de hombres y mujeres en la muestra estudiada, pero sí la hubo en la edad que presentaban los pacientes de los grupos S/ND y C/ND ( $p=0,0003$ ) siendo el grupo C/ND aproximadamente, en promedio, 10 años mayor que el grupo S/ND. También el tiempo de duración de la diabetes era mayor en los pacientes C/ND. La mayor parte de los pacientes presentaban HTA, reflejándose en valores aumentados de presión sistólica (mayor a 120 mmHg) y además cierto grado de obesidad (IMC normal: 18,5-24,99).

Cuando se analizaron los parámetros bioquímicos, se observó que en la población estudiada los niveles de HbA1c y glucemia se encontraban elevados con respecto a los valores normales (HbA1c: 4,8-6% y glucemia: 70-110 mg%). El perfil lipídico de los pacientes es decir, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL se encontraban en los valores normales (CT: menor a 200 mg/dL, colesterol HDL: 35-55 mg/dL y colesterol LDL: menor a 150 mg/dL), mientras que la trigliceridemia se encontraba levemente aumentada (TG: menor a 150 mg/dL).

Cuando se compararon las funciones renales se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de creatinina ( $p<0,0001$ ) y en el IFGe (CKDEPI) ( $p<0,0001$ ) entre los pacientes S/ND y C/ND. La función renal de los pacientes C/ND estaba disminuida. La albuminuria se encontraba elevada en ambos grupos con respecto a los valores normales (Albuminuria: menor a 20  $\mu\text{g}/\text{min}$ ), pero no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de pacientes ( $p=0,0887$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los otros parámetros analizados.

**Tabla XXII. Parámetros clínicos, bioquímicos y estilos de vida en la población estudiada (Estudio Nefropatía Diabética)**

	<b>S/ND (n= 48)</b>	<b>C/ND (n=40)</b>	<b>Valor p</b>
<b>Sexo (F/M)</b>	30/18	22/18	0,4818
<b>Edad (Años)</b>	62,52 ± 9,39	71,98 ± 6,76	0,0003
<b>Duración de la diabetes (Años)</b>	12,71 ± 10,66	15,03 ± 12,47	0,3501
<b>Hipertensión (Si/No)</b>	36/12	33/7	0,4003
<b>Fumador (Si/No)</b>	6/42	4/36	0,7167
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,59 ± 5,53	30,27 ± 5,49	0,7910
<b>Terapia con Insulina (Si/No)</b>	23/25	12/28	0,0892
<b>Glucemia (mg %)</b>	133,52 ± 50,07	132,56 ± 51,42	0,9295
<b>HbA1c (%)</b>	7,92 ± 1,62	7,8 ± 1,64	0,7471
<b>Creatininemia (mg/dl)</b>	0,92 ± 0,21	1,38 ± 0,46	<0,0001
<b>CKDEPI (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)</b>	78,5 ± 20,82	46,85 ± 10,15	<0,0001
<b>Albuminuria (µg/min)</b>	25,06 ± 26,69	46,91 ± 53,91	0,0887
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	177,1 ± 41,22	173,16 ± 41,57	0,6841
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	158,64 ± 80,29	160,42 ± 67,66	0,9997
<b>HDL colesterol (mg/dl)</b>	55,51 ± 32,46	49,73 ± 23,53	0,4137
<b>LDL colesterol (mg/dl)</b>	103,03 ± 32,55	99,67 ± 34,58	0,6805
<b>Presión sistólica (mmHg)</b>	127,89 ± 18,52	131,66 ± 19,18	0,3684
<b>Presión diastólica (mmHg)</b>	74,49 ± 10,69	75,55 ± 11,62	0,6695

Los datos están expresados como la media ± la desviación estándar (DE) o número de pacientes.

Las diferencias entre los grupos de pacientes sin Nefropatía Diabética (S/ND) y Con Nefropatía Diabética (C/ND) fueron comparados usando el t test o el del Chi-cuadrado.

IMC, índice de masa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; CKDEPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration);

En la Figura 10 se pueden observar los resultados de electroforesis en geles de agarosa con muestras de ADN y, de ser necesario, posterior digestión enzimática con las endonucleasas de restricción correspondientes (Tabla XX) de los distintos polimorfismos estudiados, (A) rs841853 del gen SLC2A1, B) rs1799983 del gen eNOS, C) rs7756992 del gen CDKAL1 y D) rs4646994 del gen ECA). Como se puede observar, luego de la digestión enzimática, cada polimorfismo presenta fragmentos de distintos tamaños (señaladas con Flechas Blancas) permitiendo así la distinción del genotipo, el polimorfismo rs4646994 del gen ECA no requiere digestión enzimática, los fragmentos esperados se detallan en la Tabla XX.

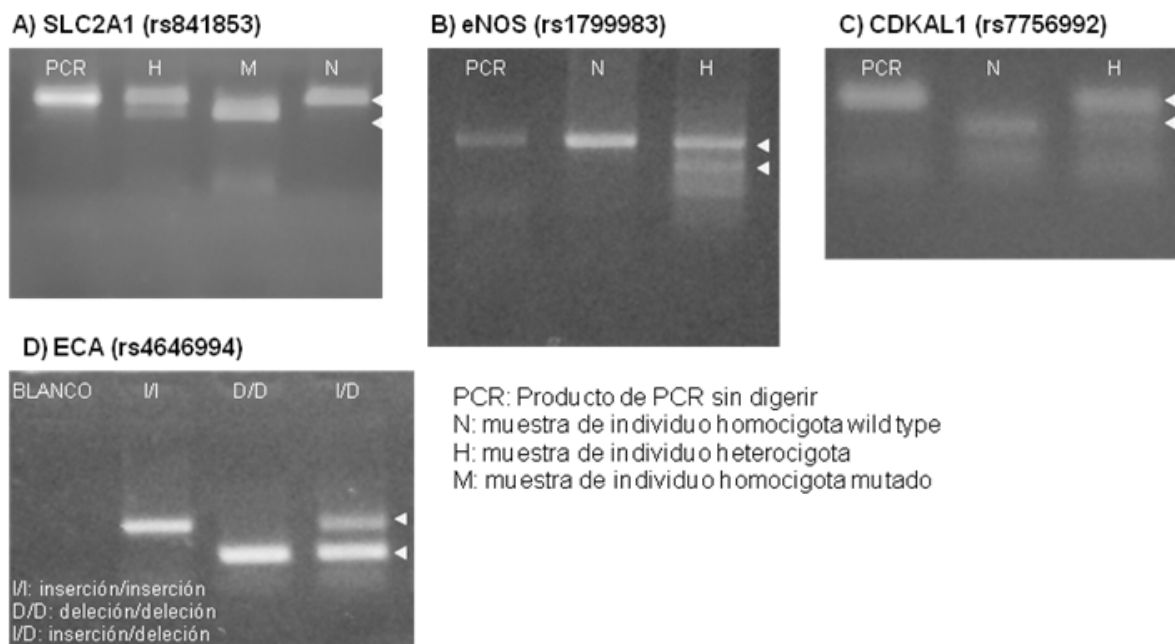
En cada carril en las electroforesis en geles de agarosa se pueden observar:

- Producto de PCR sin digerir (fragmentos mencionados en la Tabla XX)
- Producto de PCR de un individuo Homocigota Wild Type (N)

- Producto de PCR de un individuo Heterocigota (H)
- Producto de PCR de un individuo Homocigota Mutado (M)

En la electroforesis en gel de agarosa para visualizar el rs4646994 del gen ECA (Figura 10- D) se puede observar:

- Blanco de Reacción
- Producto de PCR de un individuo con genotipo I/I
- Producto de PCR de un individuo con genotipo D/D
- Producto de PCR de un individuo con genotipo I/D



**Figura 10. Electroforesis en gels de agarosa al 2,5% P/V de los productos de PCR para cada polimorfismo digeridos con la enzima de restricción, según correspondía (Estudio Nefropatía Diabética).**

Para determinar la aleatoriedad de la población estudiada, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos para ver si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla XXIII).

**Tabla XXIII. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos estudiados**

	Frecuencia Genotípica (n/frecuencia)						Frecuencia Alélica		HWE
	wt/wt		wt/mut		mut/mut		wt	mt	valor p
<b>SLC2A1 (rs841853)</b>	22	0,25	40	0,45	26	0,30	0,48	0,52	0,4
<b>e-NOS (rs1799983)</b>	47	0,53	34	0,39	7	0,08	0,73	0,27	0,79
<b>ECA (rs4646994)</b>	24	0,27	35	0,40	29	0,33	0,47	0,53	0,057
<b>CDKAL1 (rs7756992)</b>	21	0,24	42	0,48	25	0,28	0,48	0,52	0,67

Wt: Wild type

Mut: mutado

n: número de pacientes

HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg

Como se puede observar en la Tabla XXIII al menos un SNP de cada gen analizado fue encontrado en los pacientes estudiados. En la población estudiada la frecuencia de pacientes con al menos 1 alelo mutado para los distintos polimorfismos fueron: 52% para el rs841853; 27% para el rs1799983; 53% para el rs4646994; y 52% para el rs7756992. Los genotipos de los diferentes polimorfismos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ), asegurando la aleatoriedad de la población estudiada.

Para el análisis de asociación entre los polimorfismos estudiados y la presencia o ausencia de ND, se utilizó un modelo de regresión logística múltiple (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo).

El gen SLC2A1, codifica a la proteína GLUT1, la cual media el flujo de glucosa de las células mesangiales que conduce a la activación de las cascadas de señalización que favorecen la glomeruloesclerosis (20). Se observó la asociación entre el polimorfismo rs841853 del gen SLC2A1, y el riesgo de ND en la DM (21). Se analizó la relación entre el SNP rs841853 y la presencia de ND (Tabla XXIV).

**Tabla XXIV. Asociación del SNP rs841853 presente en el gen SLC2A1 con la presencia de Nefropatía Diabética**

Modelo	Genotipo	S/ND	C/ND	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	G/G	14 (29,2)	8 (20)	1,00	0,48
	G/T	22 (45,8)	18 (45)	1,43 (0,49-4,17)	
	T/T	12 (25)	14 (35)	2,04 (0,64-6,52)	
Dominante	G/G	14 (29,2)	8 (20)	1,00	0,32
	G/T-T/T	34 (70,8)	32 (80)	1,65 (0,61-4,45)	
Recesivo	G/G-G/T	36 (75)	26 (65)	1,00	0,31
	T/T	12 (25)	14 (35)	1,62 (0,64-4,06)	
Sobredominante	G/G-T/T	34 (70,8)	32 (80)	1,00	0,94
	G/T	22 (45,8)	18 (45)	0,97 (0,42-2,25)	
Log-aditivo	---	---	---	1,43 (0,80-2,55)	0,22

IC: Intervalo de confianza 95%. p calculado del test Chi-cuadrado.

S/ND, Sin Nefropatía Diabética; C/ND, Con Nefropatía Diabética.

n: número de pacientes

=: porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo G/G del rs841853 del gen SLC2A1 fue del 29,2% en los pacientes S/ND y 20% en los pacientes C/ND; mientras que para genotipo T/T fue del 25% en los pacientes S/ND y 35% en los pacientes C/ND; y para el genotipo G/T fue 45,8% en los pacientes S/ND y 45% en los pacientes C/ND (Tabla XXIV)

En los análisis realizados entre el rs841853 del gen SLC2A1 y la presencia de ND, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos estudiados: Codominante (OR= 1,43 (0,49-4,17); p=0,48), Dominante (OR= 1,65 (0,61-4,45); p=0,32), Recesivo (OR= 1,62 (0,64-4,06); p=0,31), Sobredominante (OR= 0,97 (0,42-2,25); p=0,94) y Log-aditivo (OR= 1,43 (0,80-2,55); p=0,22) (Tabla XXIV).

El óxido nítrico tiene diversas funciones reguladoras fisiológicas y participa en la relajación del músculo liso, la inhibición de la agregación plaquetaria, la regulación inmune, la neurotransmisión y la regulación de la presión arterial (8). El polimorfismo rs1799983 del gen eNOS, da como una proteína con actividad enzimática reducida (23). Se analizó la relación entre el SNP rs1799983 y la presencia de ND (Tabla XXV).

**Tabla XXV. Asociación del SNP rs1799983 presente en el gen eNOS con la presencia de Nefropatía Diabética**

Modelo	Genotipo	S/ND	C/ND	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	G/G	26 (54,2)	21 (52,5)	1,00	0,33
	G/T	18 (37,5)	16 (40)	1,10 (0,45-2,67)	
	T/T	4 (8,3)	3 (7,5)	0,93 (0,19-4,62)	
Dominante	G/G	26 (54,2)	21 (52,5)	1,00	0,14
	G/T-T/T	22 (45,8)	19 (47,5)	1,07 (0,46-2,48)	
Recesivo	G/G-G/T	44 (91,7)	37 (92,5)	1,00	0,77
	T/T	4 (8,3)	3 (7,5)	0,89 (0,19-4,24)	
Sobredominante	G/G-T/T	30 (62,5)	24 (60)	1,00	0,19
	G/T	18 (37,5)	16 (40)	1,11 (0,47-2,63)	
Log-aditivo	---	---	---	1,02 (0,53-1,97)	0,19

IC: Intervalo de confianza 95%. p calculado del test Chi-cuadrado.

S/ND, Sin Nefropatía Diabética; C/ND, Con Nefropatía Diabética.

n: número de pacientes

?: porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo G/G del rs1799983 del gen eNOS fue del 54,2% en los pacientes S/ND y 52,5% en los pacientes C/ND; mientras que para genotipo T/T fue del 8,3% en los pacientes S/ND y 7,5% en los pacientes C/ND; y para el genotipo G/T fue 37,5% en los pacientes S/ND y 40% en los pacientes C/ND (Tabla XXV).

En los análisis realizados entre el rs1799983 del gen eNOS y la presencia de ND, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos estudiados: Codominante (OR= 1,10 (0,45-2,67); p=0,33), Dominante (OR= 1,07 (0,46-2,48); p=0,14), Recesivo (OR= 0,89 (0,19-4,24); p=0,77), Sobredominante (OR= 1,11 (0,47-2,63); p=0,19) y Log-aditivo (OR= 1,02 (0,53-1,97); p=0,19) (Tabla XXV).

La ECA es una enzima que cumple la función de hidrolizar la angiotensina I a angiotensina II y desempeña un papel clave en la modulación del tono vascular, y se asocia a la ND ya que la hiperglucemia aumenta la angiotensina II en los tejidos, lo que induce estrés oxidativo, hiperfiltración glomerular, daño endotelial, trombosis, inflamación y remodelación vascular. La importancia fisiológica del polimorfismo rs4646994 del gen ECA es su relación directa con la actividad de la ECA en plasma, la presencia del genotipo DD de este polimorfismo se asocia con un aumento al doble de la actividad de la ECA, mientras que aquellos con el genotipo II tienen la expresión más baja de la misma (24), por ellos se analizó la relación entre el SNP rs4646994 y la presencia de ND (Tabla XXVI).

**Tabla XXVI. Asociación del SNP rs4646994 presente en el gen ECA con la presencia de Nefropatía Diabética**

Modelo	Genotipo	S/ND	C/ND	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	D/D	13 (27,1)	11 (27,5)	1,00	0,55
	I/D	19 (39,6)	16 (40)	0,80 (0,12-5,40)	
	I/I	16 (33,3)	13 (32,5)	2,40 (0,30-19,04)	
Dominante	D/D	13 (27,1)	11 (27,5)	1,00	0,73
	I/D-I/I	35 (72,9)	29 (72,5)	1,33 (0,25-7,01)	
Recesivo	D/D-I/D	32 (66,7)	27 (67,5)	1,00	0,28
	I/I	16 (33,3)	13 (32,5)	2,67 (0,41-17,17)	
Sobredominante	D/D-I/I	32 (66,7)	27 (67,5)	1,00	0,49
	I/D	19 (39,6)	16 (40)	0,55 (0,10-3,00)	
Log-aditivo	---	---	---	1,49 (0,55-4,03)	0,43

IC: Intervalo de confianza 95%. p calculado del test Chi-cuadrado.

S/ND, Sin Nefropatía Diabética; C/ND, Con Nefropatía Diabética.

n: número de pacientes

#: porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo D/D del rs4646994 del gen ECA fue del 27,1% en los pacientes S/ND y 27,5% en los pacientes C/ND; mientras que para genotipo I/I fue del 33,3% en los pacientes S/ND y 32,5% en los pacientes C/ND; y para el genotipo I/D fue 39,6% en los pacientes S/ND y 40% en los pacientes C/ND (Tabla XXVI).



Los resultados del estudio para los análisis realizados entre el rs4646994 del gen ECA y la presencia de ND, no muestran diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos estudiados: Codominante (OR= 0,80 (0,12-5,40); p=0,55), Dominante (OR= 1,33 (0,25-7,01); p=0,73), Recessivo (OR= 2,67 (0,41-17,17); p=0,28), Sobredominante (OR= 0,55 (0,10-3,00); p=0,49) y Log-aditivo (OR= 1,49 (0,55-4,03); p=0,43) (Tabla XXVI).

El gen que codifica para CDKAL1 traduce a una metiltiotransferasa que cataliza las modificaciones de 2-metilto (ms2) de varios sustratos, incluida la adición de ms2 a N6-treonil-carbamoil adenósido en la posición 37 del ARN de transferencia Lys (UUU)(28). La variante rs7756992 del gen CDKAL1 fue estudiada como posible polimorfismo asociado a ND (27). Se analizó la relación entre el SNP rs7756992 y la presencia de ND (Tabla XXVII).

**Tabla XXVII. Asociación del SNP rs7756992 presente en el gen CDKAL1 con la presencia de Nefropatía Diabética**

Modelo	Genotipo	S/ND	C/ND	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	A/A	12 (25)	9 (22,5)	1,00	0,92
	A/G	22 (45,8)	20 (50)	1,21 (0,42-3,48)	
	G/G	14 (29,2)	11 (27,5)	1,05 (0,32-3,38)	
Dominante	A/A	12 (25)	9 (22,5)	1,00	0,78
	A/G-G/G	36 (75)	31 (77,5)	1,15 (0,43-3,09)	
Recesivo	A/A-A/G	34 (70,8)	29 (72,5)	1,00	0,86
	G/G	14 (29,2)	11 (27,5)	0,92 (0,36-2,34)	
Sobredominante	A/A-G/G	26 (54,2)	20 (50)	1,00	0,7
	A/G	22 (45,8)	20 (50)	1,18 (0,51-2,74)	
Log-aditivo	---	---	---	1,02 (0,57-1,82)	0,96

IC: Intervalo de confianza 95, p calculado del test Chi-cuadrado,

S/ND, Sin Nefropatía Diabética; C/ND, Con Nefropatía Diabética,

n: número de pacientes

%: porcentaje de pacientes

En la población estudiada, la frecuencia del genotipo A/A del rs7756992 del gen CDKAL1 fue del 25% en los pacientes S/ND y 22,5% en los pacientes C/ND; mientras que para genotipo G/G fue del 29,2% en los pacientes S/ND y 27,5% en los

pacientes C/ND; y para el genotipo A/G fue 45,8% en los pacientes S/ND y 50% en los pacientes C/ND (Tabla XXVII).

En los análisis realizados entre el rs7756992 del gen CDKAL1 y la presencia de ND, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos estudiados: Codominante (OR= 1,21 (0,42-3,48); p=0,92), Dominante (OR= 1,15 (0,43-3,09); p=0,78), Recesivo (OR= 0,92 (0,36-2,34); p=0,86), Sobredominante (OR= 1,18 (0,51-2,74); p=0,7) y Log-aditivo (OR= 1,02 (0,57-1,82); p=0,96) (Tabla XXVII).

En resumen, en este estudio se analizó la posible asociación entre distintos polimorfismos y la presencia o ausencia de ND. La relación entre la presencia de los polimorfismos rs841853 (gen SLC2A1); rs1799983 (gen eNOS); rs4646994 (gen ECA); rs7756992 (gen CDKAL1) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes S/ND y C/ND clínicas y el riesgo a desarrollar ND.

## 5.13 DISCUSIÓN

Los problemas renales son relativamente comunes en las personas con DM. Esto se debe a que la diabetes afecta a todas las arterias del cuerpo. Se estima que aproximadamente el 40% de las personas que tienen DM2 desarrollan ND.(14)

Tanto los pacientes con DM1 como los con DM2 pueden verse afectados por nefropatía. La nefropatía diabética es una causa importante de enfermedad renal a largo plazo y enfermedad renal en etapa terminal, necesitando de diálisis o trasplantes.(14)

A pesar de que la hiperglucemia está estrechamente relacionada con el desarrollo de complicaciones microvasculares, la evidencia de una relación directa entre la hiperglucemia y la nefropatía es menos convincente en los seres humanos, ya que solo el 30% de los pacientes diabéticos desarrollan nefropatía clínica. (37)

La mayoría de los pacientes no llegan a la insuficiencia renal, aunque en muchos de ellos hay evidencia histológica de daño renal. No está claro por qué algunos pacientes diabéticos son más susceptibles que otros al desarrollo de la enfermedad renal. Los factores hereditarios pueden proporcionar protección contra la susceptibilidad a la nefropatía diabética, pero no hay evidencia sobre qué factores son importantes. La predisposición familiar a la hipertensión arterial, aumenta la susceptibilidad a la enfermedad renal en pacientes con DM.(38)

Estudios han demostrado que los pacientes con DM que presentan presión arterial alta, progresan a microalbuminuria mas frecuentemente que en los pacientes con DM que tienen presión arterial normal, lo que indica que la hipertensión es un factor de riesgo importante para la ND.(38)

Nuestros pacientes diabéticos tipo 2 del estudio se clasificaron en dos grupos según la presencia o ausencia de ND.

Entre los pacientes con ND y sin ND, se observó diferencia estadística en los valores de creatininemia y el IFGe ( $p < 0,001$ ).

Como sucede con la RD, debido a la compleja interacción entre la DM2 y factores ambientales y genéticos, se han realizado varios estudios para identificar genes, y sus variantes asociadas con la ND.

Varias investigaciones han examinado al gen SLC2A1 como un gen candidato que podría conferir susceptibilidad al desarrollo de ND (26,39). Se han estudiado varias variantes del gen SLC2A1 (rs841853 (40), rs841847 (41), rs841848 (42), rs1385129 (42) y rs710218 (42) para ver si hay asociación entre dichos polimorfismos y la ND, pero los resultados no siempre fueron concluyentes, una posible razón puede ser la heterogeneidad genética de las diferentes poblaciones o la heterogeneidad clínica de los diferentes estudios.(42)

En el estudio de Makni y colaboradores, observaron que la variante T en el rs841853 presente en el gen SLC2A1, confiere susceptibilidad a ND en pacientes con DM2 en una población tunecina (40). En nuestro estudio, no se observó ninguna asociación entre la presencia del polimorfismo rs841853 y la presencia de ND.

Como mencionamos anteriormente, el gen ECA y su variante rs4646994 son muy estudiadas en distintas complicaciones cardiovasculares y en la DM2. Se ha sugerido que el alelo D del gen ECA juega un papel importante en la progresión a la ND (43). En el estudio de Fathi y colaboradores, observaron una asociación entre la presencia del polimorfismo rs4646994 del gen ECA con la ND (43). En nuestro estudio, no se observó ninguna asociación entre la presencia del polimorfismo rs4646994 y la presencia de ND en pacientes con DM2.

Se ha sugerido que la disfunción endotelial vascular resultante de la alteración de la actividad de la NOS en las células endoteliales vasculares, desempeña un papel importante en la patogenia de la ND (44). Se ha informado que el polimorfismo rs1799983 en el gen eNOS se asocia con disfunción endotelial que conduce a ND. En el estudio realizado por Mrozikiewicz-Rakowska y colaboradores no encontraron ninguna asociación entre la presencia del polimorfismo y la ND (45). En nuestro estudio tampoco se observó asociación entre la presencia del polimorfismo rs1799983 y la presencia de ND en pacientes con DM2.

Como mencionamos anteriormente, el gen CDKAL1 se lo ha estudiado en la DM2, ya sea en su predisposición al desarrollo de la patología o a la presencia de complicaciones.(33)

En el estudio de Lasram y colaboradores, sugiere que el rs7756992 del gen CDKAL1 tiene un efecto protector contra la ND (25). En nuestro estudio no se observó ninguna asociación entre el polimorfismo rs7756992 del gen CDKAL1 y la presencia de ND.

## 5.14 BIBLIOGRAFÍA

1. Varios. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Rev Asoc Latinoam Diabetes. 2013
2. National Institute for Clinical Excellence (NICE). Chronic kidney disease in adults : assessment and management. 2017;(July 2014).
3. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KAM, Zoungas S, et al. Diabetic kidney disease. Nat Rev Dis Prim. 2015 Jul 30;1:15018.
4. Kellum JA, Lameire N, Aspelin P, Barsoum RS, Burdmann E a, Goldstein SL, et al. Summary of Recommendation Statements. Kidney Int Suppl. 2012 Mar;2(1):8–12.
5. Martínez-Castelao A, Górriz JL, Bover J, Segura-de la Morena J, Cebollada J, Escalada J, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. Endocrinol y Nutr. 2014 Nov;61(9):e25–43.
6. Guyton A, Hall J. Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica. Vol. 12, ELSEVIER. 2010. p. 961–976
7. Yamagishi S. Role of AGEs in diabetic nephropathy. Curr Pharm Des. 2008;14(10):946–52.
8. Macisaac RJ, Ekinci EI, Jerums G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. Am J Kidney Dis. 2014;63(2 SUPPL.2):S39–62.
9. Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: Overview. Diabetes Care. 2014;37(1):9–16.
10. Hosseini SM, Boright AP, Sun L, Canty AJ, Bull SB, Klein BEK, et al. The association of previously reported polymorphisms for microvascular complications in a meta-analysis of diabetic retinopathy. Hum Genet.

2015;134(2):247–57.

11. Schrier RW, Estacio RO, Mehler PS, Hiatt WR. Appropriate blood pressure control in hypertensive and normotensive type 2 diabetes mellitus: a summary of the ABCD trial. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007 Aug;3(8):428–38.
12. Feodoroff M, Harjutsalo V, Forsblom C, Thorn L, Wadén J, Tolonen N, et al. Smoking and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Acta Diabetol*. 2016 Aug 14;53(4):525–33.
13. Su S, Wang W, Sun T, Ma F, Wang Y, Li J, et al. Smoking as a risk factor for diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Int Urol Nephrol*. 2017 Oct 19;49(10):1801–7.
14. Min TZ, Stephens MW, Kumar P, Chudleigh RA. Renal complications of diabetes. *Br Med Bull*. 2012 Dec 1;104(1):113–27.
15. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(5):643–8.
16. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Oct 9;359(15):1577–89.
17. Rajput R, Sinha B, Majumdar S, Shunmugavelu M, Bajaj S. Consensus statement on insulin therapy in chronic kidney disease. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017;127:10–20.
18. Molitch M, Group A. Diabetic nephropathy (2003). *Diabetes Care*. 2003;26(October 2001):S94–8.
19. Alkayyali S, Lyssenko V. Genetics of diabetes complications. *Mamm Genome*. 2014 Oct;25(9–10):384–400.
20. Ahlqvist E, Van Zuydam NR, Groop LC, McCarthy MI. The genetics of diabetic complications. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(5):277–87.
21. Emanuele N, Sacks J, Klein R, Reda D, Anderson R, Duckworth W, et al.

- Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. *Diabetes Care*. 2005 Aug;28(8):1954–8.
22. Saeed M. Locus and gene-based GWAS meta-analysis identifies new diabetic nephropathy genes. *Immunogenetics*. 2018 Jun 16;70(6):347–53.
  23. Jeong KH, Kim JS, Woo J, Rhee SY, Lee YH, Kim YG, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for diabetic nephropathy in Korean patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Genet*. 2019 Apr 9;cge.13538.
  24. Geng X, Wang W, Feng Z, Liu R, Cheng X, Shen W, et al. Identification of Key Genes and Pathways in Diabetic Nephropathy by Bioinformatics Analysis. *J Diabetes Investig*. 2018 Dec 9;jdi.12986.
  25. Lasram K, Ben Halim N, Benrahma H, Mediene-Benchekor S, Arfa I, Hsouna S, et al. Contribution of CDKAL1 rs7756992 and IGF2BP2 rs4402960 polymorphisms in type 2 diabetes, diabetic complications, obesity risk and hypertension in the tunisian population. *Journal of Diabetes*. 2014;102–13.
  26. Stefanidis I, Kytoudis K, Papathanasiou AA, Zaragotas D, Melistas L, Kitsios GD, et al. XbaI GLUT1 gene polymorphism and the risk of type 2 diabetes with nephropathy. *Dis Markers*. 2009;27(1):29–35.
  27. Zintzaras E, Stefanidis I. Association between the GLUT1 gene polymorphism and the risk of diabetic nephropathy: A meta-analysis. *J Hum Genet*. 2005;50(2):84–91.
  28. Grzeszczak W, Moczulski DK, Zychma M, Zukowska-Szczechowska E, Trautsolt W, Szydłowska I. Role of GLUT1 gene in susceptibility to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2001 Feb;59(2):631–6.
  29. Zhang Y, Xiao H-Q, Zeng X-T, Zuo H-X, Xu Y-C. Associations between endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and risk of diabetic nephropathy: an updated meta-analysis. *Ren Fail*. 2015;6049(November):1–15.
  30. Rahimi Z. ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy. *J Nephrothol*. 2012 Oct;1(3):143–51.



31. Locke JM, Wei FY, Tomizawa K, Weedon MN, Harries LW. A cautionary tale: the non-causal association between type 2 diabetes risk SNP, rs7756992, and levels of non-coding RNA, CDKAL1-v1. *Diabetologia*. 2015;58(4):745–8.
32. Li Y, Wang L, Lu X, Yang Z, Wang X, Zhou C, et al. CDKAL1 gene rs7756992 A/G polymorphism and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 62,567 subjects. *Sci Rep*. 2013;3:3131.
33. Dehwah MAS, Wang M, Huang Q-Y. CDKAL1 and type 2 diabetes: a global meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2010;9(2):1109–20.
34. Toto RD. Microalbuminuria: definition, detection, and clinical significance. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2004 Nov;6(11 Suppl 3):2–7.
35. Levey AS, Stevens LA. Estimating GFR using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions. *Am J Kidney Dis*. 2010 Apr;55(4):622–7.
36. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928–9.
37. Jayakumar R V. Risk factors in diabetic nephropathy. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2012 Mar 20;32(1):1–3.
38. Jha JC, Jandeleit-Dahm KAM, Cooper ME. New Insights Into the Use of Biomarkers of Diabetic Nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014 May;21(3):318–26.
39. Ng DPK, Canani L, Araki S, Smiles A, Moczulski D, Warram JH, et al. Minor effect of GLUT1 polymorphisms on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2264–9.
40. Makni K, Jarraya F, Rebaï M, Mnif F, Boudawara M, Hamza N, et al. Risk genotypes and haplotypes of the GLUT1 gene for type 2 diabetic nephropathy in the Tunisian population. *Ann Hum Biol*. 2008;35(5):490–8.
41. Cui W, Du B, Zhou W, Jia Y, Sun G, Sun J, et al. Relationship between five GLUT1 gene single nucleotide polymorphisms and diabetic nephropathy: a

- systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012 Aug;39(8):8551–8.
42. Amini S, Javanmardi M, Mokarizadeh A, Maroofi F, Jalali C, Azadi N-A, et al. Association of HaeIII single nucleotide polymorphisms in the SLC2A1 gene with risk of diabetic nephropathy; evidence from Kurdish patients with type 2 diabetes mellitus. *QJM.* 2015;
  43. Fathi M, Nikzamir AR, Esteghamati A, Nakhjavani M, Yekaninejad MS. Combination of Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion (I/D) (rs4646994) and VEGF Polymorphism (+405G/C; rs2010963) Synergistically Associated With the Development, of Albuminuria in Iranian Patients With Type 2 Diabetes. *Iran Red Crescent Med J.* 2015;17(2).
  44. Nakagawa T, Kosugi T, Haneda M, Rivard CJ, Long DA. Abnormal angiogenesis in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2009 Jul;58(7):1471–8.
  45. Mrozikiewicz-Rakowska B, Maroszek P, Nehring P, Sobczyk-Kopciol A, Krzyzewska M, Kaszuba AM, et al. Genetic and environmental predictors of chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes and diabetic foot ulcer: a pilot study. *J Physiol Pharmacol.* 2015 Oct;66(5):751–61.

# **CAPÍTULO 6**

## **FACTORES ASOCIADOS A LA TRADUCCIÓN DE LA INSULINA**

## 6.1 RESUMEN

La insulina es una hormona peptídica producida por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos y es la principal hormona anabólica del cuerpo, regulando el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas al promover la absorción de los carbohidratos. Alteraciones en mecanismos involucrados en la traducción de la insulina, ya sea en variaciones en el número de copias (VNC) del gen del ARNt Lys (CUU) o la escasa modificación del ARNt Lys (UUU) conducida por la proteína codificada por el gen CDKAL1 podrían estar asociadas al desarrollo de la DM2.

El objetivo del trabajo fue estudiar posibles alteraciones en algunos mecanismos involucrados en la traducción de la insulina. Se estudió si la presencia de la delección del gen que codifica al ARNt Lys (CUU) en el cromosoma 11 está asociada a DM2; y se analizaron los niveles expresión de CDKAL1 y el grado de modificación ms2 del ARNt Lys (UUU) en individuos sanos y pacientes con DM2.

**Materiales y Métodos:** Para el estudio del gen ARNt Lys (CUU) presente en el cromosoma 11 (ARNt Lys (CUU) Cr11) se incluyó un total de 199 individuos mayores de 21 años (122 pacientes con DM2 y 77 sujetos sanos) de tres centros de salud distintos: Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación Ver, Córdoba; Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba; y Centro Médico Privado "San Ricardo Pampurri", Villa Carlos Paz. La amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 se realizó mediante Duplex PCR semicuantitativa y Real Time PCR. Mientras que para el estudio de la determinación de la modificación 2-metilación en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) y la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos se incluyó un total de 67 individuos mayores de 21 años (24 pacientes con DM2 y 43 sujetos sanos) de 2 centros de salud distintos: Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba y Centro Médico Privado "San Ricardo Pampurri", Villa Carlos Paz. La determinación de la modificación 2-metilación en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) y la expresión del ARNm de CDKAL1 se realizó mediante Real Time PCR.

**Resultados:** Se observó diferencia significativa en la expresión del ARNm de CDKAL1 en los pacientes con DM2, en donde éstos últimos expresaban mayores niveles de ARNm de CDKAL1 en relación a los sujetos sanos ( $p=0,007$ ), mientras

que no se observó diferencia significativa entre la población de sujetos sanos y los pacientes con DM2 y la cantidad de modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) ( $p=0,593$ ). No se observó diferencia significativa entre la población de sujetos sanos y los pacientes con DM2 y la delección del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 ( $p>0,05$ ).

Conclusiones: Nuestros hallazgos sugieren que los niveles de expresión del ARNm de CDKAL1 podrían estar aumentados en pacientes con DM2.

Palabras claves: Diabetes Mellitus tipo 2, ARNt Lys, VNC, CDKAL1

## 6.2 DIABETES MELLITUS E INSULINA

La fisiopatología de la DM se caracteriza por hiperglucemia causada por defectos en la secreción de insulina (función alterada de las células  $\beta$ ) o en la acción de la insulina (resistencia a la insulina por parte del tejido hepático y muscular), estos defectos ocurren temprano en el curso de la enfermedad y con frecuencia presente antes del diagnóstico.(1)

Además de las causas mencionadas en el Capítulo I, existen evidencias que indican que factores involucrados en mecanismos moleculares de la traducción de la insulina desempeñan un papel vital en la patogénesis de la DM.(2)

En este trabajo de tesis se analizaron diferentes posibles factores asociados a la desregulación en la traducción de la insulina y su posible asociación con la DM, como la presencia de la delección del gen que codifica al ARNt Lys (CUU) en el cromosoma 11, los niveles expresión de CDKAL1 y el grado de modificación ms2 del ARNt Lys (UUU) en individuos sanos y pacientes con DM2. (3,4)

## 6.3 PÁNCREAS E INSULINA

El páncreas se compone de dos grandes tipos de tejidos, los acinos, que secretan jugos digestivos al duodeno, y los islotes de Langerhans.(5)

El páncreas humano posee de 1 a 2 millones de islotes de Langerhans, los cuales se organizan en torno a pequeños capilares, hacia los que vierten sus hormonas, y contienen cuatro tipos fundamentales de células, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ) y F. Las células  $\beta$  representan casi el 60 % de la totalidad de las células de los islotes y secretan insulina y amilina. Las células  $\alpha$ , que componen casi el 25 % del total de células, secretan glucagón, y las células  $\delta$ , que representan el 10 % de las células, liberan somatostatina y péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP). La célula F, que secreta el polipéptido pancreático y adrenomedulina.(5)

La insulina es una proteína, con un peso molecular de 5.808 Da, que consiste en 51 aminoácidos contenidos dentro de dos cadenas peptídicas: una cadena  $\alpha$ , con 21 aminoácidos, y una cadena  $\beta$ , con 30 aminoácidos. Las cadenas están conectadas por dos puentes disulfuro. Además, existe un puente disulfuro intracatenario que une las posiciones 6 y 11 en la cadena  $\alpha$ .(6)

La insulina endógena tiene una vida media en circulación de 3 a 5 minutos. Se cataboliza principalmente por insulinasas en hígado, riñón y placenta. Aproximadamente el 50% de la insulina se elimina por un solo paso a través del hígado.(6)

El péptido C, residuo de 31 aminoácidos, de peso molecular de 3.000 Da, formado durante la separación de la insulina a partir de la proinsulina, no tiene actividad biológica conocida. Se libera de las células  $\beta$  en cantidades equimolares a la insulina. No se elimina por el hígado sino que se degrada o excreta principalmente por el riñón. Tiene una vida media 3 o 4 veces mayor que la de la insulina.(6)

#### **6.4 BIOSÍNTESIS DE LA INSULINA**

La insulina se sintetiza en las células  $\beta$  y se libera bajo la influencia de varios estímulos, entre ellos, la ingesta de proteínas y carbohidratos.(6)

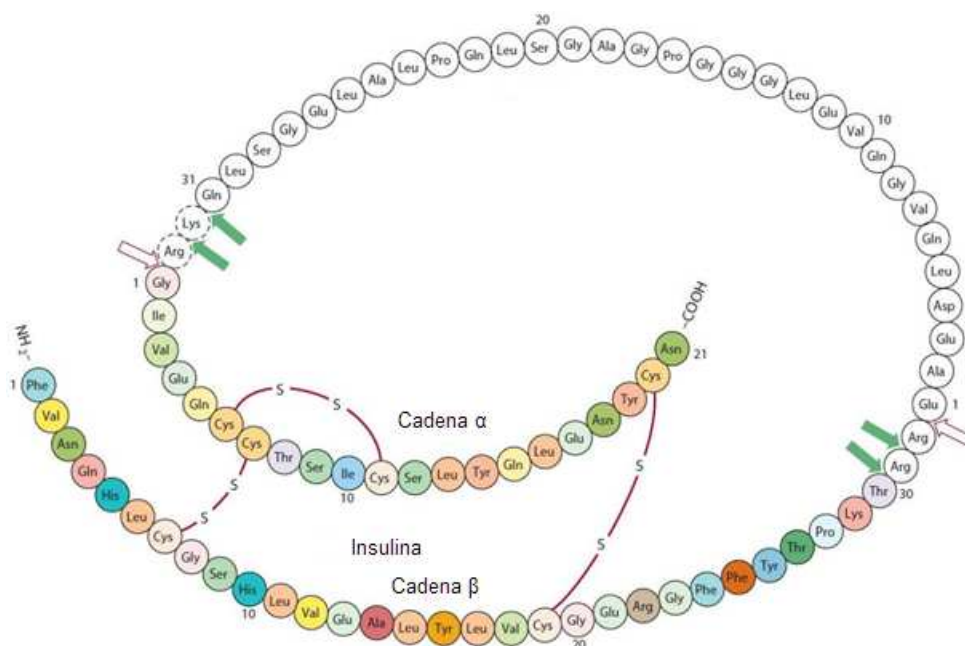
El gen que codifica a la insulina humana se localiza en el cromosoma 11p15.5. Una molécula precursora, la preproinsulina, es un péptido de cadena larga de peso molecular de 11.500 Da, que se produce por la síntesis en el retículo endoplasmático rugoso de las células  $\beta$  del páncreas. La acción de enzimas microsomales la desdoblan en proinsulina (de peso molecular de 9.000 Da) casi de inmediato después de su síntesis.(6)

La proinsulina se transporta al aparato de Golgi donde ocurre su empaquetamiento en gránulos secretores recubiertos de clatrina. La maduración del gránulo secretor se relaciona con la pérdida de la cubierta de clatrina y la conversión de la proinsulina en insulina y en un péptido, conocido como péptido C, mediante la destrucción proteolítica en dos sitios a lo largo de la cadena peptídica.(6)

## 6.5 CLIVAJE DE LA INSULINA

La proinsulina experimenta una maduración a insulina activa a través de la acción de las endopeptidasas celulares conocidas como prohormonas convertasas (PC1 y PC2), así como la exoproteasa carboxipeptidasa E. Las endopeptidasas se escinden en 2 posiciones, liberando un fragmento llamado péptido C y dejando 2 cadenas peptídicas, las cadenas  $\beta$  y  $\alpha$ , unidas por 2 enlaces disulfuro. Los sitios de escisión están ubicados cada uno después de un par de residuos básicos (lisina 64 y arginina 65, y arginina 31 y 32) (Figura 11).(7)

Después de la escisión del péptido C, estos 2 pares de residuos básicos se eliminan mediante la acción de la carboxipeptidasa (7). La insulina madura resultante se empaqueta en gránulos maduros que esperan señales metabólicas para ser liberados (como el incremento de glucosa circulante).(7)



**Figura 11. Estructura de la proinsulina humana (Traducido).** Las moléculas de insulina y péptido C están conectadas en 2 sitios por enlaces dipéptidicos. Una escisión inicial causada por una enzima similar a la tripsina (flechas sin relleno) seguida de varias escisiones generada por una enzima similar a la carboxipeptidasa (flechas sólidas) da como resultado la producción de la molécula de insulina heterodimérica (AB) (coloreada) y el péptido C (blanco).(8)



## 6.6 MECANISMO DE TRADUCCIÓN

La traducción es el proceso mediante el cual se sintetiza una proteína a partir de la información contenida en una molécula de ARN mensajero (ARNm). Durante la traducción, se lee una secuencia de ARNm utilizando el código genético, que es un conjunto de reglas que define cómo se debería traducir una secuencia de ARNm al código de 20 letras de los aminoácidos, que son los componentes básicos de las proteínas.(9)

El código genético es un conjunto de combinaciones de tres letras de nucleótidos llamados codones, cada uno de los cuales corresponde a un aminoácido específico o una señal de finalización de la síntesis proteica. La traducción ocurre en una estructura llamada ribosoma, que es la fábrica para la síntesis de proteínas.(9)

El ribosoma tiene una subunidad grande y una subunidad pequeña, y es una molécula compleja compuesta de varias moléculas de ARN ribosomal y varias proteínas. La traducción de una molécula de ARNm por el ribosoma se produce en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Durante el inicio, la pequeña subunidad ribosomal se une al comienzo de la secuencia del ARNm. Luego, una molécula de ARN de transferencia (ARNt) que lleva el aminoácido metionina se une a lo que se llama el codón de inicio de la secuencia del ARNm.(9)

El codón de inicio en todas las moléculas de ARNm tiene la secuencia AUG y codifica al aminoácido metionina. A continuación, la gran subunidad ribosomal se une para formar el complejo de iniciación completo. Durante la etapa de alargamiento, el ribosoma continúa traduciendo cada codón a su turno. Cada aminoácido correspondiente se agrega a la cadena en crecimiento y está unido por un enlace llamado enlace peptídico. El alargamiento continúa hasta que se leen todos los codones (9). Finalmente, la terminación ocurre cuando el ribosoma alcanza un codón de terminación (UAA, UAG o UGA). Dado que no hay moléculas de ARNt que puedan reconocer estos codones, el ribosoma entiende que la traducción está finalizada. Se libera la nueva proteína y se separa el complejo de traducción.(9)

## 6.7 ARN DE TRANSFERENCIA (ARNt)

El ARNt es un tipo de molécula de ARN que ayuda a decodificar una secuencia de ARNm en una proteína. Los ARNt se unen a sitios específicos en el ribosoma durante el proceso de traducción.(9)

Las proteínas se construyen a partir de aminoácidos, que se especifican mediante secuencias del ARNm de tres nucleótidos llamadas codones. Cada codón representa un aminoácido particular, y cada codón es reconocido por un ARNt específico. La molécula de ARNt tiene una estructura curvada distintiva con tres bucles que forman la estructura de un trébol de tres hojas. Uno de estos bucles contiene una secuencia llamada anticodón, que puede reconocer y decodificar un codón de ARNm. Cada ARNt tiene su correspondiente aminoácido unido a su extremo. Cuando un ARNt reconoce y se une a su codón correspondiente en el ribosoma, el ARNt transfiere el aminoácido apropiado al final de la cadena de aminoácidos en crecimiento. Luego, el ARNt y el ribosoma continúan decodificando la molécula de ARNm hasta que toda la secuencia se traduce en una proteína.(9)

## 6.8 ARNt LISINA (ARNt-Lys)

La lisina (Lys o K) es un  $\alpha$ -aminoácido que se utiliza en la biosíntesis de proteínas. Contiene un grupo  $\alpha$ -amino, un grupo ácido  $\alpha$ -carboxílico y un lisil  $((\text{CH}_2)_4\text{NH}_2)$  de cadena lateral, el cual se clasifica como un aminoácido alifático básico, cargado positivamente. Como casi todos los demás aminoácidos, el carbono  $\alpha$  es quiral y la lisina puede referirse a un enantiómero o una mezcla racémica de ambos.(9)

El cuerpo humano no puede sintetizar lisina, por lo que es esencial en humanos y debe obtenerse de la dieta. La lisina desempeña varias funciones en los seres humanos, principalmente en la proteogénesis, pero también en la reticulación de los polipéptidos de colágeno, la absorción de nutrientes minerales esenciales y

en la producción de carnitina, que es clave en el metabolismo de los ácidos grasos.(9)

Hay dos codones que codifican para la lisina, el AAG y el AAA. Según la Base de Datos de ARNt Genómico (GARNtdb, Genomic tRNA database en los seres humanos hay casi igual número de genes ARNt Lys (CUU) y ARNt Lys (UUU), habiendo 26 y 20 sitios posibles en el genoma para cada uno respectivamente (10). El ARNm de la preproinsulina tiene dos codones para la lisina, ambos AAG, uno en la región de la cadena  $\beta$ , y el otro en la unión entre el péptido C y la cadena  $\alpha$  (Ver Figura 11).(3)

Alteraciones en mecanismos involucrados en la traducción de la insulina, ya sea en variaciones en el número de copias (VNC) del gen del ARNt Lys (CUU) o la escasa modificación del ARNt Lys (UUU) conducida por la proteína codificada por el gen CDKAL1 podrían estar asociadas al desarrollo de DM2.(3,11)

## **6.9 VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS (VNC) DEL ARNt Lys (CUU) Cr11**

La variación en el número de copias (VNC) de los segmentos genómicos es una fuente de diferencias genéticas entre individuos, en muchos casos asociados con fenotipos de enfermedades complejas (12). Más de 500 genes de ARNt están entremezclados en todos los cromosomas humanos (excepto en el cromosoma Y). (12)

Mientras que clásicamente la VNC se refiere a reiteraciones de una sola copia de un loci, en el caso de los genes de ARNt es diferente porque son familias multigénicas de copias casi idénticas dispersas en múltiples loci en múltiples cromosomas (12). Esta diferencia puede ser importante porque la traducción de algunos ARNm son sensibles a las cantidades relativas de ARNt y porque la competencia del ARNt determina la eficacia de la traducción frente a la fidelidad y a la producción de proteínas nativas frente a proteínas mal plegadas.(12)

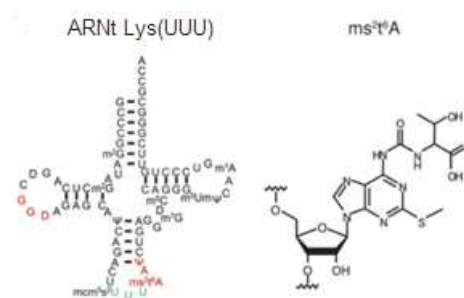
En el estudio de Iben & Maraia, identificaron varios grupos de genes de ARNt que poseen VNC, y observaron la presencia de una delección de un locus en el

cromosoma 11 que contenía un gen que codificaría al ARNt Lys (CUU) (ARNt Lys (CUU) Cr11))(3). Analizando una población multiétnica encontraron que este locus se encontraba deletado en heterocigosidad u homocigosidad en todos los grupos con una frecuencia de aproximadamente el 50 %.(3)

El locus presente en el Chr-11 ARNt Lys(CUU) podría reconocer al codón AAG de lisina, y la presencia de este locus podría afectar la traducción de la preproinsulina, lo cual podría estar involucrada en el desarrollo de la DM2.(3)

## 6.10 GEN DE LA PROTEÍNA SIMILAR A LA PROTEÍNA REGULADORA ASOCIADA A LA SUBUNIDAD 1 DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA 5 (CDKAL1)

Como mencionamos en capítulos anteriores, el gen CDKAL1 codifica para la metiltiotransferasa 2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina (ms2t6A) que cataliza las modificaciones 2-metiltio (ms2) de varios sustratos, incluida la adición de ms2 a N6-treonil-carbamoil adenosido en la posición 37 del ARNt Lys(UUU). En la Figura 12 se observan las estructuras moleculares del ARNt Lys(UUU) y ms2t6A.(4)



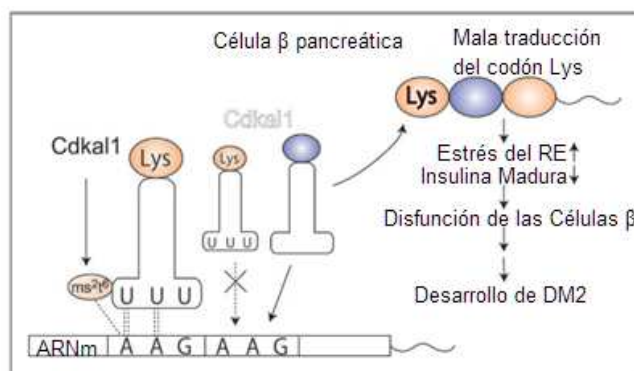
**Figura 12. Estructura molecular de ARNt Lys(UUU) y la ms2t6A (Traducido)(13)**

Esta modificación ms2 del ARNt Lys (UUU) estabiliza la interacción con el codón AAG, permitiendo una traducción eficiente del mismo. La importancia que podría tener esta modificación es que durante la lectura de la secuencia del ARNm

de la insulina, al poseer 2 aminoácidos lisina codificados por el codón AAG, alteraciones en este mecanismo podrían llevar a una síntesis anormal de la proteína madura.(4)

En el estudio de Wei y colaboradores, usaron un modelo animal knockout del gen CDKAL1, la falta de modificación del ARNt Lys (UUU) alteraba su capacidad para competir con el ARNt Lys (CUU) por el codón AAG, lo que resultaba en un plegamiento incorrecto, un procesamiento deficiente y una escasa secreción de insulina. Estas variaciones podrían contribuir en el desarrollo de enfermedades multigénicas como es el caso de la DM2.(13)

Por otro lado, en otro estudio, el de Wei y colaboradores, observaron que la deficiencia de la metiltiotransferasa codificada por el gen CDKAL1, mediante knockout del gen o mediante la adición de variantes genéticas con menor actividad, llevaban a una deficiencia en la modificación de ms2t6A del ARNt Lys (UUU) y provocaba una mala traducción del codón de lisina presente en la proinsulina, produciendo estrés en el retículo endoplasmático y reduciendo el contenido de insulina madura en las células  $\beta$ . La disfunción de las células  $\beta$  por la deficiencia de la metiltiotransferasa codificada por el gen CDKAL1 conduciría finalmente al desarrollo de DM2 (Figura 13).(11)



**Figura 13. Esquema del proceso de traducción del codón AAG y la participación del ARNt Lys (UUU). Influencia de la modificación generada por el gen CDKAL1 en células beta pancreáticas (Traducido)(11)**

## **6.11 OBJETIVO ESPECÍFICO**

En base a los estudios mencionados previamente, el objetivo planteado en esta etapa fue:

- Estudiar la existencia de posibles alteraciones en los mecanismos involucrados en la traducción de la insulina debido a variantes genéticas y eventualmente asociarlos al desarrollo de DM2.

## **6.12 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.12.1 Tipo de estudio**

Este es un estudio de tipo descriptivo y de carácter observacional, prospectivo y transversal.

### **6.12.3 IDENTIFICACIÓN DE LA DELECIÓN PRESENTE DEL ARNt Lys (CUU) Cr11**

#### **6.12.3.1 Pacientes**

En este estudio se incluyó un total de 199 individuos mayores de 21 años (122 pacientes con DM2 y 77 sujetos sanos) de tres centros de salud distintos: Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación Ver, Córdoba; Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba; y Centro Médico Privado “San Ricardo Pampurri”, Villa Carlos Paz. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Oulton-Romagosa, el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba y el Ministerio de Salud de

Córdoba y está sujeto a los acuerdos establecidos en la declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados y su consentimiento fue obtenido.

#### **6.12.3.2.1 Criterios de inclusión**

- Individuos mayores a 21 años
- Pacientes con DM2
- Sujetos sin DM2

#### **6.12.3.2.2 Criterios de exclusión**

- Individuos menores de 21 años
- Pacientes con otro tipo de diabetes

#### **6.12.3.3 Muestras biológicas**

Las muestras analizadas consistieron en:

- Sangre entera tratada con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® K<sub>2</sub>-EDTA.
- Suero obtenido de sangre, obtenido por venipuntura en tubos BD Vacutainer® SST™ con gel separador y acelerador de la coagulación. La muestra se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se la centrifugó a 3.800 rpm por 10 minutos.
- Los pacientes se presentaron con 12 horas de ayuno.

#### **6.12.3.4 Procedimientos**

##### **6.12.3.4.1 Formulario de preguntas**

Todos los pacientes completaron un cuestionario, que reveló información esencial (edad y sexo), estado de salud, uso de insulina y/o terapia con agentes orales antidiabéticos y cualquier antecedente de otras enfermedades sistémicas, y antecedentes familiares de enfermedades.

##### **6.12.3.4.2 Procesamiento de Muestras**

###### **6.12.3.4.2.1 Parámetros bioquímicos**

Los pacientes acudieron al laboratorio clínico después de un ayuno de 12 horas y se obtuvieron muestras de sangre venosa. Las muestras de sangre venosa en ayunas se recolectaron para medir los parámetros bioquímicos, que se estudiaron como ensayos de seguimiento de rutina para pacientes diabéticos. Estas mediciones incluyeron glucosa en ayunas, hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol total, triglicéridos, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), determinadas por un sistema automatizado con reactivos para biomarcadores de rutina con un analizador Roche COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza).

Los detalles de las pruebas bioquímicas se encuentran presentes en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina-“Parámetros Bioquímicos”).



#### **6.12.3.4.2.2 Extracción de ADN**

Se utilizó el kit "Wizard® DNA Purification Kit" (Cat. #A1120, Promega). Remitirse al protocolo presente en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina-“Extracción de ADN”).

#### **6.12.3.4.2.3 Técnicas para la amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11**

La amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 se realizó empleando 2 técnicas diferentes, una era la descrita por Iben & Maraia (3) (Duplex PCR semicuantitativa), y la segunda mediante la técnica de Real Time PCR (Diseño *in-house*).

#### **6.12.3.4.2.4 Amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 mediante Duplex PCR semicuantitativa**

La Duplex PCR semicuantitativa se realizó según lo descrito por Iben & Maraia (3). Al ADN extraído de los pacientes, se les realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Se tomó 0,34 µl de muestra de ADN; 3 µl de Colorless Reaction Buffer Taq 5x (Promega™); 0,12 µl de dNTPs (10 mM, Promega™); 0,12 µl de GoTaq Polimerasa® (5 U/µl, Promega™); 7,42 µl de Agua MiliQ y 1 µl de los siguientes primers (ver secuencias en la Tabla XXVIII):

- El gen ARNt Lys (CUU) Cr11 fue amplificado utilizando los primers 437\_Lys\_CTTF (10 pmol/µL, Operon™) (forward) y 437\_Lys\_CTTR (10 pmol/µL, Operon™) (reverse) (el tamaño esperado del amplicón era de ~ 400 pb)
- Se utilizó como control al gen ARNt Lys (UUU) Cr16, el cual se encuentra presente en estado homocigoto en todos los individuos analizados (3). Se

amplificó utilizando los primers C\_193\_Lys\_CTTF (10 pmol/μL, Operon™) (forward) y C\_193\_Lys\_CTTR (10 pmol/μL, Operon™) (reverse) (el tamaño esperado del amplicón era de ~ 300 pb).

**Tabla XXVIII. Secuencia de primers y tamaños de amplificación obtenidos por PCR (Estudio VNC ARNt Lys(CUU) Cr11)**

	<b>Secuencia del Primer (5'-3')</b>	<b>Tamaño del fragmento (pb)</b>
<b>437 Lys CTT</b>	F:GGCCACAGGAGCTTCAAGTA	~ 400
	R:TGTGACTCAGGGGGCATAAT	
<b>C 193 Lys CTT</b>	F:CGCAGGCGCTTCTTAGTATT	~ 300
	R:ACACACGGATCGGAGAACAC	

pb: pares de base.

La amplificación se realizó de la siguiente manera:

- a) Inicio: a 94° C por 5 minutos
- b) Desnaturalización: a 94° C por 60 segundos
- c) Hibridación: a 58° C por 60 segundos
- d) Extensión: a 72° C por 60 segundos
- e) Conservación: a -20° C

Se repitió cíclicamente las fases b-c-d por 27 veces.

Se utilizó un termociclador Biometra UNO II® (Göttingen, Alemania).

#### **6.12.3.4.2.5 Electroforesis en gel de agarosa**

Para la electroforesis en gel de agarosa se utilizó el protocolo descrito en el Capítulo 3 (Farmacogenética de la Metformina -“Electroforesis en gel de agarosa”). El gel fue observado y fotografiado en un equipo BioSpectrum 815 Imaging System UVPM-26XV (Jena, Alemania).

#### **6.12.3.4.2.6 Amplificación y cuantificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 mediante Real Time PCR**

La Real Time PCR se utilizó para la cuantificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 con las mismas condiciones propuestas por Iben & Maraia (3). Para la amplificación de cada gen (ARNt Lys (CUU) Cr11 y ARNt Lys (UUU) Cr16) se tomó 3 µl de muestra de ADN; 7,5 µl de Sybr® Green Master Mix (Cat. 4367659; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific); 3,7 µl de Agua MiliQ y 0,4 µl de los primers forward y reverse correspondientes (Tabla XXVIII). La amplificación se realizó por duplicado.

Las condiciones de amplificación de los genes mediante Real Time PCR fueron las siguientes:

- a) Inicio: a 95° C por 10 minutos
- b) Desnaturalización: a 94° C por 20 segundos
- c) Hibridación/Elongación: a 60° C por 60 segundos

En el proceso se repitieron cíclicamente las fases b-c por 40 veces.

Se utilizó un termociclador StepOne Plus Real-Time PCR system® (Massachusetts, Estados Unidos).

#### **6.12.3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el software SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) y se realizó un modelo de regresión logística múltiple (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo) para obtener los odds ratios (ORs), considerando una significativa diferencia la presencia de un valor de  $p < 0,05$ , con un IC del 95%

Las frecuencias genotípicas y alélicas fueron calculadas y comparadas para ver si estaban en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg, para determinar la aleatoriedad de la población tomada.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el uso de la prueba para calcular el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y t de Student, considerando una diferencia significativa a un valor de  $p < 0,05$ .

El software utilizado para el tratamiento de los datos estadísticos fue el Infostat (versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

#### **6.12.4 CUANTIFICACIÓN DE LA MODIFICACIÓN ms2 EN LA POSICIÓN 37 DEL ARNt Lys (UUU) Y EXPRESIÓN DEL ARNm DE CDKAL1 EN LEUCOCITOS HUMANOS**

##### **6.12.4.1 Pacientes**

En este estudio se incluyó un total de 67 individuos mayores de 21 años (24 pacientes con DM2 y 43 sujetos sanos) de dos centros de salud: Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba y Centro Médico Privado “San Ricardo Pampurri” de Villa Carlos Paz. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba y el Ministerio de Salud de Córdoba y estuvo sujeto a los acuerdos establecidos en la declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados y su consentimiento fue obtenido.

##### **6.12.4.2.1 Criterios de inclusión**

- Individuos mayores a 21 años
- Pacientes con DM2
- Sujetos sin DM2

#### **6.12.4.2 Criterios de exclusión**

- Individuos menores de 21 años
- Pacientes con otro tipo de diabetes

#### **6.12.4.3 Muestras**

Las muestras analizadas consistieron en:

- Sangre entera tratada con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® K<sub>2</sub>-EDTA.
- Los pacientes se presentaron con 12 horas de ayuno.

#### **6.12.4.4 Procedimientos**

##### **6.12.4.4.1 Procesamiento de Muestras**

###### **6.12.4.4.1.1 Purificación de Leucocitos**

Para la purificación de leucocitos provenientes de sangre periférica, se utilizó el buffer amoníaco-cloruro-potasio (ACK), para así, proceder a la lisis de los glóbulos rojos.(14)

La preparación del Buffer ACK 10X fue realizada de la siguiente manera:

Se disolvieron 82,9 g de NH<sub>4</sub>Cl (155 mM); 10g de KHCO<sub>3</sub> (10 mM) y 2 ml de Na<sub>2</sub>EDTA (0,1 mM) y se agregó cantidad suficiente de Agua MiliQ para lograr un

volumen final de 1.000 ml (14). Una vez preparado el Buffer ACK 10X, se prepararon diluciones 1X para el trabajo de mesada.

El procedimiento para la extracción de leucocitos fue la siguiente:

1. En un tubo nuevo, se agregó 100  $\mu$ L de sangre entera y 1.200  $\mu$ L de Buffer ACK 1X. Se agitó con vortex suavemente.
2. Se incubó a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 10-15 minutos.
3. Se centrifugó a 350g durante 5 minutos, se aspiró y descartó el sobrenadante sin tocar el precipitado.
4. Se agregó 1.200  $\mu$ L de Buffer ACK 1X y se repitió el Paso 2-3.
5. Se resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ L de Buffer PBS 1X frío.

#### **6.12.4.4.1.2 Extracción del ARN total**

Para la extracción del ARN total presente en los leucocitos se utilizó el kit comercial "TRIzol® ARN Isolation Reagents" (Cat. A33251; Ambion, Thermo Fisher Scientific™).(15)

El reactivo TRIzol®, es un reactivo utilizado para el aislamiento de ARN total de alta calidad o para el aislamiento simultáneo de ARN, ADN y proteínas a partir de una variedad de muestras biológicas. Es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina y está formulada para separar al ARN, ADN y proteínas de distintos tejidos, células de origen humano, animal, vegetal, levadura o de origen bacteriano.(15)

El procedimiento para la extracción de ARN total en leucocitos fue la siguiente:

### **1. Homogeneización**

- a. Se centrifugó los leucocitos resuspendidos en Buffer PBS 1X frío a 300g durante 5 minutos.
- b. Se agregó 500 µl de TRIzol® y se mezcló por pipeteo varias veces.
- c. Se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente.
- d. Se centrifugó y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

### **2. Separación de fases**

- a. Se agregó 100 µl de cloroformo agitar con vortex por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- b. Se centrifugó a no más de 12.000 g durante 15 minutos a 2-8 °C.
- c. Tras centrifugar, se observaron 3 fases:
  - i. Una fase superior incolora.
  - ii. Una interfase blanca.
  - iii. Una fase inferior roja.

El ARN se encuentra en la fase superior (incolora)

- d. Se transfirió la fase superior cuidadosamente sin alterar la interfase (en donde se encuentra el ADN) a un tubo nuevo.

### **3. Precipitación del ARN**

- a. Se precipitó el ARN agregando 250 µl de alcohol isopropílico.
- b. Se incubó la muestra a 15-30 °C durante 10 minutos y se centrifugó a no más de 12.000 g durante 10 minutos a 2-4 °C.

#### **4. Lavado**

- a. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µl de etanol al 75% v/v.
- b. Se agitó la muestra con vortex y se centrifugó a no más de 7.500 g durante 5 minutos a 2-8 °C.
- c. Se repitió el lavado de etanol una vez más y se descartó todo el etanol.

#### **5. Redisolución**

- a. Se dejó secar el precipitado de ARN durante 5 a 10 minutos.
- b. Se resuspendió en 40 µl de agua libre de RNasas pipeteando varias veces para favorecer la disolución del ARN.

#### **6.12.4.4.1.3 Determinación de la Concentración y Pureza del ARN**

Se diluyó 1 µl de ARN en 39 µl de agua Milli Q (relación 1:40) y se midió la relación de absorbancias a 260 nm y a 280 nm (A260/A280). La relación A260/A280 debía ser mayor a 1,6 y menor a 1,9, para proseguir con las otras determinaciones. Paralelamente, se calculó la concentración del ARN teniendo en cuenta que una lectura de 1 DO a 260 = 40 µg/ml de ARN.

#### **6.12.4.4.1.4 Tratamiento con ADNasa**

Para el tratamiento del ARN total obtenido con ADNasa se utilizó la enzima DNase I (RNase-free)® 1U/ µl (Cat. EN0525; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific™).(16)



La DNase I (RNase-free)<sup>®</sup> (Cat. EN0525; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>), es una endonucleasa que digiere ADN de simple y doble cadena. Hidroliza los enlaces fosfodiéster produciendo mono- y oligodesoxirribonucleótidos con grupos 5'-P y 3'-OH.(16)

Al ARN extraído se le realizó el tratamiento con ADNasa de la siguiente manera: Se tomaron 2 µl de muestra de ARN (200 ng de ARN); 6,9 µl de Reaction Buffer 10X (con Cl<sub>2</sub>Mg) (Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>); 0,1 µl de DNase I (50U/ul) (10 mM, Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>) y 6,9 µl de agua MiliQ.

Se incubó durante 30 min a 37°C; y luego se agregó 1 µl de EDTA 50 mM; y se incubó nuevamente a 65°C durante 10 minutos y finalmente durante 5 minutos a 75°C.

#### **6.12.4.4.1.5 Obtención del ADN copia mediante Retrotranscripción**

Para la obtención del ADN copia (ADNc), se realizó la retrotranscripción del ARNm. Se utilizó la enzima SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase 10.000 U/µl (Cat. 18080093; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>). (17)

La SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase es una transcriptasa inversa (RT) proveniente del virus M-MLV.(17)

Para la inhibición de ARNasas se utilizó el inhibidor RNaseOUT<sup>®</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl (Cat. 10777019; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>). (18)

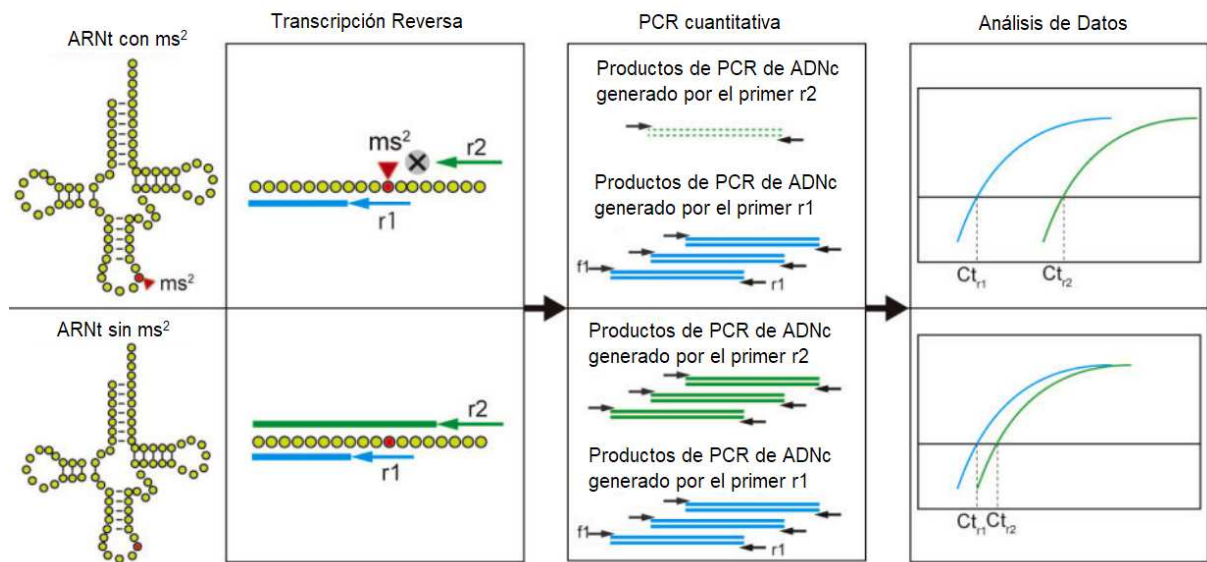
La retrotranscripción se realizó de la siguiente manera: se tomaron 4,8 µl de muestra de ARN (25 ng de ARN); 1 µl del Primer ARNtLys(UUU) R2 o R1 (20 pmol/µL, Operon<sup>™</sup>)(secuencia presente en Tabla XXIX); 2,2 µl de 5X First-Strand Buffer (Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>); 1 µl de DTT (Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>) y 0,1 µl de RNaseOUT<sup>®</sup> (40 U/ µl). Luego se incubó durante 15 minutos a 65°C. De allí, se incubó en baño de hielo durante 5 minutos.

Luego de la incubación se agregaron 2  $\mu$ l de dNTPs (10 mM, Promega™) y 0,2  $\mu$ l (2 U de enzima) de SuperScript™III RT (200 U/ $\mu$ l). Se incubó durante 60 minutos a 37°C. Luego se inactivó la enzima a 70°C durante 15 min.

#### **6.12.4.4.1.6 Cuantificación de la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) mediante Real Time PCR**

La cuantificación de la modificación ms2 en el ARNt Lys (UUU) en leucocitos fue realizada mediante la técnica descrita por Wei y colaboradores. En la amplificación mediante Real Time PCR, el ADNc correspondiente al ARNt Lys (UUU) se transcribió con el Primer R1 y el Primer R2.(19)

Como se puede observar en la Figura 14, hay un impedimento estérico que la modificación ms2 genera lo cual afecta un correcto acoplamiento en el extremo 3' del Primer R2. La cantidad de ADNc generada por el Primer R2 (flecha y grafica verde) depende en gran medida de los niveles de la modificación ms2 en una muestra de ARN. Por otro lado, la cantidad del ADNc generado por el primer R1 (flecha y grafica azul) es independiente de la presencia de la modificación ms2 y se utiliza como control interno. Cuando los niveles de la modificación ms2 están muy bajos o ausentes la amplificación de fragmentos será muy similar independientemente de si el Primer es R1 o R2, pero si está la modificación ms2 los niveles de amplificación de los fragmentos serán menores en presencia del Primer R2.(19)



**Figura 14. Descripción del método empleado para detectar la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) (Traducido)(19)**

La Real Time PCR se realizó utilizando el kit comercial Sybr® Green Master Mix (Cat. 4367659; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific™): se tomaron 3 µl de muestra de ADNc; 7,5 µl de Sybr® Green Master Mix (Cat. 4367659; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific™); 3,7 µl de Agua MiliQ, 0,4 µl de primer ARNtLys (UUU) F (10 pmol/µL, Operon™) (forward) y 0,4 µl de primer ARNtLys (UUU) R1(10 pmol/µL, Operon™) (reverse 1) o ARNtLys (UUU) (10 pmol/µL, Operon™) R2 (reverse 2). Las secuencias están presentes en la Tabla XXIX. La amplificación se realizó por triplicado.

**Tabla XXIX. Secuencia de primers (Estudio de la modificación m2 en la posición 37 del ARNt Lys(UUU))**

	<b>Secuencia de los Primer (5'-3')</b>
<b>ARNt Lys (UUU)</b>	F:GTCGGTAGAGCATCAGACTT
	R1:CCTGGACCCTCAGATTA AAA
	R2:GAACAGGGACTTGAACCCTG

F: Forward  
R: Reverse (1/2)

Las condiciones de amplificación de los genes mediante Real Time PCR fueron las siguientes:

- a) Inicio: a 95° C por 10 minutos
- b) Desnaturalización: a 94° C por 20 segundos
- c) Hibridación/Elongación: a 60° C por 60 segundos

Se repitió este proceso cíclicamente para las fases b-c por 40 veces.

Se utilizó un termociclador StepOne Plus Real-Time PCR system® (Massachusetts, Estados Unidos).

#### **6.12.4.4.1.7 Cuantificación de la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos humanos mediante Real Time PCR**

La Real Time PCR se realizó utilizando el kit comercial Sybr® Green Master Mix (Cat. 4367659; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific™). Se utilizó el protocolo mencionado en el apartado “6.12.4.4.7 Cuantificación de la modificación ms2 en el ARNt Lys (UUU) mediante Real Time PCR”.

Los primers utilizados fueron: EXP-CDKAL1-F (10 pmol/μL, Operon™) (forward) y EXP-CDKAL1-R (10 pmol/μL, Operon™) (reverse). Se utilizó al ARNm del gen GAPDH como gen normalizador (13). Para ello, el ARNm fue amplificado utilizando los primers GAPDH-RT-F (10 pmol/μL, Operon™) (forward) y GAPDH-RT-R (10 pmol/μL, Operon™) (reverse). Las secuencias están presentes en la Tabla XXX. La amplificación se realizó por triplicado.

**Tabla XXX. Secuencia de primers (Estudio cuantificación del ARNm de CDKAL1 en leucocitos humanos)**

	<b>Secuencia de los Primer (5'-3')</b>
<b>EXP- CDKAL1</b>	F:ACCGGGTGTCTCAATGCTTGT
	R:CTCTGCCATAAGCCCCCGTG
<b>GAPDH-RT</b>	F:CCCATCACCATCTTCCAGGAG
	R:GTTGTCATGGATGACCTTGGC

F: Forward  
R: Reverse

#### **6.12.4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El estudio de la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys UUU y el de la expresión del ARNm de CDKAL1 se analizaron utilizando la prueba t, mediante el programa Infostat (versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## 6.13 RESULTADOS

### 6.13.1 Identificación de la delección presente del ARNt Lys (CUU) Cr11

Para el estudio de la identificación de la delección presente del gen que codifica el ARNt Lys (CUU) en el cromosoma 11, se incluyeron un total de 199 individuos mayores de 21 años (122 pacientes con DM2 y 77 sujetos sanos) de tres centros de salud: Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación Ver, Córdoba; Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba; y Centro Médico Privado “San Ricardo Pampurri” de Villa Carlos Paz.

En la Tabla XXXI se muestran las características clínicas y bioquímicas de los sujetos participantes del estudio, clasificados según si son diabéticos o no. En la población estudiada no hay diferencia significativa en la proporción de hombres y mujeres, pero si hay mayor cantidad de pacientes con DM2 que presentan HTA respecto a los sujetos sanos ( $p=0,004$ ).

Cuando se analizaron los parámetros bioquímicos de los individuos, se observaron que en los pacientes DM2 los niveles de HbA1c y glucemia se encontraban elevados con respecto a los valores normales (HbA1c: 4,8-6% y glucemia: 70-110 mg%). Cuando se analizó el perfil lipídico, se pudo observar que los niveles de colesterol total se encontraban levemente aumentado en los sujetos sanos (CT: menor a 200 mg/dL), mientras que los niveles de trigliceridemia se encontraban levemente aumentados en los pacientes DM2 (TG: menor a 150 mg/dL), los valores de colesterol HDL y colesterol LDL se encontraban normales en ambos grupos (colesterol HDL: 35-55 mg/dL y colesterol LDL: menor a 150 mg/dL).

Cuando se realizó el análisis estadístico entre los pacientes con DM2 y los sujetos sanos, se observaron diferencias significativas en el IMC ( $p=0,0006$ ), en los niveles de glucemia ( $p<0,0001$ ) y Colesterol HDL ( $p=0,036$ ), siendo estas más elevadas en los pacientes con DM2. El grupo de los individuos sanos mostró niveles más elevados de niveles séricos de Colesterol Total que en los pacientes diabéticos

(p=0,031). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los otros parámetros analizados.

**Tabla XXXI. Parámetros clínicos, bioquímicos y estilos de vida en la población estudiada (cuantificación de la presencia de ARNt Lys (CUU) Cr 11).**

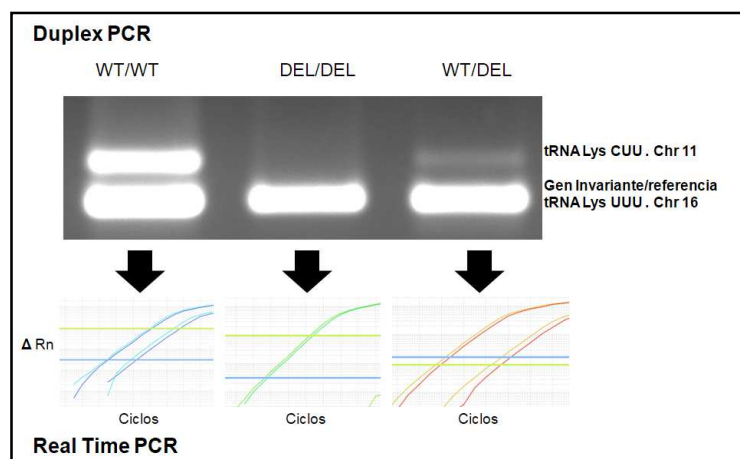
	<b>Sano (n= 77)</b>	<b>DM2 (n=122 )</b>	<b>Valor p</b>
<b>Sexo (F/M)</b>	47/30	61/61	0,1279
<b>Edad (Años)</b>	64,64 ± 12,01	67,48 ± 9,32	0,0788
<b>Duración de la diabetes (Años)</b>	-----	16,09 ± 10,27	-----
<b>Hipertensión (Si/No)</b>	46/31	96/26	0,0040
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,27 ± 2,67	30,19 ± 5,06	0,0006
<b>HbA1c (%)</b>	-----	7,45 ± 1,24	-----
<b>Glucemia (mg %)</b>	91,82 ± 10,01	129,01 ± 39,97	< 0,0001
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	200,66 ± 42,71	187,93 ± 38,90	0,0316
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	144,48 ± 57,30	159,86 ± 89,08	0,1399
<b>HDL colesterol (mg/dl)</b>	43,16 ± 10,29	48,13 ± 22,52	0,0360 *
<b>LDL colesterol (mg/dl)</b>	114,68 ± 31,11	119,52 ± 44,05	0,3649

Los datos están expresados como la media ± la desviación estándar (DE) o número de pacientes.

Las diferencias entre los grupos sujetos sanos y DM2 fueron comparados usando el t test o el del Chi-cuadrado.

IMC, índice de masa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad.

Para identificar la presencia o ausencia de la delección del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 en la población estudiada, se procedió a realizar la amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 empleando 2 técnicas diferentes, una fué la descrita por Iben & Maraia (3) (Duplex PCR semicuantitativa), y la segunda mediante la técnica de Real Time PCR (Diseño *in-house*) (Figura 15).



**Figura 15. Amplificación de los ARNt Lys(CUU) Cr11 y ARNt Lys(UUU) Cr16 mediante Duplex PCR semicuantitativa y Real Time PCR**

En la parte superior de la Figura 15 (Duplex PCR) podemos observar ejemplos de tres muestras de ADN con distintos genotipos (WT/WT, DEL/DEL y WT/DEL). En las tres muestras podemos comparar semicuantitativamente las amplificaciones del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 con respecto al gen normalizador ARNt Lys (UUU) Cr16. Podemos observar que las intensidades de las bandas de amplificación en la muestra con el genotipo WT/WT son similares con respecto al gen de referencia, mientras que en la muestra con el genotipo WT/DEL se observa una intensidad menor con respecto al gen de referencia, y por último en la muestra con el genotipo DEL/DEL no hay amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11.

En la parte inferior de la Figura 15 (Real Time PCR) podemos observar las mismas tres muestras de ADN mostradas anteriormente que presentaban distintos genotipos (WT/WT, DEL/DEL y WT/DEL) amplificado y cuantificado mediante Real Time PCR. En las tres muestras podemos comparar cuantitativamente las amplificaciones del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 con respecto al gen normalizador ARNt Lys (UUU) Cr16. En la muestra con el genotipo WT/WT los ciclos umbrales (Cycle Threshold, Ct) son similares con respecto al gen normalizador, mientras que en la muestra con el genotipo WT/DEL hay una diferencia mayor entre los Ct respecto al gen normalizador, y por último en la muestra con el genotipo DEL/DEL no hay amplificación del gen ARNt Lys (CUU) Cr11.

Para conocer la población estudiada, se calculó la distribución genotípica del locus del gen ARNt Lys (CUU) en el cromosoma 11 clasificada según el tipo de



sujetos, es decir sanos, pacientes con DM2 y totales, puede observarse en la Tabla XXXII.

**Tabla XXXII. Distribución genotípica del locus ARNt Lys(CUU) Cr 11 en la población analizada**

	<b>Genotipo Chr 11 ARNt-Lys CUU (%)</b>		
	<b>(WT/WT)</b>	<b>(WT/DEL)</b>	<b>(DEL/DEL)</b>
<b>Sujetos Sanos (n=77)</b>	31,17	41,56	27,27
<b>Pacientes con DM2 (n=122)</b>	25,41	40,98	33,61
<b>Total de sujetos (n=199)</b>	27,64	41,21	31,16

n: número de sujetos

WT: wild type (presencia del gen ARNt Lys (CUU) Cr11)

DEL: delección (ausencia del gen ARNt Lys (CUU) Cr11)

Como se puede observar en la Tabla XXXII, la delección del locus del del gen ARNt Lys (CUU) en el cromosoma 11 en la población estudiada es frecuente. En la población total de pacientes se puede observar que la presencia de la delección es del 41,21% en la forma heterocigota (WT/DEL) y 31,16% en la forma homocigota (DEL/DEL). Cuando se discrimina la población se observa que en los sujetos sanos la delección se presenta en un 41,56% en la forma heterocigota (WT/DEL) y un 27,27% en la forma homocigota (DEL/DEL), el 31,17% de la población de sujetos sanos presenta el gen en la forma homocigota (WT/WT). Mientras tanto, en los pacientes DM2 la delección se presenta en un 40,98% en la forma heterocigota (WT/DEL) y un 33,61% en la forma homocigota (DEL/DEL), el 25,41% de la población de sujetos sanos presenta el gen en la forma homocigota (WT/WT).

Para evaluar la presencia/ausencia del gen ARNt Lys (CUU) Cr11 y correlacionarlo con la presencia de la DM2 se utilizó un modelo de regresión logística múltiple (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo) . Los resultados de este estudio se describen en la Tabla XXXIII.

**Tabla XXXIII. Asociación del genotipo del gen ARNt Lys(CUU) Cr11 con la presencia de DM2**

Modelo	Genotipo	SUJETOS SANOS	PACIENTES CON DM2	OR (95% IC)	Valor p
		n; (%)	n; (%)		
Codominante	WT/WT	24 (31,2)	31 (25,4)	1,00	0,55
	WT/DEL	32 (41,6)	50 (41)	1,21 (0,60-2,42)	
	DEL/DEL	21 (27,3)	41 (33,6)	1,51 (0,70-3,20)	
Dominante	WT/WT	24 (31,2)	31 (25,4)	1,00	0,38
	WT/DEL-DEL/DEL	53 (68,8)	91 (74,6)	1,33 (0,71-2,50)	
Recesivo	WT/WT-WT/DEL	56 (72,7)	81 (66,4)	1,00	0,34
	DEL/DEL	21 (27,3)	41 (33,6)	1,35 (0,72-2,53)	
Sobredominante	WT/WT-DEL/DEL	45 (58,4)	72 (59)	1,00	0,94
	WT/DEL	32 (41,6)	50 (41)	0,98 (0,55-1,74)	
Log-aditivo	---	---	---	1,23 (0,85-1,79)	0,28

IC: intervalo de confianza del 95%. p calculado del test del Chi-cuadrado.

WT, wild type (presencia del gen ARNt Lys (CUU) Cr11); DEL, delección (ausencia del gen ARNt Lys (CUU) Cr 11).

n: número de pacientes

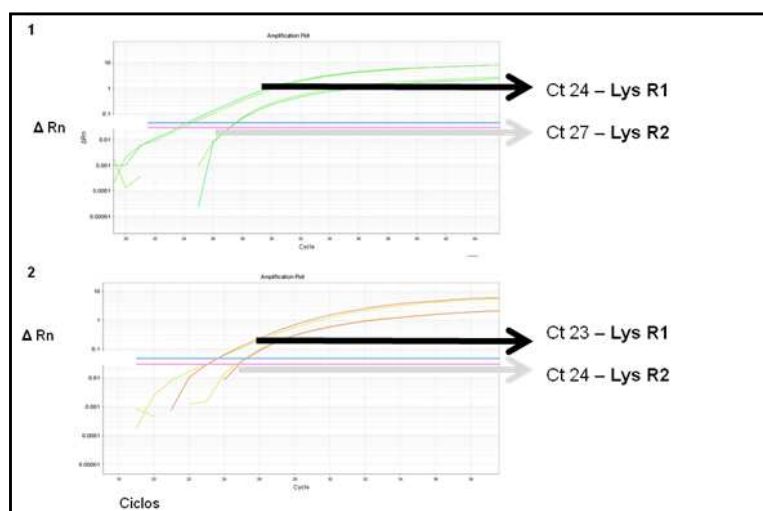
%: porcentaje de pacientes

La interpretación de los resultados obtenidos muestran que en ninguno de los modelos analizados se observan diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de sujetos sanos y la de pacientes con DM2 y la presencia del gen ARNt Lys (CUU) Cr11: ARNt Lys (CUU) Cr11: modelo Codominante (OR= 1,21 (0,60-2,42); p=0,55), Dominante (OR= 1,33 (0,71-2,50); p=0,38), Recesivo (OR= 1,35 (0,72-2,53); p=0,34), Sobredominante (OR= 0,98 (0,55-1,74); p=0,94) y Log-aditivo (OR= 1,23 (0,85-1,79); p=0,28) (Tabla XXXIII).

### 6.13.2 Cuantificación de la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU)

Para el estudio de la modificación ms2 en el ARNt Lys (UUU) en leucocitos se incluyó un total de 67 individuos mayores de 21 años (24 pacientes con DM2 y 43 sujetos sanos) de dos centros de salud: Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba y Centro Médico Privado “San Ricardo Pampurri” de Villa Carlos Paz.

La cuantificación de la modificación ms2 en el ARNt Lys (UUU) en leucocitos fue realizada mediante la técnica descrita por Wei y colaboradores (19). En la Figura 16 se pueden observar dos muestras de ADNc analizadas por nuestro grupo mediante Real Time PCR. El gráfico 1 corresponde a una muestra con niveles normales de modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU). Como se mencionó anteriormente, debido al efecto inhibitorio de la modificación ms2, se puede observar una diferencia entre la cantidad de ADNc amplificada por el par de primers F-R2 (Flecha Gris –Lys R2-) (Ct=27) y el entre el par de primers F-R1 (Flecha Negra –Lys R1-) (Ct=24). En cambio en el gráfico 2, el cual corresponde a una muestra de ADNc con niveles bajos de la modificación ms2, podemos observar que las cantidades amplificadas tanto por el par de primers F-R2 y F-R1 son similares (Ct=24 y Ct=23).



**Figura 16. Muestras analizadas de la cuantificación de la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys(UUU).**

Para evaluar la cantidad de modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) en leucocitos de los sujetos sanos y pacientes DM2, se realizó un cálculo basado en la comparación de los valores Ct del producto amplificado entre los primers CDKAL1 Forward-Reverse 1 (R1) y los primers CDKAL1 Forward-Reverse 2 (R2). Se obtuvo una relación entre la expresión del producto amplificado CDKAL1 R1 y CDKAL1 R2 (R1/R2) para el análisis entre la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys UUU y la DM2 mediante la prueba t de Student (Tabla XXXIV).

**Tabla XXXIV. Asociación entre la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) (expresada mediante la relación R1/R2) en leucocitos y la presencia de DM2**

	<b>Pacientes con DM2 (n=24)</b>	<b>Sujetos sanos (n=43)</b>	<b>Valor p</b>
<b>Relación R1/R2</b>	4,86 ( $\pm$ 3,57)	5,45 ( $\pm$ 4,7)	0,593

Los datos están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE)

n:número de sujetos

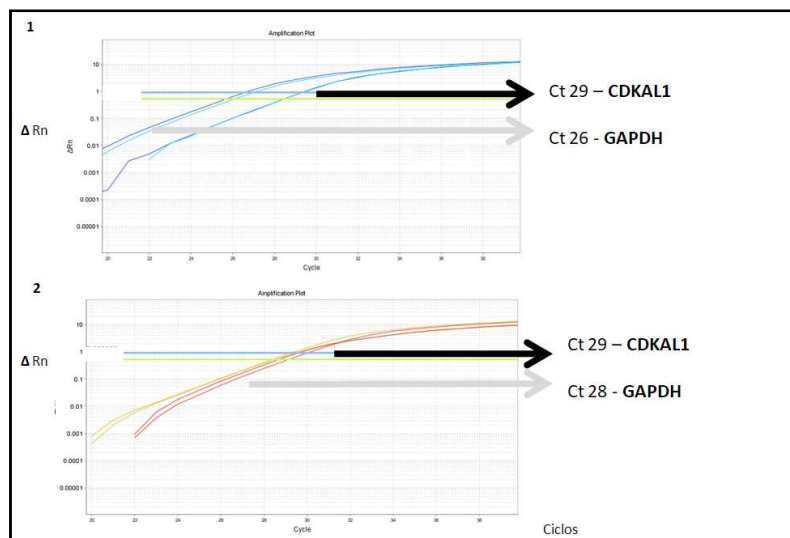
La interpretación de los resultados obtenidos muestran que no se observa diferencias estadísticamente significativas entre la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) (expresado como la Relación R1/R2) con el estado del sujeto estudiado (sano o con DM2) ( $p=0,593$ ) (Tabla XXXIV).

### **6.13.3 Cuantificación de la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos humanos**

Para el estudio de los cambios de expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos en respuesta al estado del paciente, se incluyó un total de 67 individuos mayores de 21 años (24 pacientes con DM2 y 43 sujetos sanos) de 2 centros de salud: Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba y Centro Médico Privado “San Ricardo Pampurri” de Villa Carlos Paz.

Se analizaron los cambios en la expresión del gen CDKAL1 en respuesta al estado del paciente (sano o con DM2) y se normalizaron con el gen normalizador (GAPDH) cuya expresión no cambia en respuesta al estado del paciente (13).

Se realizó la cuantificación de la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos humanos mediante la técnica de Real Time PCR, utilizando al ARNm del gen GAPDH como gen normalizador. En la Figura 17 se pueden observar dos muestras de ADNc analizadas por nuestro grupo mediante Real Time PCR. En los gráficos 1 y 2 podemos observar la expresión de los genes CDKAL1 (Flecha Negra – CDKAL1-) y del gen normalizador GAPDH (Flecha Gris –GAPDH-) en dos muestras distintas. Cuando comparamos ambas muestras podemos observar que, con respecto a la expresión del gen normalizador, la expresión del gen CDKAL1 en el gráfico 1 (CDKAL1 Ct=29, GAPDH Ct=26) fue menor que en el gráfico 2 (CDKAL1=29, GAPDH Ct=28), considerando que en el gráfico 1 la cantidad del gen normalizador presenta dos Ct menos que en el gráfico 2.



**Figura 17. Cuantificación de la expresión del ARNm del CDKAL1 en leucocitos humanos**

Para evaluar la expresión del gen CDKAL1 en leucocitos de los sujetos sanos y pacientes DM2, se realizó un cálculo basado en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de la reacción del normalizador GAPDH como factor de corrección. Se obtuvo una relación entre la expresión del gen CDKAL1 y el gen normalizador GAPDH para el análisis entre la expresión del ARNm CDKAL1 y la DM2 mediante la prueba t de Student (Tabla XXXV).

**Tabla XXXV. Asociación entre la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos y la presencia de DM2**

	<b>Pacientes con DM2 (n=24)</b>	<b>Sujetos sanos (n=43)</b>	<b>Valor p</b>
<b>Relación CDKAL1/GAPDH</b>	0,85 ( $\pm$ 1,03)	0,22 ( $\pm$ 0,24)	0,007

Los datos están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE)

n: número de sujetos

La interpretación de los resultados obtenidos muestran que hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos en los pacientes con DM2 en relación a los sujetos sanos ( $p=0,007$ ), mostrando que los pacientes DM2 tienen mayores niveles expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos (Tabla XXXV).

En resumen, en el estudio de asociación entre la expresión del ARNm de CDKAL1 en leucocitos y la presencia de DM2, se observó mayores niveles de expresión del ARNm de CDKAL1 en los pacientes con DM2 en relación a los sujetos sanos. Mientras que en el estudio de asociación entre la modificación ms2 en la posición 37 del ARNt Lys (UUU) en leucocitos y la presencia de DM2 no se observó diferencia estadísticamente significativa. Y finalmente en el estudio de identificación de la delección presente del ARNt Lys (CUU) Cr11, no se observó asociación de la presencia de dicha delección entre la población de sujetos sanos y los pacientes con DM2.

## 6.14 DISCUSIÓN

La insulina, sintetizada por las células  $\beta$  de los conductos pancreáticos, es de gran importancia fisiológica en la homeostasis metabólica ya que regula los metabolismos de los carbohidratos, de las grasas y de las proteínas al promover la absorción de los carbohidratos. Alteraciones en los mecanismos involucrados en la traducción de la insulina podrían estar asociadas al desarrollo de DM2.(7)

En el estudio de Iben & Maraia (3), observaron la presencia de una delección de un locus en el cromosoma 11 que contenía un gen que codificaría al ARNt Lys (CUU) (3). Cuando evaluaron mediante Duplex PCR semicuantitativa a 98 muestras de ADN de origen multi-étnico, encontraron que este alelo se delecionaba en heterocigosidad u homocigosidad en todos los grupos con una frecuencia de aproximadamente el 50%.(3)

El locus presente en el Chr-11 ARNt Lys (CUU) podría reconocer al codón AAG de lisina, y la presencia de este locus podría afectar la traducción de la preproinsulina, lo cual podría estar involucrada en el desarrollo de DM2.(3)

En nuestro estudio, observamos que una importante parte de la población presentaba la delección ARNt Lys (CUU) Cr11. No obstante, la presencia/ausencia de este gen y la predisposición a la DM2 no pudieron ser establecidas mediante una asociación estadística ( $p > 0,05$ ). Una de las posibles explicaciones de este resultado, es que se sabe que habrían 14 genes que codifican al ARNt Lys (CUU) distribuidos en el genoma humano (10), lo que podría compensar de cierta manera la delección presente en el cromosoma 11.

También es posible que el gen presente en el Chr-11 ARNt Lys (CUU) pueda ser un gen inactivo, o tener poca influencia en la decodificación de los codones AAG en la síntesis de insulina, por lo que su efecto se vería enmascarado por otros factores que contribuyen más significativamente en el desarrollo de la DM2, como pueden ser otras variantes genéticas u otros factores ambientales.(20)

Los ARNt son clave para una traducción de proteínas eficiente y precisa. Para estar completamente activo, los ARNt deben estar modificados después de la transcripción. La creciente evidencia indica que las modificaciones de los ARNts y

las enzimas que catalizan tales modificaciones pueden desempeñar funciones importantes en patologías humanas complejas.(20)

Debido a que las modificaciones de los ARNt pueden afectar la precisión y la eficiencia de la traducción, así como la estabilidad general del ARNt, se esperaría que la falta de tales modificaciones tenga efectos profundos y generalizados en la síntesis de proteínas.(20)

Hay varios informes que vinculan al gen CDKAL1 con la DM2. Como mencionamos anteriormente, CDKAL1 codifica a una metiltiotransferasa involucrada en la modificación del complejo 2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina (ms2t6A) en la posición 37 del ARNt Lys (UUU)(21). La evidencia sugiere que la falta de la ms2t6A37 conduce a una mala traducción de varias proteínas, incluida la proinsulina, lo que desencadena la respuesta al estrés del retículo endoplásmico. Se cree que la patogenia molecular se debería a la síntesis de proinsulina anormal, que se acumularía y no se podría convertir en insulina, lo que, a su vez, conduciría a la intolerancia a la glucosa.(21)

En el estudio de Wei y colaboradores, la perturbación de la decodificación de un codón de Lys (AAG) en la pre-proinsulina estuvo implicada en el desarrollo de la DM2 en ratones deficientes en CDKAL1, validando experimentalmente los resultados encontrados en GWAS (13). Existen dos codones para el aminoácido lisina, AAG y AAA, y en los seres humanos hay casi igual cantidad de genes para los ARNt Lys (CUU) y ARNt Lys (UUU) que permiten decodificarlos.(3)

De acuerdo con el modelo que propone la intervención de CDKAL1 en la DM2, la hipomodificación de ARNt Lys (UUU) alteraría su capacidad para competir con el ARNt Lys (CUU) en su codón de balanceo AAG, que produce un plegado incorrecto, un procesamiento y una secreción de insulina deficientes (13). Este modelo encaja de manera plausible con las influencias genéticas sutiles que se espera contribuyan a los fenotipos multigénicos complejos de la DM2.

En nuestro estudio, no se observó una asociación entre el grado de modificación ms2 del ARNt Lys (UUU) y el tipo de sujeto analizado, es decir, pacientes con DM2 y sujetos sanos.



Sí se observó una diferencia significativa entre los niveles expresión de CDKAL1 en los pacientes con DM2 y los sujetos sanos, observándose mayores niveles de ARNm de CDKAL1 en los pacientes con DM2 respecto a los sujetos sanos. Este aumento en la expresión de CDKAL1 abre la posibilidad de generar distintas hipótesis para explicar su causa.

Una de estas hipótesis, es que el aumento de expresión del ARNm de CDKAL1 sea un mecanismo compensatorio para intentar controlar la DM. Por ejemplo, en los pacientes que sufren de Myasthenia Gravis, una enfermedad neuromuscular autoinmune crónica, en donde los auto-anticuerpos se dirigen hacia los receptores de acetilcolina (resultando en la pérdida de la misma), la expresión de los ARNm de las subunidades del receptor de acetilcolina se encuentra aumentadas en respuesta a la condición patológica.(22)

Otra posible hipótesis de los altos niveles de expresión de CDKAL1 es que la variante CDKAL1-v1 este compitiendo por un micro-ARN, y por ende menor degradación del ARNm de CDKAL1. En el estudio de Zhou y colaboradores, reportaron la presencia de una variante en el splicing alternativo del gen CDKAL1 denominada CDKAL1-v1. CDKAL1-v1 es un transcrito no codificante, que regula el nivel de CDKAL1 mediante la unión competitiva al micro-ARN que se dirige contra CDKAL1 (21). La transcripción de CDKAL1-v1 contiene a los exones 1-4 y una porción del 3'UTR derivada del intrón 4. Esta variante de splicing alternativo no es funcional debido a que carece del dominio de unión al ARNt necesario para tener actividad enzimática.(21)

## 6.15 BIBLIOGRAFÍA

1. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: A 90-year perspective. *Postgrad Med J*. 2016;92(1084):63–9.
2. Zhou Z, Sun B, Huang S, Jia W, Yu D. The tRNA-associated dysregulation in diabetes mellitus. *Metabolism*. 2019 May;94:9–17.
3. Iben JR, Maraia RJ. tRNA gene copy number variation in humans. *Gene*. 2014 Feb;536(2):376–84.
4. Locke JM, Wei FY, Tomizawa K, Weedon MN, Harries LW. A cautionary tale: the non-causal association between type 2 diabetes risk SNP, rs7756992, and levels of non-coding RNA, CDKAL1-v1. *Diabetologia*. 2015;58(4):745–8.
5. Guyton A, Hall J. *Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica*. Vol. 12, ELSEVIER. 2010. 961–976 p.
6. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*. Endotext. MDTText.com, Inc.; 2000.
7. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2;217(7):2273–89.
8. Murray RK, Davis JC. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Lange Medical Book. 2003.
9. Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Massarini A. *Curtis. Biología*. Editorial medica panamericana. 2008.
10. Chan PP, Lowe TM. GtRNADB 2.0: an expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D184-9.
11. Wei F-Y, Tomizawa K. Development of type 2 diabetes caused by a deficiency of a tRNA lys modification. *Islets*. 2012 Jan 5;4(1):71–3.

12. Thapar A, Cooper M. Copy number variation: what is it and what has it told us about child psychiatric disorders? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2013 Aug;52(8):772–4.
13. Wei F, Suzuki T, Watanabe S, Kimura S, Kaitsuka T, Fujimura A, et al. Deficit of tRNA Lys modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3598–608.
14. ACK Lysis Buffer. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014 Nov 1;2014(11):pdb.rec083295.
15. ThermoFisher. TRIzol™ Reagent Experimental protocol for DNA isolation.
16. Dnase I. DNase I, RNase-free. 2016;2016(April):0–3.
17. Invitrogen. SuperScriptIII Invitrogen. 2004;(18080):1–4.
18. Life Technologies. RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor. *In Vitro*. 2011;(10777):19–20.
19. Wei F, Tomizawa K. Measurement of 2-methylthio Modifications in Mitochondrial Transfer RNAs by Reverse-transcription Quantitative PCR. *bio-protocol*. 2016;6:1–7.
20. Torres AG, Batlle E, Ribas de Pouplana L. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends Mol Med*. 2014;20(6):306–14.
21. Zhou B, Wei F-Y, Kanai N, Fujimura A, Kaitsuka T, Tomizawa K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. *Hum Mol Genet*. 2014 Sep 1;23(17):4639–50.
22. Guyon T, Wakkach A, Poëa S, Mouly V, Klingel-schmitt I, Levasseur P, et al. Regulation of Acetylcholine Receptor Gene Expression in Human Myasthenia Gravis Muscles. *J Clin Invest*. 1998;102(1):249–63.

# **CAPÍTULO 7**

# **CONCLUSIONES**

## 7.1 CONCLUSIONES

Como conclusiones de los resultados obtenidos en el trabajo podemos destacar:

En lo que respecta al estudio de la farmacogenética de la metformina:

- La presencia de las variantes 420del y 465R en el gen SLC22A1 confieren menor capacidad de transporte para el pasaje de la metformina al interior del hepatocito, lo cual podría explicar la presencia de niveles más elevados de HbA1c en los pacientes con DM2.

Para el estudio de asociación entre los polimorfismos estudiados y la presencia de retinopatía diabética:

- Se observa una asociación entre el alelo G del rs4712527 del gen CDKAL1 y un menor riesgo a desarrollar retinopatía diabética proliferativa en pacientes con DM2 en la población argentina estudiada.

Para el estudio de asociación entre los polimorfismos estudiados y la presencia de nefropatía diabética:

- No se observó asociación entre la nefropatía diabética y la presencia de las variantes rs4646994 del gen ECA, rs7756992 del gen CDKAL1, rs1799983 del gen e-NOS y rs841853 de gen SLC2A1.

En el estudio de posibles alteraciones en mecanismos involucrados en la traducción de la insulina:

- La presencia de la delección del gen presente en el cromosoma 11, el cual codificaría a un ARNt Lys (CUU) es frecuente en nuestra población y no sería una causa para la predisposición a desarrollar DM2.
- No se observó diferencias estadísticamente significativas entre el grado de modificación 2-metilto del ARNt Lys (UUU) entre los pacientes con DM2 y sujetos sanos.
- Se observó una diferencia significativa entre los niveles del ARNm de CDKAL1 en los pacientes DM2 y los sujetos sanos, siendo mayores en los pacientes con DM2 respecto a los sujetos sanos.

## 7.2 TRABAJOS PRESENTADOS

### 7.2.1 Artículos publicados en revistas especializadas

**Efectividad de la dosis de metformina en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo II en relación a polimorfismos en el gen SLC22A1.** Autores: **Pablo Yang**; Juan Carlos Nicolás, Cristian Ariel Galván, Dante Miguel Beltramo, Néstor Walter Soria. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.** (Acta Bioquím Clín Latinoam 2014; 48 (2): 229-35)

**Pharmacogenetics and personalized treatment of type 2 diabetes mellitus.** Autores: **Pablo Yang**; Verónica Ojeda Heredia, Dante M. Beltramo, Néstor W. Soria. **International Journal of Diabetes in Developing Countries.** (IJoDiDC 2016, 36 (4): 508-518). DOI: 10.1007/s13410-016-0517-2.

**The rs4712527 Polymorphism in the CDKAL1 Gene: A Protective Factor for Proliferative Diabetic Retinopathy Progress in Type 2 Diabetes.** Autores: **Pablo Yang**, José D. Luna, Emilio Alcoba, Aylén Sein, Ana L. Gramajo, Claudio P. Juárez, Dante M. Beltramo, Néstor W. Soria. **Journal of VitreoRetinal Diseases.** (JVRD 2018, 2 (4):200-207). DOI: 10.1177/2474126418777405

**Rol de variantes genéticas con el desarrollo de Enfermedad Renal Crónica en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2.** Autores: **Pablo Yang**, Ojeda Verónica, Ruiz-Pecchio Adriana, Soria Néstor W. **Methodo.** (Methodo 2018, 3(4):103-111). DOI:10.22529/me.2018.3(4) 02

**Loss of the tRNALysCUU encoding gene, Chr-11 tRNA-Lys-CUU, is not associated to Type 2 Diabetes Mellitus.** Autores: **Pablo Yang**, Dante Miguel Beltramo, LluísRibas de Pouplana, Néstor Walter Soria, Adrian Gabriel Torres. **Biomarkers in Medicine.** (Biomark Med 2019, 13(4):259-266). DOI: 10.2217/bmm-2018-0322

## 7.2.2 Comunicaciones orales

**Variantes genéticas asociadas a retinopatía diabética en pacientes argentinos con diabetes.** Autores: **Bioq. Yang Pablo**, Med. Alcoba Emilio, Med. Sein Aylén, Med. Gramajo Ana, Dr. Juárez Beltrán Patricio, Dr. Beltramo Dante, Dr. Soria Néstor, Dr. Luna Pinto José. En las **Jornadas CAO 2015** llevado a cabo del 13 al 16 de Mayo del 2015 en Buenos Aires, Argentina.

**Asociación de variantes genéticas y retinopatía diabética proliferativa en una población argentina de pacientes Diabéticos Tipo II.** Autores: **Bioq. Yang Pablo**, Med. Sein Aylén, Med. Aucar Emilia, Med. Gramajo Ana L., Med. Márquez Gabriel Emiliano, Med. Alcoba Emilio, Dr. Juárez Beltrán Patricio, Dr. Beltramo Dante, Dr. Luna Pinto José D, Dr. Soria Néstor. En el **XI Congreso AIVO-BRAVO – III Join Meeting** llevado a cabo el 20 y 21 de Octubre del 2016 en Buenos Aires, Argentina.

## 7.2.3 Pósters

**Influencia de la presencia de variantes genéticas en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo II en el tratamiento con metformina.** Autores: **Bioq. Yang Pablo**, Bioq. Esp. Nicolas Juan Carlos, Dr. Galván Cristian, Med. Díaz Gustavo, Dr. Beltramo Dante, Dr. Soria Néstor. En el **XIX Congreso Argentino de Diabetes** llevado a cabo del 6 al 8 de Noviembre del 2014 en Mar del Plata, Argentina.

**The rs4712527 polymorphism in the CDKAL1 gene, as a protective predictor of proliferative diabetic retinopathy development in type 2 diabetic patients.** Autores: Dr. Luna Pinto José D, **Bioq. Yang Pablo**, Med. Sein Aylén, Med. Aucar Emilia, Med. Gramajo Ana L., Med. Márquez Gabriel Emiliano, Dr. Juárez Beltrán Patricio, Dr. Beltramo Dante, Dr. Soria Néstor. En el **ARVO 2017 Annual Meeting** llevado a cabo del 7 al 11 de Mayo del 2017 en Baltimore, Estados Unidos.



**Contribución de variantes genéticas con el riesgo a desarrollar enfermedad renal crónica y retinopatía en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.** Autores: **Bioq. Yang Pablo**, Med. Ojeda Heredia Verónica, Bioq. Ruiz-Pecchio Adriana, Med. Luna Pinto José, Dr. Soria Néstor. En el **XIII Jornadas Bioquímicas del NOA** llevado a cabo del 4 al 6 de Octubre del 2018 en Termas de Río Hondo, Argentina.

# Efectividad de la metformina en pacientes con diabetes tipo II según variantes en el gen SLC22A1

*Effectiveness of Metformin in patients with type II diabetes related to variants in the SLC22A1 gene*

*Eficácia de Metformina em doentes com diabetes tipo II, relacionado com variantes do gene SLC22A1*

- Pablo Yang<sup>1a</sup>, Juan Carlos Nicolás<sup>1bc</sup>, Cristian Ariel Galván<sup>1ac</sup>, Pablo Vélez<sup>1d</sup>, Luciano Da Ronco<sup>1c</sup>, Gustavo Tomás Díaz<sup>3e</sup>, Dante Miguel Beltramo<sup>4ad</sup>, Néstor Walter Soria<sup>2ac</sup>

<sup>1</sup> Bioquímico.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias Químicas.

<sup>3</sup> Médico.

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias Químicas. investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

<sup>a</sup> Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Avenida Armada Argentina 3555, (X5016DHK) Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Cátedra de Análisis Clínicos I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Avenida Armada Argentina 3555, (X5016DHK) Córdoba, Argentina.

<sup>c</sup> Laboratorio de Análisis Clínicos Especializados (LACE), Avenida Vélez Sarsfield 528, (X5000JJS) Córdoba, Argentina.

<sup>d</sup> Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR), Santa María de Pujillo (X5164), Córdoba, Argentina.

<sup>e</sup> Centro Médico San Ricardo Pampurri, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## Resumen

La diabetes *mellitus* tipo II (DM II) es una enfermedad que afecta una gran cantidad de individuos. Un medicamento empleado en el tratamiento de los pacientes es la metformina. Este medicamento es transportado al interior de los hepatocitos por un transportador codificado por el gen SLC22A1. Variantes en el gen con actividad reducida pueden disminuir la cantidad de metformina disponible en el hígado y reducir la respuesta terapéutica. Se propuso evaluar diferentes parámetros bioquímicos en relación a la dosis de metformina y la presencia de variantes en el transportador. Se estudiaron 103 pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de DM II, tratados con 1700 mg/día de metformina por más de 6 meses. Se analizaron 5 polimorfismos en el gen SLC22A1, glucemia, HbA1c, función hepática, perfil lipídico y renal. Los niveles de HbA1c y de glucemia fueron más elevados en los pacientes que presentaban los polimorfismos R61C, G401S, M420del y G465R aunque la diferencia fue estadísticamente significativa sólo para la HbA1c en los pacientes que presentaban las variantes M420del y G465R ( $p=0,0273$  y  $0,0018$ , respectivamente). La presencia de polimorfismos con actividad reducida en el gen SLC22A1 afecta los niveles de glucemia y de HbA1c en pacientes con DM II cuando son tratados con metformina.

**Palabras clave:** diabetes tipo II \* farmacogenética \* gen SLC22A1 \* metformina \* polimorfismos

## Summary

*Diabetes mellitus type II (DM II) is a disease that affects a large number of individuals. One of the drugs used for the treatment is metformin. Metformin is delivered into hepatocytes by a transporter encoded by the SLC22A1 gene. Gene variants with reduced activity may decrease the amount*

of metformin available in the liver and reduce the therapeutic response. Various biochemical parameters were evaluated in relation to the metformin dose and the presence of transporter variants. A total of 103 patients older than 18 diagnosed with DM II who were treated with 1700 mg/day of metformin for more than six months were studied. Five polymorphisms in the SLC22A1 gene were analyzed as well as glycemia, HbA1c level, liver function, and lipid and kidney profiles. HbA1c and glycemia levels were higher in patients with the R61C, G401S, M420del and G465R polymorphisms; although the difference was statistically significant only for HbA1c in patients with the M420del and G465R variants ( $p=0.0273$  and  $0.0018$ , respectively). Polymorphisms with reduced activity in the SLC22A1 gene affect blood glucose levels and HbA1c in patients with DM II when they are treated with metformin.

**Key words:** diabetes type II \* pharmacogenetics \* SLC22A1 gene \* metformin \* polymorphisms

## Resumo

O diabetes mellitus tipo II (DM II) é uma doença que afeta uma grande quantidade de indivíduos. Um medicamento utilizado no tratamento dos doentes é a metformina. Esse medicamento é transportado no interior dos hepatócitos por um transportador codificado pelo gene SLC22A1. Variantes no gene com atividade reduzida podem diminuir a quantidade de Metformina disponível no fígado e reduzir a resposta terapêutica. Propôs-se avaliar diferentes parâmetros bioquímicos em relação à dose da metformina e à presença de variantes no transportador. Foram estudados 103 pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico de DM II tratados com 1700 mg/dia de metformina por mais de 6 meses. Foram analisados 5 polimorfismos no gene SLC22A1; glicemia, HbA1c, função hepática, perfil lipídico e renal. Os níveis de HbA1c e de glicemia foram superiores em doentes que apresentavam os polimorfismos R61C, G401S, M420del e G465R; embora a diferença seja estatisticamente significativa apenas para o HbA1c nos doentes que apresentavam as variantes M420del e G465R ( $p=0,0273$  e  $0,0018$ ; respectivamente). A presença de polimorfismos com atividade reduzida no gene SLC22A1 afeta os níveis da glicemia e do HbA1c em doentes com DM II quando são tratados com metformina.

**Palavras-chave:** diabetes tipo II \* farmacogenética \* gene SLC22A1 \* metformina \* polimorfismos

## Introducción

La diabetes *mellitus* tipo II (DM II) es una enfermedad crónica que afecta a gran cantidad de individuos en todo el mundo.

La metformina es uno de los hipoglucemiantes más utilizados en el tratamiento de pacientes con DM II (1). La biodisponibilidad de la metformina no es completa y existen grandes diferencias interindividuales luego de la administración oral (20%–70%) (2-4).

Se especula que el mecanismo de acción de la metformina es mediante la reducción de la producción hepática de glucosa, disminución de la absorción intestinal, incremento del transporte de glucosa dentro de las células e inhibición de la gluconeogénesis; aunque el mecanismo exacto de acción no se conoce (5). Los últimos hallazgos le confieren a la metformina propiedades antiateroscleróticas, hipotensoras y anticancerosas. Además, se han encontrado otras propiedades pleiotrópicas, tales como la disminución de lípidos plasmáticos, disminución del estrés oxidativo e incremento en la actividad fibrinolítica (5).

La metformina es transportada por transportadores catiónicos (OCTs) tanto a nivel renal como hepático. En humanos, el OCT1 (*Organic Cation Transporter 1*; nombre del gen: *Solute Carrier Family 22A1* (SLC22A1)) se expresa

en la membrana basolateral de los hepatocitos y media el ingreso hepático de metformina (6-8). A diferencia de lo que sucede en hígado, el OCT2 (*Organic Cation Transporter 2*; nombre del gen: *Solute Carrier Family 22A2* (SLC22A2)) se expresa fundamentalmente en riñón y permite el ingreso de metformina a las células del tubo proximal (8)(9). Estudios realizados en un ratón *knockout* para el gen OCT1 demostraron que la concentración renal de metformina fue 30 veces más baja que en ratones normales. Además, los niveles de metformina en sangre eran más elevados mientras que los efectos hipoglucemiantes eran menores (6)(10)(11).

El *clearance* de metformina ocurre fundamentalmente a nivel renal y no sufre prácticamente ninguna transformación a nivel hepático. Debido a que el *clearance* renal es mucho más elevado que la velocidad de filtración glomerular, el principal mecanismo de eliminación es entonces a través de secreción tubular activa (12).

Muchos polimorfismos en el gen SLC22A1 han sido descritos (13-19). No obstante, existen controversias entre la presencia de polimorfismos en este gen y la efectividad hipoglucemiante de la metformina (20).

En este estudio se calculó la frecuencia de una serie de polimorfismos presentes en el gen SLC 22A1: R61C (rs12208357), P341L (rs2282143), M420del (rs35191146), G401S (rs34130495) y G465R (rs34059508) en pacien-

tes caucásicos con DM II que viven en la ciudad de Córdoba, Argentina, tratados con 1700 mg/día de metformina por un período superior a 6 meses y con valores normales de *clearance* de creatinina. Además, se analizaron glucemia, niveles sanguíneos de HbA1c, función hepática y perfil lipídico.

## Materiales y Métodos

### PACIENTES

Ciento tres pacientes con DM II no relacionados que residen en la ciudad de Córdoba participaron en este estudio y fueron reclutados en el laboratorio LACE, siendo 44 hombres y 59 mujeres (edad promedio: 62,4 años,  $r=33-90$  años). Todos recibieron 1700 mg/día de metformina por lo menos durante 6 meses. El estudio fue realizado de acuerdo a normas de la Declaración de Helsinki y aprobado por los Comités de Ética del Instituto Oulton - Romagosa y del Ministerio de Salud de Córdoba. Todos los sujetos recibieron, completaron y firmaron el consentimiento informado.

### PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Se evaluaron valores de glucemia, niveles de HbA1c, función hepática (AST, ALT, bilirrubina, ALP), perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos, HDL - Col, LDL - Col) y perfil renal (albúmina y creatinina urinarias).

### DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN SLC22A1

Se obtuvo el ADN de los pacientes de sangre periférica usando el equipo comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se estudiaron 5 diferentes polimorfismos en el gen SLC22A1 (R61C, P341L, M420del, G401S y G465R), los cuales se analizaron mediante la técnica de PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism assay*) usando *primers* específicos (diseñados por este equipo) (Tabla I) en un termociclador MJ Research (Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

La reacción de PCR se realizó usando 80 ng del ADN de los pacientes; 3  $\mu$ L del *buffer* 5X de la enzima; 200  $\mu$ M de cada dGTP, dATP, dCTP y dTTP; 10  $\mu$ M de cada *primer* específico del polimorfismo *Forward* y *Reverse*, 0.6 U de Go-Taq polimerasa (Promega) y agua csp 15  $\mu$ L. Los parámetros de ciclado fueron: 94 °C durante 2 min y luego 35 ciclos de 94 °C por 50 s, 58 °C por 50 s y 72 °C por 60 s y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos de amplificación fueron digeridos con endonucleasas de restricción específicas (Tabla I), luego separados por electroforesis en geles de agarosa (2,5% p/v) y visualizados por irradiación con luz ultravioleta luego de la tinción con bromuro de etidio.

Se tomaron 5 muestras al azar para ser analizadas por secuenciación del ADN, a fin de verificar si los resultados obtenidos por la técnica de PCR - RFLP eran coincidentes.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizó el *software* GraphPad Prism, versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EE.UU.) para calcular el *chi* cuadrado, considerando una diferencia significativa un valor de  $p < 0,05$ . Las frecuencias genotípicas y alélicas observadas para las diferentes variantes del gen SLC22A1 fueron comparadas con las esperadas de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg.

## Resultados

Los parámetros bioquímicos analizados se presentan en la Tabla II.

Las frecuencias genéticas y alélicas fueron calculadas para 5 polimorfismos del gen SLC22A1 (R61C, P341L, M420del, G401S y G465R) encontrándose todas en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla III).

Se detectó al menos un polimorfismo en el gen SLC22A1 en 65 de los 103 pacientes analizados. Los niveles de HbA1c y de glucemia fueron más elevados en los pacientes que presentaban los polimorfismos R61C y

Tabla I. Secuencia de primers, endonucleasas de restricción y tamaños de los fragmentos de restricción esperados.

Polimorfismo en el gen SLC22A1	Secuencia del Primer (5' → 3')	Tamaño del Fragmento	Endonucleasa de Restricción	Tamaño del Fragmento Digerido (pb)	
				N	M
R61C	F: TGATCAGATGGCCACGTGCATT	607 pb	HhaI	26, 83, 87, 100 y 311	26, 100, 170 y 311
	R: GAGCCGGGCGTGCATACAC				
P341L	F: TGCCCTTGTCATGGGTGTGAAGC	267 pb	TseI	267	86 y 181
	R: AGCGTGCTGATTCTGCCTGGA				
M420del	F: CTCAGTTTACGGACTCTGTGCT	381 pb	NlaIII	6, 36, 48, 114 y 177	6, 48, 114 y 213
	R: CACTGTGCACGGCCCTCAAT				
G401S	Idem F M420del	381 pb	Sau96I	14, 34, 110 y 223	14, 110 y 257
	Idem R M420del				
G465R	F: TGTTGCCCTGTGCTGCAAATCTC	870 pb	BsaXI	166, 346 y 358	346 y 524
	R: GCCACTGCCGAGCTGCAAAA				

N: alelo normal, M: alelo mutado, pb: pares de base.

Tabla II. Parámetros bioquímicos analizados en la población de estudio (promedio).

	Mujeres	DE	Hombres	DE	Media	DE
Hb Glicosilada (%)	6,84	1,01	6,97	0,96	6,9	0,99
Glucemia (mg/dL)	122,4	30,96	136,2	26,79	128,3	29,92
CT (mg/dL)	203,2	43,44	208,80	74,52	205,60	58,49
HDL (mg/dL)	44,32	12,33	41,05	9,79	42,92	11,37
LDL (mg/dL)	120,2	34,55	123,5	29,08	121,6	32,22
TG (mg/dL)	170	102,7	192,86	107,8	179,7	105
Creatinina (mg/dL)	0,79	0,18	0,92	0,16	0,86	0,18
Clarence (mL/min)	95,47	17,7	91,66	12,1	93,84	15,61
GPT/ALT (mUI/mL)	18,42	8,15	28,43	19,85	22,7	15,12
GOT/AST (mUI/mL)	17,69	4,21	24,13	9,28	20,57	7,59

DE: desviación estándar.

Tabla III. Frecuencias genotípicas y alélicas en la población estudiada.

Polimorfismo	Genotipo (n/frec.)						Frecuencia alélica		Hardy-Weinberg	
	wt/wt		wt/mut		mut/mut		wt	mut	X <sup>2</sup> test	Valor de p
R61C	92	0,893	11	0,107	0	0,000	0,947	0,053	0,3280	0,5670
P341L	98	0,951	5	0,049	0	0,000	0,976	0,024	0,0637	0,8007
M420del	65	0,631	36	0,350	2	0,019	0,806	0,194	1,4068	0,2356
G401S	86	0,835	15	0,146	2	0,019	0,908	0,092	1,7490	0,1860
G465R	92	0,893	10	0,097	1	0,010	0,942	0,058	1,3650	0,2427

n: Número de pacientes; frec: frecuencia; wt: alelo salvaje (*wild type*); mut: alelo mutado

G401S aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla IV A y B).

Los pacientes con los alelos M420del y G465R presentan niveles más elevados de HbA1c ( $p=0,0273$  y  $p=0,0018$ , respectivamente) (Tabla IV A). En estas tablas (Tabla IV A y B) se presentan los valores de glucemia y HbA1c para los pacientes que recibieron 1700 mg/día de metformina, no encontrándose diferencia

significativa en los otros parámetros bioquímicos analizados (datos no mostrados).

Finalmente, el método de PCR - RFLP descrito en este trabajo para la detección de cada polimorfismo en el gen SLC22A1 ha resultado ser simple, económico y eficaz (el resultado del secuenciamiento del ADN coincidió en todas las muestras analizadas, Figura 1).

Tabla IV. Relación de los niveles de HbA1c (A) y glucemias (B) en función de la presencia de los polimorfismos en el gen SLC22A1.

A

Polimorfismo	HbA1c (%) (media, DE, n)		
	wt/wt	wt/mut+ mut/mut	p
R61C	6,872 ± 0,1033 (92)	7,095 ± 0,3032 (11)	ns
P341L	6,904 ± 0,1000 (98)	6,748 ± 0,4894 (5)	ns
M420del	6,732 ± 0,1123 (65)	7,176 ± 0,1745 (38)	0,0273
G401S	6,846 ± 0,1074 (86)	7,147 ± 0,2296 (17)	ns
G465R	6.792 ± 0,09696 (92)	7,764 ± 0,3301 (11)	0,0018

DE: desviación estándar; n: Número de pacientes; wt: alelo salvaje (*wild type*); mut: alelo mutado

B

Polimorfismo	Glucemia (mg/dL) (media, DE, n)		
	wt/wt	Wt/mut+ mut/mut	p
R61C	127,4 ± 3,060 (92)	135,5 ± 10,56 (11)	ns
P341L	128,8 ± 3,062 (98)	117,2 ± 8,749 (5)	ns
M420del	124,6 ± 3,482 (65)	134,6 ± 5,231 (38)	ns
G401S	127,8 ± 3,177 (86)	130,8 ± 7,995 (17)	ns
G465R	126,3 ± 3,099 (92)	144,6 ± 8,304 (11)	ns

DE: desviación estándar; n: Número de pacientes; wt: alelo salvaje (*wild type*); mut: alelo mutado.

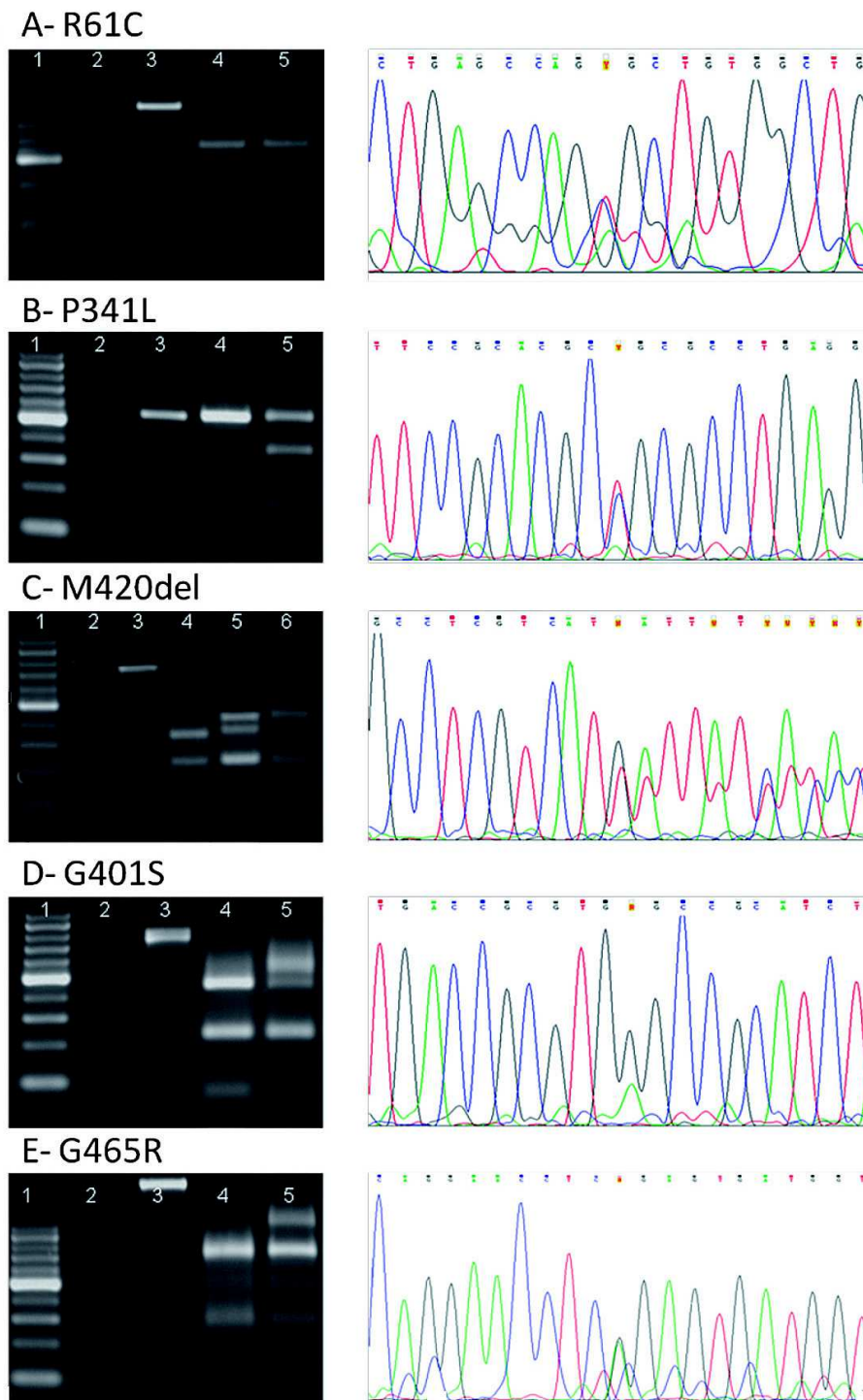


Figura 1. Izquierda: Electroforesis en geles de agarosa al 2,5% p/v de los productos de PCR para cada polimorfismo digeridos con la enzima de restricción correspondiente. 1: marcador de peso molecular de 50 pb (la banda más intensa corresponde a 250 pb), 2: blanco de PCR, 3: producto de PCR sin digerir, 4: muestra de individuo homocigota wild type, 5: muestra de individuo heterocigota, 6: muestra de individuo homocigota mutado. Derecha: Secuencias de ADN de muestras heterocigotas para cada polimorfismo.

## Discusión y Conclusiones

De acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes, se estima que el número de diabéticos en el mundo actualmente es de 366 millones, y el mismo aumentaría hasta alcanzar los 553 millones para el año 2030 (*Prevalence of Diabetes*, www.idf.org). Como consecuencia de estos números, en los últimos años ha crecido el interés por comprender las diferencias observadas en la efectividad terapéutica de diferentes hipoglucemiantes, entre ellos la metformina. Para este medicamento, se sabe que la presencia de variantes en el gen SLC22A1 que codifica al transportador OCT1 podrían explicar, al menos en parte, esas diferencias en la efectividad.

En este trabajo se propuso conocer cuál era la frecuencia de cinco polimorfismos en el gen SLC22A1 en 103 pacientes con DM II y su posible relación con los niveles de glucemia, HbA1c y dosis de metformina recibidas por los pacientes.

Trabajos realizados por diferentes investigadores han demostrado que el gen SLC22A1 es muy polimórfico (18)(20)(21). Los datos obtenidos en este trabajo muestran los valores de las frecuencias de variantes en el gen SLC22A1 en pacientes con DM II en Córdoba, Argentina (Tabla III).

Estudios funcionales realizados por Shu *et al.* (10) donde transfectaron de forma estable líneas celulares que expresaban al gen salvaje y a otras 12 variantes pudieron observar que a pesar de tener niveles de mensajero similares, el ingreso de metformina a la célula se veía disminuido. Este hallazgo podría explicarse por los reducidos valores de Vmax encontrados en las diferentes variantes. Este mismo grupo realizó otro análisis en el cual estudiaban a individuos sanos, algunos que tenían y otros que no tenían variantes en el gen SLC22A1. A los mismos se les administró glucosa de manera oral y se midió la glucemia obteniendo valores similares en todos los individuos. Además se observó que si a los mismos se les administraba metformina, las glucemias se normalizaban más rápidamente en aquellos individuos que no presentaban polimorfismos *versus* los que sí los tenían, por lo tanto el área bajo la curva era mayor en aquellos individuos que presentaban algún polimorfismo. También observaron que aquellos individuos con variantes en el gen SLC22A1 que recibieron oralmente glucosa tenían niveles más elevados de insulina dos horas post - administración.

Como se mencionó anteriormente, en los pacientes analizados se observaron niveles de HbA1c y de glucemia más elevados que en aquellos que presentaban los polimorfismos R61C, M420del, G401S y G465R, coincidiendo con lo encontrado por Shu (10). Además, los pacientes con los alelos 420del y 465R presentaban valores de HbA1c superiores con significación estadística ( $p=0,0273$  y  $p=0,0018$ , respectivamente) (Tabla IV A).

La presencia de variantes en el gen SLC22A1 que confieren menor capacidad de transporte de metformina al interior del hepatocito podría explicar la presencia de niveles más elevados de HbA1c y de glucemia en estos pacientes. A pesar de estos hallazgos, es necesario realizar estudios más extensivos para ver si lo encontrado en este trabajo se repite en otras poblaciones. También se podría analizar a un grupo de pacientes vírgenes de tratamiento, dosar los niveles de HbA1c y glucemia y repetir esta cuantificación 6 meses post tratamiento con metformina, para poder comparar los beneficios del tratamiento y eventualmente sacar conclusiones más sólidas sobre el rol desempeñado por la presencia de variantes genéticas en el gen SLC22A1. Adicionalmente, pacientes de diferentes regiones de Argentina deberían ser analizados, ya que un perfil genético diferente puede existir al recibir este país diferentes corrientes migratorias y la respuesta al tratamiento eventualmente podría ser diferente.

### AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue financiado por la Universidad Católica de Córdoba y el laboratorio LACE.

### CORRESPONDENCIA

DR. NÉSTOR WALTER SORIA  
Cátedra de Biotecnología  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Católica de Córdoba  
Avenida Armada Argentina 3555  
(X5016DHK), CÓRDOBA, Argentina  
Tel/Fax: 54-351-4938060  
E-mail: nestorwsoria@gmail.com

## Referencias bibliográficas

1. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med* 2002; 137: 25-33.
2. Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes *mellitus*. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 12: 235-46.
3. Pentikainen PJ, Neuvonen PJ, Penttila A. Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. *Eur J Clin Pharmacol* 1979; 16: 195-202.
4. Sambol NC, Chiang J, O'Conner M, Liu CY, Lin ET, Goodman AM, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin in healthy subjects and patients with noninsulin-dependent diabetes *mellitus*. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 1012-21.
5. Grzybowska M, Bober J, Olszewska M. Metformin - mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes *mellitus*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2011; 65: 277-85.

6. Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuvara H, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 510-5.
7. Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 913-21.
8. Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, *et al.* Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 871-81.
9. Kimura N, Okuda M, Inui K. Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. *Pharm Res* 2005; 22: 255-9.
10. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, *et al.* Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 2007; 117: 1422-31.
11. Wang DS, Kusuvara H, Kato Y, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 844-8.
12. Zolk O. Disposition of metformin: Variability due to polymorphisms of organic cation transporters. *Ann Med* 2012; 44: 119-29.
13. Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes *mellitus*. *Pharmacogenomics J* 2009; 9: 242-7.
14. 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: 38-44.
15. Chen L, Takizawa M, Chen E, Schlessinger A, Segenthaler J, Choi JH, *et al.* Genetic polymorphisms in organic cation transporter 1 (OCT1) in Chinese and Japanese populations exhibit altered function. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 335: 42-50.
16. Itoda M, Saito Y, Maekawa K, Hichiya H, Komamura K, Kamakura S, *et al.* Seven novel single nucleotide polymorphisms in the human SLC22A1 gene encoding organic cation transporter 1 (OCT1). *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 19: 308-12.
17. Jablonski KA, McAteer JB, de Bakker PI, Franks PW, Pollin TI, Hanson RL, *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: 2672-81.
18. Sakata T, Anzai N, Shin HJ, Noshiro R, Hirata T, Yokoyama H, *et al.* Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (SLC22A1) affecting transport functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 789-93.
19. Zhou K, Donnelly LA, Kimber CH, Donnan PT, Doney AS, Leese G, *et al.* Reduced-function SLC22A1 polymorphisms encoding organic cation transporter 1 and glycemic response to metformin: a GoDARTS study. *Diabetes* 2009; 58: 1434-9.
20. Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, *et al.* Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5902-7.
21. Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, *et al.* Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 591-5.

Recibido: 11 de marzo de 2013

Aceptado: 17 de febrero de 2014



# Pharmacogenetics and personalized treatment of type 2 diabetes mellitus

Pablo Yang<sup>1</sup> · Verónica Ojeda Heredia<sup>2</sup> · Dante M. Beltramo<sup>1,3</sup> · Néstor W. Soria<sup>1</sup>

Received: 18 January 2016 / Accepted: 5 August 2016  
© Research Society for Study of Diabetes in India 2016

**Abstract** Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is one of the most prevalent diseases in the world. An important difference in effectiveness and toxicity of hypoglycemic agents has been associated with the presence of genetic variants in people with T2DM. We conducted a literature review up November 2015 by combining keywords type 2 diabetes mellitus, hypoglycemic agents and pharmacogenetics (PKG). Metformin, sulfonylureas, and meglitinide drugs are widely used for the T2DM treatment, although new drugs in combination with metformin are administered. Genetic variants in proteins that function as carriers, channels, or metabolizing enzymes affect both the pharmacokinetics and pharmacodynamics of these agents. Significant progress in T2DM's pharmacogenetics has been made; however, more studies involving a larger number of patients from different ethnic groups must be done. Furthermore, patients with T2DM generally are complex patients receiving hypolipidemic and hypotensive medications. Drug-drug interaction studies between these drugs must be done to really know the contribution of each polymorphism in drug effectiveness and/or toxicity.

**Keywords** Hypoglycemic agents · Polymorphisms · Effectiveness · Toxicity

## Introduction

Currently, there are eight categories of hypoglycemic agents for T2DM treatment: (1) sulfonylureas (SU), (2) meglitinides, (3) biguanides, (4) thiazolidinediones (TZDs), (5) alpha-glucosidase (AG) inhibitors, (6) dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibitors, (7) glucagon-like peptide-1 (GLP1) analogs, and (8) sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) inhibitors.

Despite the variety of drugs available for the T2DM treatment, many patients do not achieve clinical goals or manifest adverse effects due to the presence of another illness, lack of treatment adherence, drug-drug interaction, or by the presence of genetic variants. Genetic polymorphisms of metabolizing enzymes, transporters, receptors, and other therapeutic targets can affect the absorption, distribution, metabolism, and elimination of drugs that can lead to interindividual differences in drug efficacy and/or toxicity.

## Methods

A PubMed systematic search of items that involved the words “polymorphism,” “type 2 diabetes mellitus,” “effectiveness,” “toxicity,” “pharmacogenetics,” and “pharmacogenomics” until November 2015 was done. We select those polymorphisms that were associated with toxicity or decreased response to hypoglycemic agents in patients with T2DM. In addition, the polymorphism selected should contribute to one of these two features, and the observed effect should be repeated by other studies (except for those drugs which only

✉ Néstor W. Soria  
nestorwsoria@gmail.com

<sup>1</sup> Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Unidad Asociada al CONICET, Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas Obispo Trejo 323, CP:5000 Córdoba, Córdoba, Argentina  
<sup>2</sup> Servicio de Diabetología, Hospital Nacional de Clínicas, Santa Rosa 1568, CP:5000 Córdoba, Córdoba, Argentina  
<sup>3</sup> Centro de Excelencia en Productos y Procesos (CEPROCOR) Pabellón CEPROCOR, Santa María de Punilla, CP: 5164 Córdoba, Argentina

one polymorphism has been reported to cause toxicity or ineffectiveness).

## Overview of hypoglycemic drugs

### Sulfonylureas (SU)

Between the secretagogues, the SUs stimulate insulin secretion by pancreatic beta cells.

SUs bind to their receptors, which leads to cell depolarization and insulin release. The main mechanism of action is closure ATP-sensitive K channels present in beta cells, and therefore, insulin release [1]. ATP-sensitive K channels from beta cell form a complex of two proteins: one pore-forming subunit (Kir6.2) encoded by KCNJ11 gene and a drug binding subunit (SUR1) encoded by ABCC8 gene. Therefore, investigation of variants in ABCC8 and KCNJ11 genes that affect drug response should be studied.

The E23K polymorphism (rs5219) in KCNJ11 gene is associated with T2DM development, as well as an increased risk of SU therapeutic failure [2]. A study has found that carriers of K variant have a better therapeutic response to gliclazide [3]. Holstein et al. suggest that patients with T2DM carrying the K variant have reduced SU's therapy response [4].

Another variant, S1369A, produced by a single nucleotide polymorphism (SNP) in ABCC8 gene (rs757110) influenced the hypoglycemic efficacy of SU in Chinese patients, where A carriers were more sensitive to gliclazide [5].

Genetic variants involved in the SU's pharmacodynamics are important in the effectiveness, mainly the gene transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) encoding a transcription factor (TCF-4), is involved in the cellular differentiation and

proliferation [6]. The TCF7L2 gene is related to the risk of developing T2DM [7]. Interestingly, Javorski et al. analyzed patients with the rs7903146 polymorphism, which showed a greater gliclazide effect in those carriers with the CC genotype compared with those belonging to the group of CT + TT genotypes [8].

One study suggested that the magnitude of the fasting plasma glucose (FPG), decreased after 6 months of SU's plus metformin treatment in patients with T2DM, was associated with the rs163184 variant (T/G) presence in the potassium channel voltage-gated KQT-like subfamily Q member 1 (KCNQ1) gene [9]. The SU's FPG response was significantly lower in carriers of the risk GG genotype.

Furthermore, the R variant for rs1801278 in the IRS-1 gene encoding the insulin receptor substrate-1 (a component of the insulin signaling cascade) was associated with an increased risk of SU's failure due to uncontrolled hyperglycemia despite combined sulfonylurea and metformin treatment [10].

Furthermore, the SUs are metabolized primarily by cytochrome P450 enzyme complex (CYP450), the CYP2C9 isoform. There are two main allelic variants, CYP2C9\*2 (R144C) (rs1799853) and CYP2C9\*3 (I359L) (rs105791), which are associated with elevated SUs serum levels. Lower dose of tolbutamide was necessary to regulate the levels of serum glucose for those carriers with the CYP2C9\*3 variant compared to patients with wild CYP2C9 genotype (CYP2C9\*1). Moreover, a study by Kirchheiner et al. showed that the CYP2C9\*3 variant was associated with a decreased glyburide clearance [11]. Different studies in several populations (Korean, Finnish, American, Japanese, and Chinese) demonstrated that patients with the CYP2C9\*3 allele had higher SU's area under the curve (AUC) than those with CYP2C9\*1 allele [12–17]. Polymorphisms associated with SU response are summarized in Table 1.

**Table 1** Pharmacogenetic of SU drugs

Reference	Gene	rs number	Drug	Effect
Sesti [2] Javorsky [3] Holstein [4]	KCNJ11	5219	Glibenclamide Gliclazide Glimepiride or glibenclamide	K allele is associated to secondary SU failure. K allele showed better therapeutic response. K allele showed worse therapeutic response.
Zhang [5]	ABCC8	757110	Gliclazide	A carriers were more sensitive to Gliclazide, had more diminution of HbA1c levels.
Javorsky [8]	TCF7L2	7903146	Gliclazide, glimepiride, glibenclamide, glipizide	C allele showed better Gliclazide therapeutic effect
Scroner [9]	KCNQ1	163184	Gliclazide, glimepiride, glibenclamide, glipizide	GG genotype carriers showed significantly lower SU FPG response.
Sesti [10]	IRS-1	1801278	Glibenclamide	R allele is associated with increased risk of secondary failure.
Kirchheiner [11] Becker [12]	CYP2C9	1057910	Tolbutamide Glyburide	*3 is associated with reduced Glyburide clearance. *3 carriers needed a lower dose of Tolbutamide in order to regulate glucose levels.
Shon [13] Niemi [14] Suzuki [15] Tan [16] Lee [17]			Chlorpropamide Glyburide, Glimepiride Glimepiride Glipizide Tolbutamide	*3 allele showed higher SU AUC than *1 allele. *3 allele showed higher SU AUC than *1 allele. *3 allele showed higher SU AUC than *1 allele. *3 allele showed higher SU AUC than *1 allele. *3 allele showed higher SU AUC than *1 allele.

## Meglitinides

The mechanism of action of meglitinides is by stimulating the pancreas and subsequent insulin release. Blockage of potassium channels leads to beta cell depolarization and this results in insulin release [18]. Repaglinide and nateglinide are fast prandial insulin releasers [19]. Lower risk of hypoglycemia makes these agents an attractive option for some elderly patients, in particular when other agents may be contraindicated [20].

Nateglinide is eliminated via hepatic transformation and subsequent renal tubular secretion. According to *in vitro* studies, approximately 70 % of the intrinsic nateglinide's clearance may be mediated by CYP2C9. Kirchheiner et al. showed that carriers of the CYP2C9\*3 variant significantly reduced oral nateglinide clearance.

Studies in a Chinese population with healthy individuals showed that the CYP2C9\*3 and the rs4149056 (T/C) polymorphisms in solute carrier organic anion transporter family member 1B1 (SLCO1B1) may affect the nateglinide pharmacokinetics, with higher AUC in subjects with these variants [21]. Other studies showed that the C allele carriers had increased AUC compared to T allele carriers when patients were treated with repaglinide [22, 23].

For its part, the repaglinide is metabolized by CYP2C8, and according to clinical studies, the carriers of CYP2C8\*3 (rs11572080 + rs10509681) have higher clearance than those with wild genotype (CYP2C8\*1) [22].

The presence of the variant \*18 (rs28371759) in the CYP3A4 influences some repaglinide pharmacokinetic parameters such as lower mean elimination rate constant and higher half-life than those with normal CYP3A4\*1 [24].

Another transporter involved in the therapeutic efficacy of repaglinide is the solute carrier family 30 (zinc transporter) member 8 (SLC30A8). The T allele of rs13266634 and the A allele of rs16889462 for these gene variants are associated with better repaglinide's response [25].

Repaglinide levels may be influenced by the presence of gene variants in the multidrug resistance (MDR1). Three SNPs were evaluated in a Chinese population, and a unique variant, rs2032582 (G/T/A), was associated with variations in the pharmacokinetics of repaglinide, suggesting that the GT and TT carriers could be exposed to high repaglinide levels [26].

In relation to KCNJ11 gene, the E23K mutation is associated with a greater decrease of HbA1c levels in K carriers [27].

Also, Yu et al. [28] demonstrated that variations in the KCNQ1 gene in Chinese patients with DM2, and homozygous TT for the rs2237892 polymorphism, had lower glucose levels after repaglinide treatment, while those with the risk C allele for the variant rs2237895 was associated with a greater increase in both fasting insulin and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) levels. In turn, patients

with T2DM and the TT genotype for the rs290487 (in the gene TCF7L2), the treatment was more effective with respect to fasting insulin, triglycerides, and low-density lipoprotein cholesterol levels compared with those with CC or CT genotypes [27].

Finally, polymorphisms in insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (IGF2BP2) gene, such as rs1470579 and rs4402960 were associated with the development of T2DM with repaglinide's therapeutic efficacy on T2DM [29]. The effects of repaglinide's treatment at the FPG and PPG levels were reduced in patients with DC + AC genotypes compared with AA carriers for the rs1470579. However, patients with GT + TT genotypes showed a greater effect of repaglinide treatment in postprandial serum insulin levels (PINS) compared to subjects with the GG genotype for the rs4402960. Polymorphisms associated with Meglitinides response are summarized in Table 2.

## Biguanides

Metformin reduces hyperglycemia mainly by suppressing the production of glucose by hepatic gluconeogenesis [30]. The exact mechanism of action of metformin is not known.

This drug causes few side effects when prescribed correctly and has been associated with lower risk of hypoglycemia [31]. Lactic acidosis can be a serious problem in the case of overdose and in persons with contraindications, but usually, there are no significant risks [32].

Unlike most drugs, metformin does not undergo hepatic transformation and is not metabolized [33]. However, it is transported to and from the cells and organs [34].

Several pharmacogenetic studies have reported the importance of gene coding for transporters such as organic cation transporter 1 (OCT1) (SLC22A1 gene), organic cation transporter 2 (OCT2) (SLC22A2 gene), organic cation transporter 3 (OCT3) (SLC22A3 gene), multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) protein (SLC47A1 gene), and multidrug and toxin extrusion2 (MATE2) protein (SLC47A2 gene). Some polymorphisms in the SLC22A1 gene were associated with metformin's side effects (rs628031, rs36056065) [35], with variations in pharmacokinetic parameters of metformin (greater AUC and higher maximum plasma concentration ( $C_{max}$ )) (rs12208357, rs34130495, rs72552763, rs34059508) [36] and clinical efficacy of metformin (rs628031, rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495, rs34059508, rs461473) [37, 38].

One of metformin transporters, the OCT2 protein is expressed specifically in the kidney and plays a critical role in renal secretion. The rs201919874 (C/T), rs145450955 (C/T), and rs316019 (G/T) variations exhibited decreased biological function leading to increased plasma concentrations of metformin [39].

The protein encoded by the SLC47A1 gene is responsible for metformin excretion in bile and urine, respectively. The

**Table 2** Pharmacogenetic of meglitinides drugs

Reference	Gene	rs number	Drug	Effect
Kirchheiner [20] Cheng [21]	CYP2C9	1057910	Nateglinide	*3 variant showed significantly reduced oral nateglinide clearance. *3 allele showed higher nateglinide AUC than *1 allele.
Cheng [21] Niemi [22] Kalliokoski [23]	SLCO1B1	4149056	Nateglinide Repaglinide Repaglinide	C allele showed higher nateglinide AUC than T allele. C allele exhibited higher repaglinide AUC than T allele. C allele exhibited higher repaglinide AUC than T allele.
Niemi [22]	CYP2C8	11572080+10509681	Repaglinide	*3 allele showed lower repaglinide AUC than *1 allele.
Ruzilawati [24]	CYP3A4	28371759	Repaglinide	*18 displayed higher repaglinide half-life than those with *1 allele.
Huang [25]	SLC30A8	13266634  16889462	Repaglinide	T allele showed better repaglinide response on FINS and PINS than C allele. A allele showed enhanced repaglinide efficacy in FPG, PPG, and HbA1c than G allele.
Xiang [26]	ABCB1	2032582	Repaglinide	GT and TT genotypes had higher repaglinide AUC than GG and GA genotypes.
Yu [27]	KCNJ11	5219	Repaglinide	Patients with GA or AA genotype showed higher levels of FPG, PPG, and HbA1c compared with patients with GG genotype.
Yu [27]	TCF7L2	290487	Repaglinide	Patients with TT genotype showed enhanced repaglinide efficacy in FINS than CC or CT genotypes.
Yu [28]	KCNQ1	2237892	Repaglinide	TT homozygotes showed lower glucose levels following repaglinide treatment.
Huang [29]	IGF2BP2	1470579  4402960	Repaglinide	Patients with AC+CC genotypes showed reduced repaglinide efficacy in FPG and PPG compared with AA genotype. Patients with GT+TT genotypes exhibited enhanced repaglinide effect on PINS compared with GG genotype.

rs2289669 (G/A) was significantly associated with metformin response. For each minor A allele of rs2289669, HbA1c reduction was 0.30 % higher than in those with the G allele [40]. The variant rs2252281 (T/C) in the promoter of SLC47A1 gene is associated with a greater response to metformin in patients with T2DM measured as a relative change in HbA1c mean levels [41]. However, the rs12943590 (G/A) polymorphism in the SLC47A2 gene is associated with reduced metformin [41]. In another study, patients with diabetes who were AA homozygous showed a poorer response to metformin measured as a relative change in HbA1c compared with those with the G reference allele [42].

The ataxia telangiectasia mutated (ATM) locus includes chromosome 11 open reading frame 65 (C11orf65) gene associated with glycemic response to metformin, particularly the C allele for the rs11212617. This variant showed a greater decrease in HbA1c levels than those with the A allele [43]. Polymorphisms associated with Biguanides response are summarized in Table 3.

### Thiazolidinediones (TZD)

TZDs are a class of oral hypoglycemic drugs that improve glycemic control in patients with T2DM by improving insulin sensitivity. TZDs exert their hypoglycemic effects through a mechanism that involves activation of gamma isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ), a nuclear receptor. Activation by TZDs-induced PPAR $\gamma$  alters the

transcription of several genes involved in energy balance, metabolism of glucose and lipids, including those encoding lipoprotein lipase, a fatty acid transport protein, binding protein adipocyte fatty acids, fatty acyl-CoA synthase, malate dehydrogenase, glucokinase, and glucose transporter GLUT4 [44].

The TZDs safety (pioglitazone and rosiglitazone) are related to liver and cardiovascular problems, fluid retention, weight gain, and bone fractures. However, pioglitazone tends to be cardioprotective while rosiglitazone is cardiotoxic [45].

The PPAR $\gamma$ 2 has one common, not synonymous polymorphism, that is often found in the population, the P12A (rs1801282) [46]. Functional studies showed that the A allele has reduced DNA binding PPAR $\gamma$  response elements and reduced transcriptional activation in the presence of TZDs [47]. A study with obese postmenopausal women showed a greater reduction in glucose levels in subjects with the PA genotype than in those with the PP genotype [48]. Kang et al. found that patients with the PA genotype showed a better therapeutic response to rosiglitazone than those with genotype PP measured as decreased fasting plasma glucose and HbA1c levels [49].

Moreover, Hsieh et al. demonstrated that the decrease in FPG and HbA1c levels after pioglitazone treatment was significantly higher in subjects with the A allele (AP and AA) than those without the A allele (PP) [50]. According to this study, patients with the PA genotype had significantly higher serum triglyceride levels and differential PPG values compared to those with the PP genotype [51]. They also showed

**Table 3** Pharmacogenetic of metformin

Reference	Gene	rs number	Drug	Effect
Tarasova [35]	SLC22A1	628031	Metformin	A allele is associated to gastrointestinal side effects.
Tarasova [35]		36056065		8-bp insertion allele is associated to gastrointestinal side effects.
Shu [36]		12208357		C carriers showed higher metformin AUC than R carriers.
Yang [38]				C carriers showed higher HbA1c after metformin treatment than R carriers.
Shu [36]		34130495		S carriers showed higher metformin AUC than G carriers.
Yang [38]				S carriers showed higher HbA1c after metformin treatment than G carriers.
Shu [36]		72552763		Deletion carriers showed higher metformin AUC than wt carriers.
Yang [38]				Deletion carriers showed higher HbA1c after metformin treatment than M carriers.
Shu [36]		34059508		R carriers showed higher metformin AUC than G carriers.
Yang [38]				R carriers showed higher HbA1c after metformin treatment than G carriers.
Song [39]	SLC22A2	201919874	Metformin	CT carriers showed higher metformin AUC than CC carriers.
Song [39]		145450955		CT carriers showed higher metformin AUC than CC carriers.
Song [39]		316019		GT and TT carriers showed higher metformin AUC than GG carriers.
Becker [40]	SLC47A1	2289669	Metformin	A carriers showed more HbA1c reduction after metformin treatment than G carriers.
Stocker [41]		2252281		C carriers showed more HbA1c reduction after metformin treatment than T carriers.
Stocker [41]	SLC47A2	12943590	Metformin	GG and GA carriers showed higher HbA1c reduction after metformin treatment than AA carriers.
Choi [42]				GG carriers showed higher HbA1c reduction after metformin treatment than AA carriers.
Zhou [43]	C11orf65	11212617	Metformin	C carriers showed greater reduction of HbA1c than those with A allele carriers.

that the rs17584499 polymorphism (C/T) in the protein tyrosine phosphatase receptor type D (PTPRD) gene was associated with pioglitazone's therapeutic efficacy. Patients with CT and TT genotypes had significantly lower differential PPG values compared to those with the CC genotype.

A study by Makino et al. analyzed the polymorphism rs1862513 (C/G) in resistin gene in patients with T2DM and revealed that patients with the GG genotype but not with the CG correlated with a reduction in fasting plasma glucose and HOMA-IR compared to the CC genotype [52].

As mentioned above, polymorphisms in drug transporters have been studied and in this case, we want to show their relationship with the TZDs effectiveness. The R219K variant (rs2230806) in the ABCA1 gene was studied in patients with T2DM, and rosiglitazone's treatment response was evaluated after 48 weeks. Individuals homozygous RR showed a better response to treatment with rosiglitazone in terms of improved insulin sensitivity than the carriers of K minor allele [53].

Rosiglitazone and pioglitazone are metabolized in the liver by cytochromes, mainly by CYP2C8 and with lower CYP2C9 contribution [54]. Several polymorphisms not synonymous for CYP2C8 were observed, especially \*2 and \*3, both with decreased enzyme activity [54]. Some studies investigated the contribution of CYP2C8\*3 in patients treated with rosiglitazone. The mean AUC was lower in individuals homozygous CYP2C8\*3 compared to subjects who had the wild variant [55].

Some polymorphisms in the retinol binding protein 4 (RBP4) gene and the response to rosiglitazone treatment in T2DM Chinese patients was evaluated. Patients with the GG genotype for the rs3758539 (G/A) in RBP4, showed an enhanced efficacy of rosiglitazone expressed in FPG and FINS

as compared to the GA or AA genotypes. Yet, another polymorphism in the same gene, the rs10882283 (T/G), showed that in patients with TG or GG genotypes had higher efficacy than those in the TT group measured as HbA1c levels [56].

Kang et al. studied the effects of rosiglitazone on plasma glucose and adiponectin levels relative to common polymorphisms in the adiponectin gene (ACDC). There was a lower reduction in the level of fasting plasma glucose and HbA1c in GG carriers compared with other genotypes for the rs2241766 variant. With respect to the rs1501299 variant, it had less reduction in fasting plasma glucose level for the GG genotype than for other genotypes. A haplotype analysis showed reductions in HbA1c levels, and FPG were lower for the homozygous GG haplotype than the other haplotypes [57]. Polymorphisms associated with TZD response are summarized in Table 4.

#### $\alpha$ -glucosidase (AG) inhibitors

$\alpha$ -glucosidase inhibitors, including acarbose, are competitive inhibitors of membrane-bound intestinal  $\alpha$ -glucosidases that hydrolyze oligosaccharides, trisaccharides, and disaccharides to glucose and other monosaccharides in the small intestine and thereby delay postprandial glucose absorption [58].

PPAR alpha (PPAR $\alpha$ ), a transcription factor of the nuclear receptor superfamily regulates fatty acid oxidation. Andrulionyte et al. showed a study where in the placebo group, the G allele of rs1800206 (C/G) increased the risk of diabetes and was associated with elevated levels of plasma glucose and insulin. However, in the acarbose group, subjects carrying the minor G allele for rs4253776 SNP and CC genotype for rs4253778, both in the of PPAR $\alpha$  gene, had an

**Table 4** Pharmacogenetic of thiazolidinedione drugs

Reference	Gene	rs number	Drug	Effect
Kang [49]	PPAR $\gamma$	1801282	Rosiglitazone	Patients with PA genotype showed better therapeutic response to rosiglitazone than patients with PP genotype.
Hsieh [50]			Pioglitazone	Patients with A allele showed better therapeutic response to pioglitazone than patients with P allele.
Pei [51]			Pioglitazone	Patients with A allele showed higher FPG and TG differential values after pioglitazone treatment than patients with P allele.
Pei [51]	PTPRD	17584499	Pioglitazone	Patients with CT+TT genotypes showed lower differential value of PPG compared to those with CC genotype.
Makino [52]	RETN	1862513	Pioglitazone	HbA1c reduction was correlated with GG genotype.
Wang [53]	ABCA1	2230806	Rosiglitazone	RR homozygotes showed a better response to rosiglitazone treatment than minor K allele carriers.
Stage [55]	CYP2C8	11572080+10509681	Rosiglitazone	*3 carriers showed lower rosiglitazone AUC than *1 carriers.
Zhou [56]	RBP4	3758539	Rosiglitazone	Patients with GG genotype showed better rosiglitazone efficacy in FPG and FINS compared with that in GA+AA genotype.
		10882283		Patients with TG+GG genotype showed better rosiglitazone efficacy in HbA1c level compared with that in TT genotype.
Kang [57]	ADIPOQ	2241766	Rosiglitazone	GG carriers showed a smaller reduction in FPG and HbA1c than carriers with other genotypes
		1501299		GG genotype showed lower reduction in FPG than in other genotypes

increased risk of diabetes [59]. In another study, subjects with PP genotype for rs1801282 in PPAR $\gamma$ 2 gene and S allele for rs18192678 in PPAR- $\gamma$  coactivator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) gene were associated with the conversion from impaired glucose tolerance to T2DM in the STOP-NIDDM trial [60].

#### Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibitors

The DPP-4 or gliptins are a class of oral hypoglycemic agents blocking the DPP4 enzyme.

While glucagon raises blood glucose levels, DPP4 inhibitors reduce glucagon and glycemia levels. The DPP4-inhibitor action is increasing the incretins levels (“GLP-1” and gastric inhibitory polypeptide “GIP”) [61], which inhibit the release of glucagon, which in turn increases insulin secretion, also decreasing gastric emptying and glycemia levels.

Adverse effects, including nasopharyngitis, headache, nausea, heart failure, hypersensitivity, and skin reactions have been observed in clinical studies [62].

Zimdahl et al. showed an association between the rs7903146 polymorphism in the TCF7L2 gene and the degree of response after linagliptin treatment. Patients with the CC genotype showed a greater reduction in HbA1c than those with the TT genotype [63].

The non-synonymous polymorphism rs147614497 (R623Q) is present in the DPP4 gene. In vitro studies showed that the R623Q led to decrease vildagliptin hydrolysis [64].

Other variants could be studied such as those in the CYP3A4/A5 genes because saxagliptin is metabolized largely by both cytochromes [62].

#### Glucagon-like peptide-1 (GLP1) analogs

GLP-1 is a natural peptide hormone, secreted from the intestine after a meal. GLP-1 stimulates insulin release (the incretin effect), suppresses glucagon release (which reduces hepatic gluconeogenesis), slows gastric emptying, and promotes satiety. The rs367543060 (T149M) in the GLP1 receptor (GLP-1R) has contributed to altering the response of GLP-1 in vitro [65].

Natural GLP1 has a short half-life, of only a few minutes, as a result of degradation by endopeptidases such as DPP4. GLP1 analogs, also known as incretin mimetic (exenatide and liraglutide), are a modified GLP1 and are resistant to degradation by DPP4 [66]. GLP1 analogs are given in combination with other treatments in the management of T2DM and is applied once daily (liraglutide) or twice daily (exenatide) by subcutaneous injection.

One of its biggest advantages over older insulin secretagogues, like SUs or meglitinides, the risk of causing hypoglycemia is much lower.

To date, only one study has shown an association between the presence of an SNP in the cannabinoid 1 receptor (CNR1) gene and liraglutide effectiveness. Those subjects without the A allele of the rs1049353 (G/A) showed improved cholesterol levels after weight loss in Spanish T2DM patients [67].

#### SGLT2 inhibitors

Inhibitors of glucose co-transporter sodium 2 (SGLT2) is a new drug class indicated only for the treatment of T2DM.

SGLT2 is a human protein that facilitates the reabsorption of glucose at the kidney. SGLT2 inhibitors block the reabsorption of glucose at the kidney, increase the excretion of glucose, and improve glycemic control and weight loss [68].

The advantages of this class of agents include modest weight loss, lower risk of hypoglycemia, and decreased blood pressure. However, use of these drugs are limited due to the high frequency of genital fungal infections, and less common side effects are hypotension, dizziness, and worsening renal function [69].

Over 50 different mutations in the SLC5A2 gene encoding SGLT2 protein were found, and these mutations could lead to renal glycosuria [70]. Enigk et al. suggest the realization of pharmacogenomic studies to determine if the efficacy of treatment with SGLT2 inhibitors could be affected by the presence of polymorphisms in the SLC5A2 gene [71]. For the moment, no studies have been published of patients with DM2 about genetic variants and response to SGLT2 inhibitors. Meanwhile, dapagliflozin, an SGLT2 inhibitor, is mainly metabolized through uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1-9 (UGT1A9) to give its major inactive metabolite, dapagliflozin 3-O-glucuronide; therefore, mutations in this gene could affect the efficacy of treatment [72]. Polymorphisms associated with  $\alpha$ -glucosidase Inhibitors, Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors, Glucagon-like peptide-1 analogues and SGLT2 inhibitors responses are summarized in Table 5.

## Discussion

In patients with DM2, fulfilling the objectives of glycemia and HbA1c requires striking a balance between age, comorbidities, and risk of hypoglycemia. The American Association of Clinical Endocrinologists suggests achieving values lower than 6.5 % of HbA1c for most patients, which significantly reduces the risk of developing nephropathy [73]. It has also been found that maintaining lower HbA1c levels reduces the risk of developing cardiovascular disease. According to this, glycemic control must be individualized. In newly diagnosed patients with type 2 diabetes and without cardiovascular disease, HbA1c levels between 6.0 and 6.5 % must be desirable, which ensures minimal risk of hypoglycemia or other adverse consequences. A broader range of HbA1c levels can be handled in elderly patients or those at risk of hypoglycemia. Tolerance may be higher (7–8 % HbA1c) for patients with a history of severe hypoglycemia, kidney disease, or macrovascular complications. Therefore, the choice of drug therapy should consider the therapeutic goal to be achieved, in addition to age and other factors such as risks of adverse effects of each treatment.

In the Glycemic Control Algorithm proposed by the American Association of Clinical Endocrinologists [73], a hierarchy of hypoglycemic agents is suggested. Following this algorithm, we propose the analysis of polymorphisms associated with lack of drug efficacy and/or toxicity of agents

**Table 5** Pharmacogenetic of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, dipeptidyl peptidase-4 inhibitors, glucagon-like peptide-1 analogs, and SGLT2 inhibitors

Reference	Gene	rs number	Drug	Effect
$\alpha$ -glucosidase inhibitors				
Andrulionyte [59]	PPAR $\alpha$	4253776 4253778	Acarbose	G carriers showed an increased risk of diabetes. Patients with the CC genotype showed an increased risk of diabetes.
Andrulionyte [60]	PPAR $\gamma$	1801282	Acarbose	PP genotype for rs1801282 and S allele for rs8192678 were associated with the conversion from impaired glucose tolerance to T2DM.
Andrulionyte [60]	PPAR $\gamma$ C1A	8192678	Acarbose	PP genotype for rs1801282 and S allele for rs8192678 were associated with the conversion from impaired glucose tolerance to T2DM.
Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors				
Filippatos [62]	CYP3A4	Undescribed yet	Saxagliptin	Unknown
Filippatos [62]	CYP3A5	Undescribed yet	Saxagliptin	Unknown
Asakura [64]	DPP4	147614497	Vildagliptin	R623Q mutation resulted in a decrease in vildagliptin-hydrolyzing activity.
Zimdahl [63]	TCF7L2	7903146	Linagliptin	Patients with TT genotype showed reduced HbA1c response compared with CC patients after linagliptin treatment.
Glucagon-like peptide-1 analogs				
De Luis [67]	CNR1	1049353	Liraglutide	A carriers showed an improvement in insulin resistance secondary to weight loss after liraglutide treatment.
SGLT2 inhibitors				
Enigk [71]	SLC5A2	9934336	None	G-allele was associated with increased 30-min plasma glucose, 120-min insulin concentrations and AUC <sub>120min</sub> (glucose) during oral glucose tolerance.
Kasichayanula [72]	UGT1A9	Someone	Dapagliflozin	Unknown

delivered to a patient; hence, when these variants are detected, we should, ideally, try to change to another drug for which the patient does not present the unfavorable variant. We claim now that it is not inconsistent with what has mentioned above; we believe that it is necessary to make many previous studies to determine, more precisely, which of the polymorphisms proposed today will have clinical use tomorrow. According to the American Association of Clinical Endocrinologists, the drug hierarchy is as follows: (1) metformin, (2) GLP1 agonists, (3) SGLT2 inhibitors, (4) DPP4 inhibitors, (5) TZD, (6) alpha-glucosidase inhibitors, and (7) SU/meglitinides. Therefore, genes and polymorphisms that could be studied are classified according to the previous hierarchy: (1) SLC22A1, SLC22A2, SLC47A1, SLC47A2, etc. (Table 3); (2) CNR1 (Table 5); (3) SLC5A2, UGT1A) (Table 5); (4) CYP3A4, CYP3A5, DPP4, TCF7L2 (Table 5); (5) PPAR $\gamma$ , PTPRD, RETN, ABCA1, CYP2C8, etc. (Table 4); (6) PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ C1A (Table 5); and (7) KCNJ11, ABCC8, TCF7L2, KCNQ1, CYP2C9 for SU (Table 1) and CYP2C9, SLC01B1, CYP2C8, CYP3A4, SLC30A8, etc. (Table 2).

This kind of suggestion would apply to monotherapy treatment (patients with <7.5 % HbA1c at baseline) and also to those requiring double or triple therapy (patients with >7.5 % HbA1c at baseline). One possible application described throughout this review involves the use of information gathered from genetic variants in the SLC22A1 gene, which codifies a carrier entering the blood circulating metformin to the hepatocyte. In our research, we studied a group of patients with type 2 diabetes who were receiving 2500 mg/day of metformin (maximum recommended dose) and analyzed them to detect the presence of five polymorphisms in the SLC22A1 gene (rs12208357, rs2282143, rs35191146, rs34130495, and rs34059508; all these variants lead to reduced transporter activity). After 3 months of metformin treatment with 2500 mg/day, most patients receiving this dose did not achieve the target HbA1c levels. When comparing this therapeutic failure with the variants in the SLC22A1 gene, we discovered that most of them had more than one polymorphism in the SLC22A1 gene, which could significantly affect the drug income into the hepatocyte, significantly decreasing its therapeutic action. For this group of patients, we proposed to use another hypoglycemic drug (SU, meglitinides, TZDs, AG inhibitors, DPP4 inhibitors, GLP-1 analogs, and SGLT2 inhibitors), seeking the most effective treatment, measured as HbA1c level. To attain this, there are two options, (A) polymorphism analysis, associated with the new drug (effectiveness/toxicity) or (B) directly test the new drug and wait 3 months and see whether HbA1c values have reached the therapeutic target. The use of the first or the second option will depend on several factors. Currently, there are no data from clinical studies in which a large number of patients from different ethnicities were analyzed to determine what

polymorphisms must be necessarily analyzed. This could be an expensive study, and today, we are not sure whether the analysis could be useful. This claim does not overlook the need to conduct this kind of studies. The second option seems to be more viable and less expensive, and it is what indeed happens. The analysis involves treatment with one hypoglycemic drug; yet, we believe it can be extrapolated when therapeutic goals have not been fulfilled and the recommending of the beginning of a combination therapy of two or three drugs.

Such recommendations are not new and have been proposed for other diseases and drug treatment associated with them. Today, FDA and EMEA show a list of drug/gene variants that can/should be analyzed prior to the use of a particular drug. Examples include (drug-polymorphism) abacavir-HLA-B\*5701, capecitabine-DPYD\*2A, irinotecan-UGT1A1\*28, cetuximab-KRAS exon 12 and 13, and clopidogrel-CYP2C19\*2 and \*3. Therefore, the analysis of polymorphisms in genes that may affect the effectiveness/toxicity of a given hypoglycemic drug could be useful in the pharmacological treatment of patients with DM2 while taking into account the importance of other non-genetic factors including treatment adherence, physical activity, and appropriate diet.

## Conclusion

As mentioned above, it is clear that there are numerous variations in patient's DNA that could contribute to variability in both drug's effectiveness and toxicity.

Different polymorphisms analyzed may affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of different hypoglycemic drugs; in fact, variants in genes encoding channels (KCNJ11, ABCC8, ABCB1, ABCA1, etc), transporters (SLCO1B1, SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC5A2, etc), receptors (PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , etc), and metabolizing enzymes (CYP2C9, CYP2C8, CYP3A5, CYP3A4, UGT1A9, etc) have been shown.

Then, it will be necessary to conduct studies with a larger number of patients and with different ethnic background to validate the results published. In fact, there are new hypoglycemic drug categories and new drugs, and there is currently no association with known polymorphisms to influence their effectiveness or toxicity, probably because no association studies were done.

Advances in pharmacogenetics of T2DM are significant although a clinical application of these depends primarily on the increase in the number of studies to validate the results obtained in different populations. Unfortunately, for many of the polymorphisms analyzed, only few studies have been published or were conducted with a small number of patients, making it difficult to extrapolate these results to a larger population or to be clinically used.



**Acknowledgments** PY was supported by the Training Program from UCC-CONICET. This work was supported by UCC grant.

### Compliance with ethical standards

**Ethical responsibilities of authors** The manuscript has not been submitted to any other journals, has not been published previously, and has not been fabricated or manipulated.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Informed consent** The informed consent of each patient was collected in each of the cited articles.

### References

- Panten U, Schwanstecher M, Schwanstecher C. Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1996;104:1–9. doi:10.1055/s-0029-1211414.
- Sesti G, Laratta E, Cardellini M, Andreozzi F, Del Guerra S, Irace C, et al. The E23K variant of KCNJ11 encoding the pancreatic beta-cell adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel subunit Kir6.2 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:2334–9. doi:10.1210/jc.2005-2323.
- Javorsky M, Klimcakova L, Schroner Z, Zidzik J, Babjakova E, Fabianova M, et al. KCNJ11 gene E23K variant and therapeutic response to sulfonylureas. *Eur J Intern Med*. 2012;23:245–9. doi:10.1016/j.ejim.2011.10.018.
- Holstein A, Hahn M, Stumvoll M, Kovacs P. The E23K variant of KCNJ11 and the risk for severe sulfonylurea-induced hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *Horm Metab Res*. 2009;41:387–90. doi:10.1055/s-0029-1192019.
- Zhang H, Liu X, Kuang H, Yi R, Xing H. Association of sulfonylurea receptor 1 genotype with therapeutic response to gliclazide in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77:58–61. doi:10.1016/j.diabres.2006.10.021.
- Xu H, Murray M, McLachlan AJ. Influence of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of sulfonylurea drugs. *Curr Drug Metab*. 2009;10:643–58.
- Wang J, Hu F, Feng T, Zhao J, Yin L, Li L, et al. Meta-analysis of associations between TCF7L2 polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in the Chinese population. *BMC Med Genet*. 2013;14:8. doi:10.1186/1471-2350-14-8.
- Javorský M, Schroner Z. Association between TCF7L2 genotype and glycemic control in diabetic patients treated with gliclazide. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:1–5. doi:10.1155/2013/374858.
- Schroner Z, Dobrikova M, Klimcakova L, Javorsky M, Zidzik J, Kozarova M, et al. Variation in KCNQ1 is associated with therapeutic response to sulphonylureas. *Med Sci Monit*. 2011;17:CR392–6.
- Sesti G, Marini MA, Cardellini M, Sciacqua A, Frontoni S, Andreozzi F, et al. The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:1394–8.
- Kirchheiner J, Brockmöller J, Meineke I, Bauer S, Rohde W, Meisel C, et al. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;71:286–96. doi:10.1067/mcp.2002.122476.
- Becker M, Visser L, Trienekens P, Hofman A, van Schaik R, Bhc S. Cytochrome P450 2C9 \*2 and \*3 polymorphisms and the dose and effect of sulfonylurea in type II diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83:288–92. doi:10.1038/sj.clpt.6100273.
- Shon J, Yoon Y, Kim M-J, Kim K, Lim Y, Liu K, et al. Chlorpropamide 2-hydroxylation is catalysed by CYP2C9 and CYP2C19 in vitro: chlorpropamide disposition is influenced by CYP2C9, but not by CYP2C19 genetic polymorphism. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;59:552–63. doi:10.1111/j.1365-2125.2005.02364.x.
- Niemi M, Cascorbi I, Timm R, Kroemer HK, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different CYP2C9 genotypes. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72:326–32. doi:10.1067/mcp.2002.127495.
- Suzuki K, Yanagawa T, Shibasaki T, Kaniwa N, Hasegawa R, Tohkin M. Effect of CYP2C9 genetic polymorphisms on the efficacy and pharmacokinetics of glimepiride in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006;72:148–54. doi:10.1016/j.diabres.2005.09.019.
- Tan B, Zhang Y, Chen X, Zhao X-H, Li G-X, Zhong D-F. The effects of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glipizide in Chinese subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66:145–51. doi:10.1007/s00228-009-0736-2.
- Lee CR, Pieper JA, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Evaluation of cytochrome P4502C9 metabolic activity with tolbutamide in CYP2C91 heterozygotes. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72:562–71. doi:10.1067/mcp.2002.127913.
- Malaisse WJ. Mechanism of action of a new class of insulin secretagogues. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107(Suppl :S140–3). doi:10.1055/s-0029-1212170.
- Dornhorst A. Insulintropic meglitinide analogues. *Lancet*. 2001;358:1709–16. doi:10.1016/S0140-6736(01)06715-0.
- Kirchheiner J, Meineke I, Müller G, Bauer S, Rohde W, Meisel C, et al. Influence of CYP2C9 and CYP2D6 polymorphisms on the pharmacokinetics of nateglinide in genotyped healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43:267–78. doi:10.2165/00003088-200443040-00005.
- Cheng Y, Wang G, Zhang W, Fan L, Chen Y, Zhou H-H. Effect of CYP2C9 and SLCO1B1 polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of nateglinide in healthy Chinese male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;69:407–13. doi:10.1007/s00228-012-1364-9.
- Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Leathart JB, Neuvonen M, Daly AK, et al. Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77:468–78. doi:10.1016/j.clpt.2005.01.018.
- Kalliokoski A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide and nateglinide. *J Clin Pharmacol*. 2008;48:311–21. doi:10.1177/0091270007311569.
- Ruzilawati AB, Gan SH. CYP3A4 genetic polymorphism influences repaglinide's pharmacokinetics. *Pharmacology*. 2010;85:357–64. doi:10.1159/000302731.
- Huang Q, Yin J-Y, Dai X-P, Wu J, Chen X, Deng C-S, et al. Association analysis of SLC30A8 rs13266634 and rs16889462 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus and repaglinide response in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66:1207–15. doi:10.1007/s00228-010-0882-6.
- Xiang Q, Cui YM, Zhao X, Yan L, Zhou Y. The influence of MDR1 G2677T/a genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of repaglinide in healthy Chinese volunteers. *Pharmacology*. 2012;89:105–10. doi:10.1159/000336345.

27. Yu M, Xu X-J, Yin J-Y, Wu J, Chen X, Gong Z-C, et al. KCNJ11 Lys23Glu and TCF7L2 rs290487(C/T) polymorphisms affect therapeutic efficacy of repaglinide in Chinese patients with type 2 diabetes. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87:330–5. doi:10.1038/clpt.2009.242.
28. Yu W, Hu C, Zhang R, Wang C, Qin W, Lu J, et al. Effects of KCNQ1 polymorphisms on the therapeutic efficacy of oral antidiabetic drugs in Chinese patients with type 2 diabetes. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89:437–42. doi:10.1038/clpt.2010.351.
29. Huang Q, Yin J, Dai X, Pei Q, Dong M, Zhou Z, et al. IGF2BP2 variations influence repaglinide response and risk of type 2 diabetes in Chinese population. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31:709–17. doi:10.1038/aps.2010.47.
30. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med.* 2002;137:25–33.
31. Strack T. Metformin: a review. *Drugs Today (Barc).* 2008;44:303–14.
32. Lipska KJ, Bailey CJ, Inzucchi SE. Use of metformin in the setting of mild-to-moderate renal insufficiency. *Diabetes Care.* 2011;34:1431–7. doi:10.2337/dc10-2361.
33. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22:820–7. doi:10.1097/FPC.0b013e3283559b22.
34. Wang L, Weinshilboum R. Metformin pharmacogenomics: biomarkers to mechanisms. *Diabetes.* 2014;63:2609–10. doi:10.2337/db14-0609.
35. Tarasova L, Kalnina I, Geldner K, Bumbure A, Ritenberga R, Nikitina-Zake L, 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;22:659–66. doi:10.1097/FPC.0b013e3283561666.
36. Shu Y, Brown C, Castro RA, Shi RJ, Lin ET, Owen RP, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:273–80. doi:10.1038/sj.clpt.6100275.
37. Christensen MMH, Brasch-Andersen C, Green H, Nielsen F, Damkier P, Beck-Nielsen H, et al. The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21:837–50. doi:10.1097/FPC.0b013e32834c0010.
38. Yang P, Nicolás JC, Galván CA, Vélez P, Da Ronco L, Díaz GT, et al. Effectiveness of metformin in patients with type II diabetes related to variants in the SLC22A1 gene | Eficácia de Metformina em doentes com diabetes tipo II, relacionado com variantes do gene SLC22A1. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2014;48:229–35.
39. Song IS, Shin HJ, Shim EJ, Jung IS, Kim WY, Shon JH, et al. Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;84:559–62. doi:10.1038/clpt.2008.61.
40. Becker ML, Visser LE, van Schaik RHN, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BHC. Genetic variation in the multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein influences the glucose-lowering effect of metformin in patients with diabetes: a preliminary study. *Diabetes.* 2009;58:745–9. doi:10.2337/db08-1028.
41. Stocker SL, Morrissey KM, Yee SW, Castro RA, Xu L, Dahlin A, et al. The effect of novel promoter variants in MATE1 and MATE2 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;93:186–94. doi:10.1038/clpt.2012.210.
42. Choi JH, Yee SW, Ramirez AH, Morrissey KM, Jang GH, Joski PJ, et al. A common 5'-UTR variant in MATE2-K is associated with poor response to metformin. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90:674–84. doi:10.1038/clpt.2011.165.
43. Zhou K, Bellenguez C, Spencer CCA, Bennett AJ, Coleman RL, Tavendale R, et al. Common variants near ATM are associated with glycemic response to metformin in type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2011;43:117–20. doi:10.1038/ng.735.
44. Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;18(Suppl 2):S10–5.
45. Kung J, Henry RR. Thiazolidinedione safety. *Expert Opin Drug Saf.* 2012;11:565–79. doi:10.1517/14740338.2012.691963.
46. Wang L, Teng Z, Cai S, Wang D, Zhao X, Yu K. The association between the PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala polymorphism and nephropathy susceptibility in type 2 diabetes: a meta-analysis based on 9,176 subjects. *Diagn Pathol.* 2013;8:118. doi:10.1186/1746-1596-8-118.
47. Knouff C, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev.* 2004;25:899–918. doi:10.1210/er.2003-0036.
48. Ramírez-Salazar M, Pérez-Luque E, Fajardo-Araujo M, Garza SM, Malacara JM. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR gamma 2 gene on response to pioglitazone treatment in menopausal women. *Menopause.* 2008;15:1151–6. doi:10.1097/gme.0b013e31816d5b2d.
49. Kang ES, Park SY, Kim HJ, Kim CS, Ahn CW, Cha BS, et al. Effects of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene on rosiglitazone response in type 2 diabetes. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78:202–8. doi:10.1016/j.clpt.2005.04.013.
50. Hsieh M-C, Lin K-D, Tien K-J, Tu S-T, Hsiao J-Y, Chang S-J, et al. Common polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (Pro12Ala) and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (Gly482Ser) and the response to pioglitazone in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2010;59:1139–44. doi:10.1016/j.metabol.2009.10.030.
51. Pei Q, Huang Q, Yang G, Zhao Y, Yin J, Song M, et al. PPAR- $\gamma$ 2 and PTPRD gene polymorphisms influence type 2 diabetes patients' response to pioglitazone in China. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34:255–61. doi:10.1038/aps.2012.144.
52. Makino H, Shimizu I, Murao S, Kondo S, Tabara Y, Fujiyama M, et al. A pilot study suggests that the G/G genotype of resistin single nucleotide polymorphism at -420 may be an independent predictor of a reduction in fasting plasma glucose and insulin resistance by pioglitazone in type 2 diabetes. *Endocr J.* 2009;56:1049–58.
53. Wang J, Bao Y, Hu C, Zhang R, Wang C, Lu J, et al. Effects of ABCA1 variants on rosiglitazone monotherapy in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29:252–8. doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00744.x.
54. Daily EB, Aquilante CL. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. *Pharmacogenomics.* 2009;10:1489–510. doi:10.2217/pgs.09.82.
55. Stage TB, Christensen MMH, Feddersen S, Beck-Nielsen H, Brøsen K. The role of genetic variants in CYP2C8, LPIN1, PPARGC1A and PPAR $\gamma$  on the trough steady-state plasma concentrations of rosiglitazone and on glycosylated haemoglobin A1c in type 2 diabetes. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23:219–27. doi:10.1097/FPC.0b013e32835f91fc.
56. Zhou F, Huang Q, Dai X, Yin J, Wu J, Zhou H, et al. Impact of retinol binding protein 4 polymorphism on rosiglitazone response in Chinese type 2 diabetic patients. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2011;36:949–57. doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.004.
57. Kang ES, Park SY, Kim HJ, Ahn CW, Nam M, Cha BS, et al. The influence of adiponectin gene polymorphism on the rosiglitazone response in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28:1139–44. doi:10.2337/diacare.28.5.1139.
58. van de Laar FA. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4:1189–95.

59. Andrulionyte L, Kuulasmaa T, Chiasson J-L, Laakso M. Single nucleotide polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  gene (PPARA) influence the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. *Diabetes*. 2007;56:1181–6. doi:10.2337/db06-1110.
60. Andrulionyte L, Zacharova J, Chiasson J-L, Laakso M. Common polymorphisms of the PPAR- $\gamma$ 2 (Pro12Ala) and PGC-1 $\alpha$  (Gly482Ser) genes are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes in the STOP-NIDDM trial. *Diabetologia*. 2004;47:2176–84. doi:10.1007/s00125-004-1577-2.
61. Scheen AJ. A review of gliptins for 2014. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16:43–62. doi:10.1517/14656566.2015.978289.
62. Filippatos TD, Athyros VG, Elisaf MS. The pharmacokinetic considerations and adverse effects of DPP-4 inhibitors [corrected]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10:787–812. doi:10.1517/17425255.2014.907274.
63. Zimdahl H, Itrich C, Graefe-Mody U, Boehm BO, Mark M, Woerle H-J, et al. Influence of TCF7L2 gene variants on the therapeutic response to the dipeptidylpeptidase-4 inhibitor linagliptin. *Diabetologia*. 2014;57:1869–75. doi:10.1007/s00125-014-3276-y.
64. Asakura M, Fujii H, Atsuda K, Itoh T, Fujiwara R. Dipeptidyl peptidase-4 greatly contributes to the hydrolysis of vildagliptin in human liver. *Drug Metab Dispos*. 2015;43:477–84. doi:10.1124/dmd.114.062331.
65. Beinborn M, Worrall CI, McBride EW, Kopin AS. A human glucagon-like peptide-1 receptor polymorphism results in reduced agonist responsiveness. *Regul Pept*. 2005;130:1–6. doi:10.1016/j.regpep.2005.05.001.
66. Christensen M, Knop FK. Once-weekly GLP-1 agonists: how do they differ from exenatide and liraglutide? *Curr Diab Rep*. 2010;10:124–32. doi:10.1007/s11892-010-0102-x.
67. de Luis DA, Ovalle HF, Soto GD, Izaola O, de la Fuente B, Romero E. Role of genetic variation in the cannabinoid receptor gene (CNR1) (G1359A polymorphism) on weight loss and cardiovascular risk factors after liraglutide treatment in obese patients with diabetes mellitus type 2. *J Investig Med*. 2014;62:324–7. doi:10.231/JIM.0000000000000032.
68. Jabbour SA, Goldstein BJ. Sodium glucose co-transporter 2 inhibitors: blocking renal tubular reabsorption of glucose to improve glycaemic control in patients with diabetes. *Int J Clin Pract*. 2008;62:1279–84. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01829.x.
69. Geerlings S, Fonseca V, Castro-Diaz D, List J, Parikh S. Genital and urinary tract infections in diabetes: impact of pharmacologically-induced glucosuria. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103:373–81. doi:10.1016/j.diabres.2013.12.052.
70. Yu L, Lv J-C, Zhou X, Zhu L, Hou P, Zhang H. Abnormal expression and dysfunction of novel SGLT2 mutations identified in familial renal glucosuria patients. *Hum Genet*. 2011;129:335–44. doi:10.1007/s00439-010-0927-z.
71. Enigk U, Breitfeld J, Schleinitz D, Dietrich K, Halbritter J, Fischer-Rosinsky A, et al. Role of genetic variation in the human sodium-glucose cotransporter 2 gene (SGLT2) in glucose homeostasis. *Pharmacogenomics*. 2011;12:1119–26. doi:10.2217/pgs.11.69.
72. Kasichayanula S, Liu X, Griffen SC, Lacrete FP, Boulton DW. Effects of rifampin and mefenamic acid on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of dapagliflozin. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15:280–3. doi:10.1111/dom.12024.
73. Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, Blonde L, Bloomgarden ZT, Bush MA, et al. Consensus statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm—2016 executive summary. *Endocr Pract*. 2016;22:84–113. doi:10.4158/EP151126.CS.

# The rs4712527 Polymorphism in the *CDKALI* Gene: A Protective Factor for Proliferative Diabetic Retinopathy Progress in Type 2 Diabetes

Pablo Yang, PhD<sup>1</sup>, José D. Luna, MD<sup>2</sup>, Emilio Alcoba, MD<sup>2</sup>, Aylén Sein, MD<sup>2</sup>, Ana L. Gramajo, MD<sup>2</sup>, Claudio P. Juárez, MD<sup>2</sup>, Dante M. Beltramo, PhD<sup>1,3</sup>, and Néstor W. Soria, PhD<sup>1</sup>

## Abstract

**Purpose:** Diabetic retinopathy (DR) is one of the chronic retinal disorders linked to diabetes and remains the leading cause of blindness in working-age people. Many studies have demonstrated the existence of associations between type 2 diabetes mellitus (T2DM) and variants in the cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1 (*CDKALI*) gene. Here, we performed a case-control study in the *CDKALI* gene (rs4712527 polymorphism) to investigate the potential association between this single-nucleotide polymorphism (SNP) and DR risk. **Methods:** Two hundred thirty-one patients with T2DM (126 patients with proliferative diabetic retinopathy [PDR] and 105 patients without diabetic retinopathy [WDR]), who assisted at the Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, were studied. An independent cohort of 98 patients (56 with PDR and 42 with WDR) from the Hospital Nacional de Clínicas was taken for replication. A complete ophthalmological examination included an external examination of the eye and adnexa, pupil responsiveness, and slit-lamp biomicroscopic examination. Genotyping of rs4712527 was carried out by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The odds ratio (OR) and 95% CI were calculated by unconditional logistic regression adjusted for diabetes duration, body mass index, insulin therapy, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and systolic and diastolic blood pressure. **Results:** Analysis from the rs4712527 SNP in the Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, cohort was found to be associated with decreased risk of PDR both before and after adjustment, under the codominant (adjusted OR = 0.16 [95% CI, 0.06-0.44];  $P = 4e-04$ ), dominant (adjusted OR = 0.17 [95% CI, 0.07-0.43];  $P = 1e-04$ ), overdominant (adjusted OR = 0.20 [95% CI, 0.08-0.52];  $P = 5e-04$ ), and log-additive (adjusted OR = 0.28 [95% CI, 0.13-0.59];  $P = 4e-04$ ) models. In the combined analysis including both cohorts, the rs4712527 was nominally involved as a protective factor in the development of DR. **Conclusions:** Our findings suggest that the rs4712527 in the *CDKALI* gene might be involved in the protection to develop PDR in T2DM.

## Keywords

*CDKALI* gene, polymorphism, rs4712527, diabetic retinopathy, type 2 diabetes

## Introduction

There is compelling evidence that the individual risk of developing type 2 diabetes mellitus (T2DM) is strongly influenced by genetic factors.<sup>1</sup> Recent reports on genome-wide association studies (GWASs) have effectively revealed a number of loci linked with propensity to T2DM.<sup>2</sup> The heritability for diabetic retinopathy (DR) was estimated at 18%, while for proliferative diabetic retinopathy (PDR), it would be 52%.<sup>3,4</sup>

DR is a complication of diabetes due to sustained high blood sugar levels, which causes progressive damage to the retina. It is one of the principal causes of blindness in the working-age population and affects around 5.3 million adults causing an estimated 12 000 to 24 000 new cases of blindness each year.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Unidad Asociada al CONICET: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas, Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, Córdoba, Argentina

<sup>3</sup> Centro de Excelencia en Productos y Procesos (CEPROCOR), Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina

## Corresponding Author:

Néstor W. Soria, PhD, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Unidad Asociada al CONICET: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas, Campus Universitario, Av. Armada Argentina 3555. CP: 5.016, Córdoba, Argentina.

Email: nestorwsoria@gmail.com

The number of adults with diabetes worldwide is estimated to increase by 42% in developed countries like United States and 170% in developing countries like Argentina. Visual impairment in DR is largely attributed to microvascular changes induced by ischemic retinopathy.<sup>6</sup> These ischemic changes stimulate increased microvascular permeability and neovascular proliferation in the retina leading to diabetic macular edema and PDR, 2 major retinopathy stages in diabetes that induce blindness.<sup>7</sup>

Clinically, the first changes in the diabetic retina include microaneurysms, hemorrhages, hard exudates, cotton wool spots, venous beading, and intraretinal microvascular abnormalities. The growth of new abnormal blood vessels often leading to vitreous and preretinal hemorrhage and tractional retinal detachment is the main feature of PDR.<sup>8</sup>

The frequency and severity of DR are very heterogeneous between different ethnic groups, despite presenting the same risk factors such as diabetes duration and glycemic control. In addition, there are patients with many years of disease evolution and good glycemic control with PDR and patients with poor metabolic control who never present severe DR. As mentioned above, genetic factors may explain this apparent paradox of retinal complications in diabetic patients. Evidence also suggests a genetic control on the development and progression of retinopathy in diabetic patients.<sup>3</sup> Consequently, genetic factors are one of the pillars where DR and other diabetic complications are studied.<sup>9</sup> Some works report the study of candidate genetic variants in the presence or progression of DR.<sup>10,11</sup> These reports show significant interaction between genes, environment, and behavior in the development of vascular complications in patients with T2DM, in addition to the ethnic component. However, genetic association studies have attempted to unravel the genetic risk factors for diabetic microvascular complications for DR, showing dissimilar results between different groups, having no data from the Argentine population.

Candidate genes are believed to be important in the pathogenesis of diabetes<sup>12-14</sup> or DR,<sup>15-22</sup> including the vitamin D receptor, melatonin receptor 1B, solute carrier family 30 member 8, peroxisome proliferator-activated receptors, adiponectin, fat mass and obesity associated, hypoxia-inducible factor 1-alpha, insulin-like growth factor 1, integrin alpha M, vascular endothelial growth factor B, PHD finger protein 21A, N-acetyltransferase 1, aldo-keto reductase family 1, member B1, and cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1 (*CDKAL1*) genes.

Ultimately, *CDKAL1*, whose function is not fully known, is believed to encode a methylthio transferase that catalyzes the 2-methylthio (ms2) modifications of various substrates, including the addition of ms2 to N6-threonyl-cabamoyladenine at position 37 of transfer RNA Lys (UUU).<sup>23</sup> Individuals carrying single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *CDKAL1* gene associated with T2DM could have an alteration in insulin secretion and an increased risk of T2DM<sup>24,25</sup> and diabetic complications.<sup>26</sup> In turn, some studies have considered SNPs as a protective factor for T2DM

and renal complications.<sup>27</sup> Meanwhile, Fu et al<sup>28</sup> suggested the possible role of the rs4712527 polymorphism (localized in one intron), with Peng et al<sup>29</sup> and Liu et al<sup>26</sup> showing an association between the rs7756992 and the rs10946398, respectively, with DR in a Chinese population with type 2 diabetes.<sup>29</sup>

Different GWASs have shown an association of T2DM or its complications with the *CDKAL1* gene. In addition, many SNPs in the *CDKAL1* gene have been shown to be associated with the development of DR or diabetic nephropathy (DN) as risk or protective factors. The purpose of this study is to determine whether another variant in the *CDKAL1* gene, the rs4712527 SNP, could be associated with the presence of PDR in Argentinean patients with T2DM.

## Methods

### Patients

*Patients from Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER.* Patients older than 21 years with T2DM were recruited between July 2014 and July 2015 from a private eye clinic (Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER) located in the city of Córdoba, Argentina. Two hundred thirty-one patients with T2DM (126 patients with PDR and 105 patients without diabetic retinopathy [WDR]) were studied.

*Patients from Hospital Nacional de Clínicas (replication study).* A total of 98 patients with DR (56 with PDR and 42 with WDR) were recruited from the public Hospital Nacional de Clínicas from the city of Córdoba and were included in the replication study, since both cohorts have a comparable ethnic background so that no major differences in minor allele frequency exist. The age, gender, and body mass index (BMI) distribution was comparable in both cohorts.

### Clinical Evaluation

T2DM was diagnosed according to criteria of the American Diabetes Association (2005).<sup>30</sup> Diabetic patients were defined as those having a self-reported previous history of physician-diagnosed T2DM treated with insulin or oral hypoglycemic agents. Patients had to show a diagnosis of diabetes of at least 5 years. The duration of diabetes was defined as the interval between the first diagnosis of diabetes and the time of enrollment in the present study. All patients completed a questionnaire that revealed basic information (age and sex), mainly Spanish and Italian ancestors (Caucasian origin), smoking habits, health status (such as the use of insulin and oral hypoglycemic therapy and any history of other systemic diseases), and family history of diseases. By study design, all recruited patients had normal renal function. A complete ophthalmological examination included an external examination of the eye and adnexa, pupil responsiveness, and slit-lamp biomicroscopic examination. Intraocular pressure measurements were performed prior to pupil dilation using a Goldmann applanation tonometer (Haag-Streit AT 900, Koeniz, Switzerland). The

examination also included a dilated indirect ophthalmoscopic examination (including evaluation of the posterior segment and vitreous, optic nerve, retinal vasculature, peripheral retina, and macula) performed by 1 of the 2 retinal specialists (J.D.L. or A.L.G.) and dilated fundus photography. Seven fields of 30° color fundus photographs with stereoscopic images of the optic disc and macula were taken through the dilated pupils of each patient, using a digital fundus camera (Zeiss Visucam Pro, Oberkochen, Germany). Optical coherence tomography (OCT) imaging (Cirrus high-resolution spectral domain-OCT system; Carl Zeiss Meditec, Inc, Dublin, California) was also obtained at the time of enrollment. Two retinal specialists (J.D.L. and A.L.G.) determined again the presence or absence of DR and classified the pathology in a masked manner. Our study groups were classified into 2 extreme forms of patients with T2DM according to severity of retinal affection, following the gold standard grading system for defining severity of DR, the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS).<sup>31</sup> One group included patients showing no signs of DR at all, and the other group comprised patients with retinal neovascularization with or without previous treatment for PDR.

### Laboratory Assay

Patients came to the clinical laboratory after a 12-hour fasting overnight and venous blood samples were obtained. The fasting venous blood samples were collected for the measurement of biochemical parameters, which were studied as routine follow-up assays for diabetic patients. These measurements included fasting glucose, glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), determined by an automated system with reagents for routine biomarkers with a Roche COBAS 6000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) analyzer.

### Genotyping

**DNA preparation.** Patients' DNA was obtained from peripheral blood using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin), according to the manufacturer's instructions. One hundred fifty microliters of anticoagulated blood were lysed with cell lysis solution and nucleic lysis solution. The sample was then centrifuged and the supernatant was discarded. Different solutions provided by the manufacturer (RNase solution, protein precipitation solution) were used for DNA extraction. In addition, isopropanol and ethanol 70% were used for DNA precipitation. Finally, the extracted DNA was suspended again in DNA rehydration solution.

### Single-Nucleotide Polymorphism

The rs4712527 SNP was studied in the CDKAL1 gene,<sup>28</sup> which was analyzed with polymerase chain reaction-restriction

fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay using specific primers in a Biometra UNO II cycler (Göttingen, Germany).

PCR was performed using 80 ng of patients' DNA: 3  $\mu$ L of 5X enzyme buffer; 200 mM of each dGTP, dATP, dCTP, and dTTP; 10  $\mu$ M of each forward 5' GGGTGTGAGGATT-GAAGTCGG 3' and reverse 5' AAACATTAGCCC-CATCTCCCT 3' primer; 0.6 U of Go-Taq polymerase (Promega); and water qs 15  $\mu$ L. The cycling parameters were as follows: 94°C for 2 minutes and then 35 cycles of 94°C for 50 seconds, 60°C for 50 seconds and 72°C for 60 seconds, and a final extension at 72°C for 5 minutes.

The amplification product (expected 343 bp) was checked by electrophoresis on agarose gels (1.5% wt/vol) and visualized by irradiation with ultraviolet (UV) light after staining with ethidium bromide. Afterward, PCR products were digested with the restriction endonuclease *Alu I* and were then separated by agarose gel electrophoresis (2.5% wt/vol) prestained with ethidium bromide and visualized by UV light irradiation. For the A allele, the expected sizes were 189 + 26 + 128 bp, while for the G allele, the sizes were 189 + 154 bp. The accuracy of each PCR-RFLP was confirmed by sequencing 10 selected samples.

### Statistical Analysis

SNPStats software (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) was used and a multiple logistic regression model (codominant, dominant, recessive, overdominant, and log-additive) was made to obtain odds ratios (ORs), considering a significant difference  $P$  value <.05, with a 95% CI.<sup>32</sup> The genotypic and allelic frequencies observed for the different variants were compared with those expected according to the Hardy-Weinberg Law. Biochemical and clinical parameters were analyzed using the  $t$  test and  $\chi^2$ , respectively, using the Infostat program.<sup>33</sup>

## Results

### Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER cohort

The population studied consisted of 231 patients with T2DM. As shown in Table 1, the compared cohorts in our study had no significant differences in terms of age, smoking habits, presence of arterial hypertension, and the biochemical parameters. On the contrary, there is a significant difference in the proportion of men and women in the sample, with the number of women greater in the WDR group than in the PDR group. Also, there are significant differences in the duration and time of onset of diabetes and also in glycosylated hemoglobin levels as in the presence of insulin treatment, all these parameters being higher in the PDR group. Finally, the BMI was significantly higher in the WDR group compared to the PDR group. The genetic and allelic frequencies for rs4712527 in the CDKAL1 gene were in Hardy-Weinberg equilibrium in both cohorts (Table 2). A multiple logistic regression model was used (codominant, dominant, recessive, overdominant, and log-additive) and variables were adjusted by diabetes duration,

**Table 1.** Clinical, Lifestyle, and Biochemical Parameters Analyzed in the Populations Studied (Average).<sup>a</sup>

	Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER Cohort			Hospital Nacional de Clínicas Cohort		
	WDR (n = 105)	PDR (n = 126)	P Value	WDR (n = 42)	PDR (n = 56)	P Value
Sex (F/M)	81/24	36/90	<.0001 <sup>b</sup>	31/11	17/39	<.0001 <sup>b</sup>
Age (years)	67.29 (8.42)	67.07 (6.36)	.9001	67.95 (9.03)	66.84 (6.30)	.4965
Known diabetes duration (years)	10.34 (6.68)	19.52 (8.82)	<.0001 <sup>b</sup>	10.95 (7.14)	19.05 (8.34)	<.0001 <sup>b</sup>
Age of onset (years)	56.94 (9.04)	47.55 (10.84)	.0001 <sup>b</sup>	57.00 (9.56)	47.79 (10.31)	<.0001 <sup>b</sup>
Hypertension (yes/no)	81/24	108/18	.0926	30/12	47/9	.1356
Smoker (yes/no)	27/78	39/87	.3802	11/31	20/36	.3157
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.69 (5.97)	29.24 (3.58)	.04 <sup>b</sup>	32.24 (6.24)	29.58 (3.55)	.016 <sup>b</sup>
Insulin therapy (yes/no)	6/99	84/42	<.0001 <sup>b</sup>	2/40	38/18	<.0001 <sup>b</sup>
FPG (mg %)	120.46 (35.87)	129.52 (41.03)	.3144	121.02 (36.65)	134.71 (43.40)	.1023
HbA <sub>1c</sub> (%)	7.02 (1.13)	7.85 (1.24)	.0035 <sup>b</sup>	6.98 (1.19)	7.90 (1.26)	.0004 <sup>b</sup>
Total cholesterol (mg/dL)	175.94 (39.31)	186.64 (32.54)	.1992	167.81 (39.33)	186.52 (31.07)	.0099 <sup>b</sup>
Triglycerides (mg/dL)	154.14 (67.49)	148.00 (51.58)	.6552	167.88 (79.57)	149.79 (58.31)	.2173
HDL cholesterol (mg/dL)	48.37 (11.85)	45.53 (11.82)	.3019	48.40 (11.99)	45.09 (11.77)	.1750
LDL cholesterol (mg/dL)	108.60 (40.30)	113.21 (41.96)	.6292	108.02 (45.07)	111.70 (40.32)	.6724
Systolic blood pressure (mm Hg)	126.57 (8.97)	130.48 (11.99)	.119	127.14 (10.19)	130.36 (11.28)	.149
Diastolic blood pressure (mm Hg)	76.86 (10.68)	76.90 (11.28)	.9851	76.57 (10.02)	77.32 (11.68)	.579

Abbreviations: BMI, body mass index; FPG, fasting plasma glucose; HbA<sub>1c</sub>, glycosylated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; PDR, proliferative diabetic retinopathy; WDR, without diabetic retinopathy.

<sup>a</sup>The data are expressed as mean (SD) or number of patients. Differences between both groups of patients (with PDR and WDR) were compared using t test or  $\chi^2$  test.

<sup>b</sup>Statistically significant.

**Table 2.** Genotypic and Allelic Distribution and Hardy-Weinberg Equilibrium in the Populations Studied.

CDKAL1 (rs4712527)	Genotype			Alleles		H-W Equilibrium (P)
	Wt/Wt	Wt/Mut	Mut/Mut	Wt	Mut	
Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER cohort	21	78	132	120	342	.085
Hospital Nacional de Clínicas cohort	6	24	68	36	160	.070

Abbreviations: CDKAL1, cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1; H-W, Hardy-Weinberg; Mut, mutant; Wt, Wild type.

BMI, insulin therapy, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, triglycerides, systolic blood pressure, and diastolic blood pressure to obtain the ORs. Table 3 shows the results obtained for rs4712527 in the CDKAL1 gene. It seems that the presence of G variant for A>G polymorphism (rs4712527) in the CDKAL1 gene is a protective factor for the development of retinal neovascularization in retinas of diabetic patients under the codominant (OR = 0.31 [95% CI, 0.17-0.57];  $P = 3e-04$ ), dominant (OR = 0.34 [95% CI, 0.19-0.58];  $P = 1e-04$ ), overdominant (OR = 0.35 [95% CI, 0.20-0.64];  $P = 4e-04$ ), and log-additive models (OR = 0.49 [95% CI, 0.33-0.75];  $P = 6e-04$ ). This result was demonstrated after the genetic data were adjusted to the biochemical and clinical parameters (diabetes duration, BMI, insulin therapy, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, triglycerides, systolic blood pressure, and diastolic blood pressure); the OR, 95% CI, and  $P$ , respectively, were as follows: the codominant (OR = 0.16 [95% CI, 0.06-0.44];  $P = 4e-04$ ), dominant (OR = 0.17 [95% CI, 0.07-0.43];  $P = 1e-04$ ), overdominant (OR = 0.20 [95% CI, 0.08-0.52];  $P = 5e-04$ ), and log-additive models (OR = 0.28 [95% CI, 0.13-0.59];  $P = 4e-04$ ; Table 3).

### Hospital Nacional de Clínicas Cohort

The clinical, lifestyle, and biochemical parameters and genotypic and allelic distribution in the Hospital Nacional de Clínicas cohort were similar to those that came from the Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER cohort (Table 1). The adjusted genetic data with biochemical and clinical parameters include diabetes duration, BMI, insulin therapy, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, triglycerides, systolic blood pressure, and diastolic blood pressure; the OR, 95% CI, and  $P$ , respectively, were as follows: codominant model (OR = 0.13 [95% CI, 0.02-0.83];  $P = 0.0053$ ), dominant model (OR = 0.10 [95% CI, 0.02-0.60];  $P = .0059$ ), recessive model (OR = 0.01 [95% CI, 0.00-0.54];  $P = .024$ ), and log-additive model (OR = 0.10 [95% CI, 0.02-0.47];  $P = .015$ ).

### Analysis Including Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER, and Hospital Nacional de Clínicas Patients

The analysis of the contribution of the rs4712527 polymorphism with the risk of developing DR in 329 patients (both

**Table 3.** Association of rs4712527 Polymorphism in the CDKALI Gene With the Presence of PDR.<sup>a</sup>

CDKALI (rs4712527)		Centro Privado de Ojos Romagosa, Fundación VER Cohort						Hospital Nacional de Clínicas Cohort					
Model	Genotype	WDR, n (%)	PDR, n (%)	OR (95% CI)	P Value	Adjusted OR (95% CI) <sup>b</sup>	P Value <sup>b</sup>	WDR, n (%)	PDR, n (%)	OR (95% CI)	P Value	Adjusted OR (95% CI) <sup>b</sup>	P Value <sup>b</sup>
Codominant	A/A	51 (48)	93 (73.8)	1.00	3.00E-04	1.00	.0015	22 (52.4)	46 (82.1)	1.00	.0039	1.00	.0053
	A/G	42 (40)	24 (19.1)	0.31 (0.17-0.57)		0.22 (0.09-0.54)		15 (35.7)	9 (16.1)	0.29 (0.11-0.76)		0.13 (0.02-0.83)	
	G/G	12 (11.4)	9 (7.1)	0.41 (0.16-1.04)		0.31 (0.07-1.48)		5 (11.9)	1 (1.8)	0.10 (0.01-0.87)		0.00 (0.00-0.28)	
Dominant	A/A	51 (48.6)	93 (73.8)	1.00	1.00E-04	1.00	3.00E-04	22 (52.4)	46 (82.1)	1.00	.0015	1.00	.0059
	A/G-G/G	54 (51.4)	33 (26.2)	0.34 (0.19-0.58)		0.23 (0.10-0.54)		20 (47.6)	10 (17.9)	0.24 (0.10-0.60)		0.10 (0.02-0.60)	
Recessive	A/A-A/G	93 (88.6)	117 (92.9)	1.00	.26	1.00	.3	37 (88.1)	55 (98.2)	1.00	.035	1.00	.024
	G/G	12 (11.4)	9 (7.1)	0.60 (0.24-1.48)		0.46 (0.10-2.05)		5 (11.9)	1 (1.8)	0.13 (0.02-1.20)		0.01 (0.00-0.54)	
Overdominant	A/A-G/G	63 (60)	102 (81)	1.00	4.00E-04	1.00	.001	27 (64.3)	47 (83.9)	1.00	.026	1.00	.049
	A/G	42 (40)	24 (19.1)	0.35 (0.20-0.64)		0.24 (0.10-0.59)		15 (35.7)	9 (16.1)	0.34 (0.13-0.89)		0.20 (0.04-1.05)	
Log-additive	–	–	–	0.49 (0.33-0.75)	6.00E-04	0.37 (0.20-0.71)	.0015	–	–	0.34 (0.13-0.64)	9.00E-04	0.10 (0.02-0.47)	.0015

Abbreviations: BMI, body mass index; CDKALI, cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein I-like 1; OR, odds ratio; PDR, proliferative diabetic retinopathy; WDR, without diabetic retinopathy.

<sup>a</sup>P calculated from  $\chi^2$  test.

<sup>b</sup>Adjusted for known diabetes duration, BMI, insulin therapy, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, systolic blood pressure, and diastolic blood pressure.



cohorts), corrected by biochemical and clinical parameters (diabetes duration, BMI, insulin therapy, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, triglycerides, systolic blood pressure, and diastolic blood pressure); the OR, 95% CI, and *P*, respectively, were as follows: in the codominant model (OR = 0.16 [95% CI, 0.07-0.37]; *P* ≤ .0001), dominant model (OR = 0.15 [95% CI, 0.07-0.34]; *P* ≤ .0001), overdominant model (OR = 0.20 [95% CI, 0.09-0.45]; *P* = 1e-04), and log-additive model (OR = 0.22 [95% CI, 0.11-0.44]; *P* ≤ .0001).

## Conclusions

With the increasing prevalence of DM and the increasing life span of people with diabetes, DR is expected to be the leading global cause of vision loss in many countries, including many South American countries, such as Argentina. According to information supplied by the International Federation of Diabetes, it is estimated that the number of diabetics in the world (currently around 382 million) will rise to 553 million by 2030 (Prevalence of Diabetes, www.idf.org), and with this, retinal complications. With these data in mind, it is necessary to determine the risk factors that may contribute to the development of DR and, most importantly, to the progression to PDR, the most devastating form of the disease in the eyes.

Undoubtedly, many factors influence the progression of the severity of DR in different populations,<sup>34</sup> among which is the family association with the progression of retinal complications. On the other hand, it has been suggested that Hispanic individuals with diabetes develop more severe retinopathy earlier in life and progresses faster compared to that found in African American or European patients having the same health status.<sup>35</sup>

Our study groups were classified into 2 extreme forms of patients with T2DM according to severity of retinal affection, following the gold standard grading system for defining severity of DR, the ETDRS.<sup>31</sup> One group was circumscribed to patients showing no signs of DR at all, and the other group comprised patients with retinal neovascularization with or without previous treatment for PDR. Between the 2 groups, despite there being no age difference, we found a significant difference in the duration of the disease, as we can appreciate in the PDR group having significantly more years of DM than the group of patients without retinopathy. Although glycemic control during examination was not significantly different between the groups, the HbA<sub>1c</sub> data showed a statistically significant difference between groups, with the PDR group having a worse glycemic control. Both the duration of diabetes and the high HbA<sub>1c</sub> values in the PDR group should not surprise us, since it is known that diabetic complications such as PDR are associated with poor glycemic control as well as with the duration of the disease.

Another difference found between groups was sex distribution, which showed more males in the PDR group than the nonneovascularized group. These data agree with those reported by Arar et al<sup>35</sup> in the FIND-Eye Study, where they observed that men had more severe DR.

It is well known that T2DM is caused by a complex interaction between environmental and genetic factors, in the same way as familial predisposition in the presence of DR.<sup>36</sup> This fact has led researchers to develop a number of studies to become aware of driving genes and their variants associated with DR.

Our data indicate that the presence of G polymorphism in the rs4712527 of the CDKAL1 gene confers a lower risk of developing PDR in a diabetic Argentinean population. Although the presence of this polymorphism in the CDKAL1 gene has been found in diabetic patients from other populations, such as Chinese people,<sup>26</sup> the association with a lower development of PDR is not currently reported.

To our knowledge, this is the first report showing a positive association between rs4712527 polymorphism in the CDKAL1 gene and T2DM retinopathy. Other polymorphisms in the CDKAL1 gene have been studied by other researchers such as Liu et al,<sup>26</sup> Peng et al,<sup>29</sup> Jiang et al,<sup>37</sup> and Rask-Andersen et al.<sup>38</sup> The first mentioned author showed an association between rs10946398 variant and an increased risk of progression to DR.<sup>26</sup> Peng et al<sup>29</sup> revealed a significant association between rs7756992 and DR, with the minor allele A conferring a lower risk of DR. On the other hand, there are reports of this polymorphism and its association with another diabetic microvascular complication. Studies by Lasram et al<sup>27</sup> showed that rs7756992 variant in the CDKAL1 gene was associated with a reduced risk for developing DN in patients with T2DM. Although our study did not perform an analysis of the renal function of patients (since all of them had normal renal function), the possibility of renal involvement in patients with PDR is widely described.<sup>35</sup> The fact that they found an association of rs7756992 variant in the CDKAL1 gene as a protective marker in patients with PDR, also reported in diabetic patients with a lower possibility of DN, would strengthen the possibility of evidencing a marker of good prognosis for ocular and renal complications of T2DM.

The present study has 2 limitations. First, the size of the sample is relatively small; second, participants come only from the Argentinean population, which, being a fundamentally immigrant population, has a diverse genetic component. However, these are preliminary results and case-control studies with larger samples and multiple comparisons will ensure and provide a more comprehensive explanation of the relationship between the presence of SNPs and the severity of DR.

In conclusion, we showed that the rs4712527 in the CDKAL1 gene is associated with DR risk in an Argentinean population. The results found here need be confirmed in further studies with larger samples and different populations.

## Acknowledgments

The authors thank the patients for their cooperation and for providing blood samples for the study. Grants from Universidad Católica de Córdoba and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina, are greatly acknowledged.

## Ethical Approval

The protocol for this study was approved by the Ethics Committee of Instituto Oulton and Clínica Romagosa, Ethics Committee of Hospital Nacional de Clínicas, and the Department of Health of Córdoba. Research was conducted according to the standards of the Helsinki Declaration.

## Statement of Informed Consent

Written informed consent was obtained from all participants before their enrollment.

## Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Grants from Universidad Católica de Córdoba and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

## References

- Willemsen G, Ward KJ, Bell CG, et al. The concordance and heritability of type 2 diabetes in 34,166 twin pairs from international twin registers: the Discordant Twin (DISCOTWIN) Consortium. *Twin Res Hum Genet.* 2015;18(6):762-771.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science.* 2007;316(5829):1341-1345.
- Looker HC, Nelson RG, Chew E, et al. Genome-wide linkage analyses to identify loci for diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2007;56(4):1160-1166.
- Hietala K, Forsblom C, Summanen P, Groop PH; FinnDiane Study Group. Heritability of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2008;57(8):2176-2180.
- Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BE. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXIII: the twenty-five-year incidence of macular edema in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology.* 2009;116(3):497-503.
- Leasher JL, Bourne RR, Flaxman SR, et al. Global estimates on the number of people blind or visually impaired by diabetic retinopathy: a meta-analysis from 1990 to 2010. *Diabetes Care.* 2016;39(9):1643-1649.
- Williams R, Airey M, Baxter H, Forrester J, Kennedy-Martin T, Girach A. Epidemiology of diabetic retinopathy and macular oedema: a systematic review. *Eye (Lond).* 2004;18(10):963-983.
- Fong DS, Aiello LP, Ferris FL III, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2004;27(10):2540-2553.
- Hosseini SM, Boright AP, Sun L, et al. The association of previously reported polymorphisms for microvascular complications in a meta-analysis of diabetic retinopathy. *Hum Genet.* 2015;134(2):247-257.
- Sobrin L, Green T, Sim X, et al. Candidate Gene Association Study for diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Candidate Gene Association Resource (CARE). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(10):7593-7602.
- Thorsen SU, Sandahl K, Nielsen LB, et al. Polymorphisms in the CTSH gene may influence the progression of diabetic retinopathy: a candidate-gene study in the Danish Cohort of Pediatric Diabetes 1987 (DCPD1987). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015;53(11):1959-1965.
- Safar HA, Chehadeh SEH, Abdel-Wareth L, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms among Emirati patients with type 2 diabetes mellitus. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;175:119-124.
- Grotz AK, Gloyn AL, Thomsen SK. Prioritising causal genes at type 2 diabetes risk loci. *Curr Diab Rep.* 2017;17(9):76.
- Phani NM, Vohra M, Rajesh S, et al. Implications of critical PPAR $\gamma$ 2, ADIPOQ and FTO gene polymorphisms in type 2 diabetes and obesity-mediated susceptibility to type 2 diabetes in an Indian population. *Mol Genet Genomics.* 2016;291(1):193-204.
- Zhang J, Suo Y, Liu M, Xu X. Identification of genes related to proliferative diabetic retinopathy through RWR algorithm based on protein-protein interaction network. *Biochim Biophys Acta.* 2018;1864(6, pt B):2369-2375.
- Ung C, Sanchez AV, Shen L, et al. Whole exome sequencing identification of novel candidate genes in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Vision Res.* 2017;139:168-176.
- Priscakova P, Minarik G, Repiska V. Candidate gene studies of diabetic retinopathy in human. *Mol Biol Rep.* 2016;43(12):1327-1345.
- Mishra B, Swaroop A, Kandpal RP. Genetic components in diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol.* 2016;64(1):55-61.
- Shtir C, Aldahmesh MA, Al-Dahmash S, et al. Exome-based case-control association study using extreme phenotype design reveals novel candidates with protective effect in diabetic retinopathy. *Hum Genet.* 2016;135(2):193-200.
- He K, Lv W, Zhang Q, Wang Y, Tao L, Liu D. Gene set enrichment analysis of pathways and transcription factors associated with diabetic retinopathy using a microarray dataset. *Int J Mol Med.* 2015;36(1):103-112.
- Vidhya G, Anusha B. Diaretinopathy database—a gene database for diabetic retinopathy. *Bioinformatics.* 2014;10(4):235-240.
- Ng MCY, Saxena R, Li J, et al. Transferability and fine mapping of type 2 diabetes loci in African Americans: the Candidate Gene Association Resource Plus Study. *Diabetes.* 2013;62(3):965-976.
- Zhou B, Wei FY, Kanai N, Fujimura A, Kaitsuka T, Tomizawa K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. *Hum Mol Genet.* 2014;23(17):4639-4650.
- Mansoori Y, Daraei A, Naghizadeh MM, Salehi R. Significance of a common variant in the CDKAL1 gene with susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Iranian population. *Adv Biomed Res.* 2015;4:45.
- Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A, et al. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia.* 2008;51(4):597-601.
- Liu NJ, Xiong Q, Wu HH, et al. The association analysis polymorphism of CDKAL1 and diabetic retinopathy in Chinese Han population. *Int J Ophthalmol.* 2016;9(5):707-712.

27. Lasram K, Ben Halim N, Benrahma H, et al. Contribution of CDKAL1 rs7756992 and IGF2BP2 rs4402960 polymorphisms in type 2 diabetes, diabetic complications, obesity risk and hypertension in the Tunisian population. *J Diabetes*. 2015;7(1): 102-113.
28. Fu L, Lin Y, Yang Z, Yin Y. Association analysis of genetic polymorphisms of TCF7L2, CDKAL1, SLC30A8, HHEX genes and microvascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2012;29(2):194-199.
29. Peng D, Wang J, Zhang R, et al. CDKAL1 rs7756992 is associated with diabetic retinopathy in a Chinese population with type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2017;7(1):8812.
30. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2289-2304.
31. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs—an extension of the modified airleie house classification. *Ophthalmology*. 1991;98(5):786-806.
32. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22(15):1928-1929.
33. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2016. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; 2016. <http://www.infostat.com.ar>. Accessed September 15, 2016.
34. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, et al. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*. 2001;44(2): 156-163.
35. Arar NH, Freedman BI, Adler SG, et al. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: The FIND-Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):3839-3845.
36. Harris MI, Klein R, Cowie CC, Rowland M, Byrd-Holt DD. Is the risk of diabetic retinopathy greater in non-Hispanic blacks and Mexican Americans than in non-Hispanic whites with type 2 diabetes? A U.S. Population Study. *Diabetes Care*. 1998;21(8): 1230-1235.
37. Jiang G, Hu C, Tam CH, et al. Genetic and clinical variables identify predictors for chronic kidney disease in type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2016;89(2):411-420.
38. Rask-Andersen M, Philippot G, Moschonis G, et al. CDKAL1-related single nucleotide polymorphisms are associated with insulin resistance in a cross-sectional cohort of Greek children. *PLoS One*. 2014;9(4): e93193.

## Rol de variantes genéticas en el desarrollo de Enfermedad Renal Crónica en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2.

## Role of genetic variants to the development of Chronic Kidney Disease in patients with Type 2 Diabetes Mellitus.

Pablo Yang<sup>1</sup>, Verónica Ojeda,<sup>2</sup> Adriana Ruiz-Pecchio,<sup>3</sup> Néstor W. Soria<sup>1</sup>

1 Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Unidad Asociada al CONICET: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas. Obispo Trejo 323. CP: 50001YG. Córdoba. Córdoba. Argentina. TE: + 54 351 4938060.

2 Departamento de Diabetología, Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba. Santa Rosa 1564. CP: 5000ETF. Córdoba. Córdoba. Argentina.

3 Laboratorio de Nefrología, Laboratorio Central, Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba. Santa Rosa 1564. CP: 5000ETF. Córdoba. Córdoba. Argentina.

Correspondencia: Néstor W. Soria, Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Unidad Asociada al CONICET: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas. Obispo Trejo 323. CP: X5000DHK. Córdoba. Córdoba. Argentina; e-mail: [nestorwsoria@gmail.com](mailto:nestorwsoria@gmail.com)

### Resumen

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es una afección que perjudica a un gran número de pacientes. Una de las causas es la Nefropatía en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).

Objetivo: Indagar si las presencias de variantes genéticas contribuyen al desarrollo de ERC en pacientes con DM2.

Materiales y métodos: se evaluaron criterios clínicos, bioquímicos y moleculares en 25 pacientes con DM2. Los polimorfismos se analizaron mediante PCR-RFLP para ECA (rs4646994); CDKAL1 (rs7756992); e-NOS (rs1799983) y SLC12A3 (rs11643718).

Resultados: El análisis estadístico mediante modelo dominante arrojaron para: ECA (rs4646994) (OR=1,33 (IC 95%) 0,25-7,01; p=0,73); CDKAL1 (rs7756992) (OR= 1 (IC 95%) 0,14-7,39; p=NA); e-NOS (rs1799983) (OR= 0,29 (IC 95%) 0,05-1,57; p=0,14) y SLC12A3 (rs11643718 (OR= 1,62 (IC 95%) 0,19-13,93; p=0,66).

Conclusiones: ninguna de las variantes evaluadas en los genes ECA, CDKAL1, e-NOS y SLC12A3 mostraron asociaciones positivas o negativas con el riesgo a desarrollar ERC en pacientes con DM2.

### Abstract

Chronic Kidney Disease (CKD) is a condition that affects a large number of patients. One cause is the Nephropathy in Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) patients.

Objective: Evaluate if some polymorphisms contribute to CKD risk in DM2 patients.

Materials and methods: clinical, biochemical and molecular parameters from 25 patients with DM2 were evaluated. The polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP for the ECA (rs4646994); CDKAL1 (rs7756992); e-NOS (rs1799983) and SLC12A3 (rs11643718) genes.

Results: Statistical analysis using a dominant model showed: ACE (rs4646994) (OR = 1.33 (95% CI) 0.25-7.01, p = 0.73); CDKAL1 (rs7756992) (OR = 1 (95% CI) 0.14-7.39; p = NA); e-NOS (rs1799983) (OR = 0.29 (95% CI) 0.05-1.57; p = 0.14) and SLC12A3 (rs11643718 (OR = 1.62 (95% CI) 0.19-13.93, p = 0.66).  
Conclusions: none of the evaluated variants in ACE, CDKAL1, e-NOS and SLC12A3 genes showed positive or negative associations with CKD risk in DM2 patients.

## Introducción

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) se define como alteraciones de la estructura o de la función del riñón que duran al menos 3 meses y que tienen implicancias para la salud, traduciéndose en una Tasa de Filtrado Glomerular estimada (TFGe) inferior a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.<sup>1</sup> La Diabetes Mellitus (DM) es la enfermedad que más contribuye a la ERC en todo el mundo junto con la hipertensión arterial (HTA).<sup>2</sup>

En 2017, la DM afectaba a 451 millones de pacientes en todo el mundo y se espera que incremente a 693 millones para 2045.<sup>3</sup> Una de sus complicaciones es la Nefropatía Diabética (ND), la cual contribuye significativamente con la ERC.<sup>4</sup> El riesgo a desarrollar ND ha sido ampliamente estudiado, existiendo algunas variantes genéticas que pueden contribuir al desarrollo de esta complicación.<sup>5,6</sup>

A partir de los hallazgos realizados en estudios de asociación génica a nivel mundial, muchos autores están buscando posibles relaciones entre la presencia de variantes genéticas y la manifestación de una patología o de una complicación de la misma. En nuestro país, existen escasos estudios genéticos, particularmente en el área de la ERC.

En parte como consecuencia de lo mencionado anteriormente, el motivo de nuestro estudio fue realizar un trabajo piloto en un grupo de pacientes con DM Tipo 2 (DM2) de la ciudad de Córdoba, Argentina, a los fines de evaluar el riesgo a desarrollar ERC según la presencia de los SNPs: rs4646994<sup>7</sup>, rs7756992<sup>8</sup>, rs1799983<sup>9</sup> y rs11643718<sup>10</sup> en cuatro genes diferentes (ECA; CDKAL1; e-NOS y SLC12A3).

## Materiales y métodos

### Pacientes y evaluación clínica

Se reclutaron un total de 25 pacientes con DM2 de entre 53 y 86 años de edad (11 hombres y 14 mujeres) que asistieron al Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba Capital, Argentina, entre los meses de marzo y septiembre del año 2017. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba y el Ministerio de Salud de Córdoba y está de acuerdo con la declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados y su consentimiento fue obtenido.

El diagnóstico de DM2 fue realizado de acuerdo a los criterios de la Asociación Americana de Diabetes de 2005.

Los pacientes fueron clasificados en dos grupos de acuerdo a su categoría ERC (con más de 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> de TFGe (categorías G1 y G2) y

los que tenían menos de 59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> de TFGe (categorías G3a, G3b, G4 y G5)) siguiendo las guías KDIGO 2018<sup>11</sup>.

### Análisis de Laboratorio

Se obtuvieron muestras de sangre venosa en ayuno de 12 horas. Las determinaciones incluyeron glucosa, hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol total, triglicéridos, colesterol de baja densidad (LDL) y colesterol de alta densidad (HDL), aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), gama glutamil transpeptidasa (GGT) y albuminuria (1° orina de la mañana), todos determinados por un sistema automatizado con reactivos para biomarcadores de rutina con el equipo Roche COBAS® 6000 (Analizador Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). La Creatininemia fue cuantificada por el método cinético de Jaffé modificado y normalizado a espectrometría de masa/dilución isotópica (IDMS).

### Genotipado

#### Extracción del ADN

El ADN de los pacientes fue obtenido a partir de sangre periférica utilizando el kit de purificación Wizard Genomic DNA (Promega, Madison, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Detección de los Polimorfismos

Se estudiaron los polimorfismos en los genes: ECA (rs4646994); CDKAL1 (rs7756992); e-NOS (rs1799983) y SLC12A3 (rs11643718), mediante PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa – Longitud del Fragmento de Restricción del Polimorfismo) usando cebadores específicos en un termociclador Biometra UNO II (Göttingen, Alemania) (Tabla 1).

Los productos de PCR se digirieron con endonucleasas de restricción específicas y los fragmentos de ADN fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (2,5% p/v) preteñidos con bromuro de estudio y visualizados mediante irradiación con luz ultravioleta. En la Tabla 1 se encuentran detallados los genes y los polimorfismos estudiados, los cebadores y enzimas de restricción empleadas y los fragmentos de ADN esperados post digestión enzimática.

## Análisis Estadístico

Se utilizó el software SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) y los datos fueron analizados mediante un modelo de regresión logística múltiple (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo) para obtener los Odds-Ratios (OR), considerando una diferencia estadísticamente significativa la presencia de un valor  $p < 0.05$ , con un intervalo de confianza del 95%.

Las frecuencias genotípicas y alélicas observadas de los diferentes polimorfismos se compararon con las esperadas de acuerdo con la Ley Hardy-Weinberg.

Los parámetros bioquímicos y clínicos se analizaron utilizando la prueba  $t$  y  $\chi^2$  respectivamente, utilizando el programa Infostat.

## Aspectos éticos

## Resultados

La población estudiada consistió en 25 pacientes con DM2, 15 pacientes con bajo y 10 pacientes con alto riesgo de ERC. Como se muestra en la Tabla 2, los grupos comparados en nuestro estudio no mostraron diferencias significativas en términos de edad, sexo, duración de la enfermedad, tabaquismo, presencia de hipertensión arterial (diastólica), terapia con insulina, índice de masa corporal y albuminuria (excepto la creatininemia). Por el contrario, hay una diferencia significativa en la presión sistólica, donde los pacientes con riesgo más elevado de ERC presentaban valores más altos.

En la Tabla 3 se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas de los cuatro genes analizados, cada uno con su correspondiente SNP. Las mismas fueron calculadas y comparadas para ver si estaban en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg, para determinar la aleatoriedad de la población tomada. Como se puede observar, en todos los casos el valor de  $p$  es superior a 0,05, indicando que no hay diferencia significativa en los resultados, por lo tanto, la población estudiada no presenta ningún sesgo en su reclutamiento.

Los resultados del análisis de regresión logística múltiple se muestran en la Tabla 4 para los cuatro polimorfismos, ECA (rs4646994); CDKAL1 (rs7756992); e-NOS (rs1799983) y SLC12A3 (rs11643718). Los análisis incluían a los modelos codominante, dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo. En ninguno de los análisis se observaron valores de OR y  $p$  significativos, lo que significa que ninguna de las

variantes analizadas en la población estudiada parece influir con el riesgo a desarrollar ERC.

## Discusión

El incremento de la prevalencia de la DM contribuirá a un incremento de la ND y esta, al desarrollo de ERC. Actualmente, la presencia de ERC varía a nivel global, desde el 7 al 8% en Asia del Sur y África hasta el 11-12% en Norteamérica, América del Sur y Europa<sup>12</sup>.

En América Latina, la prevalencia e incidencia de la ERC ha aumentado en todos los países, sin embargo, existen amplias variaciones entre las tasas de los diferentes países. En toda la región, la ERC aumentó de 119 pacientes por millón de habitantes (ppm) en 1991 a 568 ppm en 2008. Las tasas de prevalencia más altas se registraron en Puerto Rico (1170 ppm), Uruguay (1079 ppm) y Chile (1036 ppm). Las tasas de prevalencia más bajas se informaron en Nicaragua (35 ppm) y Paraguay (92 ppm)<sup>13</sup>. Escasos son los datos oficiales que se tienen respecto al número de afectados en la población Argentina.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, la DM sigue siendo la causa principal de ERC en América Latina, con las tasas más altas en Puerto Rico (65%), México (51%), Venezuela (42%) y Colombia (42 %). Las tasas más bajas se encuentran en Brasil (25,7%), Uruguay (22,1%), Costa Rica (20%) y Paraguay (15%)<sup>13</sup>.

Nuestro estudio, clasificó a los pacientes en dos grupos, uno con bajo riesgo y otro con alto riesgo de ERC de acuerdo a los criterios KDIGO. Entre ambos grupos de pacientes, prácticamente no había diferencia estadística en los parámetros clínicos y bioquímicos analizados, aunque las diferencias encontradas se observaron exclusivamente en la presión arterial sistólica y en la creatininemia. Como señalábamos anteriormente, es sabido que la elevada presión sistólica contribuye a un riesgo aumentado a desarrollar ERC, por lo tanto, los valores encontrados en nuestro grupo de pacientes están perfectamente de acuerdo con lo que se encuentra en otros estudios.

El polimorfismo rs4646994 del gen ECA, fue analizado por Shanmuganathan y colaboradores<sup>14</sup>. Ellos encontraron que la variante D, estaba asociada con un aumento del riesgo a desarrollar ERC. En sentido contrario, Jayapalan y colaboradores no pudieron observar esta asociación<sup>15</sup>.

Los estudios que muestran la asociación del polimorfismo rs7756992 del gen CDKAL1 con la ERC en pacientes con DM2 son inconsistentes, algunos muestran posibles asociaciones, otros no<sup>16</sup>.

Cuando analizamos distintos estudios para ver la contribución al desarrollo de ERC, algunos trabajos arrojan conclusiones diferentes en relación al polimorfismo rs1799983 presente en el gen e-NOS, por ejemplo el de Mrozikiewicz-Rakowska y colaboradores, no lograron encontrar ninguna asociación<sup>17</sup>, mientras Chand y colaboradores si mostraron la existencia de una asociación<sup>18</sup>.

Por último, cuando analizamos el polimorfismo rs11643718 en el gen SLC12A3, el mismo está asociado al riesgo de desarrollar ERC en pacientes con ND en el estudio publicado por Kim y colaboradores<sup>19</sup>. Contrariamente a estos hallazgos, Ng y colaboradores no encontraron ninguna asociación<sup>20</sup>.

A partir de nuestros resultados, no podemos afirmar que alguno de los 4 polimorfismos estudiados confiere mayor o menor riesgo a desarrollar ERC. Si bien, el número de pacientes estudiados es pequeño (siendo una de las limitaciones de nuestro estudio), es importante conocer más cuáles son los factores que pueden contribuir a la ERC en pacientes con DM2, y esto utilizarlo a la hora de proyectar el desarrollo de un estudio que incluya un mayor número de pacientes. Además, según nuestras búsquedas bibliográficas, la información disponible y confiable en relación a la prevalencia e incidencia de ERC en Argentina es escasa, y este pequeño estudio puede contribuir como punto de partida, para otros proyectos que permitan darnos una idea más acabada de lo que sucede en nuestro país.

Una segunda limitación, es que el estudio fue realizado en una población de origen caucásico, por lo tanto, diferencias se podrían encontrar si se analizaran pacientes provenientes de otras regiones de nuestro país y/o la de otros países.

## Bibliografía

1. Martínez-Castelao A, Górriz JL, Bover J, Segura-de la Morena J, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Semer - Med Fam* [Internet]. 2014 Nov;40(8):441–59. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1575092214001715>
2. Monhart V. Hypertension and chronic kidney diseases. *Cor Vasa* [Internet]. 2013 Aug;55(4): e397–402. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010865013000945>
3. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2018 Apr; 138:271–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
4. Maric C, Hall JE. Obesity, Metabolic Syndrome and Diabetic Nephropathy. In: *Contrib Nephrol* [Internet]. 2011. p. 28–35. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/324941>
5. Rizvi S. Association of genetic variants with diabetic nephropathy. *World J Diabetes* [Internet]. 2014 Dec 15 [cited 2015 Aug 9];5(6):809–16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4265867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Tamm R, Oselin K, Kallassalu K, Magi R, et al. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: three new mutations and haplotype analysis in the Estonian population. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2014 Jun 4];46(7):974–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18605963>
7. Fathi M, Nikzamir AR, Esteghamati A, Nakhjavani M, et al. Combination of Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion (I/D) (rs4646994) and VEGF Polymorphism (+405G/C; rs2010963) Synergistically Associated With the Development, of Albuminuria in Iranian Patients With Type 2 Diabetes. *Iran Red Crescent Med J* [Internet]. 2015 Feb 21 [cited 2015 Oct 22];17(2): e19469. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4376980&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Li Y, Wang L, Lu X, Yang Z, et al. CDKAL1 gene rs7756992 A/G polymorphism and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 62,567 subjects. *Sci Rep* [Internet]. 2013 Dec 4 [cited 2014 Jul 31];3(1):3131. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3816287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Dellamea B, Leitão C, Friedman R, Canani L. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):17.
10. Zhang R, Zhuang L, Li M, Zhang J, et al. Arg913Gln of SLC12A3 gene promotes development and progression of end-stage renal disease in Chinese type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem*. 2018;437(1–

- 2):203–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-017-3120-z>
11. Ronco P, Wong G, Agarwal A, Anders H, et al. KDIGO 2018 Clinical Practice Guideline for the Prevention, Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Hepatitis C in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* [Internet]. 2018 Oct;8(3):91–165. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2157171618300054>
  12. Correa-Rotter R, García-García G, Iñiguez JC, Ramirez-Sandoval JC. Ethnicity and Chronic Kidney Disease in Disadvantaged Populations – An International Perspective. In: *Chronic Renal Disease*. Elsevier; 2015. p. 833–42.
  13. Kumaresan R, Giri P, Shanmuganathan R. Prevalence of angiotensin converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism in South Indian population with hypertension and chronic kidney disease. *J Postgrad Med*. 2015;61(4):230–4.
  14. Muniandy S, Chan S, Jayapalan J. Null association between ACE gene I/D polymorphism and diabetic nephropathy among multiethnic Malaysian subjects. *Indian J Hum Genet*. 2010;16(2):78–86.
  15. Jiang G, Hu C, Tam CHT, Lau ESH, et al. Genetic and clinical variables identify predictors for chronic kidney disease in type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2016;89(2):411–20.
  16. Mrozikiewicz-Rakowska B, Maroszek P, Nehring P, Sobczyk-Kopciol A, et al. Genetic and environmental predictors of chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes and diabetic foot ulcer: a pilot study. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(5):751–61.
  17. Chand S, Chue CD, Edwards NC, Hodson J, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Single Nucleotide Polymorphism and Left Ventricular Function in Early Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(1):e0116160.
  18. Kim JH, Shin HD, Park BL, Moon MK, et al. SLC12A3 (solute carrier family 12 member [sodium/chloride] 3) polymorphisms are associated with end-stage renal disease in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2006;55(3):843–8.
  19. Ng DPK, Nurbaya S, Choo S, Koh D, et al. Genetic variation at the SLC12A3 locus is unlikely to explain risk for advanced diabetic nephropathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(7):2260–4.
  20. Ng DPK, Nurbaya S, Choo S, Koh D, et al. Genetic variation at the SLC12A3 locus is unlikely to explain risk for advanced diabetic nephropathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2008 May 25 [cited 2015 Nov 4];23(7):2260–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18263927>

### Palabras claves:

GENES; POLIMORFISMOS; ENFERMEDAD RENALCRÓNICA, NEFROPATÍA DIABÉTICA; DIABETES MELLITUS TIPO 2.

### Keywords:

GENES; POLYMORPHISMS; CHRONIC KIDNEY DISEASE, DIABETIC NEPHROPATHY; DIABETES MELLITUS TYPE 2.





## Anexo tablas

**Tabla 1.** Secuencia de cebadores, enzimas de restricción y tamaños esperados de los productos de digestión.

GEN	SNP	Secuencias de cebadores (5' > 3')	Tamaño PCR (pb)	Enzima de Restricción	Fragmentos digeridos (pb)	
					Wild-type	Mutado
ECA	rs4646994	F: CTGGAGACCCCATCCTTTCT	I: 490 D: 190			
		R: GATGTGGCCATCACATTCGTCAGA				
CDKAL1	rs7756992	F: CCTGACTTTTGCCAACCAAA	279	BglII	A: 201+78	G: 279
		R: TTCATGCAACCAAGAGAGGT				
e-NOS	rs1799983	F: AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA	248	MboI	G: 248	T: 163+85
		R: CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA				
SLC12A3	rs11643718	F: TTCTACAAGCGCAGGCTTTG	626	AvaI	G:168+ 86 + 222 + 149	A: 168 + 86 + 373
		R: GTGCCCTCTGACACATCTAGG				

**Tabla 2.** Parámetros clínicos, bioquímicos y estilos de vida en la población estudiada (media).

	Clasificación de riesgo a desarrollar ERC		Valor p
	<sup>a</sup> Bajo (n= 10)	<sup>a</sup> Alto (n=15)	
Sexo (F/M)	4/6	10/5	0,1882
Edad (Años)	71,40 ± 7,95	71,60 ± 3,57	0,9328
Duración de la diabetes (Años)	20,60 ± 15,47	18,60 ± 15,14	0,7512
Hipertensión (Si/No)	8/2	15/0	0,0710
Fumador (Si/No)	0/10	1/14	0,4047
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27,73 ± 4,99	30,47 ± 5,77	0,2329
Terapia con Insulina (Si/No)	5/5	8/7	0,8702
Glucemia (mg %)	135,80 ± 67,28	121,09 ± 62,83	0,5823
HbA1c (%)	9,03 ± 1,80	8,11 ± 1,78	0,2890
Creatininemia (mg/dl)	1,02 ± 0,10	1,47 ± 0,62	<b>0,0146*</b>
CKDEPI (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	71,00 ± 7,06	43,47 ± 11,38	<b>&lt;0.0001*</b>
Albuminuria (µg/min)	24,58 ± 20,75	33,29 ± 37,09	0,6479
Colesterol (mg/dl)	185,14 ± 49,54	179,55 ± 30,28	0,7684
Triglicéridos (mg/dl)	151,00 ± 105,34	161,55 ± 76,21	0,8080
HDL colesterol (mg/dl)	50,67 ± 12,26	47,50 ± 11,77	0,6157
LDL colesterol (mg/dl)	116,50 ± 44,93	104,60 ± 35,81	0,5671
ALT (mUI/ml)	35,50 ± 26,13	18,22 ± 5,95	0,1102
AST (mUI/ml)	31,50 ± 16,72	17,89 ± 3,55	0,0586
GGT (mUI/ml)	47,43 ± 26,93	27,29 ± 12,26	0,0969
Presión sistólica (mmHg)	117.43 ± 4.43	136.77 ± 20.39	<b>0.0055*</b>
Presión diastólica (mmHg)	68.57 ± 9.00	76.42 ± 8.82	0.0806

Los datos están expresados como la media ± la desviación estándar (DE) o número de pacientes (n). Las diferencias entre los grupos de pacientes (Sin/Con) Nefropatía fueron comparados usando el t test o el del Chi-cuadrado.

ERC: Enfermedad Renal Crónica

<sup>a</sup> Bajo: Grado 1 y 2, con Tasa de Filtrado Glomerular estimado igual o mayor a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

<sup>a</sup> Alto: Grado 3a, 3b, 4 y 5: Tasa de Filtrado Glomerular estimado menor a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

IMC, índice de masa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; CKDEPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration); ALT, alanino amino transferasa; AST, aspartato amino transferasa; GGT, gama glutamil transpeptidasa.

\*Estadísticamente significativo.

**Tabla 3.** Distribución alélica y genotípica junto al equilibrio de Hardy-Weinberg de los diferentes SNPs analizados en la población estudiada.

	Genotipo			Alelos		Equilibrio H-W (p)
	wt/wt	wt/mut	mut/mut	wt	mut	
ECA (rs4646994)	9	8	8	26	24	0,0726
CDKAL1 (rs7756992)	5	14	6	24	26	0,5425
e-NOS (rs1799983)	12	11	2	35	15	0,8118
SLC12A3 (rs11643718)	4	10	11	18	32	0,5094

Wt: Wild type

Mut: mutante

H-W: Hardy Weinberg

**Tabla 4.** Asociación de SNPs presentes en los genes ECA (rs4646994), CDKAL1 (rs7756992), e-NOS (rs1799983) y SLC12A3 (rs11643718) con el riesgo a desarrollar ERC. (Parte I)

Modelo /Genes	Genotipo	Bajo riesgo n; (%)	Alto riesgo n; (%)	OR (95% IC)	Valor p
<i>ECA (rs4646994)</i>					
Codominante	D/D	4 (40)	5 (33,3)	1,00	0,55
	I/D	4 (40)	4 (26,7)	0,80 (0,12-5,40)	
	I/I	2 (20)	6 (40)	2,40 (0,30-19,04)	
Dominante	D/D	4 (40)	5 (33,3)	1,00	0,73
	I/D-I/I	6 (60)	10 (66,7)	1,33 (0,25-7,01)	
Recesivo	D/D-I/D	8 (80)	9 (60)	1,00	0,28
	I/I	2 (20)	6 (40)	2,67 (0,41-17,17)	
Sobredominante	D/D-I/I	6 (60)	11 (73,3)	1,00	0,49
	I/D	4 (40)	4 (26,7)	0,55 (0,10-3,00)	
Log-aditivo	---	---	---	1,49 (0,55-4,03)	0,43

**Tabla 4.** Asociación de SNPs presentes en los genes ECA (rs4646994), CDKAL1 (rs7756992), e-NOS (rs1799983) y SLC12A3 (rs11643718) con el riesgo a desarrollar ERC. (Parte II)

Modelo /Genes	Genotipo	Bajo riesgo	Alto riesgo	OR (95% IC)	Valor p
<b>CDKAL1 (rs7756992)</b>					
Codominante	A/A	2 (20)	3 (20)	1,00	0,92
	A/G	6 (60)	8 (53,3)	0,89 (0,11-7,11)	
	G/G	2 (20)	4 (26,7)	1,33 (0,11-15,70)	
Dominante	A/A	2 (20)	3 (20)	1,00	NA
	A/G-G/G	8 (80)	12 (80)	1,00 (0,14-7,39)	
Recesivo	A/A-A/G	8 (80)	11 (73,3)	1,00	0,7
	G/G	2 (20)	4 (26,7)	1,45 (0,21-9,98)	
Sobredominante	A/A-G/G	4 (40)	7 (46,7)	1,00	0,74
	A/G	6 (60)	8 (53,3)	0,76 (0,15-3,86)	
Log-aditivo	---	---	---	1,16 (0,35-3,91)	0,81
<b>e-NOS (rs1799983)</b>					
Codominante	G/G	3 (30)	9 (60)	1,00	0,33
	G/T	6 (60)	5 (33,3)	0,28 (0,05-1,62)	
	T/T	1 (10)	1 (6,7)	0,33 (0,02-7,14)	
Dominante	G/G	3 (30)	9 (60)	1,00	0,14
	G/T-T/T	7 (70)	6 (40)	0,29 (0,05-1,57)	
Recesivo	G/G-G/T	9 (90)	14 (93,3)	1,00	0,77
	T/T	1 (10)	1 (6,7)	0,64 (0,04-11,63)	
Sobredominante	G/G-T/T	4 (40)	10 (66,7)	1,00	0,19
	G/T	6 (60)	5 (33,3)	0,33 (0,06-1,75)	
Log-aditivo	---	---	---	0,42 (0,11-1,62)	0,19
<b>SLC12A3 (rs11643718)</b>					
Codominante	G/G	2 (20)	2 (13,3)	1,00	0,66
	G/T	4 (40)	6 (40)	1,50 (0,15-15,46)	
	T/T	4 (40)	7 (46,7)	1,75 (0,17-17,69)	0,74
	T/T	4 (40)	7 (46,7)	1,31 (0,26-6,64)	
Sobredominante	G/G-T/T	6 (60)	9 (60)	1,00	NA
	G/T	4 (40)	6 (40)	1,00 (0,20-5,12)	
Log-aditivo	---	---	---	1,29 (0,43-3,91)	0,65

ERC: Enfermedad Renal Crónica.

IC: Intervalo de confianza 95%. p calculado del test Chi-cuadrado.

N: número de pacientes

%: porcentaje de pacientes.





## Loss of the tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUU</sub> encoding gene, *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*, is not associated with Type 2 diabetes mellitus

Pablo Yang<sup>1</sup>, Dante Miguel Beltramo<sup>1</sup>, Lluís Ribas de Pouplana<sup>2,3</sup>, Néstor Walter Soria<sup>4</sup> & Adrian Gabriel Torres<sup>\*,2</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Asociada al CONICET: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina

<sup>2</sup>Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona Institute of Science & Technology, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>3</sup>Catalan Institution for Research & Advanced Studies (ICREA), 08010 Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>4</sup>Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Asociada al CONICET: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina

\*Author for correspondence: Tel.: +34 934 034 867; Fax: +34 934 034 870; [adriangabriel.torres@irbbarcelona.org](mailto:adriangabriel.torres@irbbarcelona.org)

**Aim:** To investigate the presence/absence of the *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* gene as a marker for genetic predisposition to Type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods:** We enrolled 122 patients diagnosed with T2DM and 77 non-diabetic individuals. We evaluated clinical and biochemical parameters (body mass index, hypertension, cholesterol levels, glycosylated hemoglobin, triglycerides, etc.), and performed a genotypic profiling of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* by polymerase chain reaction analyses. **Results:** Approximately one third of the population lacked *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*. We did not observe a statistically significant association between the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM. **Conclusion:** The genotypic distribution of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* in our population was consistent to that reported by others. This gene failed as a marker for T2DM predisposition.

First draft submitted: 18 September 2018; Accepted for publication: 15 January 2019; Published online: 18 March 2019

**Keywords:** biomarker • gene translation • genotypic profiling • insulin • PCR • T2DM • tRNA • tRNA gene • tRNA-Lys-CUU • Type 2 diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized mainly by persistent hyperglycemia, which may be caused by a defect in the synthesis of insulin (Type 1 DM) or resistance to its action (Type 2 DM [T2DM]). It is estimated that in 2017 the number of diabetic patients was approximately 425 million people worldwide, of whom almost 50% are unaware of their condition [1]. T2DM is the most common form of DM where it accounts for approximately 90% of cases, and its onset is due to genetic factors (largely unknown) and environmental risk factors, such as obesity and sedentary lifestyle [2]. By the time T2DM is usually diagnosed, nearly half of the patients present diabetes-related tissue damage, and upon diagnosis vascular complications are usually still observed [3]. Therefore, early diagnosis of T2DM is of utmost importance.

Transfer RNAs (tRNAs) are non-protein coding ribonucleic acids that aid in the process of protein synthesis. In order to be fully active, tRNAs need to be chemically modified post-transcriptionally and become charged with their specific amino acid by aminoacyl-tRNA synthetases. Once fully matured, tRNAs deliver the amino acid to the ribosome where protein synthesis takes place. Nucleotide triplets on the tRNA molecule (anticodon) specifically recognize nucleotide triplets (codons) on messenger RNAs (mRNAs), decoding three nucleotides at a time and converting the genetic information present in mRNAs into a newly formed peptide chain [4].

Functional dysregulation of both mitochondrial and cytosolic tRNAs have been associated with T2DM [5,6]. A mutation in the mitochondrial *tRNA-Leu-UUR* gene was reported as a pathogenic factor of maternal inheritance in T2DM [7], and the gene (*LARS2*) was reported as a T2DM susceptibility gene [8]. Direct measurement of 2-methylthio modification on cytoplasmic tRNA<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub> positively correlated with levels of insulin secretion in

patients with T2DM [9]; and mutations in *CDKALI*, the gene encoding the enzyme responsible for 2-methylthio modification have also been linked to T2DM [10–12]. Mechanistically, it is believed that lack of this modification impairs the efficient recognition of lysine AAG codons present in the pre-proinsulin mRNA resulting in translational defects leading to misfolding and poor processing of this protein into insulin [5,13].

Notably, lysine AAG codons can also be decoded by tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUU</sub>. It has been recently reported that the deletion allele of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* is widespread in the human population [14]. Because tRNA abundance can affect translational efficiency and fidelity, it has been suggested that the human genomic variation of this locus could be implicated in T2DM [14–16]. With the aim to establish a novel marker for early detection of genetic predisposition to T2DM, we evaluated the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* in patients with T2DM and in non-diabetic (non-DM) individuals using a simple and cost-effective duplex-PCR approach.

## Materials & methods

### Patients from Centro Privado de Ojos Romagosa and Hospital Nacional de Clínicas

Subjects older than 21 years old were recruited between July 2014 and July 2015 from the Centro Privado de Ojos Romagosa and Hospital Nacional de Clínicas located in Córdoba city, Argentina. 122 patients with T2DM and 77 non-DM individuals were studied.

### Clinical evaluation

T2DM was diagnosed according to criteria from the American Diabetes Association [2]. Diabetic patients were defined as those having a self-reported previous history of physician-diagnosed T2DM treated with insulin or oral hypoglycemic agents. Patients had to inform a diagnosis of diabetes of at least 5 years. The duration of diabetes was defined as the interval between the first diagnosis of diabetes and the time of enrollment in the present study. All subjects completed a questionnaire that revealed basic information including age and sex, origin (Caucasian, mainly Spanish and Italian ancestors), health status (e.g., the use of insulin and oral hypoglycemic therapy and any history of other systemic diseases) and family history of diseases.

### Ethics statement

The protocol for this study was approved by the Department of Health of Córdoba, and the Ethics Committees of ‘Instituto Oulton–Clínica Romagosa’ and ‘Hospital Nacional de Clínicas.’ Research was conducted according to standards of the Helsinki Declaration. Written informed consent was obtained from all participants before their enrollment.

### Laboratory assay

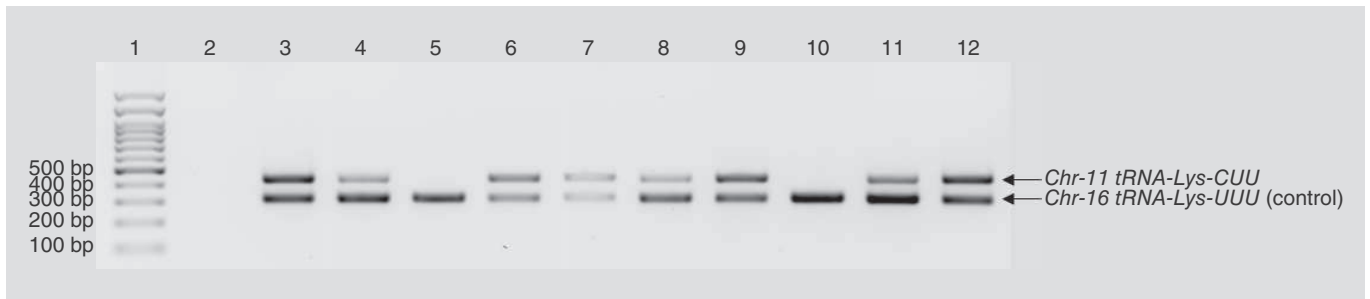
Patients came to the clinical laboratory after a 12 h fasting overnight, and venous blood samples were obtained. Measurement of biochemical parameters, which were studied as routine follow-up assays for diabetic patients, included fasting glucose, glycosylated hemoglobin (HbA1c), total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-cholesterol) and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-cholesterol), and were determined by an automated system with reagents for routine biomarkers with a Roche COBAS® 6000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) analyzer. The same biochemical parameters, with the exception of HbA1c, were evaluated on non-DM individuals.

### DNA preparation

DNA was obtained from peripheral blood using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, MD, USA) according to the manufacturer’s instructions, except that 150 µl of anti-coagulated blood was used instead of the recommended 300 µl. Volumes from the Kit’s reagents were scaled down accordingly.

### PCR detection of the tRNA-Lys-CUU locus on Chr-11

Duplex PCR was done as described by Iben and Maraia [14]. Briefly, the *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* gene was amplified using the 437\_Lys\_CTTF (forward) [5′-GGCCACAGGAGCTTCAAGTA-3′] and 437\_Lys\_CTTR (reverse) [5′-TGTTGACTC AGGGGGCATAAT-3′] primers (expected amplicon ~400 bp). A control tRNA gene that is consistently present in all individuals (*Chr-16 tRNA-Lys-UUU*) was amplified using the C\_193\_Lys\_CTTF (forward) (5′-CGCAGGCGCTTCTTAGTATT-3′) and C\_193\_Lys\_CTTR (reverse) (5′-ACACACGGATCGGAGAACAC-3′) primers (expected amplicon ~300 bp). Iben and Maraia reported that individuals lacking *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*



**Figure 1.** Representative agarose gel showing the obtained amplicons derived from the *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* locus (upper band) and from the control tRNA locus (*Chr-16 tRNA-Lys-UUU*) that is invariably present in all individuals (lower band). Results for ten individuals are shown. Lane 1: 100 base pair (bp) molecular weight marker. Lane 2: PCR-negative control, no amplicon detection. Lanes 3, 4 and 5: homozygous for the presence (+/+), heterozygous (+/-) and homozygous for the deletion (-/-) of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*, respectively. Lanes 6 to 12: results for additional individuals.

have also lost flanking DNA regions for a total loss of ~21 Kb (no other genes or genomic features are annotated in this region besides *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*) [14]. Therefore, under our experimental conditions, if *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* is missing, no amplicons derived from this gene should be detected. Duplex PCR was performed using GoTaq DNA polymerase (Promega) in a 15  $\mu$ l final reaction volume for 27 cycles. A total of 5  $\mu$ l of PCR reactions were run on a 1% agarose gel and visualized with ethidium bromide. Gel pictures were taken using a BioSpectrum 815 Imaging System UVPM-26XV. Evaluation of the number of alleles present for *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* was performed relative to the intensity of amplicon detection for *Chr-16 tRNA-Lys-UUU* (because the number of alleles present on *Chr-16 tRNA-Lys-UUU* is invariable in the population, its amplicon detection serves as gel loading controls; Figure 1).

### Statistical analyses

The number of analyzed individuals (N) for statistical testing was defined based on previous analyses of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* genetic variation screening performed in a population conformed by 97 individuals [14]. SNPStats software (<http://bioinfo.iconologia.net/SNPstats>) was used and a multiple logistic regression model (codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive) was made to obtain odds ratios (ORs), considering as significant difference a p-value followed a normal distribution, and two-tailed statistical testing was performed.

### Results

The main characteristics of the studied population (122 T2DM patients and 77 non-DM individuals) are shown in Table 1. When considering all patients regardless of their body weight, T2DM patients presented statistically significant hypertension, increased body mass index (BMI), higher glycemia and HDL-cholesterol; while presenting overall a slight decrease in total cholesterol levels. All other evaluated parameters were not statistically significant (Table 1). Higher levels of LDL-cholesterol are frequently observed in T2DM patients having metabolic syndrome [17]. When considering only overweight individuals (BMI 25–29.9), a statistically significant increase in LDL-cholesterol is observed in T2DM patients over non-DM subjects (Supplementary Table 1). Of note, in our cohort, 15 non-DM individuals presented signs of metabolic syndrome based on levels of triglycerides (>150 mg/dl), HDL (<40 mg/dl for men; <50 mg/dl for women), blood pressure (>130 mmHg) and BMI (>30 kg/m<sup>2</sup>) [18]; while the remaining 62 non-DM individuals did not present metabolic syndrome. In addition, 13 out of 77 non-DM individuals presented glycemia values higher than 100 mg/dl, which is within the criteria for diagnosing prediabetes [19].

We next evaluated the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* in all individuals by duplex PCR [14]. Figure 1 shows a representative agarose gel presenting individuals *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* positive homozygote (+/+) (lanes 3, 6, 7, 9 and 12), heterozygote (+/-) (lanes 4, 8, 11) and *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* deletion homozygote (-/-) (lanes 5, 10). It has previously been reported that approximately one third of a population (N = 97) comprising individuals that have not been reported to present T2DM (herein considered non-DM individuals), lacked *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* [14]. We confirmed, this genotypic distribution in our population considered as a whole (non-DM plus T2DM individuals), only non-DM individuals, or only T2DM patients (Table 2). In addition, we confirmed that there were no statistically significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in the studied

**Table 1. Clinical and biochemical parameters analyzed in the studied populations.**

Clinical/biochemical parameters	Individuals †		
	Non-DM (N = 77)	T2DM (N = 122)	p-value ‡
Sex (F/M)	47/30	61/61	0.1279
Age (years)	64.64 ± 12.01	67.48 ± 9.32	0.0788
Known diabetes duration (years)	–	16.09 ± 10.27	–
Hypertension (yes/no)	46/31	96/26	0.0040 §
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.27 ± 2.67	30.19 ± 5.06	0.0006 §
HbA1c (%)	–	7.45 ± 1.24	–
Glycemia (mg/dl)	91.82 ± 10.01	129.01 ± 39.97	< 0.0001 §
Total cholesterol (mg/dl)	200.66 ± 42.71	187.93 ± 38.90	0.0316 §
Triglycerides (mg/dl)	144.48 ± 57.30	159.86 ± 89.08	0.1399
HDL cholesterol (mg/dl)	43.16 ± 10.29	48.13 ± 22.52	0.0360 §
LDL cholesterol (mg/dl)	114.68 ± 31.11	119.52 ± 44.05	0.3649

† Data expressed as mean ± standard deviation or number of individuals.  
‡ Differences between groups were compared using t-test or  $\chi^2$ -test.  
§ Statistically significant.  
BMI: Body mass index; F: Female; HbA1c: Glycosylated hemoglobin; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; M: Male; Non-DM: Non-diabetic; T2DM: Type 2 diabetes mellitus.

**Table 2. Genotypic distribution of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* in the analyzed populations.**

Individuals	Homozygote presence (+/+), %	Heterozygote (+/-), %	Homozygote absence (-/-), %
Non-DM individuals (current study) N = 77	31.17	41.56	27.27
T2DM individuals (current study) N = 122	25.41	40.98	33.61
All individuals (current study) N = 199	27.64	41.21	31.16
Non-DM individuals† N = 97	24.74	44.33	30.93

† From [14].  
Non-DM: Non-diabetic mellitus; T2DM: Type 2 diabetes mellitus.

populations (non-DM HWE p-value = 0.14; T2DM HWE p-value = 0.06; Iben and Maraia individuals HWE p-value = 0.28).

Results of the duplex PCR screening and the statistical evaluation of the association between *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM are shown in Table 3. We did not find a statistically significant association between the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM in the analyzed population (non-DM N = 77; T2DM N = 122; Table 3). This was also true when we removed all non-DM individuals that presented metabolic syndrome or signs of prediabetes from the analyses (non-DM N = 59; T2DM N = 122; Supplementary Table 2). Because our full cohort contained a lower number of non-DM individuals (N = 77) than T2DM patients (N = 122), we included in our analyses for statistical robustness, the data from 97 additional non-DM individuals previously reported [14]; and we have obtained similar results (Supplementary Table 3). Likewise, no statistically significant association was observed when stratifying individuals by either of the parameters shown in Table 1 (sex, hypertension, BMI and lipid measurements). However, note that the statistical confidence in these cases is poor given the low number of individuals per stratified group (less than 20 individuals; data not shown). To address a potential effect of these other parameters in our association studies, while maintaining a population size suitable for statistical measurements, we adjusted the obtained ORs by gender, blood pressure, BMI and total cholesterol, but again we did not observe a statistically significant association between the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM (Supplementary Table 4).



**Table 3. Association of the genotypic distribution of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* with Type 2 diabetes mellitus.**

<i>Chr-11 tRNA-Lys-CUU</i> gene		Individuals			
Model	Genotype	Non-DM, n (%)	T2DM, n (%)	OR (95 % CI)	p-value †
Codominant	WT/WT	24 (31.2)	31 (25.4)	1.00	0.55
	WT/DEL	32 (41.6)	50 (41)	1.21 (0.60–2.42)	
	DEL/DEL	21 (27.3)	41 (33.6)	1.51 (0.70–3.20)	
Dominant	WT/WT	24 (31.2)	31 (25.4)	1.00	0.38
	WT/DEL-DEL/DEL	53 (68.8)	91 (74.6)	1.33 (0.71–2.50)	
Recessive	WT/WT-WT/DEL	56 (72.7)	81 (66.4)	1.00	0.34
	DEL/DEL	21 (27.3)	41 (33.6)	1.35 (0.72–2.53)	
Overdominant	WT/WT-DEL/DEL	45 (58.4)	72 (59)	1.00	0.94
	WT/DEL	32 (41.6)	50 (41)	0.98 (0.55–1.74)	
Log-additive	–	–	–	1.23 (0.85–1.79)	0.28

† p-value calculated from  $\chi^2$ -test.  
 DEL: Deleted (absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*); Non-DM: Non-diabetic; OR: Odds Ratio; T2DM: Type 2 diabetes mellitus; WT: Wild type (presence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*).

### Discussion

In recent years, several genes implicated in tRNA biology have been reported as useful biomarkers for a range of human diseases [5,20–22]. For example, measuring the levels of tRNA modification enzymes can be used to predict the risk of relapse after treatment with tamoxifen on patients with early-stage breast cancer [23]; or to predict the risk for colorectal cancer [24].

There is a known association between appropriate decoding of lysine AAG codons and efficient translation and processing of pre-proinsulin into insulin [5]. In addition, it has been proposed that the expression levels of tRNA genes could be used as biomarkers for human diseases [16]. In light of these observations, we hypothesized that the absence of the tRNA gene encoding for tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUU</sub> (*Chr-11 tRNA-Lys-CUU*), a common genetic variant reported in the human population [14], could be predictive of T2DM.

In our cohort, we observed that approximately one third of the population were lacking *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*, consistent with a previous report [14]. However, we did not find a statistically significant association between the presence/absence of this gene and T2DM. While *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* could be important for decoding the AAG codons on pre-proinsulin mRNA, it is worth noting that the human genome contains 20 additional genes encoding for this tRNA [25]. *Chr-11* harbors only one *tRNA-Lys-CUU* gene (the one studied in this work); the other *tRNA-Lys-CUU* genes are distributed in *Chr-1* (4 genes), *Chr-5* (3 genes), *Chr-6* (1 gene), *Chr-14* (1 gene), *Chr-15* (2 genes), *Chr-16* (6 genes), *Chr-18* (1 gene) and *Chr-19* (2 genes; Supplementary Table 5). In this sense, other *tRNA-Lys-CUU* genes could be compensating for any potential detrimental effect due to the loss of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* in the human population. Importantly, however, not all of the annotated human tRNA genes are transcriptionally active and hence, may not be contributing towards the cellular tRNA pool necessary for protein translation [26]. Unfortunately, quantifying the mature tRNA pool and being able to unambiguously define the tRNA genes contributing towards this tRNA transcript pool, is currently very challenging [27]. As novel technologies emerge, a careful analysis of tRNA expression at single gene resolution in different cells and tissues will be possible, and could be beneficial to address this matter in depth.

Another possibility is that *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* may be having a small influence on decoding AAG codons to produce proper insulin, however, these small effects in T2DM patients could be masked by other non-genetic factors (e.g., obesity and sedentary lifestyle) that contribute more significantly to the onset of T2DM. We performed similar statistical analyses upon stratification of the studied individuals by their BMI (normal: BMI 18.5 to 24.9; overweight: BMI 25 to 29.9; obese: BMI 30 or above), in an effort to eliminate one of the environmental risk factors with known association to T2DM (i.e., obesity), but again did not find any association between *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM. We note however, that in these analyses the number of non-overweight/non-obese individuals were limited (non-DM: N = 9; T2DM: N = 12; data not shown).

While our current analyses suggest that the genotypic profiling of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* may not be a suitable biomarker for T2DM, it is important to note that in this work we have performed a broad patient selection, taking into account only their age (21 years and above) and that they have or have not been diagnosed with T2DM. In

this sense, we believe it would be valuable to perform similar studies upon fine stratification of T2DM patients, not only considering removing as many non-genetic factors that could be contributing to the onset of T2DM (see above), but also taking into account specific clinical parameters. For example, if *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* is important for processing of pre-proinsulin; individuals lacking this gene should present hyperproinsulinemia. It would be interesting in future work to associate the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* with levels of pre-proinsulin.

## Conclusion

Although we could confirm the expected genotypic distribution of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*, we did not find a correlation between presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM in the analyzed population.

### Executive Summary

#### Background

- The presence of the gene encoding for tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUU</sub> (*Chr-11 tRNA-Lys-CUU*) is highly variable in the human population.
- Mechanistic defects on tRNA<sup>Lys</sup> function has been previously associated with Type 2 diabetes mellitus (T2DM), due to its role in translation of pre-proinsulin.
- The aim of this study was to evaluate if the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* could be used as a marker for genetic predisposition to T2DM.

#### Materials & methods

- A total of 122 patients diagnosed with T2DM, and 77 non-diabetic individuals were enrolled.
- Clinical parameters, such as body mass index, hypertension, total cholesterol, high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol, glycosylated hemoglobin, glycemia and triglycerides were evaluated.
- Genotypic profiling of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and of a control gene *Chr-16 tRNA-Lys-UUU* was performed by duplex PCR.

#### Results

- About one third of the cohort lacked *Chr-11 tRNA-Lys-CUU*. This genotypic distribution was consistent to that reported previously in another population.
- We did not observe a statistically significant association between the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM when considering our population as a whole.
- We did not observe a statistically significant association between the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM when including, in addition, genotyping data from 97 non-DM subjects reported in a previous study.
- We did not observe a statistically significant association between the presence/absence of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* and T2DM upon stratification of individuals by sex, hypertension, body mass index or lipid measurements. However, these results should be considered preliminary due to the relatively low number of individuals available for analysis per stratified group.

#### Discussion & conclusion

- Our current analyses suggest that the genotypic profiling of *Chr-11 tRNA-Lys-CUU* may not be a suitable biomarker for T2DM. However, it would be valuable to perform similar studies upon fine stratification of individuals based on specific clinical parameters, and taking into account potential non-genetic factors that could be contributing to the onset of T2DM.

### Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: [www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/bmm-2018-0322](http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/bmm-2018-0322)

### Author contributions

P Yang and NW Soria performed experiments; NW Soria, DM Beltramo, LR de Pouplana and AG Torres analyzed data; NW Soria supervised research; AG Torres: conceived the study; and wrote the manuscript with input from all authors.

### Acknowledgments

The authors thank the patients for their cooperation and for providing blood samples for the study. The authors thank V Ojeda and J Luna for their medical support.

### Financial & competing interests disclosure

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Grants from Universidad Católica de Córdoba to NW Soria Grant by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BIO2015-64572) to LR de Pouplana. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

### References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S *et al.* IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 138, 271–281 (2018).
- **A global analysis indicating the importance and prevalence of Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in the human population.**
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37(Suppl. 1), S81–90 (2014).
3. Ambady R, Chamukuttan S. Early diagnosis and prevention of diabetes in developing countries. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 9(3), 193–201 (2008).
4. Piñeyro D, Torres AG, Ribas de Pouplana L. Biogenesis and Evolution of Functional tRNAs. In: *Fungal RNA Biology*. Sesma A, Von der Haar T (Eds.) Springer International Publishing, Switzerland, 233–267 (2014).
5. Torres AG, Batlle E, Ribas de Pouplana L. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends Mol. Med.* 20(6), 306–314 (2014).
- **A systematic review that describes defects in genes encoding tRNA modification enzymes associated to T2DM.**
6. Abbott JA, Francklyn CS, Robey-Bond SM. Transfer RNA and human disease. *Front. Genet.* 5, 158 (2014).
7. van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W *et al.* Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted Type II diabetes mellitus and deafness. *Nat. Genet.* 1(5), 368–371 (1992).
- **To the best of our knowledge, this is the first article describing defects on tRNA biology associated to Type 2 diabetes mellitus (T2DM).**
8. 't Hart LM, Hansen T, Rietveld I *et al.* Evidence that the mitochondrial leucyl tRNA synthetase (LARS2) gene represents a novel Type 2 diabetes susceptibility gene. *Diabetes.* 54(6), 1892–1895 (2005).
9. Xie P, Wei FY, Hirata S, Kaitzuka T, Suzuki T, Tomizawa K. Quantitative PCR measurement of tRNA 2-methylthio modification for assessing Type 2 diabetes risk. *Clin. Chem.* 59(11), 1604–1612 (2013).
10. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for Type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316(5829), 1331–1336 (2007).
11. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I *et al.* A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of Type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 39(6), 770–775 (2007).
12. Wei FY, Tomizawa K. Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of Type 2 diabetes. *Endocr. J.* 58(10), 819–825 (2011).
13. Stoy J, Steiner DF, Park SY, Ye H, Philipson LH, Bell GI. Clinical and molecular genetics of neonatal diabetes due to mutations in the insulin gene. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 11(3), 205–215 (2010).
14. Iben JR, Maraia RJ. tRNA gene copy number variation in humans. *Gene.* 536(2), 376–384 (2014).
- **A thorough analysis using data from the 1000 genomes project that reports for the first time the genotypic variation of Chr-11 tRNA-Lys-CUU in humans and propose its potential role in T2DM.**
15. Maraia RJ, Iben JR. Different types of secondary information in the genetic code. *RNA.* 20(7), 977–984 (2014).
16. Tuller T. The effect of dysregulation of tRNA genes and translation efficiency mutations in cancer and neurodegeneration. *Front. Genet.* 3, 201 (2012).
17. Rutter MK, Nesto RW. Blood pressure lipids and glucose in Type 2 diabetes: how low should we go? Re-discovering personalized care. *Eur. Heart. J.* 32(18), 2247–2255 (2011).
18. Swarup S. Metabolic syndrome. In: *StatPearls*. Zeltser R (Ed.) StatPearls Publishing, Treasure Island, FL, USA (2018).
19. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2017: summary of revisions. *Diabetes Care* 40(Suppl. 1), S4–S5 (2017).

20. Torres AG, Ribas de Pouplana L. Transfer RNA Modifications: From Biological Functions to Biomedical Applications. In: *Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine*. Jurga S, Erdmann VA, Barciszewski J (Eds.) Springer International Publishing, Basel, Switzerland, 1–26 (2016).
21. Sissler M, Gonzalez-Serrano LE, Westhof E. Recent advances in mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases and disease. *Trends Mol. Med.* 23(8), 693–708 (2017).
22. Soares AR, Santos M. Discovery and function of transfer RNA-derived fragments and their role in disease. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 8(5). doi: 10.1002/wrna.1423 (2017).
23. Bartlett JM, Thomas J, Ross DT *et al.* Mammostrat as a tool to stratify breast cancer patients at risk of recurrence during endocrine therapy. *Breast Cancer Res.* 12(4), R47 (2010).
24. Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E *et al.* Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. *Mol. Cancer*. 9, 100 (2010).
25. Chan PP, Lowe TM. GtRNAdb 2.0: an expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes. *Nucleic Acids Res.* 44(D1), D184–D189 (2016).
26. Gogakos T, Brown M, Garzia A, Meyer C, Hafner M, Tuschl T. Characterizing expression and processing of precursor and mature human tRNAs by hydro-tRNAseq and PAR-CLIP. *Cell Rep.* 20(6), 1463–1475 (2017).
- **Reveals that not all of the tRNA genes encoded in the human genome are actively expressed.**
27. Torres AG, Pineyro D, Rodriguez-Escriba M *et al.* Inosine modifications in human tRNAs are incorporated at the precursor tRNA level. *Nucleic Acids Res.* 43(10), 5145–5157 (2015).