



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Efecto de polimorfismos en los genes *ABCB1* y
CYP3A4 en la eficacia del tratamiento con
corticosteroides en pacientes mexicanos con
esclerosis múltiple.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

BALBUENA OLVERA ANDREA JOSELIN

ASESOR: Dr. Jorge Luis Guerrero Camacho

CO-ASESOR: QFB. Gabriel Arturo Lima Villeda

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Efecto de polimorfismos en los genes ABCB1 Y CYP3A4 en la eficacia del tratamiento con corticosteroides en pacientes mexicanos con esclerosis múltiples.

Que presenta la pasante: **Andrea Joselin Balbuena Olvera**
Con número de cuenta: **310062077** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Diciembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Q.F.B. Gabriel Arturo Lima Villeda	
1er. SUPLENTE	M.F.C. Cecilia Hernández Barba	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Dedicatoria

A mis padres, por su apoyo amor y comprensión, por brindarme las herramientas para llegar hasta aquí.

Agradecimientos

A mamá y papá, por su amor, apoyo y guía, por todo el esfuerzo que hicieron para que yo lograra llegar hasta aquí. Por impulsar mis sueños, muchas gracias.

A mis hermanos por alegrar mis días, por sus consejos y su cariño, muchísimas gracias Miguel y Anita.

A Marcos por tu amor y compañía, por darme esas palabras de aliento cuando las necesitaba, gracias por recorrer este camino conmigo.

A mis amigos de la universidad Viri, Kari, Sara y Dano por hacer de la universidad un recorrido más emocionante y alegre, especialmente a Chavi y Chucho por ser como una pequeña familia.

A mis amigos del INNN, Kari, Dano, Oscar, Chucho y Gabo, por su ayuda y por hacer pasar el tiempo más ameno y alegre.

A los miembros del Departamento de Neurogenética del INNN-MVS, por las enseñanzas que me brindaron y por hacer del laboratorio un lugar muy agradable para trabajar, especialmente al Dr. Jorge Guerrero por su asesoría durante mi servicio social y tesis.

Finalmente, al jurado revisor por sus observaciones, para hacer de este un mejor trabajo.

Contenido

Índice de figuras.....	6
Índice tablas	6
Abreviaturas	8
Resumen.....	9
1. Marco teórico	11
1.1. Esclerosis múltiple	11
1.1.1. Etiología.....	11
1.1.2. Clasificación.....	12
1.1.3. Síntomas	12
1.1.4. Epidemiología	13
1.1.5. Tratamiento	13
1.1.5.1. Evaluación del tratamiento.....	15
1.2. Corticosteroides.....	16
1.2.1. Farmacocinética	17
1.2.2. Reacciones adversas.....	20
1.2.2.1. Genética en las RAM	20
1.3. Gen <i>ABCBI</i>	22
1.3.1. Características de la proteína.....	22
1.3.2. Variantes.....	24
1.3.2.1. <i>C1236T</i> rs1128503	24
1.3.2.2. <i>G2677 T/A</i> rs2032582	25
1.3.2.3. <i>C3435T</i> rs1045642	26
1.3.2.4. Haplotipos	27
1.4. Gen <i>CYP3A4</i>	28
1.4.1. Características de la proteína.....	28
1.4.1.1. Variante <i>CYP3A4*1B</i> rs2740574	29
2. Justificación.....	31
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivos	32
4.1. Objetivo General	32
4.2. Objetivos específicos.....	32
5. Diagrama metodológico	33
6. Metodología	34

6.1.	Selección de participantes	34
6.2.	Obtención de muestra sanguínea.....	34
6.3.	Extracción de DNA	34
6.4.	Cuantificación de DNA.....	35
6.5.	Integridad de DNA.....	36
6.6.	PCR	36
6.7.	RFLP	38
6.8.	Secuenciación.....	40
6.9.	Análisis estadístico.....	42
7.	Resultados	43
7.1.	Características del DNA obtenido.....	43
7.2.	Características de la población.....	44
7.3.	Frecuencia de la población de acuerdo con la respuesta y la presencia de RAM	45
7.4.	Genotipificación de las variantes	46
7.5.	Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes en la población estudiada.....	48
7.6.	Relación entre la presencia de las variantes con la respuesta a corticosteroides.....	49
7.7.	Relación entre los alelos y genotipos con el EDSS e IP.....	51
7.8.	Frecuencia de haplotipos en la población.....	54
8.	Discusión.....	57
9.	Conclusión.....	62
10.	Referencias.....	63

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de desmielinización en esclerosis múltiple (EM).....	11
Figura 2. Escala EDSS para la evaluación clínica de la EM.....	15
Figura 3. Estructura de los corticosteroides	16
Figura 4. Principales metabolitos de la dexametasona, metilprednisolona y prednisona.....	19
Figura 5. Estructura de los transportadores ABC.....	23
Figura 6. Concentración e integridad de las muestras de DNA genómico.....	43
Figura 7. Integridad de muestras de DNA en gel de agarosa 0.8%.....	44
Figura 8. Genotipificación de la variante <i>C1236T</i> mediante RFLP	46
Figura 9. Genotipificación de la variante <i>C3435T</i> mediante RFLP	47
Figura 10. Genotipificación de la variante <i>CYP3A4*1B</i> mediante RFLP.....	47
Figura 11. Electroferogramas de la secuenciación de la variante <i>G2677T/A</i>	48

Índice tablas

Tabla 1. Síntomas de la Esclerosis Múltiple.	12
Tabla 2. Tratamiento en la esclerosis múltiple.....	14
Tabla 3. Efectos adversos de los corticosteroides	20
Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes <i>C1236T</i> , <i>G2677T/A</i> y <i>C3435T</i> del gen <i>ABCB1</i> y <i>CYP3A4*1B</i> entre poblaciones.....	30
Tabla 5. Primers utilizados para amplificar los fragmentos deseados.....	36
Tabla 6. Calculo de reactivos para la reacción de amplificación de los fragmentos para las variantes <i>C1236T</i> , <i>G2677T/A</i> , <i>C3435T</i> y <i>CYP3A4*1B</i>	37
Tabla 7. Condiciones de temperatura para PCR.....	38
Tabla 8. Sitio de corte de las enzimas utilizadas para RFLP	39
Tabla 9. Cálculo de cantidad de reactivos necesario para llevar a cabo RFLP del fragmento para las variantes <i>C1236T</i> , <i>C3435T</i> y <i>CYP3A4*1B</i>	39
Tabla 10. Cantidad de reactivos necesaria para preparar gel de poliacrilamida 10% y 14%	39
Tabla 11. Cantidad de reactivos y muestras para realizar el corrimiento en gel de poliacrilamida ..	40
Tabla 12. Tamaño de los fragmentos esperados según los genotipos para cada variante	40
Tabla 13. Cálculo de reactivos utilizados para realizar la reacción de secuenciación	41
Tabla 14. Condiciones de temperatura utilizadas para la reacción de secuenciación	41
Tabla 15. Características de la población estudiada.....	44

Tabla 16. Frecuencia de individuos con distintas respuestas y presencia de RAM	45
Tabla 17. Frecuencias genóticas y alélicas en pacientes con EM	49
Tabla 18. Presencia de genotipos y alelos en relación con las RAM y el tipo de respuesta	50
<i>Tabla 18. Presencia de genotipos y alelos en relación con las RAM y el tipo de respuesta</i> <i>(continuación)</i>	51
Tabla 19. Relación de alelos y genotipos con EDSS e IP	52
<i>Tabla 19. Relación de alelos y genotipos con EDSS e IP (continuación)</i>	52
Tabla 20. Comparación de EDSS inicial y final en pacientes con EM portadores de variantes de <i>ABCB1</i> y <i>CYP3A4</i>	54
Tabla 21. Frecuencia de haplotipos en la población estudiada y relación con RAM.....	55
Tabla 22. Frecuencias de haplotipos en individuos con respuesta alterada	56

Abreviaturas

• C	Grados Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ABCBI	Casete de unión a ATP Subfamilia B Miembro 1
ACD	Ácido cítrico dextrosa
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
EDSS	Escala expandida del estado de discapacidad
EM	Esclerosis múltiple
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMPR	Esclerosis múltiple progresiva recurrente
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
Gp-P	Glicoproteína P
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides
IP	Índice de progresión
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina
MDR1	Gen de resistencia a múltiples fármacos 1
Min	Minutos
MI	Mililitro
MM	Mestizo-mexicanos
MPM	Marcador de peso molecular
MR	Receptor de mineralocorticoides
NBD	Dominio de unión a nucleótidos
Ng	Nanogramos
nGRE	Elementos de respuesta negativa a glucocorticoides
PCR	Reacción en cadena polimerasa
RAM	Reacción adversa medicamentosa
RFLP	Restricción de fragmentos de longitud polimórfica
Rpm	Revoluciones por minuto
Seg	Segundos
SNC	Sistema nervioso central
SRSN	Síndrome nefrótico con respuesta a esteroides
TBE	Tris ácido bórico EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TMD	Dominio transmembrana
U	Unidades de actividad enzimática
UV	Ultravioleta

Resumen

El tratamiento con corticosteroides es muy frecuente en pacientes con esclerosis múltiple (EM), siendo los más utilizados la metilprednisolona, la prednisona y dexametasona. Pese a su eficacia terapéutica, en algunos casos los individuos no responden de manera adecuada y entre las posibles razones por las que esto ocurre, se encuentran las de origen genético, especialmente de los genes implicados en la farmacocinética. En este caso los genes *CYP3A4* y *ABCB1* que codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo y transporte de los corticosteroides, suelen presentar variantes genéticas que pueden alterar la función de la proteína, lo que impacta en la respuesta de los individuos al tratamiento.

Variaciones en estos genes podrían alterar el funcionamiento de sus proteínas, por lo que en este estudio se planteó como objetivo determinar la influencia de los polimorfismos más comunes de los genes *ABCB1* (*C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*) y *CYP3A4* (**1B*) en la eficacia del tratamiento inmunosupresor con metilprednisolona, prednisona y dexametasona, así como en la generación de reacciones adversas. Lo cual se realizó mediante la obtención de DNA genómico de 83 pacientes mestizo-mexicanos con EM, previo consentimiento informado, para posteriormente genotipificar por PCR-RFLP (*C1236T*, *C3435T* y *CYP3A4*1B*) y secuenciación tipo Sanger (*G2677T/A*). Una vez obtenidos los genotipos se comprobó el equilibrio de Hardy-Weinberg y la relación entre las variantes y la respuesta al tratamiento, así como con la presencia de reacciones adversas medicamentosas (RAM) en la población, así como con el valor de EDSS (escala expandida del estado de discapacidad) e IP (índice de progresión).

También se realizó un análisis de haplotipos en la población y se buscó si estos se asociaban con la respuesta al tratamiento y a la presencia de RAM en la población.

Se encontró que los alelos más frecuentes de las variantes *C1236T*, *G2677T/A*, *C3435T* y *CYP3A4*1B* en la población de individuos mestizo-mexicanos con EM, fueron el T (55.4%), G (58.6%), C (56.6%) y A (97%). El haplotipo más frecuente fue el CGCA con un 33.35%. Entre la población estudiada se observó que la mayoría de los individuos mostraron respuesta a los corticosteroides y no presentaron RAM (92%).

Los análisis estadísticos mostraron que el genotipo 2677 GT podría estar asociado a la ausencia de RAM y el genotipo 3435 TT podría estar implicado en la falta de respuesta al tratamiento.

La presencia del alelo 1236C, el genotipo 1236 CT ($p=0.004$) y alelo 2677G ($p=0.037$) está relacionada con menor discapacidad en los pacientes con EM, pero la presencia del genotipo 2677 TT ($p=0.015$) con mayor discapacidad, por lo que hay una posibilidad de que dichas variantes estén implicadas en la EM.

Los resultados anteriores permitieron llegar a la conclusión de que no se puede establecer relación entre las variantes *C1236T*, *G2677T/A*, *C3435T* y *CYP3A4*1B* con la respuesta de individuos mestizo-mexicanos con EM ante el tratamiento con metilprednisolona, prednisona y/o dexametasona, aunque es probable que al aumentar la muestra y profundizar en su

estudio, pueda aclararse la relación de las variantes 1236C, 2677G, 1236CT, 1236 TT, 2677 TT y 3435 con el grado de discapacidad de pacientes con EM y posiblemente el tratamiento.

En lo que refiere a la presentación de RAM en la población de mestizo mexicanos con EM se encontró una posible relación con la presencia del genotipo GT, sugiriendo que los individuos que portan este genotipo tienden a no presentar reacciones adversas con dexametasona, metilprednisolona y prednisona, aunque esto no puede asegurarse debido a que el tamaño de la muestra analizada es pequeño.

1. Marco teórico

1.1. Esclerosis múltiple

Es una enfermedad desmielinizante, crónica, autoinmune e inflamatoria que afecta a todo el sistema nervioso central (SNC) (Domínguez *et al.*, 2012).

En ella hay daño a la mielina axonal del SNC, cerebro, médula espinal y nervios ópticos, con formación de cicatrices llamadas esclerosis, placas o lesiones, que afectan la capacidad de los nervios para conducir impulsos eléctricos desde y hacia el cerebro, dando lugar a la aparición de los síntomas (Torrades, 2004). Aunque está planteada como una enfermedad autoinmune, aún se desconoce qué impulsa al sistema inmunológico a dañar la mielina, por lo que su origen es considerado multifactorial, implicando a la predisposición genética y factores ambientales (Torrades, 2004).

1.1.1. Etiología

En general la patología consiste en tres aspectos: inflamación peri-venosa, desmielinización y gliosis (Domínguez *et al.*, 2012).

La hipótesis más aceptada para explicar el comienzo de la formación de una placa es la que implica el paso a través de barrera hematoencefálica de células T activadas y posteriormente de macrófagos (Torrades, 2004) que son responsables de la destrucción de la mielina, la *figura 1* muestra el mecanismo de daño a la mielina de forma simplificada.

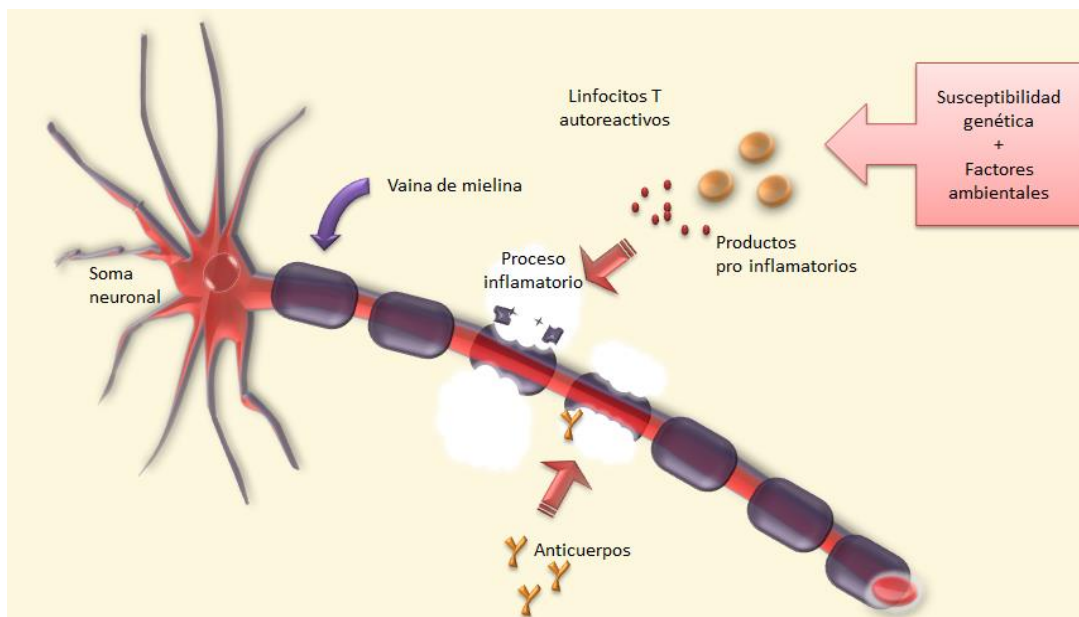


Figura 1. Mecanismo de desmielinización en esclerosis múltiple (EM)
Modificado de Arcos Sánchez et al (2011).

1.1.2. Clasificación

La forma en la que se presenta y evoluciona la enfermedad es variable, por lo que de acuerdo con el curso de la enfermedad existen cuatro categorías en las que se pueden agrupar los pacientes: esclerosis múltiple recurrente remitente (EMRR), esclerosis múltiple secundariamente progresiva (EMSP), esclerosis múltiple primariamente progresiva (EMPP) y esclerosis múltiple progresiva recurrente (EMPR) (Goldenberg, 2012).

La EMRR se caracteriza por cuadros agudos de síntomas neurológicos con recuperaciones; mientras que en la EMSP las remisiones se vuelven infrecuentes y por lo general son reemplazadas por empeoramiento gradual de los síntomas, generalmente deja secuelas neurológicas y hay progresión de lesiones tempranas; por otra parte en la EMPP hay síntomas neurológicos progresivos y graduales sin remisiones desde el inicio; en cuanto a la EMPR es considerada un subtipo de la forma PP que puede tener recaídas raras sobreimpuestas a una progresión lenta, que tiene escasez de lesiones cerebrales y espinales en la resonancia magnética (Domínguez *et al.*, 2012).

Además, se ha observado que los pacientes que presentan la forma EMSP tienen retraso en la progresión de la enfermedad cuando se les administra tratamiento modificador de la enfermedad, mientras que aquellos que presentan la forma EMPR tienden a mostrar resistencia a los fármacos utilizados comúnmente (Goldenberg, 2012).

1.1.3. Síntomas

Los pacientes de EM muestran una sintomatología variable que además tiene duración y severidad distinta dependiendo de la zona dañada en el SNC, además del curso de la enfermedad, sin embargo, los síntomas más comunes se agrupan en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Síntomas de la Esclerosis Múltiple.

Más frecuente	Otros
Visión borrosa o doble	Pérdida de la sensación (tacto, térmica y dolor)
Distorsión del color rojo-verde	Impedimento del habla
Ceguera en un ojo	Temblores
Debilidad muscular en extremidades	Mareo
Dificultad de coordinación y equilibrio	Pérdida de audición
Dificultad para andar y ponerse de pie	Dificultad de atención, memoria y enjuiciamiento
Parálisis parcial o total	Trastornos psicóticos (depresión maniaca y paranoia)
Espasticidad	Disfunción urinaria
Fatiga	Disfunción sexual
Parestesias	

Basado en Instituto Nacional de Transtornos Neurológicos y Accidentes Cardiovasculares (INTNAC, 2002)

Algunas manifestaciones clínicas son consideradas típicas de la EM, entre ellas se incluyen trastornos sensitivos-motores en uno o más miembros que se presentan en aproximadamente un 50% de los pacientes, neuritis óptica que se observa como síntoma inicial en el 25% de los pacientes, diplopía por oftalmoplejía internuclear, ataxia, vejiga neurogénica, fatiga, disartria, neuralgia del trigémino que se presenta en menos del 10%, nistagmo y vértigo (Domínguez *et al.*, 2012)

1.1.4. Epidemiología

Las edades media y mediana para el inicio de la EM son 30 y 23.5 años respectivamente, apareciendo cinco años antes en las mujeres que en los hombres, la forma primariamente progresiva aparece entre los 35 y 39 años, mientras la secundariamente progresiva suele presentarse entre los 40 y 44 años (Bermejo *et al.*, 2011) se calcula que aqueja aproximadamente 2 millones de personas en el mundo, con prevalencia en zonas de Norteamérica, Europa, Australia y Nueva Zelanda de 590 casos por cada 100,000 habitantes (Domínguez *et al.*, 2012). En México hay 20 mil casos, de los cuales solo 7 mil son tratados, con una incidencia de un varón por cada 2 mujeres (IMSS, 2017). Sabiendo cual es el grupo mayormente afectado y considerando que la EM es, en muchas ocasiones, incapacitante se puede decir que hay un gran impacto a nivel económico y emocional tanto en los pacientes como sus familias, puesto que se ve disminuida su productividad laboral y en algunos casos la capacidad de valerse por sí mismos. Es por ello que se destaca la necesidad de un tratamiento adecuado que les permita tener una mejor calidad de vida.

1.1.5. Tratamiento

Las lesiones de la EM no son reversibles y el tratamiento no frena completamente el avance de la enfermedad, por lo que es importante el inicio oportuno del tratamiento, que permita prevenir la formación de lesiones mayores y con ello la incapacidad, además de retrasar el curso de la enfermedad.

Los individuos que padecen EM utilizan tratamiento farmacológico constantemente, pues aun cuando pueden tener periodos de estabilidad, sufren de recaídas que deben ser controladas, además de requerir tratamiento para disminuir la sintomatología.

Es por ello que el tratamiento utilizado en la EM se divide en tres categorías, que incluyen el tratamiento de los brotes, tratamiento modificador de la enfermedad y tratamiento sintomático, además de la rehabilitación (Martínez *et al.*, 2015), estos son descritos en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Tratamiento en la esclerosis múltiple

Tipo	Objetivo	Tratamiento
Brotos	Reducen intensidad y duración de los ataques, aunque no se ha demostrado que afecten la evolución a largo plazo.	Glucocorticoides en altas dosis durante 3 a 5 días. La plasmaféresis y el uso de hormona adrenocorticotropa (ACTH) son otras alternativas ante la falla de los corticoides
Modificador de la enfermedad	Reducir el número de brotes y sus secuelas, así como frenar evolución de la enfermedad.	Primera línea: INF- β , acetato de glatimero, teriflunomida y dimetilfumarato. Segunda línea: fingolimod, natalizumab, alemtuzumab y mitoxantrona.
Sintomático	Mejora los síntomas derivados de la enfermedad	Espasticidad: baclofeno, gabapentina, tizanidina, entre otros. Fatiga: amantidina. Dolor: antiepilépticos o antidepresivos tricíclicos. Ataxia y temblor: isoniacida, carbamacepina o levetiracetam. Depresión. Antidepresivos tricíclicos o los ISRS.
Rehabilitación	Mejorar la calidad de vida en los pacientes	Fisioterapia, logopedia, terapia ocupacional, etc.

Basado en: Martínez et al (2015); Díaz y Jiménez (2016)

De acuerdo con la *tabla 2* podemos ubicar a los corticosteroides en el tratamiento de brotes. Siendo su acción principal la de reducir la inflamación responsable de desencadenar el brote, también conocido como exacerbación o recaída aguda, que se manifiesta clínicamente en el paciente. Los corticosteroides más utilizados y por ello incluidos en este estudio son: prednisona, metilprednisolona y dexametasona.

Uno de los esquemas utilizados en el tratamiento con corticosteroides es el de metilprednisolona 1-2g vía intravenosa por 3-7 días, continuado con dosis orales de prednisona por 13 días, 200mg los primeros 4 días, 100mg los siguientes 4 días y después ir disminuyendo 20 mg diariamente hasta retirar el fármaco (Domínguez *etl al.*, 2012).

1.1.5.1. Evaluación del tratamiento

Para determinar la respuesta al tratamiento y la evolución del paciente se toman en cuenta el número de recaídas, la escala expandida del estado de discapacidad, EDSS, por sus siglas en inglés, y la evidencia de cambios en la resonancia magnética (Domínguez *et al.*, 2012).

El EDSS es uno de los instrumentos más empleado para describir la progresión de la enfermedad y evaluar la eficacia terapéutica en los ensayos clínicos (Meyer *et al.*, 2014), y es una escala que mide aspectos distintos del deterioro neurológico y de las consecuencias personales, familiares y sociales (Domínguez *et al.*, 2012), en la *figura 2* se pueden observar los criterios de esta escala.



Figura 2. Escala EDSS para la evaluación clínica de la EM
Obtenido de Izquiero y Ruiz (2003)

No hay una recomendación clara de cómo interpretar los cambios en el valor de EDSS en la literatura, aunque algunos autores recomiendan una progresión de 1.0 como un cambio significativo para pruebas clínicas, según la guía de la Agencia Europea de Medicina (EMA, por sus siglas en inglés) sugieren que el cambio promedio a partir del inicio de un estudio no es un parámetro adecuado para medir la eficacia, recomendando definir el éxito o fracaso de un tratamiento, al alcanzar una puntuación de EDSS o un cambio determinado en el valor de EDSS (Meyer *et al.*, 2014). Para evaluar el aumento o disminución en el valor de EDSS se recomienda que este sea de 1 punto, cuando el EDSS base es igual o menor a 5.5 y de 0.5 puntos en valores de EDSS mayores 5.5 (Meyer *et al.*, 2014).

Utilizar esta escala además de evaluar el tratamiento nos permitirá el cálculo del índice de progresión (IP) de la enfermedad, que se obtiene dividiendo la puntuación obtenida en la

escala EDSS entre la duración de la enfermedad en años, obteniendo un puntaje cuya medida está en torno de 0.40 – 0.50 puntos/año (Carretero *et al.*, 2001).

1.2. Corticosteroides

Los corticosteroides también nombrados corticoides o glucocorticoides son moléculas derivadas del cortisol o hidrocortisona, con acción antiinflamatoria, antialérgica e inmunosupresora (Serra *et al.*, 2012). Su estructura se muestra en la *figura 3*.

Estos fármacos atraviesan la membrana celular fácilmente debido a su naturaleza liposoluble y una vez dentro de la célula se unen a un receptor intracelular ubicado en el citosol, para ello existen dos receptores de respuesta a corticosteroides: receptor de glucocorticoides (GR) y receptor de mineralocorticoides (MR), ambos muestran gran homología estructural pero diferente distribución tisular y afinidad por su ligando (Serra *et al.*, 2012).

El MR muestra mayor afinidad por corticosteroides endógenos como el cortisol, mientras que el GR muestra menor afinidad por el cortisol y unión preferencial a los corticosteroides sintéticos, cuando son utilizados en dosis terapéuticas (Krieger *et al.*, 2014).

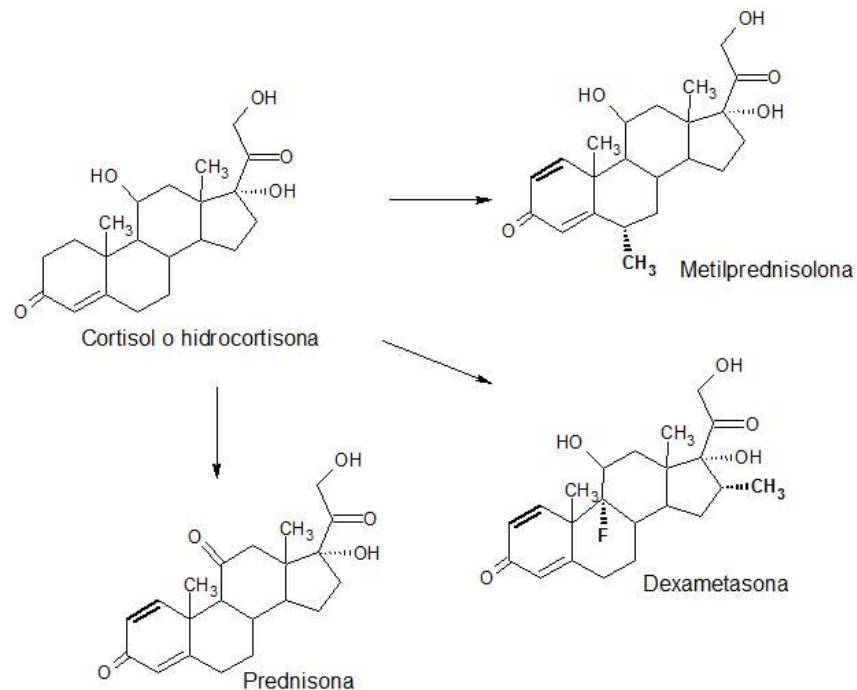


Figura 3. Estructura de los corticosteroides

En negritas se resaltan las modificaciones químicas que sufrió el cortisol para la síntesis de cada fármaco.

Modificado de Serra et al (2012).

El receptor se activa cuando se une a su ligando ya sea endógeno como el cortisol o un corticosteroide sintético. Una vez que esto sucede, el receptor se transloca al núcleo, donde

actúa en forma de dímero como factor de transcripción al unirse a regiones reguladoras del DNA llamadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) modulando de esta manera la expresión de genes que están implicados en el metabolismo y la respuesta inmune (Krieger *et al.*, 2014), el dímero también actúa inhibiendo algunos genes mediante la unión a elementos de respuesta negativa al glucocorticoide (nGRE) (Serra *et al.*, 2012).

Muchos de los genes que son activados poseen efectos antiinflamatorios, sin embargo, los mayores efectos relacionados con el control de la inflamación son secundarios a la inhibición de la síntesis de múltiples proteínas inflamatorias, a través de la supresión de determinados genes como la síntesis de quimiocinas, citocinas, moléculas de adhesión celular, etc. (Díaz, 2008)

Se considera que los corticosteroides actúan de dos maneras, la vía descrita previamente, que es conocida como el mecanismo genómico y otra que es mediante un mecanismo no genómico, el cual implica a la glicoproteína ácida receptora citosólica que modula la velocidad de descarga neuronal o modifica la recaptación extraneuronal de neurotransmisores, siendo relacionado a los cambios en el comportamiento como reacción adversa en el uso de corticosteroides, además en tejido linfocitario y hepático un GR monomérico de membrana interactúa con la maquinaria apoptótica promoviendo muerte o sobrevida, según la línea celular (Serra *et al.*, 2012).

El efecto genómico de los corticosteroides tiene una latencia y persistencia de horas a meses, mientras que el efecto no genómico es rápido, de inicio y persistencia fugaces (Serra *et al.*, 2012).

1.2.1. Farmacocinética

Al ingresar al organismo, algunos fármacos deben ser activados para ejercer su efecto, este es el caso de la prednisona que es un profármaco metabolizado en el hígado por la 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa a su metabolito activo prednisolona (Drozdik, 2017).

Como ya se ha mencionado antes, estos fármacos ingresan fácilmente a la célula por sus características liposolubles, sin embargo, la penetración lipofílica de la prednisolona hacia los tejidos está limitada por la Gp-P (Drozdik, 2017), un transportador transmembrana que actúa como una bomba de eflujo celular para varias sustancias, incluyendo los glucocorticoides (Nebesio *et al.*, 2016), por lo que también regula la concentración de dexametasona y metilprednisolona en los tejidos.

El metabolismo de estos fármacos es llevado a cabo en el hígado, donde pueden sufrir reacciones de reducción, oxidación e hidroxilación para ser posteriormente conjugados con ácido glucurónico o sulfato, de manera que adquieran mayor solubilidad y puedan excretarse (Rodríguez y Espinosa, 2016).

El citocromo P450 (CYP450) es uno de los complejos enzimáticos implicado en el metabolismo de fase I de varios fármacos y en este caso no es la excepción, pues las enzimas implicadas en el metabolismo de la prednisolona son el CYP3A4 y CYP3A5 (Quetglas *et al.*, 2015), que son isoenzimas de este complejo. La dexametasona (Whirl-Carrillo *et al.*, 2012) y la metilprednisolona (Quetglas *et al.*, 2015) también son sustratos del CYP3A4.

En la *figura 4* se muestran los metabolitos encontrados en orina, para cada fármaco en estudio, que en el caso de la prednisona, se considera el de su metabolito activo la prednisolona. En este caso es importante resaltar los metabolitos con hidroxilación en el carbono 6, pues basándonos en el hecho de que la 6 β - hidroxilación del cortisol es catalizada por el CYP3A4 y CYP3A5, además de que se ha demostrado que la hidroxilación en la posición 6 α y 6 β es mediada por CYP3A4 en microsomas hepáticos de humano *in vitro* (Varis, 2000), estos metabolitos podrían ser el resultado de la acción de CYP3A4 sobre prednisolona, dexametasona y metilprednisolona.

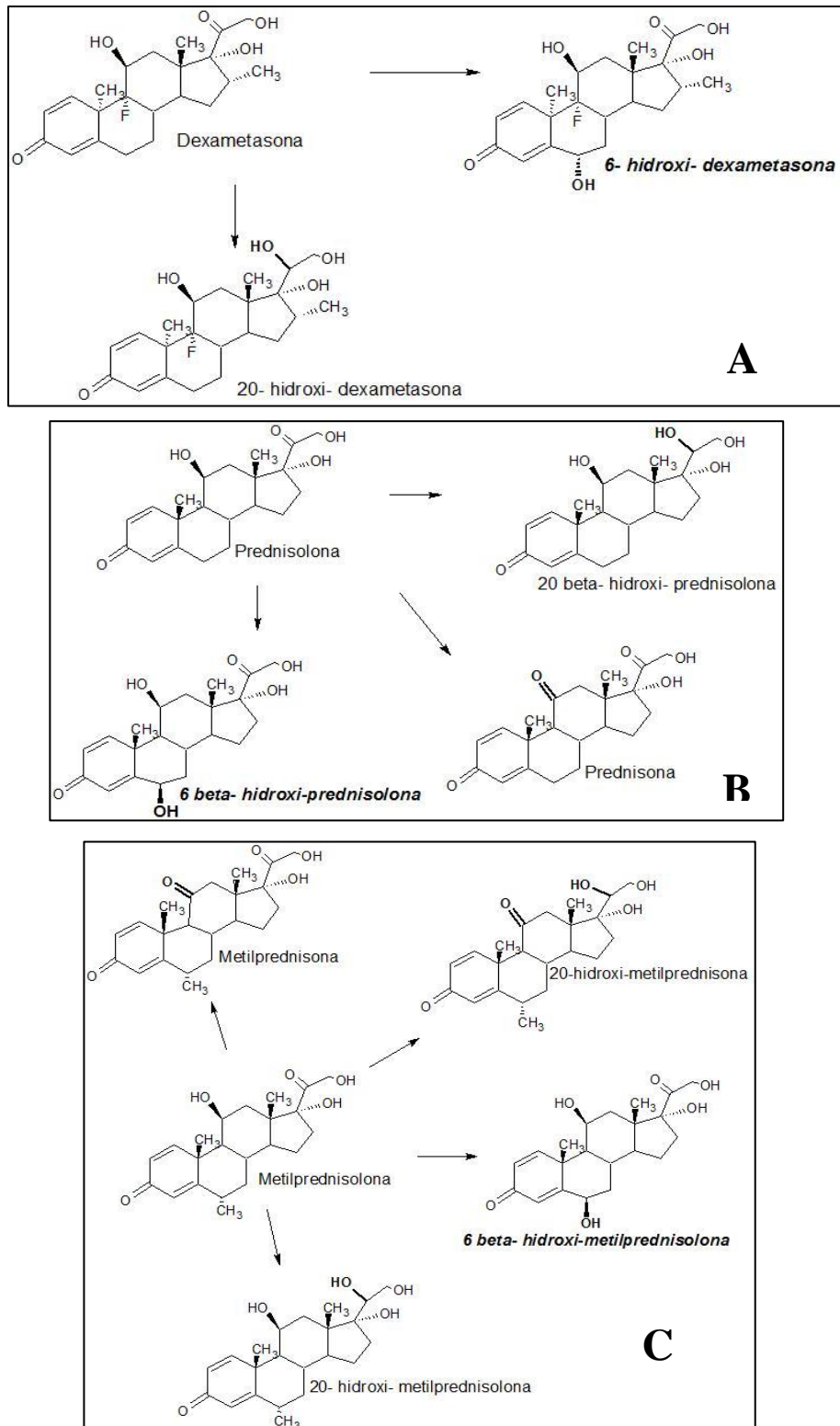


Figura 4. Principales metabolitos de la dexametasona, metilprednisolona y prednisolona

En negritas se indican las modificaciones metabólicas que sufrió el fármaco y en *italicas* se resaltan los metabolitos 6 hidroxilados. La sección A corresponde a metabolitos de dexametasona, la B metabolitos de prednisolona y la C de metilprednisolona. Modificado de Morales et al (2014).

1.2.2. Reacciones adversas

Si bien estos fármacos son utilizados por las ventajas de sus efectos terapéuticos, se sabe que también pueden provocar efectos indeseables (reacciones adversas medicamentosas, RAM), frecuentemente son eficaces en el tratamiento de las recaídas de la EM, aunque algunas veces han mostrado efectos adversos (Krieger *et al.*, 2014).

Los efectos que pueden presentarse durante el tratamiento con corticosteroides están agrupados en la *Tabla 3*, pueden variar de intensidad y gravedad, afectando la calidad de vida de los pacientes, por ello se buscan estrategias que apoyen en la elección de la terapia adecuada para cada paciente.

Tabla 3. Efectos adversos de los corticosteroides

Tipo de efecto	Efectos
Agudos	-Estimulación del SNC que conduce a cuadros psicóticos -Insuficiencia adrenal aguda -Síndrome de privación que incluye (astenia, anorexia, náuseas, mareos, cefaleas, mialgias, artralgias, fiebre, hipotensión ortostática, depresión, descamación dérmica, y eritema nodoso.
Crónicos	-Relacionado a hipercortisolismo por tratamiento crónico: Aspecto cushingoide, obesidad central, hiperglobulia, intolerancia a glucosa o hiperglucemia e hipercolesterolemia, osteoporosis u osteonecrosis, pérdida de masa muscular, depresión, disforia, insomnio, trastornos digestivos, edemas, alteraciones cutáneas. -Otros: Hipokalemia, trastornos reproductivos (amenorrea, infertilidad), cataratas, exoftalmos, aumento de presión intraocular e hipertensión endocraneana benigna, en pacientes pediátricos retardo en la estatura

Basado en Serra et al (2012).

Por lo general se relaciona la presentación de efectos adversos con el uso crónico de estos agentes, sin embargo, hay casos de pacientes que han mostrado efectos adversos intolerables con cursos cortos de corticosteroides, siendo los efectos más comunes el insomnio, labilidad emocional (depresión, irritabilidad, euforia y rara vez psicosis), dispepsia, dolor de cabeza e hipertensión (Frohamn *et al.*, 2007).

1.2.2.1. Genética en las RAM

La genética es uno de los factores que está implicado en la forma en la que un individuo puede responder a un tratamiento farmacológico, así como en la susceptibilidad para presentar alguna reacción adversa. La diferencia en la respuesta a los fármacos puede indicar

la existencia de conjuntos de variantes en un individuo o en una población (Roden *et al.*, 2011).

Las variantes en el DNA pueden determinar la síntesis de enzimas (con actividad aumentada, disminuida o nula) que tengan capacidad ya sea para activar un fármaco para que actúe, mantenerlo en el organismo el tiempo suficiente para que ejerza su acción y de eliminarlo, ocasionando que un individuo tenga buena respuesta, presente severos efectos adversos o que no se beneficie del fármaco (Ortiz y Tabak, 2012).

Por ello existe la farmacogenética y la farmacogenómica, la primera se refiere al estudio de los aspectos genéticos relacionados con la variabilidad de la respuesta a los medicamentos, en individuos o poblaciones, mientras que la segunda es definida como la aplicación del estudio de la variabilidad genética, en las distintas formas de respuesta en los individuos, debida, entre otros factores, a la capacidad metabólica de dicho sujeto (Ortiz y Tabak, 2012). Su estudio resulta de gran importancia pues facilita la identificación de biomarcadores que permiten optimizar la selección de fármacos, dosis y duración del tratamiento, así como la prevención de reacciones adversas a fármacos (Wang *et al.*, 2012).

Los genes que se encuentran asociados con la seguridad o eficacia terapéutica reciben el nombre de farmacogenes y pueden clasificarse en cuatro categorías que incluyen: farmacocinéticos, farmacodinámicos, modificadores de la enfermedad y genes de procesos neoplásicos (Ortiz y Tabak, 2012).

Entre los genes más estudiados se encuentran los que codifican para las enzimas del citocromo P450 pues tienen un papel muy importante en la absorción, metabolismo e inactivación de fármacos, siendo algunas de las principales la 2D6, 2C9, 2C19, 1A2, 3A4 y 3A5 (Ortiz y Tabak, 2012). Además del gen *ABCB1* que codifica para la Glicoproteína P (Gp-P), que es la encargada de mediar el paso de algunos fármacos hacia la luz intestinal y se considera responsable del fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (Ortiz y Tabak, 2012).

En este estudio se incluyeron a los genes *CYP3A4* y *ABCB1*, que pertenecen a la categoría de los farmacocinéticos, es decir que se encuentran relacionados ya sea a la absorción, distribución, metabolismo o eliminación de los fármacos. Siendo de interés para este análisis porque entre sus sustratos se encuentran los corticosteroides.

Además, estos genes son de gran importancia en el organismo porque en conjunto establecen maquinaria de detoxificación del cuerpo, pues mientras la Gp-P se encarga de expulsar sustancias (endógenas y exógenas) de la célula, *CYP3A4* inactiva los compuestos tóxicos del organismo, por lo que, al alterarse la funcionalidad de alguno o ambos, puede resultar en acumulación o eliminación acelerada de estas sustancias. Considerando que la Gp-P se encarga de expulsar a los corticosteroides de la célula y *CYP3A4* es su principal enzima

metabolizadora, las alteraciones en el funcionamiento de estas proteínas puede provocar el fallo terapéutico o la presentación de efectos adversos.

Es por esto, que en este trabajo se estudiará la presencia de variantes genéticas en pacientes de EM, así como las variaciones en respuesta al tratamiento, de manera que se pueda observar si hay individuos que muestren respuesta adecuada (respondedores) y que no muestren respuesta ante la terapia (no respondedores), así como RAM, relacionadas a las variantes genéticas encontradas en la población

1.3. Gen *ABCB1*

Los genes ABC (cassette de unión a ATP) son importantes en la multiresistencia a fármacos y uno de sus integrantes es *ABCB1* (cassette de unión a ATP subfamilia B miembro 1), que es uno de los transportadores de fármacos mejor caracterizados (Islam *et al.*, 2005), también es conocido como gen de resistencia a múltiples fármacos 1 (*MDR1*) y su producto recibe el nombre de glicoproteína P (Gp-P) (Uhr *et al.*, 2008).

El gen *ABCB1* se encuentra en el cromosoma 7q21.12, abarca una región de 209.6kb y contiene 29 exones (Hodges *et al.*, 2011). El promotor contiene una caja GC y una caja CCAAT invertida (Brambilla, 2013), esta región contiene algunos polimorfismos de baja frecuencia y en comparación con otros genes es relativamente invariante (Hodges *et al.*, 2011).

Los principales factores de transcripción de este gen son el EGR1, NF-IL6 y SXR/PXR, mientras que hay diversas moléculas inductoras tanto endógenas como exógenas (Brambilla, 2013). Entre los inductores exógenos podemos encontrar diversos fármacos como la digoxina, cisplatino, rifampicina y doxorubicina (Brambilla, 2013)

1.3.1. Características de la proteína

Las proteínas transportadoras ABC tienen dos dominios funcionales, el primero está anclado a la membrana por su estructura alfa hélice, el segundo que es un dominio de unión a nucleótidos (NBD por sus siglas en inglés) está unido a ATP que provee la energía necesaria para el cambio conformacional y permite el transporte de compuestos a través de la membrana (Escalante *et al.*, 2014). La estructura general de los miembros de esta familia puede observarse en la *figura 5*.

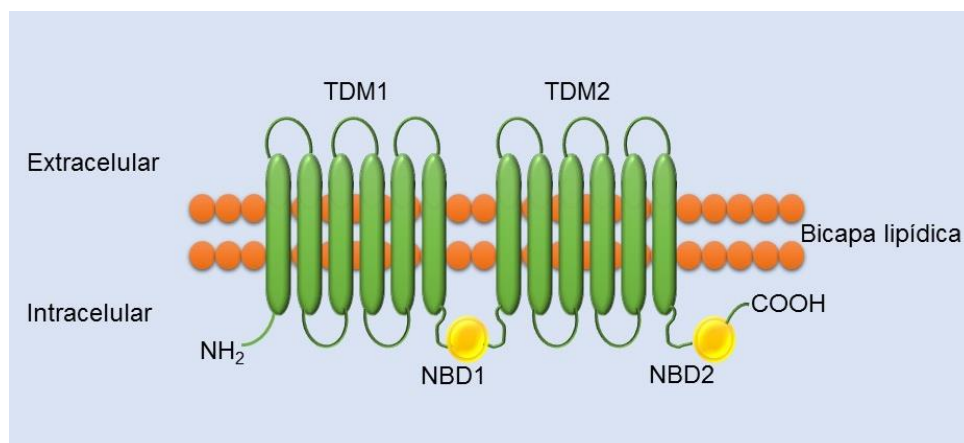


Figura 5. Estructura de los transportadores ABC
Modificado de Choudhuri y Klaassen (2006).

La Gp-P contiene 1280 aminoácidos en su cadena, su estructura secundaria muestra dos regiones homólogas que contienen seis dominios transmembrana y un dominio de unión a nucleótidos (Hodges *et al.*, 2011).

Las 12 hélices transmembrana forman una proteína con forma toroidal similar a un poro acuoso, los aminoácidos que contiene este poro son hidrófobos y aromáticos en la parte extracelular, mientras que aquellos ubicados en el citosol son polares y cargados (Hodges *et al.*, 2011). Muchos de los aminoácidos altamente conservados que se encuentran formando este poro reconocen distintos sustratos (Hodges *et al.*, 2011).

El mecanismo de la Gp-P no está esclarecido, sin embargo, el modelo más aceptado para explicar el funcionamiento de esta proteína es llamado bomba de vacío hidrofóbica, en la que el sustrato interactúa directamente con el sitio de unión a fármacos de la proteína, para ser bombeado al espacio extracelular con ayuda de la hidrólisis de ATP a ADP (Fung y Gottesman, 2009). Es expresada en la membrana plasmática de las células en órganos de eliminación y barrera, donde tiene funciones protectoras y excretoras (Hodges *et al.*, 2011). Los tejidos donde puede encontrarse son: intestino, barrera hematoencefálica, hígado, riñón, páncreas, corteza adrenal y placenta (Brambilla, 2013).

En las barreras hematoencefálica y hematotesticular transporta sustratos fuera de los tejidos, mientras que en el intestino limita su absorción, además de estar implicado en la excreción de sus sustratos en orina, acelerando el aclaramiento renal (Leschiziner *et al.*, 2007). Por lo tanto, se considera que la Gp-P está muy relacionada con la biodisponibilidad y limitación de la citotoxicidad de un amplio rango de sustancias, fármacos y xenobióticos, incluidos iones, azúcares, glicanos, fosfolípidos, proteínas, fármacos anticancerígenos, antibióticos, corticosteroides, inmunosupresores, bloqueadores de canales de calcio entre otros (Brambilla, 2013).

1.3.2. Variantes

Este gen puede asociarse a la variabilidad interindividual en la respuesta a fármacos debido a alteraciones en su expresión o función provocadas por algunos polimorfismos, las variantes pueden actuar alterando residuos de aminoácidos, genes promotores o secuencias de unión, así como la estabilidad del mRNA (Leschiziner *et al.*, 2007).

Hay unos 1279 SNPs en la región del gen *ABCBI*, de los cuales 62 son codificantes (22 sinónimos, 42 no sinónimos y uno en el codón de inicio) (Hodges *et al.*, 2011).

Los más estudiados son: rs1128503 (*C1236T*), rs2032582 (*G2677T/A*) y rs1045642 (*C3435T*) (Escalante *et al.*, 2014), siendo el centro de diversos estudios farmacocinéticos y de asociación con enfermedades, con resultados muy controversiales (Hodges *et al.*, 2011). Se han asociado con modificaciones funcionales dependientes de sustrato o de inhibidor, en estudios *in vitro*, y de expresión reducida en tejidos (Brambilla, 2013), a continuación, se abordará más a fondo cada una de estas variantes.

1.3.2.1. *C1236T* rs1128503

Está localizado en el exón 12 que codifica una región esencial para la unión con el sustrato, no provoca cambio del aminoácido en la posición 412Gly (Brambilla, 2013). Aunque existe la posibilidad de que este SNP genere un sitio de pausa para el ribosoma, afectando el plegamiento, es decir el efecto de esta mutación podría ser el resultado del empleo de un codón raro (cambio de GGC a GGT), similar a lo que sucede con el SNP *C3435T* (Fung y Gottesman, 2009).

Sin embargo, parece no cambiar la expresión de la proteína o su función y no estar relacionada con cambios en la estabilidad del RNAm (Fung y Gottesman, 2009). Y aunque en muchos estudios se ha intentado caracterizar la asociación de este SNP con algún fenotipo, en la literatura no se ha logrado llegar a un consenso, por ejemplo, en algunos estudios se ha encontrado un incremento en la exposición al fármaco o en la respuesta asociados con el genotipo 1236 CC, el genotipo 1236 TT, o ningún efecto relacionado al SNP (Hodges *et al.*, 2011).

De acuerdo a un estudio realizado en pacientes con esquizofrenia tratados con risperidona, se encontró que esta variante estaba implicada en la respuesta clínica, pues los homocigotos TT tenían mayor porcentaje en la escala BPRS (evalúa síntomas psicóticos y puede utilizarse en la valoración de la respuesta farmacológica, diagnóstico y clasificación sindrómica de pacientes psicóticos) a las 8 semanas de tratamiento, lo cual los llevó a sospechar de baja expresión y funcionamiento de la Gp-P en la BHE en el genotipo TT, de manera que una disminución de la función de eflujo de la risperidona puede aumentar su concentración en cerebro y asociarse con la mayor eficacia, sin embargo, no se encontraron evidencias de mayor concentración del fármaco con respecto a otros genotipos (Xing *et al.*, 2006).

Por otra parte, en un estudio con adolescentes italianos en tratamiento inmunosupresor posterior a trasplante de riñón, se encontró una reducción importante de la concentración de tacrolimus, provocando un ajuste de dosis, en pacientes con el genotipo TT, lo que se atribuyó a un aumento en el metabolismo del fármaco en las personas con este genotipo (Turolo *et al.*, 2010). Además, en un estudio realizado por Wasilewska *et al* (2007), concluyen que la variante 1236T podría ser un marcador en pacientes con respuesta lenta a prednisona oral.

Se ha demostrado que esta variante puede afectar el plegamiento de la proteína en conjunto con el SNP *C3435T*, provocando una disminución en el efecto de algunos inhibidores y probablemente la disminución de la actividad (Brambilla, 2013).

Su frecuencia varía de un 30 a 93% dependiendo del grupo étnico de los individuos, por ejemplo, el alelo de menor frecuencia en asiáticos es el C, mientras que en africanos es el T (Hodges *et al.*, 2011), en la *Tabla 4* se muestran las frecuencias de este alelo en diferentes poblaciones.

1.3.2.2. G2677 T/A rs2032582

Este SNP se localiza en el exón 21, genera una sustitución de Alanina por Serina o Treonina (Ala893Ser/Thr) (Brambilla, 2013), de manera que hay un cambio de un residuo lipofílico por uno hidrofílico, por lo que posiblemente esta sustitución podría afectar la precisión geométrica del sitio de interacción y su estructura secundaria (Xing *et al.*, 2006).

Muchos estudios han mostrado que este polimorfismo está implicado en la expresión y en la actividad de la Gp-P (Xing *et al.*, 2006). Aunque sus efectos son controversiales pues se ha reportado que hay incremento en la función de eflujo cuando el alelo T está presente, mientras que otros han demostrado disminución de la función, en tanto que hay quienes no encontraron efectos, sin embargo, esto ha sido explicado por un efecto dependiente del sustrato (Brambilla, 2013). Además, en análisis bioquímicos se muestra que la presencia del alelo T o A pueden alterar la inducción de la actividad ATPasa (Brambilla, 2013).

En el estudio de Wasilewska *et al* (2007), se encontró que los pacientes que presentaban el alelo 2677T tendían a responder con menor rapidez a glucocorticoides, ellos identificaron a la variante 2677TA en pacientes con respuesta lenta a la prednisona oral, en contraste con otro estudio hecho en células de mamífero transfectadas con un plásmido que contenía la variante 2677T, donde se encontró que estas acumulaban menor cantidad de digoxina que las células con la variante 2677G (Wasilewska *et al.*, 2007).

Muchos estudios del polimorfismo *G2677T/A* y los niveles de expresión en el mRNA han mostrados resultados negativos, excepto un estudio en el cual se reportó la asociación del genotipo GG y la reducción en la expresión del RNAm (Leschiziner *et al.*, 2007).

Al igual que el SNP *C1236T*, el *G2677T/A* ha demostrado que en combinación con otros SNP funcionales, como el *C3435T*, puede presentar un gran impacto al cambiar la estructura tridimensional y disminuir el efecto de algunos inhibidores (Brambilla, 2013)

La frecuencia de individuos portadores del alelo T varía mucho entre la población mundial de un 2- 65% según datos del proyecto HapMap, por otra parte los homocigotos GG tienen una frecuencia del 81% en población africana comparada al 10-32% encontrado en Indio Americanos, Mexicanos, Italianos, Asiáticos y Caucásicos, mientras que el alelo A es relativamente infrecuente presentándose de un 0- 17% en las diferentes etnias poblacionales (Hodges *et al.*, 2011), en la *tabla 4* se encuentran las frecuencias de los alelos en distintas poblaciones.

1.3.2.3. C3435T rs1045642

El SNP *C3435T* está localizado en el exón 26, no cambia el aminoácido de la posición 1145 (Ile) que se encuentra en el segundo dominio de unión a ATP (Brambilla, 2013).

El alelo 3435T ha sido asociado con la disminución en la expresión de Gp-P en estudios hechos en tejidos como placenta, hígado y leucocitos, aunque en los estudios *in vitro* no hay evidencia que confirme su asociación con la expresión de la proteína, por lo que otra hipótesis plantea que este alelo disminuye la estabilidad del mRNA (Brambilla, 2013).

En uno de los primeros estudios donde se encuentra relación de las variantes en el funcionamiento de la Gp-P, la variante alélica 3435T se relacionó con la reducción de la expresión de la Gp-P en duodeno de caucásicos saludables, de acuerdo a este hallazgo la concentración de digoxina en el plasma de estos sujetos se encontraba elevada, lo que llevó a pensar en una mejor absorción intestinal del fármaco debido a los bajos niveles intestinales de la Gp-P, sin embargo, los hallazgos recientes no coinciden con esto pues hay reportes donde no se encuentra cambio en el aclaramiento de la digoxina en sujetos caucásicos que tienen el alelo 3435T o el alelo silvestre 3435C, además de haber reportes de expresión elevada en sujetos japoneses que portan el alelo 3435T, así como en sujetos caucásicos (Choudhuri y Klaassen, 2006).

El alelo 3435T también ha sido asociado como un marcador de buena respuesta al tratamiento con esteroides, pues en pacientes pediátricos de trasplante cardíaco los niños que fueron homocigotos para el alelo T se asociaron a una mejor respuesta a los esteroides tras un año del trasplante, en comparación con aquellos que presentaban el polimorfismo 3435 CC y 2677 GG, además, otro estudio mostró que el genotipo TT en las posiciones 3435 y 2677 estaban asociados a un menor riesgo de presentar osteonecrosis de cabeza femoral posterior al trasplante renal en pacientes japoneses (Wasilewska *et al.*, 2007). Aunque en ambos estudios se muestra mejor respuesta al tratamiento ante el genotipo TT, la interpretación que le dieron a sus resultados fue distinta, pues en el primer estudio asociaron este genotipo a una

baja actividad de la Gp-P, mientras que en el segundo lo asoció a mayor actividad (Wasilewska *et al.*, 2007).

En el estudio realizado por Wasilewska *et al* (2007), donde se analizó la relación entre polimorfismos del gen *MDR-1* y parámetros indicadores del curso clínico, así como la respuesta al tratamiento de niños con síndrome nefrótico con respuesta a esteroides (SRSN por sus siglas en inglés), mostraron asociación entre el genotipo TT y el aumento del tiempo necesario para eliminar la proteinuria después de comenzar la administración oral de glucocorticoides, también se encontró asociación con las recaídas, pacientes con el genotipo TT tuvieron una alta prevalencia en niños con SRSN y recaídas frecuentes, por lo que se podría establecer una relación entre el genotipo TT y el potenciamiento de la función basal de la Gp-P o su sobre regulación por parte de la prednisolona (Wasilewska *et al.*, 2007).

Por otra parte, *in vitro*, se ha detectado una disminución en la función, diferencia en la especificidad del sustrato y la conformación de la proteína cuando están los SNP *C3435T*, *C1236T* y/o *G2677T*/, este efecto es explicado por alteraciones durante el ensamblaje del ribosoma y el codón alterado, provocando una conformación terciaria que cambia la función de la proteína con una disminución en el efecto de los inhibidores (Brambilla, 2013).

Esta variante muestra una gran variedad interétnica en sus frecuencias, el alelo 3435C varía de un 34-90% entre las poblaciones (Hodges *et al.*, 2011), las frecuencias de distintas poblaciones se muestran en la *tabla 4* y se utilizarán para compararlas con las de la población obtenida en este trabajo.

1.3.2.4. Haplotipos

Como se ha dicho anteriormente los SNP estudiados en este trabajo, han mostrado que al encontrarse juntos pueden provocar un mayor impacto en el funcionamiento de la Gp-P.

Además, varios de los polimorfismos del gen *ABCB1* tienen un fuerte desequilibrio de ligamiento que deriva en una diversidad de haplotipos, considerándose este como un factor responsable de provocar las inconsistencias en los estudios donde se intentan relacionar polimorfismos de este gen con ciertos fenotipos, en diferentes grupos étnicos (Wasilewska *et al.*, 2007), es por eso que en este estudio también se evaluarán los haplotipos presentes en la población y su relación con la respuesta a corticosteroides.

En el trabajo realizado por Wasilewska *et al* (2007), se encontró que la distribución de haplotipos era significativamente distinta entre individuos con respuesta temprana y tardía a esteroides, aquellos con respuesta temprana tuvieron una mayor frecuencia en el haplotipo GCG que los de respuesta tardía (63 vs 32 %), mientras que el haplotipo más común en los de respuesta tardía fue el TTT (los otros dos haplotipos TTC y CTT) contenían el alelo T en la posición 2677 y fueron solo observados en los respondedores tardíos. Además, observaron

que el promedio de días que pasaron para la remisión fue más bajo en individuos homocigotos para el haplotipo CGC y más alto en homocigotos para el haplotipo TTT.

Sin embargo, los estudios de asociación de haplotipos han mostrado datos no concluyentes, pues el haplotipo TTT ha sido asociado con el incremento en los niveles de irinotecán, contrastado a otros datos que lo relacionan al aumento en la eliminación de la fexofenadina; mientras que homocigotos CGC/CGC mostraron asociación con incremento en la farmacorresistencia a tratamientos con antiepilépticos en un estudio, pero con los haplotipos CGC y TTT en otro estudio (Hodges *et al.*, 2011).

Los haplotipos más frecuentes, muestran al polimorfismo *C3535T* combinado con los polimorfismos *C1236T* y/o *G2677T/A*, su frecuencia también varía de acuerdo con origen étnico, en individuos africanos se encontró una mayor frecuencia del haplotipo CGC y no del TTT, con resultados similares en personas caucásicas, mientras que en la población asiática e india el predominante es el TTT (Fung y Gottesman, 2009).

1.4. Gen *CYP3A4*

Los citocromos P450 son una superfamilia de enzimas capaces de catalizar la biotransformación oxidativa de muchos fármacos y otros xenobióticos liposolubles (Zanger y Schwab, 2013).

En humanos hay 57 genes putativos funcionales y 58 pseudogenes que son codificados en clusters distribuidos a través de los cromosomas autosómicos, están agrupados de acuerdo a la similitud de su secuencia en 18 familias y 44 subfamilias, una de ellas es la familia CYP3 que consiste solo de una subfamilia, en humanos, *CYP3A* que está localizada en el cromosoma 7q22.1 y tiene un tamaño de 231Kb, compuesta por los cuatro genes *CYP 3A4*, *3A5*, *3A7* Y *3A43* (Zanger y Schwab, 2013).

Este gen ha sido secuenciado y su longitud es de 27kb, con 13 exones, su promotor contiene un elemento de transcripción basal (-35 a -50) y tiene otros posibles elementos en la región 5' no traducida, como AP-3, p53, el elemento de respuesta a glucocorticoides GRE y algunas secuencias del elemento receptor de estrógenos (Guengerich, 1999)

1.4.1. Características de la proteína

El *CYP3A4* y la Gp-P muestran un gran solapamiento en sus sustratos; esto, junto con la coordinación de la regulación y expresión de estas dos proteínas, las implica como protectoras del organismo ante toxinas de la dieta y ambiente (Choudhuri y Klaassen, 2006).

Se expresa en hígado y en el tracto gastrointestinal (Reyes *et al.*, 2008), siendo una de las isoformas más abundantes (Zanger y Schwab, 2013).

Su sitio activo es grande y flexible de manera que puede acomodar y metabolizar preferencialmente compuestos lipofílicos con estructura grande (Zanger y Schwab, 2013). Se encuentra implicado en el metabolismo de una amplia variedad de fármacos tales como: inmunosupresores, bloqueadores de canales de calcio, agentes quimioterapéuticos, antihistamínicos, sedantes y estrógenos sintéticos (Reyes *et al.*, 2008).

Funciona eficientemente como una hidroxilasa esteroidea y participa en el catabolismo de varios esteroides endógenos como la testosterona, progesterona, androstenediona, cortisol y ácidos biliares (Zanger y Klein, 2013), catalizando la 6 β -hidroxilación de los esteroides (Johns Hopkins University, 2008). Es por ello que su estudio en la eficacia del tratamiento con fármacos esteroides (corticosteroides) resulta de gran importancia.

1.4.1.1. Variante *CYP3A4*1B* rs2740574

Las enzimas CYP muestran una gran variación genética entre individuos, mostrando deficiencia en el 1-30% de la población, dependiendo de su etnia (Sol *et al.*, 2013).

El funcionamiento del *CYP3A4* puede verse alterado por variantes en el gen, que en la mayoría de los casos implican pérdida de función, en mayor medida cuando los polimorfismos afectan splicing y expresión, que cuando afectan transcripción o estructura proteica; mientras que hay ganancia de función en las variantes del número de copias (CNV) que repercutan en incremento del número de copias funcionales del gen, así como variantes en el promotor y en aminoácidos que resultan en incremento de la utilización del sustrato, sin embargo pocas variantes afectan la selectividad del sustrato o la inducibilidad de las vías metabólicas de algún fármaco (Zanger y Schwab, 2013).

En el gen *CYP3A4* se han observado polimorfismos que afectan el tratamiento de varias enfermedades al modificar el metabolismo de los fármacos (Sol, et al, 2013), uno de los más estudiados, es la variante del promotor proximal *CYP3A4*1B* [392A-G] rs2740574 (Zanger y Klein, 2013), que ha sido asociada al potenciamiento de la actividad del *CYP3A4* (Shi *et al.*, 2015). Sin embargo, los efectos funcionales de esta variante no están completamente dilucidados, debido a los resultados mostrados en distintos estudios (Zanger y Klein, 2013).

Por una parte, se cree que este polimorfismo incrementa la expresión por un cambio en la afinidad de unión con el factor de transcripción, coincidiendo con estudios que han demostrado aumentar la eliminación de fármacos anticancerígenos, docetaxel y la ciclofosfamida, comparado con individuos normales (Sol *et al.*, 2013).

En contraparte, se le ha sido asociado con una disminución en la hidroxilación de la quinina (Reyes *et al.*, 2008) y en un estudio, donde se monitoreó el contenido de midazolam en individuos sanos, se encontró que los homocigotos mutantes para *CYP3A4*1B* tenían una disminución del 30% en la velocidad de aclaramiento del midazolam, comparados a los homocigotos normales (Liu *et al.*, 2017).

La frecuencia de este polimorfismo es considerablemente variable entre diferentes poblaciones, la variante alélica muestra una frecuencia del 3.6% en americanos blancos, 54.6% en americanos africanos, 9.3% en americanos hispánicos y un 0% en americanos japoneses y chinos (Albekairy *et al.*, 2013), en la *tabla 4* se recopilaron las frecuencias encontradas en las distintas poblaciones.

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes C1236T, G2677T/A y C3435T del gen ABCB1 y CYP3A4*1B entre poblaciones

<i>Variante</i>	<i>Alelo/Genotipo</i>	MM	LAM ***	C ***	P ***	A ***	EA ***	SA ***	E ***
<i>C1236T</i>	C	.49*	.53	.57	.67	.86	.37	.41	.58
	T	.50*	.47	.43	.33	.14	.63	.59	.42
	CC	.24*	.27	.35	.41	.74	.16	.17	.33
	TT	.25*	.20	.20	.07	.02	.41	.35	.17
	CT	.52*	.53	.45	.52	.24	.43	.48	.50
<i>G2677T/A</i>	G	.50*	.547	.537	.588	.980	.468	.358	.573
	T	.42*	.406	.415	.294	.020	.398	.592	.410
	A	.07*	.047	.048	.118	.001	.134	.050	.018
	GG	.23*	.28	.29	.33	.962	.22	.13	.32
	TT	.16*	.14	.18	.05	.002	.17	.36	.16
	AA	.00*	.02		.01		.02		
	GT	.46*	.50	.44	.40	.035	.36	.41	.49
	GA	.09*	.03	.06	.12		.14	.04	.02
TA	.06*	.03	.03	.09	.002	.09	.06	.01	
<i>C3435T</i>	C	.49*	.52	.56	.62	.85	.60	.43	.48
	T	.51*	.48	.44	.38	.15	.40	.57	.52
	CC	.23*	.25	.32	.36	.723	.38	.19	.23
	TT	.25*	.20	.20	.12	.023	.17	.34	.27
	CT	.52*	.55	.48	.52	.254	.45	.47	.50
<i>CYP3A4*1B</i>	A		.93	.90	.97	.23	.996	.96	.97
	G	.088**	.07	.10	.03	.77	.004	.04	.03
	AA	.833**	.86	.82	.93	.06	.992	.922	.946
	GG	.009**		.02		.60		.002	.002
	AG	.157**	.15	.16	.07	.34	.008	.076	.052

MM: Mestizo Mexicanos, LAM: Habitantes de los Ángeles California con ancestría mexicana, C: Colombianos, P: Peruanos, A: Africanos, EA: Este de Asia, SA: Sur de Asia, E: Europeos. Basado en: Ortega *et al* (2015)*; Reyes *et al* (2008)** y datos del proyecto 1000 genomas Zerbino *et al* (2017)***

2. Justificación

La esclerosis múltiple es una enfermedad altamente incapacitante que afecta a población en edad productiva, por lo que es de gran importancia ofrecerles un tratamiento eficaz que evite, controle y/o disminuya los efectos incapacitantes de las remisiones o brotes, con efectos adversos mínimos o nulos que les permita tener una mejor calidad de vida.

Considerando que uno de los factores implicados en la respuesta individual, así como en la posibilidad de presentar reacciones adversas a medicamentos son aquellos de origen genético, en este estudio se analizará la presencia de variantes relacionadas al funcionamiento alterado de las proteínas codificadas por los genes *ABCB1* y *CYP3A4* que están relacionadas en el transporte y metabolismo, respectivamente, de la dexametasona, metilprednisolona y prednisona.

En otros trabajos se ha reportado variabilidad en la función de la enzima, codificada por *CYP3A4*, y la proteína Gp-P, codificada por el gen *ABCB1*, cuando se encuentran los SNP *CYP3A4*1B*, *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*, siendo la base para plantear la posibilidad de que determinar la presencia de estos SNP en la población, permitirá predecir la eficacia del tratamiento en los pacientes y disminuir o eliminar las reacciones adversas.

Esto en pacientes con EM que han recibido tratamiento con estos corticosteroides recurrentemente, de manera que permita esclarecer si hay asociación entre la presencia de los SNP *C1236T*, *G2577T/A*, *C3435T* y *CYP3A4*1B* con la respuesta al tratamiento y la presencia de RAM de los fármacos corticosteroides de uso más común en el tratamiento de brotes de EM.

3. Hipótesis

Las variantes *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1*, así como el alelo *CYP3A4 *1B* predisponen a los pacientes con esclerosis múltiple a mostrar alteraciones en la respuesta y a presentar reacciones adversas al tratamiento con los corticosteroides: dexametasona, metilprednisolona y prednisona.

4. Objetivos

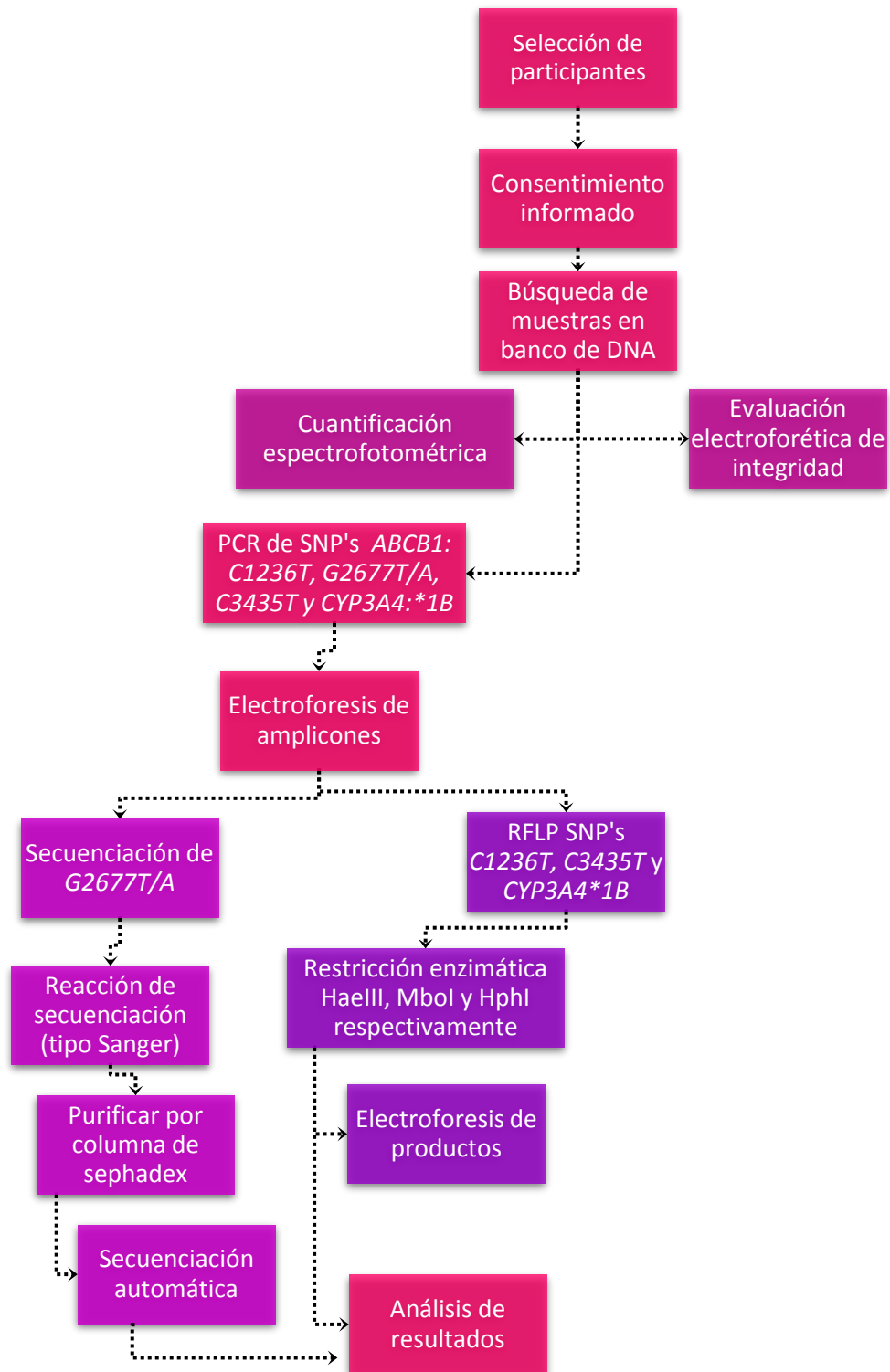
4.1. Objetivo General

Determinar la influencia de los polimorfismos más comunes de los genes *ABCB1* (*C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*) y *CYP3A4* (**1B*) en la eficacia del tratamiento inmunosupresor con metilprednisolona, prednisona y dexametasona, así como en la generación de reacciones adversas, mediante la genotipificación de pacientes con EM, de esta manera saber si estas variantes podrían funcionar como marcadores del pronóstico del tratamiento con corticosteroides.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar las frecuencias de genotipos y alelos para los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1*, y **1B* del gen *CYP3A4* en pacientes mexicanos con esclerosis múltiple.
- Determinar la frecuencia de pacientes con alteraciones en la respuesta al tratamiento inmunosupresor en la muestra de estudio (respuesta nula, intermedia y presencia de RAM).
- Determinar la asociación de los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1*, y **1B* del gen *CYP3A4* con la respuesta al tratamiento.
- Determinar la asociación de los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1*, y **1B* del gen *CYP3A4* con el desarrollo de reacciones adversas a medicamentos.
- Determinar la frecuencia de haplotipos encontrados en la población estudiada.
- Determinar si existe relación entre los haplotipos más frecuentes con la presentación de RAM y la respuesta al tratamiento.

5. Diagrama metodológico



6. Metodología

6.1. Selección de participantes

Se seleccionaron individuos con diagnóstico de esclerosis múltiple, que recibieron algún corticosteroide durante su tratamiento farmacológico.

Se incluyeron 83 pacientes que previamente firmaron un consentimiento informado, donde se les explicó el uso de sus datos y muestras, además de resolver sus dudas acerca de la participación.

Fueron utilizados los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Nacionalidad mexicana (padres y abuelos mexicanos)
- Diagnóstico de esclerosis múltiple
- Pacientes que en algún momento fueron tratados con corticosteroides
- Género indistinto

Criterios de exclusión:

- Diagnóstico de enfermedad desmielinizante distinta de esclerosis múltiple
- Padres y/ abuelos que no sean mexicanos

Criterios de eliminación

- El diagnóstico de esclerosis múltiple fue descartado o se cambió por el de otra enfermedad.
- Muestras de DNA con baja calidad, que impedirían llevar a cabo el procedimiento experimental

Los datos anteriores y otros datos clínicos como edad, sexo, EDSS e IP fueron obtenidos del historial clínico recopilado por los médicos tratantes.

6.2. Obtención de muestra sanguínea

Con la finalidad de extraer el DNA genómico a partir de linfocitos de sangre periférica, se obtuvo muestra de sangre mediante punción venosa con sistema al vacío, siendo recolectada en tubos con ACD (ácido cítrico y dextrosa) para impedir su coagulación.

6.3. Extracción de DNA

Para eliminar los eritrocitos y dejar únicamente los linfocitos, se llevó a cabo un procedimiento de lisis con buffer TTS (Tris- Tritón x100- Sacarosa) que provoca la ruptura de los eritrocitos por choque osmótico y disuelve sus membranas.

Los restos de los eritrocitos rotos son separados de los linfocitos mediante centrifugación a 5000 rpm a 4°C. De manera que en el sedimento se encuentran los linfocitos y en el sobrenadante los residuos de eritrocitos rotos.

Una vez que se ha obtenido un botón de linfocitos limpio, este pasa por una serie de pasos que permitirán liberar y extraer el DNA de su núcleo celular. Esto implica agregar NaCl 0.5 mM para provocar la ruptura de los linfocitos por shock osmótico, seguido de la adición de SDS (dodecilsulfato sódico) para disolver las membranas y posteriormente NaCl saturado para precipitar las proteínas presentes. Esto se centrifuga a 13500rpm para separar el DNA liberado de las proteínas precipitadas.

Después para separar el DNA liberado, se realiza una extracción agregando una mezcla 49:1 de cloroformo-álcool isoamílico, que por diferencia de solubilidad permitirá separar el DNA de lípidos, proteínas y otros contaminantes que no se hayan eliminado en el paso anterior.

El DNA se precipitará con alcohol etílico absoluto y posteriormente se realizarán lavados con alcohol etílico al 70%, para eliminar residuos de sales.

Una vez precipitado y lavado el DNA se secó al vacío para después resuspenderse en agua inyectable.

6.4. Cuantificación de DNA

Después de resuspender el DNA obtenido este es cuantificado mediante espectrofotometría, utilizando el espectrofotómetro para microvolúmenes Genova Nano Jenway. Este realizó lecturas a una longitud de onda de 260 nanómetros, pues este es el pico máximo de absorbancia de las bases nitrogenadas, además de una a 280 nm que es la absorbancia máxima de las proteínas.

Con los datos anteriores el equipo arroja un valor conocido como relación 260/280 que refleja la pureza de la muestra de DNA con respecto a las proteínas presentes, por ello se busca que la relación sea lo más cercana a 1.8 para considerarlas puras, considerando que mientras menor sea esta relación indica contaminación de proteínas.

Para llevar a cabo estas mediciones se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Calibrar el espectrofotómetro con 3µL de agua
2. Limpiar el lente del espectrofotómetro con un algodón.
3. Homogenizar muestra de DNA y tomar 3µL de la parte media, colocarlos en el lente del espectrofotómetro.
4. Obtener los datos de concentración, relación 260/280 y 260/230.

Una vez obtenida la concentración de la muestra, se consideraron adecuadas las que tuvieran una concentración mayor a 30 ng/µL y aquellas con concentraciones mayores a 300 ng/µL fueron diluidas a 120 ng/µL.

6.5. Integridad de DNA

Para verificar que el DNA obtenido no se degradó durante el proceso de extracción, la muestra obtenida fue sometida a un proceso de electroforesis, en el que se realizó lo siguiente:

1. Preparar gel de agarosa 0.8% con TBE 0.5x
2. Mezclar 3 μ L de DNA, 3 μ L de colorantes de carga y 2 μ L de GelRed 1x, homogenizar e introducir en un pozo del gel.
3. Correr electroforéticamente a 100V por 30 – 40 minutos.
4. Observar en transiluminador (luz UV)

Al finalizar, las muestras en las que se observaba una banda definida se tomaban como íntegras y aquellas en las que se observaban varias bandas o un escalonado de bandas se calificaron como degradadas.

Para ello se asignó una calificación de cruces donde +++ es totalmente íntegro, ++ íntegro con degradado tenue, + íntegro con degradado abundante, +/- íntegro con abundante degradado y – completamente degradado (Figura 7).

6.6. PCR

Para analizar cada variante, se amplificaron fragmentos del DNA que contenían a cada SNP, utilizando la técnica PCR (reacción en cadena polimerasa).

Esta técnica requiere de dos primers o cebadores que delimiten el fragmento que se desea amplificar, en este caso se utilizaron los mostrados en la *tabla 5*:

Tabla 5. Primers utilizados para amplificar los fragmentos deseados

Fragmento	Primer (5 \rightarrow 3')	Longitud (nt)	Tamaño de amplicón (pb)
<i>C1236T</i>	F: TATCCTGTCTCTGTGAATTGCC	22	370
	R: CCTGACTCACACACCAATG	20	
<i>G2677T/A</i>	F: TGCAGGCTATAGGTTCCAGG	20	220
	R: GTTTGACTCACCTTCCCCG	19	
<i>C3435T</i>	F: TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG	20	197
	R: AAGGCATGTATGTTGGCCTC	20	
<i>CYP3A4*1B</i>	F: TTCAGGCATAGGTAAGATC	20	111
	R: AATCTATTAATCGCCTCTCAC	22	

Además, se requiere cumplir con otras condiciones para llevar a cabo la reacción, como lo son: concentración de iones Magnesio (MgCl), presencia de dNTP's (desoxinucleótidos trifosfato), una DNA polimerasa que funcione adecuadamente a la temperatura utilizada durante la reacción, siendo en este caso la Taq Polimerasa. Todos estos factores los encontramos en un reactivo llamado Master Mix de Qiagen.

Otro aspecto que se debe controlar es la concentración del DNA en la reacción, para ello se calculó la cantidad de muestra necesaria para agregar aproximadamente 120ng de DNA. Considerando que, si para llegar a esta cantidad de DNA eran necesarios menos de 0.5µL, se debía realizar dilución de la muestra.

Las cantidades de reactivos utilizadas se muestran a continuación:

Tabla 6. Calculo de reactivos para la reacción de amplificación de los fragmentos para las variantes C1236T, G2677T/A, C3435T y CYP3A4*1B

Reactivos	Concentración	C1236T	G2677T/A	C3435T	Concentración	CYP3A4*1B
DNA	120 ng/µL	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL	120 ng/µL	1.0 µL
Agua		4.5 µL	4.5 µL	4.5 µL		5.0 µL
Primer F	1µM	1.0 µL	0.7 µL	1.0 µL	25 ng/µL	0.5 µL
Primer R	1µM	1.0 µL	0.7 µL	1.0 µL	25 ng/µL	0.5 µL
Master mix	2x	7.5 µL	0.7 µL	7.5 µL	2x	8.0 µL

1. Estos reactivos fueron mezclados y puestos en tubos de 0.2mL rotulados con el número de muestra además de un control negativo.
2. Se le agregó a cada uno (excepto al control negativo) la cantidad de muestra necesaria, para cumplir con la cantidad de DNA adecuada.

La reacción se lleva a cabo durante una serie de ciclos que constan de 3 etapas:

- Desnaturalización: se realiza alrededor de los 94 °C y permite separar las cadenas del DNA para llevar a cabo la amplificación.
- Alineación: oscila entre los 40-60 °C y en ella se lleva a cabo el acoplamiento de los primers al DNA molde.
- Extensión: se realiza a una temperatura de 72 °C, que es la temperatura óptima de acción de la Taq Polimerasa promoviendo su acción.

3. Para ello las muestras se introdujeron al termociclador con los siguientes programas:

Tabla 7. Condiciones de temperatura para PCR

	C1236T			C3435T y G2677T/A			CYP3A4*1B		
	Ciclos	Temp.	Tiempo	Ciclos	Temp.	Tiempo	Ciclos	Temp.	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	96°C	2 min	1	95°C	2 min	1	95°C	2 min
Desnaturalización	45	94°C	30 seg	40	94°C	30 seg	30	94°C	30 seg
Alineación		54°C	30 seg		60°C	30 seg		55°C	30 seg
Extensión		72°C	30 seg		72°C	30 seg		72°C	30 seg
Extensión final	1	72°C	7 min	1	72°C	7 min	1	72°C	7 min

Para comprobar que durante la PCR se obtuvieron los fragmentos esperados se realizó lo siguiente:

4. Se hizo un gel de agarosa 1% con TBE 0.5x para comprobar presencia de amplicones.
5. Se introdujo en cada pozo 1.5 µL de producto de PCR, 2 µL de colorante de carga y 1 µL de GelRed.
6. Se observó en transiluminador (luz UV) para comprobar presencia de amplicones, los tamaños esperados se enumeran en la *tabla 5*.

6.7. RFLP

La técnica RFLP (restricción de fragmentos con longitud polimórfica), es utilizada para determinar la presencia o ausencia de alguna variante, mediante el uso de enzimas de restricción, que tienen la característica de tener una secuencia de reconocimiento específica. De manera que al haber un cambio en esta secuencia la enzima no sea capaz de reconocerla y no provoque el corte en el fragmento de DNA, o en otra circunstancia el cambio de una base cree un sitio de corte para la enzima y esta pueda ejercer su acción sobre el fragmento.

Las enzimas utilizadas para llevar a cabo esta técnica se muestran a continuación, así como su sitio de corte.

Tabla 8. Sitio de corte de las enzimas utilizadas para RFLP

Enzima	Sitio de corte	Variante analizada
HaeIII	GG [^] CC	C1236T
HphI	GGTGA(8/7)	CYP3A4*1B
MboI	[^] GATC	C3435T

Para llevar a cabo esta técnica se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Se rotularon tubos de 0.2mL con el número de muestra y en ellos se agregó 10 µL de producto de PCR de cada variante C3435T y 12 µL para C1236T y CYP3A4*1B.
2. Se preparó mezcla de reacción de acuerdo con las siguientes especificaciones:

Tabla 9. Cálculo de cantidad de reactivos necesario para llevar a cabo RFLP del fragmento para las variantes C1236T, C3435T y CYP3A4*1B

Reactivo	Concentración	C1236T	C3435T	CYP3A4*1B
Agua		6.8 µL	8.8 µL	8.8 µL
Buffer	1x	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL
Enzima	10 U/µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL

3. Una vez preparada la mezcla de reacción, fue repartida a cada uno de los tubos con muestra y se homogenizó.
4. Posteriormente se introdujeron al termociclador a 37°C por 3 horas.

Para determinar el genotipo de las muestras se realizó lo siguiente:

5. Hacer gel de poliacrilamida según el orden y cantidades indicadas a continuación:

Tabla 10. Cantidad de reactivos necesaria para preparar gel de poliacrilamida 10% y 14%

Reactivos	Gel 10%	Gel 14%
Agua	45.4 mL	41.2 mL
TBE 10x	7.0 mL	7.0 mL
Acrilamida 40%*	17.0 mL	21.2 mL
Persulfato de amonio 10%	0.7 mL	0.7 mL
TEMED	0.042 mL	0.042mL

*Acrilamida-Bisacrilamida 96.7:3.3

6. Introducir en los pozos de poliacrilamida productos digeridos, marcador de peso molecular y controles negativos de digestión (muestras sin digerir), bajo el esquema mostrado a continuación:

Tabla 11. Cantidad de reactivos y muestras para realizar el corrimiento en gel de poliacrilamida

Tipo de muestra	Cantidad (µL)	Colorante de carga (µL)	GelRed 3x (µL)
Digerido	20	10	6
MPM	4.5	3	5
Control negativo	1.5	3	2

*MPM es el marcador de peso molecular VIII de Roche para los fragmentos de la variante C1236T y C3435T, el marcador para la variante CYP3A4*1B fue de 50pb*

- Realizar el corrimiento electroforético a 180V por 2:30 horas en el caso de los geles al 10% y por 3:30 horas en el caso del gel al 14%
- Observar el gel en el transiluminador (luz UV), comparar las bandas obtenidas con el control negativo (tamaño estándar del amplicón sin digerir) y contra el marcador de peso molecular para asignar genotipos según el tamaño de banda, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 12. Tamaño de los fragmentos esperados según los genotipos para cada variante

SNP	Fragmentos (pb)	Genotipo
ABCB C1236T	272,98	TT
	272, 63 y 35	CC
	272, 98, 63 y 35	CT
ABCB1 C3435T	197	TT
	158, 39	CC
	197, 158 y 39	CT
CYP3A4*1B	111	AA
	101 y 10	GG
	111, 101 y 10	AG

6.8. Secuenciación

Esta técnica permite conocer la secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA, de manera que puede observarse si la variante alélica para cada SNP está presente o no.

La secuenciación utilizada es tipo Sanger, la reacción que se lleva a cabo es similar a la de una PCR solo que en este caso solo se requiere un solo primer ya sea el forward o el reverse, de manera que únicamente se secuencia una de las cadenas, además de ddNTP (didesoxinucleotidos) marcados con un fluoróforo. Esto hace que al amplificar los fragmentos y se integre un ddNTP, que al no presentar el grupo hidroxilo en la posición 3' impida la formación de un nuevo enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido, la elongación de la cadena se detenga obteniendo así fragmentos de distintos tamaños.

Estos fragmentos al ser introducidos en el secuenciador son sometidos a electroforesis capilar donde son separados por su tamaño y posteriormente detectados debido al fluorocromo con el que está marcado cada ddNTP, emitiendo un electroferograma donde se obtienen picos de distintos colores que representan el nucleótido que fue detectado.

Para llevar a cabo la reacción se realizó lo siguiente:

1. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 13. Cálculo de reactivos utilizados para realizar la reacción de secuenciación

Reactivo	Cantidad		
Agua	3.5 μ L	x	n
Oligo F 1 μ M	1.0 μ L	x	n
Buffer	4.5 μ L	x	n
BigDye	1.1 μ L	x	n
	6.1 μ L		

Donde n es el número de muestras

2. Repartir la cantidad necesaria a cada tubo de 0.2mL previamente rotulados, posteriormente agregar de 6 – 9 μ L del producto de PCR dependiendo de la intensidad del producto, observada en el corrimiento electroforético.
3. Introducir en el termociclador bajo el siguiente programa:

Tabla 14. Condiciones de temperatura utilizadas para la reacción de secuenciación

Secuenciación			
Desnaturalización inicial	1 ciclo	96°C	30 seg
Desnaturalización	25 ciclos	95°C	30 seg
Alineación		50°C	10 seg
Extensión		60°C	4 min
Extensión final	1 ciclo	72°C	1 min

Una vez obtenida la reacción de secuenciación, esta debe ser purificada antes de introducirla al secuenciador, para eliminar los restos de componentes que puedan hacer interferencia, para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

4. Purificar la reacción de secuenciación bajo el siguiente esquema:
 - a. Pesar 0.05 g de Sephadex y agregarlo a una columna.
 - b. Hidratar con 800 μ L de agua, dejar reposar 30 min y sacar burbujas.
 - c. Colocar la columna en un tubo colector y esperar a que salga el exceso de agua por gravedad.
 - d. Decantar el tubo y colocar la columna nuevamente.
 - e. Centrifugar a 3000 rpm/2 min y decantar tubo.

- f. Transferir la columna a tubo de 1.5 mL previamente rotulado con el número de muestra.
 - g. Colocar la totalidad de la reacción de secuenciación al centro de la columna sin tocar el Sephadex.
 - h. Centrifugar a 3000 rpm/2 min.
 - i. Secar al vacío durante 40 min sin calor y protegidos de la luz.
5. Resuspender el purificado de la reacción de secuenciación con 14 μ L de formamida.
 6. Introducir los productos resuspendidos en los pozos de una placa para secuenciación capilar.
 7. Desnaturalizar a 95°C por 5 min.
 8. Introducir la placa en secuenciador e iniciar el programa para el corrimiento de las muestras.
 9. Analizar los electroferogramas y asignar el genotipo comparando con la secuencia normal.

6.9. Análisis estadístico

Para comprobar si la población se encuentra en Equilibrio de Hardy Weinberg se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2).

Para analizar la existencia de relación entre los genotipos y alelos con la respuesta al tratamiento, así como a la presencia de RAM, se utilizó la prueba Chi-cuadrado, mientras que para encontrar la relación con el EDSS y el IP se utilizó la prueba T de Student, esto se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 24.

El valor de EDSS analizado, corresponde a aquel que fue evaluado en la última visita (EDSS final) puesto que es más seguro que este EDSS represente la evaluación post-tratamiento, además de la diferencia de EDSS final menos el primer EDSS registrado, que permitirá evaluar si ha habido cambios en el EDSS.

7. Resultados

7.1. Características del DNA obtenido

Una vez obtenidas las muestras de DNA, estas fueron evaluadas para determinar si eran adecuadas para ser utilizadas. Es por ello que en la siguiente gráfica se muestran los resultados de concentración y pureza observadas en las muestras, cabe mencionar que de cada paciente se obtuvieron entre 3 y 4 muestras de DNA.

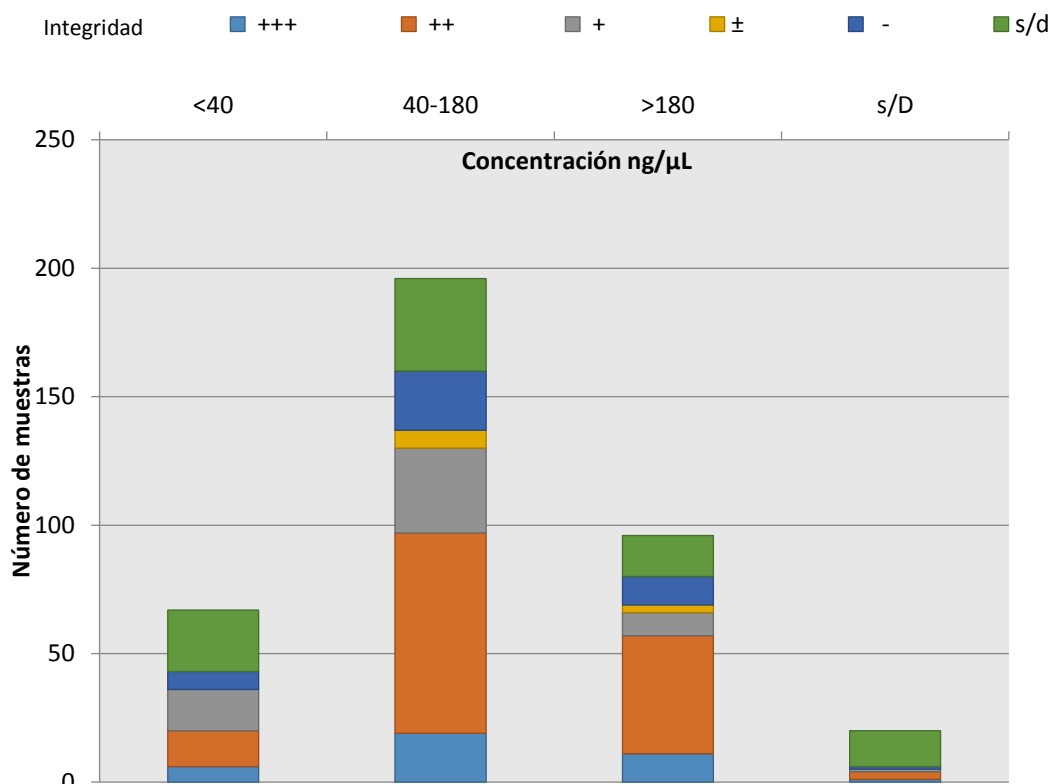


Figura 6. Concentración e integridad de las muestras de DNA genómico
Entendiendo s/d como sin dato, ya sea de concentración o integridad, por falta de muestra.

En la 6 puede observarse la cantidad de muestras que al cuantificarse mostraron concentraciones menores a 40 ng/μL, de 40-180 ng/μL, o más de 180 ng/μL, además de aquellas que no pudieron cuantificarse. En cada grupo también se indica la integridad que se encontró en las muestras, la cual fue evaluada con un sistema de cruces.

Podemos observar que la mayoría de las muestras tienen la concentración ideal para llevar a cabo el trabajo (40-180 ng/μL), las muestras con concentración baja fueron pocas y representaron dificultad para su amplificación.

A continuación, se muestra un ejemplo de cómo se evaluó la integridad de las muestras de DNA.

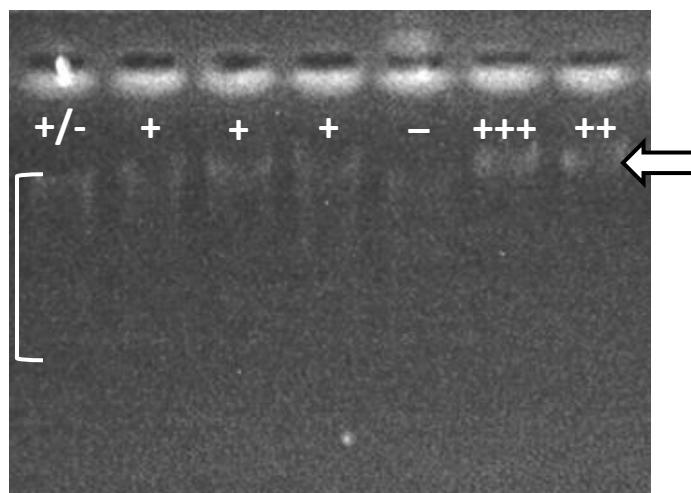


Figura 7. Integridad de muestras de DNA en gel de agarosa 0.8%

En la *Figura 7* se muestra la integridad de las muestras, evaluada mediante un sistema de cruces, según su apariencia en gel de agarosa. Considerando que: +++ significa DNA íntegro, ++ DNA íntegro con degradado tenue, + DNA íntegro con degradado abundante, +/- DNA íntegro poco visible con abundante degradado y – DNA completamente degradado.

La muestra fue considerada degradada cuando se observó el barrido señalado con el corchete, mientras que se habla de una muestra íntegra cuando se observa una banda definida, como la que es señalada con la flecha.

7.2. Características de la población

Tabla 15. Características de la población estudiada

Edad de inicio	Hombres	Mujeres	EDSSi	EDSSf	IP
27±9 años	37	46	3.52±2.06	3.7±2.19	0.96±1.24
Total	83				

EDSSi: primer EDSS registrado en historial clínico promedio, EDSSf: último EDSS registrado en historial clínico promedio, IP: índice de progresión promedio.

7.3.Frecuencia de la población de acuerdo con la respuesta y la presencia de RAM

Tabla 16. Frecuencia de individuos con distintas respuestas y presencia de RAM

	R	NR	RP	Total	RAM	NO/RAM	Total
<i>N</i>	69	1	5	75	6	69	75
<i>%</i>	92	1.3	6.7	100	8	92	100

N: número de individuos, R: Respondedores, NR: No respondedores, RP: Respuesta parcial, RAM: individuos que presentaron RAM, NO/RAM: individuos que no presentaron RAM. Sólo se contabilizaron 75 individuos porque de los 8 restantes no se encontraron datos de la respuesta al tratamiento con corticosteroides.

Se consideró RP aquellos pacientes que no presentaban totalmente el efecto deseado ante el tratamiento con corticosteroides, aunque también se incluyó a individuos que presentaban respuesta sólo a cierto tipo de corticosteroides además de aquellos que presentaron respuesta inicialmente pero que en el transcurso del tratamiento dejaron de presentarla.

En cuanto las RAM no se encontró alguna con mayor frecuencia pues los individuos que las presentaron tuvieron un cuadro característico y distinto, sin embargo, se observaron reacciones adversas como cefalea, mareo, deterioro cognitivo, sabor amargo, taquicardia, cansancio, vómito, reacciones alérgicas y acidez estomacal.

7.4. Genotipificación de las variantes

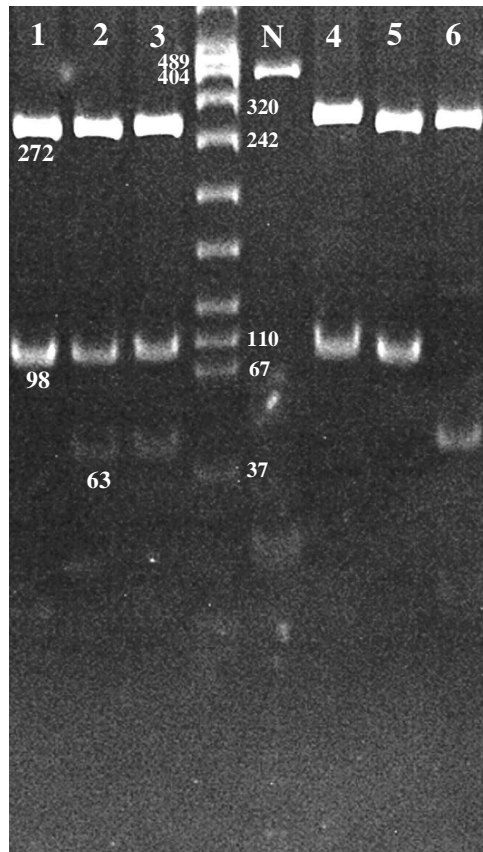


Figura 8. Genotipificación de la variante *C1236T* mediante RFLP

Se observan fotos del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida de muestras sometidas a RFLP, así como de controles negativos (N) y marcador de peso molecular (MPM). Genotipificación de la variante *C1236T*; en los carriles 1, 4 y 5 se observa al genotipo TT (272 y 98 pb), en el carril 6 se observa el genotipo CC (272 y 63 pb), en los carriles 2 y 3 se observa el genotipo CT (272, 98 y 63 pb).

El fragmento amplificado para la variante *C1236T* contiene un sitio de reconocimiento para la enzima HaeIII, por ello se observan bandas de 272pb y 98pb en los individuos que portan el alelo T, que no genera sitio de corte para la enzima. Mientras que el alelo C, que sí genera sitio de corte en el fragmento, provoca la presencia de bandas de 272pb, 63pb y 35pb, donde la primera es resultado del corte por el sitio de reconocimiento que se encuentra en la secuencia del fragmento, mientras que los fragmentos de 63 y 35pb del sitio generado por el alelo C, aunque la banda de 35pb no es apreciable en la fotografía del gel.

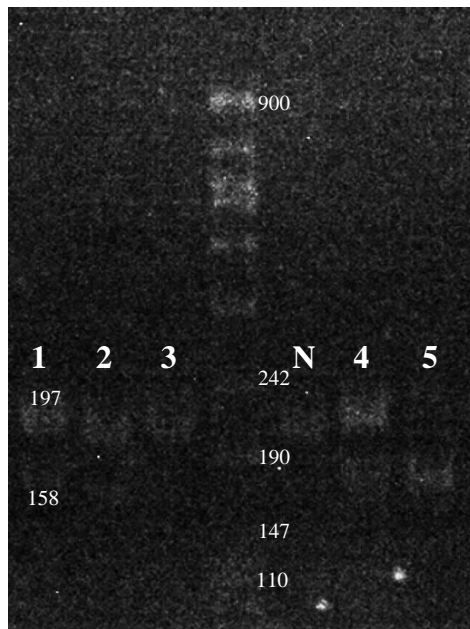


Figura 9. Genotipificación de la variante C3435T mediante RFLP

Genotipificación de la variante *C3435T*; en carril 3 se observa el genotipo TT (197pb), en carril 5 se muestra el genotipo CC (158pb), carriles 1, 2 y 4 genotipo CT (197 y 158pb).

En la variante *C3435T*, el alelo T no genera el sitio de corte enzimático por lo que aquellos individuos que presentan este alelo muestran una banda a 197pb que es el tamaño del fragmento amplificado. Mientras que el alelo C al generar el sitio de corte para la enzima MboI, induce el corte del fragmento mostrado por ello una banda a 158pb y otra de 39pb (que no es observada en la foto del gel).

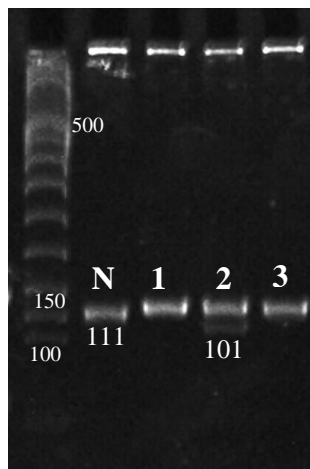


Figura 10. Genotipificación de la variante CYP3A4*1B mediante RFLP

Genotipificación de la variante *CYP3A*1B*; en los carriles 1 y 3 se observa el genotipo AA (111pb), en el carril 2 se observa el genotipo AG (111 y 101pb).

La presencia del alelo *CYP3A4*1B* (alelo G) genera la secuencia de reconocimiento de la enzima HphI, provocando el corte del fragmento en 101 y 10pb (este último no visible en la foto). Mientras que el alelo A, al no generar sitio de corte muestra el fragmento de 111pb.

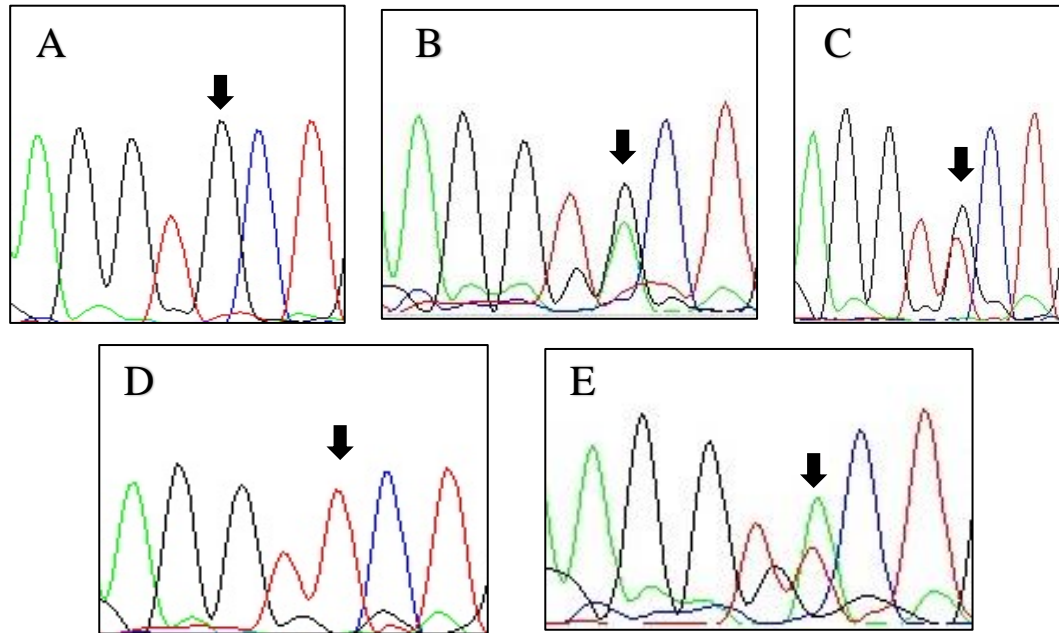


Figura 11. Electroferogramas de la secuenciación de la variante G2677T/A

En esta figura se observan fragmentos de algunos de los electroferogramas obtenidos al secuenciar el fragmento de la variante *G2677T/A*. La posición de la variante analizada es señalada con la flecha en cada electroferograma, en la sección **A** se observa al genotipo GG, en **B** al genotipo GA, en **C** al genotipo GT, en **D** al genotipo TT y en **E** al genotipo TA.

7.5. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes en la población estudiada

La frecuencia de cada alelo y genotipo que fue calculada para la muestra total de pacientes con EM, así como los resultados de Chi-cuadrado utilizados para comprobar la existencia de Equilibrio de Hardy Weinberg en la muestra, son recopilados en la *tabla 17*. En ella puede observarse que el alelo predominante en la población para las variantes *C1236T*, *G2677T/A*, *C3435T* y *CYP3A4*1B*, fueron el T, G, C y A respectivamente, mientras que los genotipos encontrados con mayor frecuencia fueron el TT, GT, CT y AA.

Además, en lo que refiere a los resultados de chi-cuadrado se muestra que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en cuanto a las variantes *G2677T/A*, *C3435T* y *CYP3A4*1B*, pero no para *C1236T*.

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con EM

Parámetro	C1236T		G2677T/A						C3435T			CYP3A4*1B			
	C	T	G	T	A	C	T	A	G	C	T	A	G		
Frecuencia alélica %	44.6	55.4	58.6	37.0	4.3	56.6	43.4	97.0	3.0						
N	74	92	95	60	7	94	72	159	5						
Frecuencia genotípica%	CC	CT	TT	GG	GT	TT	TA	GA	AA	CC	CT	TT	AA	AG	GG
	28.9	31.3	39.8	33.3	44.4	13.6	2.5	6.2	0	31.3	50.6	18.1	93.9	6.1	0
N	24	26	33	27	36	11	2	5	0	26	42	15	77	5	0
χ^2 obtenida	11.1208			0.5281						0.0754			0.0811		
χ^2 de tablas	3.8415			7.8147						3.8415			3.8415		

Para la prueba de Chi-cuadrado se utilizó una $p=0.05$. La N total de individuos analizados para la variante G2677T/A y CYP3A4*1B fue de 81 y 82 respectivamente, debido a que algunas de las muestras de DNA no pudieron ser analizadas para estas variantes.

7.6. Relación entre la presencia de las variantes con la respuesta a corticosteroides

Para evaluar la respuesta al tratamiento, se analizaron dos categorías, una de ellas fue el tipo de respuesta que presentaron los pacientes y la otra fue la presencia de RAM.

En el caso del tipo de respuesta se encontraron tres grupos de individuos, el de los respondedores, el de los no respondedores y el de respuesta parcial, por ello se calculó porcentaje de individuos que se encontraban en cada grupo para cada alelo y genotipo.

Por otra parte, al evaluar la presencia de RAM en los pacientes se encontraron dos grupos de individuos, aquellos que las presentaban y quienes no las presentaban, al igual que con el tipo de respuesta, se calculó el porcentaje de individuos que presentaban o no RAM, para cada alelo y genotipo.

Tabla 18. Presencia de genotipos y alelos en relación con las RAM y el tipo de respuesta

	R	NR	RP	P	RAM	NO/RAM	P
<i>C1236T</i>							
<i>Alelos</i>							
<i>C %</i>	90.9 (40)	2.3 (1)	6.8 (3)	.697	9.1 (4)	90.9 (40)	1.0
<i>T %</i>	92.3 (49)	1.9 (1)	5.7 (3)	.707	3.8 (2)	96.2 (51)	.057
<i>Genotipos</i>							
<i>CC %</i>	90.9 (20)	0	9.1 (2)	.707	18.2 (4)	81.8 (18)	.057
<i>TT %</i>	93.5 (29)	0	6.5 (2)	.697	6.5 (2)	93.5 (29)	1.000
<i>CT %</i>	90.9 (20)	4.5 (1)	4.5 (1)	.269	0	100 (22)	.171
<i>G2677T/A</i>							
<i>Alelos</i>							
<i>G %</i>	90.0 (54)	1.7 (1)	8.3 (5)	.534	6.7 (4)	93.3 (56)	.289
<i>T %</i>	93.5 (43)	2.2 (1)	4.3 (2)	.414	4.3 (2)	95.7 (46)	.185
<i>A %</i>	80.0 (4)	0	20.0 (1)	.470	40.0 (2)	60.0 (3)	.051
<i>Genotipos</i>							
<i>GG %</i>	92.0 (23)	0	8.0 (2)	.743	12.0 (3)	88.0 (22)	.406
<i>TT %</i>	100 (11)	0	0	.560	9.1 (1)	90.9 (10)	1.0
<i>GT %</i>	90.6 (29)	3.1 (1)	6.3 (2)	.517	0	100 (32)	.032
<i>GA %</i>	66.7 (2)	0	33.3 (1)	.177	33.3 (1)	66.7 (2)	.230
<i>TA %</i>	100 (2)	0	0	.912	50 (1)	50 (1)	.159
<i>C3435T</i>							
<i>Alelos</i>							
<i>C %</i>	91.7 (55)	1.7 (1)	6.7 (4)	.881	6.7 (4)	93.3 (56)	.593
<i>T %</i>	92.6 (50)	1.9 (1)	5.6 (3)	.686	5.6 (3)	94.4 (54)	.340

R: respondedores, NR: no respondedores, R: respuesta parcial, RAM: individuos con reacciones adversas medicamentosas, NO/RAM: individuos que no presentaron reacciones adversas medicamentosas. (n°) número de pacientes (continua en siguiente página)

Tabla 18. Presencia de genotipos y alelos en relación con las RAM y el tipo de respuesta (continuación)

	R	NR	RP	P	RAM	NO/RAM	P
<i>C3435T</i>							
<i>Genotipos</i>							
<i>CC %</i>	90.9 (20)	0	9.1 (2)	.707	13.6 (3)	86.4 (19)	.351
<i>TT %</i>	93.3 (14)	0	6.7 (1)	.881	13.3 (2)	86.7 (13)	.593
<i>CT %</i>	92.1 (35)	2.6 (1)	5.3 (2)	.548	2.6 (1)	97.4 (37)	.108
<i>CYP3A4*1B</i>							
<i>Alelos</i>							
<i>A %</i>	91.9 (68)	1.4 (1)	6.8 (5)		8.1 (6)	91.9 (68)	
<i>G %</i>	100 (4)	0	0	.830	0	100 (4)	1.0
<i>Genotipos</i>							
<i>AA %</i>	91.4 (64)	1.4 (1)	7.1 (5)	.830	8.6 (6)	91.4 (64)	1.0
<i>AG %</i>	100 (4)	0	0	.830	0	100 (4)	1.0
<i>CT %</i>	92.1 (35)	2.6 (1)	5.3 (2)	.548	2.6 (1)	97.4 (37)	.108
<i>CYP3A4*1B</i>							
<i>Alelos</i>							
<i>A %</i>	91.9 (68)	1.4 (1)	6.8 (5)		8.1 (6)	91.9 (68)	
<i>G %</i>	100 (4)	0	0	.830	0	100 (4)	1.0
<i>Genotipos</i>							
<i>AA %</i>	91.4 (64)	1.4 (1)	7.1 (5)	.830	8.6 (6)	91.4 (64)	1.0
<i>AG %</i>	100 (4)	0	0	.830	0	100 (4)	1.0

R: respondedores, NR: no respondedores, R: respuesta parcial, RAM: individuos con reacciones adversas medicamentosas, NO/RAM: individuos que no presentaron reacciones adversas medicamentosas. (n°) número de pacientes

7.7. Relación entre los alelos y genotipos con el EDSS e IP

Para evaluar el tratamiento también se utilizan los índices EDSS e IP y para encontrar si existía una relación entre estos parámetros y las variantes se realizó la prueba t de Student, en la que fueron comparadas las medias del último EDSS registrado e IP, en los individuos que portaban cada alelo o genotipo contra aquellos que no lo portaban.

Tabla 19. Relación de alelos y genotipos con EDSS e IP (continuación)

	Variante	N		M±DE		P
		Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	
IP	G2677T/A					
	GG	22	46	0.75±0.78	0.95±1.11	.452
	TT	10	58	1.59±1.98	0.76±0.69	.219
	GT	30	38	0.67±0.45	1.05±1.27	.089
	GA	5	63	1.47±1.20	0.84±0.99	.176
	TA	1	67	0.25	0.89±1.02	.533
	C3435T					
	C	58	12	0.99±1.34	0.82±0.56	.662
	T	48	22	1.05±1.37	0.78±0.896	.407
	CC	23	47	0.79±0.88	1.05±1.38	.416
	TT	12	58	0.82±0.56	0.99±1.34	.662
	CT	35	35	1.13±1.57	0.80±0.77	.273
	CYP3A4*1 B					
	A	69	0	0.97±1.24		
	G	4	65	2.65±2.91	0.87±1.03	.309
	AA	65	4	0.87±1.03	2.65±2.91	.309
	AG	4	65	2.65±2.91	0.87±1.03	.309

N: número de individuos, M: media, DE: desviación estándar.

Considerando que el IP toma en cuenta los años de evolución de la enfermedad, cabe destacar que el tiempo de evolución promedio en la población fue de 6.67 ± 5.43 años

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al comparar el EDSS inicial y el final, de los individuos con respecto a cada alelo y genotipo.

Tabla 20. Comparación de EDSS inicial y final en pacientes con EM portadores de variantes de ABCB1 y CYP3A4

Variante	EDSS inicial - EDSS final				Correlación de muestras emparejadas			Prueba de muestras emparejadas		
	Media	DE	Media	DE	N	Correlación	Sig.	t	gl	P
C1236T										
CC	3.41	2.10	3.38	2.45	16	.319	.229	.047	15	.963
TT	3.74	2.08	4.41	2.25	23	.504	.014	-1.495	22	.149
CT	3.31	1.99	3.17	1.71	21	.489	.025	.347	20	.732
C	3.35	2.01	3.26	2.03	37	.394	.016	.259	36	.797
T	3.53	2.02	3.82	2.09	44	.501	.001	-.918	43	.364
G2677T/A										
GG	3.69	2.20	3.67	2.41	21	.522	.015	.048	20	.962
TT	3.88	2.00	5.25	2.14	8	.502	.205	-1.883	7	.102
GT	3.00	1.90	3.12	1.79	25	.393	.052	-.295	24	.770
GA	4.67	1.53	3.50	2.18	3	-.901	.285	.559	2	.633
TA	2.00		2.00		1					
G	3.40	2.03	3.38	2.07	49	.426	.002	.065	48	.948
T	3.09	1.96	3.51	2.07	35	.496	.002	-1.254	34	.219
A	4.00	1.83	3.13	1.93	4	-.284	.716	.581	3	.602
C3435T										
CC	3.65	2.18	3.15	2.31	20	.398	.082	.907	19	.376
TT	3.36	2.15	4.50	2.18	11	.609	.047	-1.972	10	.077
CT	3.45	1.94	3.78	2.05	29	.474	.009	-.862	28	.396
C	3.53	2.02	3.52	2.16	49	.427	.002	.032	48	.975
T	3.43	1.94	3.93	2.08	41	.498	.001	-1.586	40	.121
CYP3A4*1B										
AA	3.33	1.94	3.59	2.15	55	.376	.005	-.853	54	.398
GG					0					
AG	5.88	2.21	5.63	1.89	4	.963	.037	.775	3	.495
Todos	3.50	2.03	3.70	2.17	60	.447	.000	-.700	59	.487

DE: desviación estándar, gl: grados de libertad, sig.: significancia.

7.8. Frecuencia de haplotipos en la población

El cálculo de haplotipos fue realizado utilizando la herramienta electrónica SNPstats y arrojó la frecuencia de cada haplotipo en la población estudiada, además de calcular la razón de momios (OR) para el grupo de individuos que presentaban RAM y los que no presentaban RAM (tabla 21).

Donde se observa que el haplotipo más frecuente en la población es el CGCA, al igual que en el grupo RAM, mientras que el haplotipo más frecuente es el TTTA en el grupo NO/RAM.

Tabla 21. Frecuencia de haplotipos en la población estudiada y relación con RAM

Haplotipo	EM	NO/RAM	RAM	OR (IC 95%)	P
CGCA	0.3335	0.3184	0.5	1.0	-
TTTA	0.3317	0.3376	0.25	0.38 (0.07- 2.15)	0.28
TGCA	0.1423	0.1552	NA	0.00 (-Inf- Inf)	1
CGTA	0.0577	0.0555	0.0833	0.49 (0.04- 6.75)	0.6
TTCA	0.0313	0.0345	NA	0.00 (-Inf- Inf)	1
TGTA	0.0273	0.0301	NA	0.49 (0.04-6.75)	0.6
CTTA	0.0157	0.0177	NA	0.00 (-Inf- Inf)	1
CACA	0.0133	0.0145	NA	0.00 (-Inf- Inf)	1
CATA	0.0133	0.0072	0.0833	0.00 (-Inf- Inf)	1
TTTG	0.0082	0.0091	NA	0.00 (-Inf- Inf)	1
TACA	0.0069	NA	0.0833	10.55 (0.45- 244.74)	0.15
CTCG	0.0064	0.0069	NA	3.21 (0.22- 46.09)	0.39
TTCG	0.0062	0.0067	NA		
TGTG	0.006	0.0064	NA		
CTCA	0	0	NA		
TATA	0	NA	NA		

EM: individuos con esclerosis múltiple, RAM: individuos que presentaron reacciones adversas al medicamento, NO/RAM individuos que no presentaron RAM, OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

También se calculó la frecuencia de haplotipos en individuos con respuesta normal al tratamiento con corticosteroides e individuos con alteraciones en la respuesta (Tabla 22), el grupo de individuos con alteraciones en la respuesta incluye a los individuos que presentaron respuesta parcial y a aquellos que no presentaron respuesta.

Se observó que el haplotipo más frecuente en el total de muestra fue CGCA (RN+RA), sin embargo, el haplotipo TTTA fue de mayor frecuencia entre los pacientes con respuesta normal, mientras que CGCA lo fue en el grupo de respuesta alterada.

Solo el haplotipo CACA presentó un valor de P menor de 0.05, pero la muestra es pequeña y debe ampliarse.

Tabla 22. Frecuencias de haplotipos en individuos con respuesta alterada

Haplotipo	RN	RA	OR (IC 95%)	P
CGCA	0.3345	0.3333	1.0	-
TTTA	0.3387	0.25	1.88 (0.37- 9.49)	0.45
TGCA	0.1316	0.25	0.49 (0.12- 2.03)	0.33
CGTA	0.0547	0.0833	1.42 (0.10- 20.52)	0.8
TTCA	0.0344	NA	Inf (-Inf- Inf)	1
TGTA	0.0307	NA	Inf (-Inf- Inf)	0.6
CTTA	0.0169	0	Inf (-Inf- Inf)	1
CACA	0.0145	NA	NA	<0.001
CATA	0.0072	0.0833	0.07 (0.00- 1.63)	0.1
TTTG	0.0091	NA	0.00 (-Inf- Inf)	1
TACA	0.0076	NA		
CTCG	0.0069	NA		
TTCG	0.0067	NA		
TGTG	0.0064	NA		
CTCA	0	NA		
TATA	0	NA		

RN: pacientes que mostraron respuesta normal, RA: pacientes que mostraron alteración en la respuesta al tratamiento, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza., NA: no aplica.

8. Discusión

Las proteínas ABCB1 y CYP3A4 están involucradas en el transporte y metabolismo de los corticosteroides, de manera que alguna alteración en su funcionamiento pudiera influir en la respuesta de los individuos ante estos fármacos. Las variantes *C1236T*, *G2677T/A*, *C3435T* (del gen *ABCB1*) y *CYP3A4*1B* (del gen *CYP3A4*) han mostrado resultados controversiales en cuanto a su implicación en la susceptibilidad a fármacos y su farmacocinética, (Brambilla, 2013), (Zanger y Klein, 2013), (Sol *et al.*, 2013), (Liu *et al.*, 2017)

Debido a que la frecuencia de los SNP son variables entre las poblaciones, se comparó la población mestizo mexicana con EM estudiada con otras poblaciones, que son mostradas en la *tabla 4*.

Para la variante *C1236T* el alelo más frecuente es el alelo T al presentarse en el 55.4% de la población de este estudio, mientras que el genotipo de mayor frecuencia fue el TT con un 39.8%.

Además, se observó que la población no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg para la variante *C1236T*, esto puede ser el resultado de errores en el método para genotipificar, de manera que este permita una detección de alguno de los genotipos con más facilidad que la de otros, aunque también puede ser el resultado de que el polimorfismo esté relacionado con la enfermedad (Iniesta *et al.*, 2005).

Se sospecha que la variante *C1236T* está relacionada a la enfermedad, pese a que en este caso no se seleccionó a una población control que permita afirmarlo, la población de mestizo mexicanos clínicamente sana, estudiada por Ortega *et al.* (2015) podría funcionar como una población de referencia, mostrando frecuencias genotípicas muy distintas a las de la muestra estudiada en este trabajo, de 0.24, 0.25, 0.52 (CC, TT y CT respectivamente) contra 0.289, 0.398 y 0.313, al comparar mediante chi-cuadrado se obtienen valores de p de 0.16, 0.004 y 0.005, respectivamente, indicando que la frecuencia de individuos sólo es similar para aquellos que portan el genotipo CC, pero difiere para los genotipos TT y CT, por lo que podría sospecharse que esta variante se encuentra relacionada con la EM, pero no podría afirmarse hasta realizar una investigación que profundice en ello, donde el número de muestra aumente y se analice un grupo control propio.

En cuanto a la variante *G2677T/A*, se observó al alelo G como el de mayor frecuencia con un 58.6%, mientras que el genotipo más frecuente es el GT con un 44.4%, siendo similar a las frecuencias presentadas por individuos que viven en Los Ángeles California con ascendencia mexicana encontrándose frecuencias de 54.7% para el alelo G y de individuos colombianos con un 44% para el genotipo GT, reportados por el Proyecto 1000 Genomas (Zerbino *et al.*, 2017). Al compararlo con las frecuencias de población mestizo mexicana sana estudiada por Ortega *et al.* (2015), la tendencia en el orden de frecuencias de alelos y genotipos se conserva de la siguiente manera: G>T>A y GT> GG > TT> GA> TA >AA, y las frecuencias son similares entre las poblaciones, exceptuando el genotipo GG que mostró una frecuencia de 23% (Ortega *et al.*, 2015) y en comparación a la de este estudio (33.3%)

es diferente ($p=0.032$), indicando una posible relación de genotipo con la EM, aunque esto debe comprobarse.

La variante *C3435T* mostró como alelo predominante al C con un 56.6% lo cual es similar a lo encontrado en la población de individuos colombianos (56%) y de individuos que viven en Los Ángeles California de ascendencia mexicana (52%), reportados por el proyecto 1000 genomas (Zerbino *et al.*, 2017), pues al compararlas mediante chi-cuadrado se obtuvo una p de 0.44 y 0.23, respectivamente.

En cuanto a la frecuencia genotípica del SNP *C3435T*, el de mayor frecuencia fue el genotipo CT con un 50.6%, similar a la de individuos de origen colombiano (48%) y de individuos peruanos (52%), reportadas por el proyecto 1000 genomas (Zerbino *et al.*, 2017), encontrando una p de 0.44 y 0.36 respectivamente. Al comparar la población estudiada con la de mestizo mexicanos sanos reportada por Ortega *et al* (2015) la tendencia en el orden de las frecuencias alélicas y genotípicas no es conservada, mostrando al alelo T como el más frecuente y el orden CT> TT> CC comparada a la de individuos mestizo mexicanos con EM, que fue encontrada, CT> CC> TT, es decir hay una distribución de alelos y genotipos distintas entre individuos con EM e individuos clínicamente sanos, sin embargo al comparar esto datos mediante chi cuadrado las frecuencias de los genotipos CC (23%), TT (25%) y CT (52%) (Ortega *et al.*,2015) mostraron ser similares a las obtenidas en este trabajo, de tal manera que podría inferirse que la diferencia entre la distribución de genotipos en la población no se debe a una relación entre la EM y la variante *C3435T*.

En lo que refiere a la variante *CYP3A4*1B* se encontró con mayor frecuencia al alelo A con un 97% mientras que el alelo G solo se presentó en un 3% de la población, esto es similar a lo mostrado por población mestizo mexicana estudiada por Reyes *et al* (2008), donde el alelo G es de menor frecuencia en la población con un 8%, aunque al realizar análisis de chi-cuadrado para comprobar si las frecuencias son similares entre las poblaciones, se encontró que las frecuencias son muy distintas, mostrando valores de p menores a 0.05, aunque esto probablemente se deba al origen de los individuos y a la diferencia en el tamaño de las muestras. Las poblaciones con las que presenta mayor similitud de frecuencias alélicas son la peruana y europea reportadas por el proyecto 1000 genomas, donde el alelo G tuvo una frecuencia del 3% (Zerbino *et al.*,2017).

En el cuanto a las frecuencias genotípicas de *CYP3A4*1B* el más frecuente fue el genotipo AA con un 93.9%, resaltando que no se encontró ningún individuo con el genotipo GG en la población estudiada, presentándose casos similares en la población que vive en Los Ángeles California con ascendencia mexicana, en la población peruana y del Este de Asia, estudiada en el proyecto mil genomas, donde tampoco se encontraron individuos con el genotipo GG (Zerbino *et al.*,2017).

Por otra parte, se encontró que en la población estudiada la mayoría de los individuos presentó respuesta favorable al tratamiento con corticosteroides en un 92% de la población, mientras que los que no presentaron respuesta fueron solo el 1.3% de la población, aunque

también se encontraron individuos con respuesta parcial, representando un 6.7% de la población.

Al analizar la relación entre la presencia de estas respuestas con las variantes genéticas, se observó que los individuos que presentaban cada alelo y genotipo mostraron distribuciones en los grupos de respuesta muy distintas, aunque en los alelos y genotipos de todas las variantes el mayor porcentaje de individuos se encontró en el grupo con respuesta a corticosteroides, esta tendencia puede ser resultado de que la mayoría de la población estudiada se encontraba en este grupo, pues no se observó relación entre genotipos y alelos con la respuesta.

El análisis de haplotipos mostró a CGCA como el más frecuente en la población mestizo mexicana con EM, seguido del haplotipo TTTA, siendo el haplotipo CGCA el más frecuente en el grupo con respuesta anormal, mientras que en el grupo de respuesta normal el más frecuente fue el TTTA. Esto presenta una distribución similar en población china con trombocitopenia inmune tratados con glucocorticoides, en la que el grupo de individuos no respondedores mostró al haplotipo CGC como el más frecuente, mientras que en individuos con buena respuesta uno de los haplotipos más frecuentes fue el TTT (Xuan *et al.*, 2014), de manera que es probable que el haplotipo CGCA esté implicado con mala respuesta a glucocorticoides, considerando que en pacientes de EM de origen español, se observó que aquellos individuos que portaban los genotipos 2677 GG y 3435 CC tendían a no presentar respuesta al tratamiento con mitoxantrona, además de mostrar mayor eflujo de dicho fármaco *in vitro* (Cotte *et al.*, 2009), vuelve más probable que al encontrar estas variantes en el haplotipo CGCA, este pueda estar implicado en la ausencia de respuesta, aunque la muestra analizada es muy pequeña y debería ampliarse, para comprobarlo.

Por otra parte, de los 16 haplotipos identificados en la muestra, el haplotipo CACA fue el único que presentó tendencia significativa, favorable a una respuesta normal a corticosteroides, de acuerdo con los datos mostrados por SNPstats, sin embargo, se debe ampliar la muestra para confirmar el resultado.

Se observaron diferencias en cuanto a los puntajes de EDSS, donde los individuos con el genotipo 2677 TT tuvieron mayor puntaje por casi 2.0 puntos indicando mayor discapacidad, en tanto que el alelo 1236C, 2677G y el genotipo 1236 CT tuvieron un EDSS menor por aproximadamente 1.5 y 1.0 puntos, indicando relación con un menor grado de discapacidad, además se observó que el genotipo 3435 TT tuvo un EDSS inicial 3.36 ± 2.15 y final de 4.5 ± 2.18 , es de decir una diferencia de más de 1 punto, indicando que esta variante podría estar implicada en una mayor progresión, aunque para corroborar este hallazgo debe aumentarse la muestra de estudio, pues en este caso aunque la p es cercana a 0.05 no alcanza a ser significativa. Estos pacientes con discapacidad mayor podrían mostrar una respuesta insuficiente a tratamientos con medicamentos que sean sustratos de glicoproteína P, como los corticosteroides.

Otro aspecto importante a resaltar es que 100% de los pacientes portadores del genotipo 2677 GT no presentaron RAM ($p=0.032$) y considerando que el alelo 2677G está relacionado a

menor discapacidad, esto podría sugerir que los portadores del alelo 2677G responden mejor a la administración de corticosteroides, a diferencia de los portadores de los genotipos 2677TT y 3435TT que mostraron relación con discapacidad mayor, posiblemente por una menor capacidad de respuesta a los corticosteroides. Aunque esto no coincide con estudios como el de Xuan *et al* (2014) en donde la población china con trombocitopenia autoinmune no mostró relación entre la respuesta a glucocorticoides y la variante C3435T, mientras que en el caso de la variante G2677G/A es el genotipo GG el que se encontró relacionado con menor respuesta al tratamiento, algunas de las razones por las que existe esta diferencia podría ser la posible presencia de otras variantes en el gen ABCB1 que se asocian a las estudiadas y que provoquen efectos distintos en el funcionamiento de la Gp-P, aunque es posible que la relación entre la discapacidad y las variantes no tenga implicaciones con la respuesta al tratamiento, pues debe considerarse que el tratamiento dirigido a reducir las secuelas y frenar la evolución de la enfermedad, es el conocido como modificador de la enfermedad (Martinez *et al.*, 2015) y no todos los fármacos incluidos en esta categoría son sustratos de la Gp-P o del CYP3A4, por lo que las variaciones en el funcionamiento de estas proteínas no necesariamente afectarían la eficacia farmacológica, además de que la respuesta a estos fármacos no ha sido evaluada en este trabajo.

Por otra parte, tomando en cuenta que el valor de EDSS, es un dato que por sí mismo no aporta información certera acerca del impacto del tratamiento sobre el grado de discapacidad en los individuos, lo más probable es que las variaciones observadas en el EDSS con respecto a la presencia de los alelos y genotipos, pueden ser consecuencia de una participación de la Gp-P en el desarrollo de la enfermedad, pues se sabe que su función en la barrera hematoencefálica es muy importante para expulsar una variedad de sustratos del cerebro, incluyendo agentes inflamatorios (Kooij *et al.*, 2010) y gran parte del daño en la EM es causada por procesos inflamatorios, por lo que las alteraciones en el funcionamiento de la Gp-P podrían tener impacto en la enfermedad, siendo alguna de estas alteraciones ocasionadas por polimorfismos (Kooij *et al.*, 2010).

Una alternativa para comprobar que la diferencia de EDSS entre los individuos que presentan los alelos y genotipos tiene alguna relación con la variación en la eficacia del tratamiento, es evaluar los valores de EDSS antes del brote, durante el brote y después del tratamiento con corticosteroides, para observar las diferencias ocasionadas por el tratamiento.

Además, se plantea la posibilidad de que 2677 GT tenga efecto protector ante RAM en individuos mestizo mexicanos con EM, tratados con corticosteroides. Al considerar los datos citados por Ichiro *et al* (2004) de población clínicamente sana de origen japonés, donde el genotipo GT se relacionó con una biodisponibilidad y aclaramiento renal intermedio de la digoxina, mientras que el genotipo TT al aumento en biodisponibilidad y disminución en aclaramiento contrario a lo ocurrido con el genotipo GG, de manera que los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser porque los individuos con el genotipo GT probablemente no tienen alteración en biodisponibilidad y aclaramiento de los corticosteroides y consecuentemente, evitan su acumulación en el organismo y producción de efectos adversos, aunque para comprobar esto deben realizarse otros estudios, aunque esto no coincide con los

resultados obtenidos por Cotte et al (2006), donde los individuos con EM de origen español y alemán con el genotipo GT tendían a mostrar mayor acumulación de mitoxantrona, lo cual podría indicar que este genotipo no evita la acumulación de corticosteroides en el organismo y por tanto la RAM, sin embargo es posible que esto se deba a diferencias en la población o en el fármaco evaluado, probablemente por efecto de especificidad de sustrato (Xuang et al., 2014).

En lo que refiere a la variante *CYP3A4*1B*, los hallazgos tampoco coincidieron con lo reportado en otros estudios, pues en ellos se asoció a la variante con la modificación en la eliminación de distintos fármacos como el docetaxel, ciclofosfamida (Sol *et al.*, 2013) y midazolam (Liu *et al.*, 2017), lo cual podría llevar a la alteración en la respuesta a dichos fármacos, por lo que se esperaba que la población que presentó el alelo G mostrara una mayor frecuencia de individuos con respuesta alterada, por el contrario la prueba chi-cuadrado reveló que este alelo no se relacionaba con el tipo de respuesta que presentaban los individuos, aunque la ausencia de hallazgos con respecto al alelo G también podría ser el resultado de su baja frecuencia en la población estudiada.

En cuanto a la evaluación de IP de quienes portaban las variantes con quienes no, se observó que la diferencia entre las medias era muy pequeñas y no significativa, mostrando valores de p mayor a 0.05, indicando que no existe relación entre las variantes genéticas estudiadas y la progresión de la enfermedad, evaluada mediante este índice.

Por otra parte, las frecuencias de haplotipos también se calcularon para los grupos de individuos que presentaban RAM y aquellos que no las presentaron, donde se encontró que el haplotipo con mayor frecuencia fue el TTTA con un 33.76% en los individuos que no tuvieron RAM ante el tratamiento con corticosteroides, mientras que el más frecuente en la población que presentó RAM fue el haplotipo CGCA con un 50%. Debido al tamaño de la muestra no se observó relación de algún haplotipo con la presencia de RAM.

Sin embargo, uno de los aspectos importantes a considerar es el hecho de que la variante *CYP3A4*1B* (alelo G) tuvo baja frecuencia en la población, siendo este alelo el que se ha ligado a alteración en la función de la enzima CYP3A4, aunque controversial en sus efectos (Zanger y Klein, 2013), es por ello que podría decirse que el alelo más frecuente (alelo A), muestra un funcionamiento normal de la proteína que permite metabolizar adecuadamente los corticosteroides, disminuyendo la probabilidad de que haya un fallo en la respuesta, aún si las variantes del gen ABCB1 modificaran la función de la Gp-P. Además debe considerarse la participación de otras enzimas en el metabolismo de los corticosteroides, tal es el caso de CYP3A5 (Varis, 2000) que podrían compensar el mal funcionamiento.

9. Conclusión

- Se determinó a los alelos T, G, C y A de las variantes *C1236T*, *G2677T/A*, *C3435T* y *CYP3A4*1B*, respectivamente, como los más frecuentes en población mestizo-mexicana con EM, así como a los genotipos TT, GT, CC y AA.
- Se encontró una baja frecuencia de individuos que no respondieron al tratamiento, individuos con respuesta parcial y con presencia de RAM a metilprednisolona, prednisona y dexametasona.
- No se logró establecer una relación entre las variantes *C1236T*, *G2677T/A*, *C3435T* y *CYP3A4*1B* con el tipo de respuesta de individuos mestizo-mexicanos con EM ante el tratamiento con metilprednisolona, prednisona y/o dexametasona.
- Se logró observar correlación del grado de discapacidad, evaluado con la diferencia de EDSS final e inicial, en portadores del genotipo 3435 TT, con tendencia a la significancia, posiblemente por mala respuesta al tratamiento, pero debe confirmarse con otros estudios.
- Se relacionó la presencia del alelo 1236C, 2677G y al genotipo 1236 CT con un menor grado de discapacidad, evaluado con EDSS, mientras que la presencia del genotipo 1236 TT y 2677 TT a un grado de discapacidad mayor, aunque esto podría estar implicado con la respuesta a fármacos que son sustratos de la Gp-P, no se logró establecer una relación, aunque existe la sospecha de que estas variantes estén implicadas en la EM.
- En lo que refiere a la presencia de RAM en la población de mestizo mexicanos con EM se encontró una posible relación con el genotipo GT, sugiriendo que los individuos que los portan tienden a no presentar reacciones adversas con dexametasona, metilprednisolona y prednisona, lo cual podría confirmarse aumentando la muestra de estudio.
- En cuanto a los haplotipos, el de mayor frecuencia fue el CGCA en la población y en los individuos con RAM y con respuesta alterada ante el tratamiento con dexametasona, metilprednisolona y prednisona, mientras que solo quienes portaban el haplotipo CACA mostraron tendencia a no presentar RAM.

10. Referencias

- Albekairy, A., Alkatheri, A., Fujita, S., Hemming, A., Howard, R., Reed, A., & Karlix, J. (2013). Cytochrome P450 3A4*1B as Pharmacogenomic Predictor of Tracolimus Pharmacokinetics and Clinical Outcome in the Liver Trasnplant Recipients. *Saudi Journal Gastroenterology*, 19(2): 89-95.
- Arcos Sánchez, C., Salinas Vela, F., & Olmedilla González, M. (2011). Nuevas perspectivas en el tratamiento de la esclerosis múltiple. *Sanidad Militar*, 67(2): 108-114.
- Bermejo, P., Blasco, M., Sánchez, A., y García, A. (2011). Enfermedades desmieliniantes del sistema nervioso central. Concepto, clasificación y epidemiología. *Medicine*, 10(75): 5065-5068.
- Brambilla, A. (2013). MDR1 (ABCB1) polymorphism: functional effects and clinical implications. *Revista de Investigación Clínica*, 65(5): 445-454.
- Carretero, J., Bowakim, W., y Acebes, J. (2001). Actualización: esclerosis múltiple. *MEDIFAM*, 11(9): 516- 529.
- Choudhuri, S., y Klaassen, C. (2006). Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphism of Human ABCB1 (MDR1), ABCCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters. *International Journal of Toxicology*, 25(4): 231-259.
- Cotte, S., Ahsen, N., Kruse, N., Huber, B., Winkelmann, U., Zettl, K., Starck, M., König, N., Tellez, N., Dörr, J., Paul, F., Zipp, F., Lühder, F., Koepsell, H., Pannek, H., Montalban, X., Gold, R. & Chan, A. (2009) ABC- transporter gene-polymorphisms are potential pharmacogenetic markers for mitoxantrone response in multiple sclerosis. *Brain a Journal of Neurology*, 132(9)2517-2530
- Díaz, M., y Jiménez, M. (2016). Tratamiento de las enfermedad demielinizantes. Esclerosis múltiple. *Medicine*, 12(23): 1337-1349.
- Díaz, C. (2008). Mecanismo de acción de los fármacos inmunosupresores. *Revista Chilena de Reumatología*, 24(2): 73-88.
- Domínguez, R., Morales, M., Rossiere, N. L., Olan, R., y Gutiérrez, J. L. (2012). Esclerosis múltiple: revisión de la literatura médica. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 55(5): 26-35.
- Drozdik, M. (2017). Chapter 30 Pharmacokinetics and Genomics of Immunosuppressive Drugs. En G. Orlando, G. Remuzzi, & F. Williams, *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration* (429-443). Elsevier.

- Escalante, D., Feria, I., Ribas, R., Rayo, D., Fagiolino, P., Vázquez, M., Escamilla, C., Grijalva, I., López, M., Orozco, S. (2014). MDR-1 and MRP2 gene polymorphism in Mexican epileptic pediatric patients with complex partial seizures. *Frontiers in Neurology*, 5, 184. doi:10.3389/fneur.2014.00184.
- Frohahn, E., Shah, A., Eggenberger, E., Metz, L., Zivadnov, R., y Stüve, O. (2007). Corticosteroids for Multiple Sclerosis: I. Application for Treating Exacerbations. *Neurotherapeutics*, 4(4): 618-626.
- Fung, K., y Gottesman, M. (2009). A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5): 860-871.
- Goldenberg, M. M. (2012). Multiple Sclerosis Review. *P&T*, 37(3): 175-184.
- Guengerich, P. (1999). Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Review Pharmacology Toxicology*, 39: 1-17.
- Hodges, L., Markova, S., Chinn, L., Gow, J., Kroetz, D., Klein, T., & Altman, R. (2011). Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*, 21(3): 152-161.
- Ichiro, I., Horoshi, T. y Kenji O. (2004) The MDR1 (ABCB1) Gene polymorphism and its clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*. 43(9): 553-576
- IMSS. (23 de Mayo de 2017). Esclerosis múltiple, enfermedad discapacitante en adultos jóvenes. México: IMSS. Recuperado de: <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201705/150>
- Iniesta, R., Guinó, E., y Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4): 333-341.
- Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares. (Junio de 2002). Esclerosis múltiple. *Esperanza en la investigación*. Estados Unidos : Office of Communication and Public Liaison. Recuperado de https://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/esclerosis_multiple.htm
- Islam, M. O., Kanemura, Y., Tajira, J., Mori, H., Kobayashi, S., Shofuda, T., Miyake, J., Hara M., Ymasaki M., y Okano, H. (2005). Caracterización of transporter ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells. *FEBS Letters*, 579(17): 3473-3480.
- Izquiero, G., y Ruiz, J. (2003). Evaluación clínica de la esclerosis múltiple: cuantificación mediante la utilización de escalas. *Revista de Neurología*, 36(2): 145-152.
- Johns Hopkins University. (17 de 1 de 2008). *OMIM Online Mendelian Inheritance in Man*. Obtenido de *124010 Cytochrome P450, subfamily IIIA, Polypeptide 4; CYP3A4: <https://www.omim.org/entry/124010#geneFunction>

- Kooiji, G., Horssen, J., de Lange, E., Reijkerkerk, A., Pol, S., Hof, B., Drexhage, J., Vennegoor, A., Killestein, J., Scheffer, Oerlemans, R., Scheper, R., Valk, P. Dijkstra, C., y Vries, H. (2010) Tlymphocytes impair P-glycoprotein function during neuroinflammation. *Journal of Autoimmunity*.34(4): 416-425
- Krieger , S., Sorells, S., Nickerson , M., y Pace, T. (2014). Mechanistic insights into corticosteroids in multiple sclerosis: War horse or Chamaleon. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 119: 6-16.
- Leschiziner, G., Andrew, T., Pirmoohamed, M., & Johnson, M. (2007). ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *The Pharmacogenomis Journal*, 7(3): 154-179.
- Liu, L., Chang, Y., Shi, X., Yang, H., Kang, L., Jin, T., Yuan, D., He, Y. (2017). Genetic analysis of drug metabolizing phase-I enzymes CYP3A4 in Tibetan populations. *Journal of genetics*, 96(2): 219-225.
- Martinez, M., Ramos, O., Luna, I. M., y Arrieta, E. (2015). Revisión de la esclerosis múltiple (2). Diagnóstico y tratamiento. *Semergen*, 41(6): 324-328.
- Meyer, S., Feng, Y., Maeurer, M., Dippel, F., y Kohlmann, T. (2014) Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurology*, 14, 58. doi:10.1186/1471-2377-14-58
- Morales, A., Puerto, D., Torres, M., Gallo, G., Rodríguez R., L., y Vallejo, M. (2014). Determinación cualitativa de algunos metabolitos de seis glucocorticoides en orina a través de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a masas-masas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*, 43(1): 137-152.
- Nebesio, T., Renbarger, J., Nabhan, Z., Ross, S., Slaven, J., Li, L., Walvoord, E., Eugster, E. (2016). Differential effects of hydrocortisone, prednisone, and dexamethasone on hormonal and pharmacokinetic profiles: a pilot study in children with congenital adrenal hyperplasia. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2016:17. doi 10.1186/s13633-016-0035-5
- Ortega, A., Dorado, P., Fricke, I., Jung H., Monroy N., Martínez, IE., Familia, I., Peña, E., Llerena , A., López, M. (2015). CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 genetic polymorphisms and phenytoin plasma concentrations in Mexican-Mestizo patients with epilepsy. *The Pharmacogenomics Journal*, 16(3): 286-292.
- Ortiz, L., y Tabak, R. (2012). Farmacogenómica en la práctica clínica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(5): 616-621.
- Quetglas, E., Armuzzi, A., Wiggie, S., Fiorino, G., Barnscheid, L., Froelich, M., y Danese, S. (2015). Review article: The pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs used in inflamatory bowel disease treatment. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(7): 773-799

- Reyes, O., Lares, I., Sosa, M., Vega, L., Albores, A., y Elizondo, G. (2008). A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in mexican amerindian and mestizo populations . *Pharmacology*, 81(2): 97-103.
- Roden, D., Wilke, R., Kroemer, H., y Stein, M. (2011). Pharmacogenomics: The genetics of variable drug responses. *Circulation*, 123(15): 1661-1670.
- Rodríguez, M., y Espinosa, F. (2016). Uso de glucocorticoides sistémicos en Pediatría: generalidades. *Acta Pediátrica de México*, 37(6): 349-354.
- Serra, H., Roganovich, J. M., y Rizzo, L. (2012). Glucocorticoides: Paradigma de medicina traslacional de lo molecular al uso clínico. *Medicina*, 72(2): 158-170.
- Shi, W.-L., Tang, H.-L., y Zhai, S.-D. (2015). Effects of the CYP3A4* 1B Gene Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renalt Transplant Recipients: A meta-analysis. *PLOS One*, 10(6): 1-14.
- Sol, J., Sub, H., Hyo, L., On, J., Won, D., Hoon, Y., Woo, M., Young, S., Doo, H. (2013). Screening of Genetic Polymorphism of CYP3A4 and CYP3A5 Genes. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 17(6): 479-484.
- Torrades, S. (2004). Esclerosis múltiple y otras efermedades desmielinizantes. Fcatores de riesgo genético y ambientales. *OFFARM*, 23(11): 86-90.
- Turolo, S., Tirelli, Amedea S., Feraresso, M., Ghio, L., Belingheri, M., Groppali, E., Torresani, E., Edefonti, A. (2010). Frequencies and roles of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 single nucleotide polymorphism in Italian teenagers after kidney tranplantation. *Pharmacological reports*, 62(6): 1159-1169.
- Uhr, M., Tontsch, A., Namendorf, C., Ripke, S., Lucae, S., Ising, M., Dose, T., Ebinger, M., Rosenhagen, M., Kohli, M., Kloiber, S., Salyakina, D., Bettecken, T., Specht, M., Pütz, B., Binder, E., Müller- Myhsok, B., Holsboer, F. (2008). Polymorphism in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron*, 57(2): 203-209.
- Varis, T. (2000). Studies on drug interactions between CYP3A4 inhibitors and glucocorticoids. *Studies on drug interactions between CYP3A4 inhibitors and glucocorticoids. Department of clinical pharmacology, University of Helsinki. Academic dissertation.* Finland: Helsinki, 30-36.
- Wang, L., McLeod, H., y Weinshilboum, R. (2012). Genomics and drug response. *New England Journal Medicine*, 364: 1144-1153.
- Wasilewska, A., Zalewski, G., Chyezewski, L., & Zhoch-Zwierz, W. (2007). MDR-1 gene polymorphism and clinical course of steroid-responsive nephrotic syndrome in children. *Pediatric Nephrology*, 22(1): 44-51.

- Whirl-Carrillo, M., McDonagh, E.M., Hebert, J. M., Gong, L., Sangkuhl, K., Thorn, C.F., Altman, R.B., Klein, T. (2012). Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(4): 414-417.
- Xing, Q. Gao, R., Li, H., Feng, G., Xu, M., Duan, S., Meng, J., Zhang, A., Qin, Sh., He, L. (2006). Polymorphism of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients. *Pharmacogenomics*, 7(7): 987-993.
- Xuan, M., Li, H., Fu, R., Yang, Y., Zhang, D., Zhang, X. & Yang, R. (2014). Association of ABCB1 gene polymorphism and haplotypes with therapeutic efficacy of glucocorticoids in Chinese patients with immune thrombocytopenia. *Human Immunology*, 75(4): 317-321.
- Zanger, U. M., y Klein, K. (2013). Pharmacogenomics of cytochrome P450 3A4: recent progress toward the "missing heritability" problem. *Frontiers in Genetics. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics*, 4, 12. doi:10.3389/fgene.2013.00012 1-15.
- Zanger, U. M., y Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1): 103-141.
- Zerbino, D., Achuthan, P., Akanni, W., Ridwan M., Barrel, D., Bhai, J., Billis, K., Cumminis, C., Gall, A., García C., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O., Janacek, S., Juettemann, T., Kiang J., Laird, M., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Kee C., Parker, A., Patricio, M., Singh, H., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thorman, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D., Trevanion, S., Aken, B., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P. (2017)a. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*, D754-D761. GRCh38.p12/rs1128503 . Obtenido de: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:8754978-5-87550785;v=rs1128503;vdb=variation;vf=805167#373531_tablePanel
- Zerbino, D., Achuthan, P., Akanni, W., Ridwan M., Barrel, D., Bhai, J., Billis, K., Cumminis, C., Gall, A., García C., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O., Janacek, S., Juettemann, T., Kiang J., Laird, M., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Kee C., Parker, A., Patricio, M., Singh, H., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thorman, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D., Trevanion, S., Aken, B., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P. (2017)b. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*, D754-D761. GRCh38.p12/rs2032582. Obtenido de:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:8753080-87531802;v=rs2032582;vdb=variation;vf=1453429

Zerbino, D., Achuthan, P., Akanni, W., Ridwan M., Barrel, D., Bhai, J., Billis, K., Cumminis, C., Gall, A., García C., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O., Janacek, S., Juettemann, T., Kiang J., Laird, M., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Kee C., Parker, A., Patricio, M., Singh, H., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thorman, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D., Trevanion, S., Aken, B., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P. (2017)c. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*, D754-D761. GRCh38.p12/ rs1045642 . Obtenido de: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:8750882-87509829;v=rs1045642;vdb=variation;vf=757723

Zerbino, D., Achuthan, P., Akanni, W., Ridwan M., Barrel, D., Bhai, J., Billis, K., Cumminis, C., Gall, A., García C., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O., Janacek, S., Juettemann, T., Kiang J., Laird, M., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Kee C., Parker, A., Patricio, M., Singh, H., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thorman, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D., Trevanion, S., Aken, B., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P. (2017)d. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*, D754-D761. GRCh38.p12/ rs2740574 . Obtenido de: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:9978397-99784973;v=rs2740574;vdb=variation;vf=2075944