



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN
ABCB1 (C1236T, G2677T/A y C3435T) EN
PACIENTES MESTIZO MEXICANOS CON
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A

AMBAR MARIEL GÓMEZ SÁNCHEZ

ASESORES:

DR. JORGE LUIS GUERRERO CAMACHO

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
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: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe 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**

Análisis de los polimorfismos del gen ABCB1 (C1236T, G2677T/A Y C3435T) en pacientes mestizo mexicanos con Esclerosis Múltiple.

Que presenta la pasante: **Ambar Mariel Gómez Sánchez**

Con número de cuenta: **306525034** 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 11 de Mayo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

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

Trabajo realizado en el Instituto Nacional
de Neurología y Neurocirugía "Manuel
Velasco Suárez" con
el financiamiento de
CONACYT-FONSEC
No. 181359

A MIS PADRES, ROSA ISELA Y JORGE

Y A MIS HERMANAS, ISABELLA Y REGINA

AGRADECIMIENTOS

A:

Mis padres, Rosa Isela Sánchez Martínez y Jorge Gómez Vargas; por su apoyo, sus sacrificios y su amor. Gracias por ser mi ejemplo de trabajo, esfuerzo y dedicación; por darme todas las herramientas para poder cumplir mis sueños, por sus consejos y por su apoyo incondicional. Gracias por darme una excelente educación, por cuidarme y procurar que siempre tuviera lo mejor para ser feliz. Por darme el regalo más grande y bonito que jamás me hayan podido dar, mis hermanas. Este largo camino se los debo a ustedes, porque siempre están ahí cuando más los necesito. Gracias por ayudarme a crecer y ser mejor cada día, los amo.

Mis hermanas, Isabella (mi gato) y Regina (mi pato); gracias por venir a mi vida a darle felicidad, color, alegrías y sonrisas. Me iluminan día a día con su energía, sus bromas y su inocencia. A pesar de lo pequeñas que son, me han enseñado que el amor de un hermano es lo mejor que puede existir. Gracias por sus abrazos, besos y cariños; me encanta pasar tiempo a su lado jugando y riendo como niñas. Son lo mejor de mi vida y las amo con todo el corazón.

Mis abuelos: Rosa María Martínez Olguín, Gustavo Sánchez González y María Elena Vargas Miranda; por cuidar de mí durante tantos años cuando mis padres no podían hacerlo. Por todo su amor, sus atenciones, sus consejos y su apoyo; son una parte fundamental en mi educación ya que gracias a ustedes nunca estuve sola, los amo.

Mis tías y tíos: Claudia, Norma, Gloria, Marisol, Brenda, Teresa, Armando, Agustín y Manuel. Por estar presentes en mi vida desde que era una niña, por cuidar de mí, apoyarme y siempre preocuparse por mi felicidad y mis logros; los quiero mucho. De manera especial a mi tío Gus (Guso), por ser como mi hermano mayor. Gracias por ser un ejemplo, por tanta diversión y aventuras juntos, por tus consejos y por cuidarme durante tantos años como si fuera tu hermana, te quiero mucho.

Mi primo, Armandito (babe) por ser mi hermano pequeño, por jugar y reír como locos cuando niños, gracias por escucharme, por tus consejos y tu apoyo. A mis primos pequeños: Manuelito, Ulises (Mugly), Matteo (Mato), Lalo (Lalolalona), Darío (Daricuol) y Ricardo (Richie); gracias por hacerme reír y por dejarme apapacharlos. Siempre van a contar conmigo primos, los quiero mucho.

Mis amigos: Carmin (Mago), gracias por ser mi mejor amiga y hermana; por todo tu apoyo en las buenas y en las malas, por escucharme, por tus consejos, tus regaños y por enseñarme el valor de una verdadera amistad. Te amo amiga, gracias por todo. Charly, gracias por ser mi mejor amigo; por acompañarme en todo momento, por brindarme las palabras adecuadas cuando más las necesito, por creer en mí y nunca dejarme caer, te amo amigo. Itzie y Jackie, amigas gracias por siempre estar presentes; a pesar de no estar juntas, sé que puedo contar con ustedes en todo momento. Gracias por tantas aventuras juntas, las amo hermanas. Fanny, gracias por todo tu apoyo y tus consejos amiga, eres muy especial para mí, te quiero mucho. Erick, gracias por apoyarme durante tantos años a lo largo de mi carrera, por ayudarme con mis tareas, proyectos y desvelos; gracias por estar siempre para mí.

Mis compañeros y amigos de la carrera: Lari, Mondri, Iza, Marita, Adolfo y Sina; gracias por hacer la estancia en la universidad mucho más divertida, por los días enteros en la biblioteca y los desvelos juntos.

Dr. Jorge Luis Guerrero Camacho (George), por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por todas tus enseñanzas, consejos y paciencia para que este trabajo se pudiera cumplir. Gracias por brindarme la confianza de poder desarrollar este proyecto, con el cual aprendí mucho y me ayudó a forjarme como profesionalista.

Todo el equipo de Neurogenética: Dr. George, Dr. Jara, Lety, Adri, David, Vato y Gina. Gracias por crear un excelente ambiente en el laboratorio, por todo lo que me enseñaron, por sus consejos y siempre darnos ánimos.

Mis compañeros de laboratorio: Gabo, Peque, Sarita, Gaby, Ara y César; gracias por formar un equipo de trabajo en donde todos nos ayudamos a sacar nuestros proyectos adelante, por hacer esas horas en el laboratorio más divertidas bromeando, riendo y comiendo juntos. Gracias por todo su apoyo y sus ánimos, los quiero.

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, gracias por todo lo que me enseñó a lo largo de la carrera y por ser el vínculo que me llevó a realizar mi tesis en el I.N.N.N.

A mi jurado conformado por: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez, Dra. Patricia Ramírez Noguera, M. en C. Maritere Domínguez Rojas y Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García; por tomarse el tiempo de leer mi trabajo y hacer las correcciones pertinentes para obtener un mejor resultado.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	12
ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN	16
1. INTRODUCCIÓN	17
Capítulo 1. Sistema Nervioso.....	17
1.1 Organización del Sistema Nervioso.....	18
1.2 Sistema Nervioso Central	18
1.2.1 Anatomía del SNC.....	18
1.2.2 Células del SNC	20
1.3 Mielinización.....	22
1.4 Sustancia gris y sustancia blanca.....	23
Capítulo 2. Enfermedades desmielinizantes	24
2.1 Esclerosis Múltiple.....	24
2.1.1 Definición	24
2.1.2 Historia.....	24
2.1.3 Epidemiología.....	24
a) Frecuencia de la EM en el mundo.....	24
b) Frecuencia de la EM en México	25
2.1.4 Género y edad de incidencia de la EM	26
2.1.5 Etiología	27
a) Aspectos Ambientales.....	27
b) Aspectos Inmunológicos	27
c) Aspectos Genéticos	29
2.1.6 Signos y Síntomas.....	29
2.1.7 Clasificación	31
2.1.8 Diagnóstico.....	32
2.1.9 Tratamiento	34
a) Tratamiento de las exacerbaciones o brotes.....	34
b) Terapia modificadora de la enfermedad.....	35
c) Tratamiento de los síntomas	36

2.2 Neuritis Óptica.....	37
Capítulo 3. Proteínas Transportadoras ABC.....	38
3.1 Proteínas ABC.....	38
3.1.1 Estructura.....	38
a) Dominios transmembranales (TMD).....	39
c) Dominios de fijación a nucleótidos (NBD).....	40
3.2 Glicoproteína P (P-gp).....	42
3.2.1 Estructura de la Glicoproteína P.....	43
3.2.2. Sustratos de la Glicoproteína P.....	44
Capítulo 4. Familias de genes ABC.....	45
4.1 Subfamilia ABCB.....	47
4.1.1 Gen ABCB1.....	47
4.1.2 Polimorfismos del gen ABCB1.....	48
a) SNP C1236T.....	50
b) SNP G2677T/A.....	51
c) SNP C3435T.....	51
4.1.3 Análisis por Haplotipo.....	52
Capítulo 5. Farmacogenómica.....	52
5.1 Definición.....	52
5.2 Historia.....	53
5.3 Medicina Personalizada.....	53
5.4 Aplicación de la farmacogenómica en México.....	53
2. JUSTIFICACIÓN.....	55
3. HIPÓTESIS.....	56
4. OBJETIVOS.....	57
5. METODOLOGÍA.....	58
5.1 Diagrama de Flujo Experimental.....	58
5.2 Material, reactivos y equipo empleado.....	59
5.3 Obtención de muestras.....	60
5.4 Extracción de DNA.....	61
5.5 Cuantificación y análisis de integridad de DNA.....	62
5.6 Amplificación de DNA por PCR.....	65
5.7 RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica).....	68
5.7.1 RFLP del polimorfismo C1236T.....	70

5.7.2 RFLP del polimorfismo C3435T.....	71
5.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	73
5.9 Secuenciación.....	74
5.9.1 Análisis de Electroferogramas.....	80
5.10 Análisis Estadístico.....	80
6. RESULTADOS.....	81
6.1 Análisis de integridad de DNA.....	81
6.2 Reacción de PCR.....	82
6.3 RFLP.....	83
6.4 Análisis de Secuencias.....	84
6.5 Frecuencias genotípicas y alélicas.....	86
6.6 Análisis Estadístico.....	89
6.7 Análisis por haplotipos.....	90
7. DISCUSIÓN.....	92
8. CONCLUSIONES.....	102
9. PERSPECTIVAS.....	103
10. Referencias.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras del sistema nervioso. SP (Sistema Nervioso Periférico), SNC (Sistema Nervioso Central)	17
Figura 2.	Corte sagital, vista medial del encéfalo	19
Figura 3.	Médula espinal y sus 31 nervios espinales	20
Figura 4.	Clasificación estructural de las neuronas	21
Figura 5.	Neuroglia del SNC	22
Figura 6.	Distribución de la sustancia gris y blanca en el SNC	23
Figura 7.	Incidencia de esclerosis múltiple en el mundo	25
Figura 8.	Destrucción de la mielina por el sistema inmunológico	28
Figura 9.	Resonancia magnética cerebral en pacientes con EM	32
Figura 10.	Patrones de bandas oligoclonales por isoelectroenfoque en suero y LCR	33
Figura 11.	Estructura de los "Transportadores completos" y los "Medios transportadores"	39
Figura 12.	Posición de los motivos presentes en el dominio NBD	41
Figura 13.	Representación esquemática de la P-gp	43
Figura 14.	Representación 3D de la P-gp	44
Figura 15.	Localización del gen <i>ABCB1</i> en el cromosoma 7	47
Figura 16.	Capacidad de transporte de la P-gp según el genotipo del SNP <i>C3435T</i>	49
Figura 17.	Estructura de P-gp, se muestra la posición de los SNPs más estudiados	50
Figura 18.	Esquema de separación de fases con cloroformo-alcohol isoamílico para la extracción de DNA	62
Figura 19.	Espectrofotómetro JENWAY Genova Nano empleado en la cuantificación de DNA	63
Figura 20.	Esquema de cámara electroforética horizontal Labnet	64
Figura 21.	Esquema de un ciclo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	65

Figura 22.	Esquema de los sitios de corte de la enzima <i>Hae III</i> y los fragmentos generados para cada genotipo del polimorfismo <i>C1236T</i>	71
Figura 23.	Esquema de los sitios de corte de la enzima <i>Mbo I</i> y los fragmentos generados para cada genotipo del polimorfismo <i>C3435T</i>	72
Figura 24.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	73
Figura 25.	Analizador Genético 3130 AB utilizado en la secuenciación de las Muestras	75
Figura 26.	Electroforesis capilar de la secuenciación automatizada	76
Figura 27.	Gel de agarosa al 0.8%, donde se verificó la integridad del DNA	81
Figura 28.	Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio	82
Figura 29.	Gel de poliacrilamida al 10%, SNP <i>C1236T</i>	83
Figura 30.	Gel de poliacrilamida al 10%, SNP <i>C3435T</i>	84
Figura 31.	Electroferogramas de distintas muestras donde se observan los 6 posibles genotipos del polimorfismo <i>G2677T/A</i>	85
Figura 32.	Consecuencias de un SNP sinónimo en los procesos de traducción	98
Figura 33.	Imagen de electroferograma de una muestra secuenciada con el Kit Wizard® Promega	101
Figura 34.	Imagen de electroferograma de una muestra secuenciada con filtros de puntas para micropipetas	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales signos y síntomas de la EM	30
Tabla 2.	Fármacos usados en el manejo de los síntomas de la EM	36
Tabla 3.	Localización tisular de la P-gp y su función como transportador	42
Tabla 4.	Sustratos, inhibidores e inductores de la glicoproteína P	44
Tabla 5.	Subfamilias del gen ABCB en humanos	45
Tabla 6.	Lista de material, reactivos y equipos empleados en este estudio	59
Tabla 7.	Secuencia de oligonucleótidos empleados en la amplificación de los polimorfismos <i>C1236T</i> , <i>G2677T/A</i> y <i>C3435T</i> del gen <i>ABCB1</i>	67
Tabla 8.	Condiciones de PCR para los SNPs <i>C1236T</i> , <i>G2677T/A</i> y <i>C3435T</i>	67
Tabla 9.	Condiciones de la digestión enzimática para los SNPs <i>C1236T</i> y <i>C3435T</i>	69
Tabla 10.	Sitio de corte y fragmentos generados por la enzima <i>Hae III</i> en el SNP <i>C1236T</i>	70
Tabla 11.	Sitio de corte y fragmentos generados por la enzima <i>Mbo I</i> en el SNP <i>C3435T</i>	71
Tabla 12.	Condiciones para la elaboración de un gel de poliacrilamida al 10%	74
Tabla 13.	Condiciones de la reacción de secuenciación para el SNP <i>G2677T/A</i>	79
Tabla 14.	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs <i>C1236T</i> , <i>G2677T/A</i> y <i>C3435T</i>	86
Tabla 15.	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs <i>C1236T</i> , <i>G2677T/A</i> y <i>C3435T</i> en los 4 grupos de diagnóstico de muestras de pacientes de EM	87
Tabla 16.	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs <i>C1236T</i> , <i>G2677T/A</i> y <i>C3435T</i> en los 2 grupos de diagnóstico de muestras de pacientes de NO	88
Tabla 17.	Análisis de asociación de los SNPs del gen <i>ABCB1</i> en individuos mexicanos	89
Tabla 18.	Haplotipos de los SNPs del gen <i>ABCB1</i> en casos de EM e individuos normales	90
Tabla 19.	Haplotipos de los SNPs del gen <i>ABCB1</i> en casos de NO e individuos normales	90
Tabla 20.	Análisis de asociación por haplotipos de casos y controles en pacientes con EM	91
Tabla 21.	Comparación de las frecuencias alélicas de los SNPs <i>C1236T</i> , <i>G2677T/A</i> y <i>C3435T</i> en distintas poblaciones del mundo y población mestizo mexicana	92

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1.	Organización del Sistema Nervioso	18
Diagrama 2.	Metodología para la extracción de DNA	61
Diagrama 3.	Análisis de integridad del DNA	64
Diagrama 4.	Metodología para la reacción en cadena de la polimerasa	68
Diagrama 5.	Metodología para la purificación del fragmento amplificado del SNP <i>G2677T/A</i> mediante el Kit Wizard® Promega	77
Diagrama 6.	Metodología para la purificación del fragmento amplificado del SNP <i>G2677T/A</i> mediante filtros de puntas para Micropipetas	78
Diagrama 7.	Metodología para la reacción de secuenciación y su purificación en Columnas	79

ABREVIATURAS

A	Adenina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ATP	Adenosin trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
C	Citosina
C1-C8	Nervios cervicales
Co1	Nervios coxígeos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
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
G	Guanina
Gly	Glicina
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo
HCl	Ácido clorhídrico
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina

INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
IMSGC	Asociación Internacional de Genética en Esclerosis Múltiple
K ⁺	Ión potasio
L1-L5	Nervios lumbares
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Mg ²⁺	Ión magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MHC II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II
MT	Mielitis Transversa
Na ⁺	Ión sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NBD	Dominios de Unión a Nucleótidos
NMO	Neuromielitis óptica
NO	Neuritis óptica
pb	Pares de bases
P-gp	Glicoproteína P
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _t	RNA de transferencia
S1-S5	Nervios sacros
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico

SP	Sistema Nervioso Periférico
SNP o SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SNS	Sistema Nervioso Somático
T	Timina
T1-T12	Nervios torácicos
TBE	Tris-Ácido Bórico-EDTA
TMD	Dominios transmembranales
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TTS	Tris-Tritón-Sacarosa

RESUMEN

El gen *MDR1* codifica una de las proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) asociadas a membrana y es responsable de la homeostasis celular, con *locus* 7q21.12. Produce una glicoproteína P (P-gp) cuya actividad tiene relevancia en la terapia farmacológica, debido a su participación en la absorción y excreción de gran variedad de fármacos, sustancias endógenas y exógenas (xenobióticas). Existe heterogeneidad alélica derivada de los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* presentes en el gen *MDR1*; como una determinante potencial de variabilidad en la eficacia y la disposición de fármacos; donde los sujetos homocigotos para estos polimorfismos transportan medicamentos con baja eficacia, los heterocigotos presentan eficacia intermedia y los homocigotos normales responden eficazmente al tratamiento.

De tal forma que en este estudio se buscó evaluar la frecuencia de estos tres polimorfismos del gen *ABCB1* en una muestra de población mestizo mexicana y en pacientes con enfermedades desmielinizantes como la Esclerosis múltiple y la Neuritis óptica. Con la finalidad de conocer, si existe asociación entre la presencia de estos tres SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) y estas enfermedades; se emplearon las técnicas de RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica) y Secuenciación, para determinar el genotipo de cada muestra de DNA genómico.

Los resultados obtenidos mostraron que sí existe una relación entre la presencia de estos polimorfismos y las enfermedades desmielinizantes antes mencionadas. De modo que, el siguiente paso de este estudio es buscar asociación de estos tres SNPs del gen *ABCB1* con relación a la respuesta al tratamiento farmacológico, edad de inicio y severidad de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. Sistema Nervioso

Con una masa de sólo 2 kg del peso corporal total, el sistema nervioso es uno de los más pequeños y complejos de los 11 sistemas del organismo. Consiste en una red intrincada y altamente organizada de millones de neuronas y de células gliales. Las estructuras que lo forman son: encéfalo, nervios craneales, médula espinal, nervios espinales, ganglios nerviosos, plexos entéricos y receptores sensitivos (Figura 1).

El cráneo encierra al encéfalo, que contiene alrededor de 100 mil millones de neuronas y doce pares de nervios craneales emergen de la base del mismo. Un nervio es un haz de miles de axones que siguen una vía determinada e inerva a una región específica del cuerpo. La médula espinal se conecta con el encéfalo, está rodeada por la columna vertebral y desde ella emergen 31 pares de nervios espinales, éstos inervan una región en el lado izquierdo o derecho del cuerpo. Los ganglios son masas pequeñas de tejido nervioso, relacionados con los nervios craneales y espinales. En los órganos del tracto gastrointestinal, se encuentran redes de neuronas llamadas plexos entéricos que regulan el aparato digestivo. Y los receptores sensitivos son dendritas de neuronas sensitivas que monitorizan los cambios en el ambiente (Tortora y Derrickson, 2006).

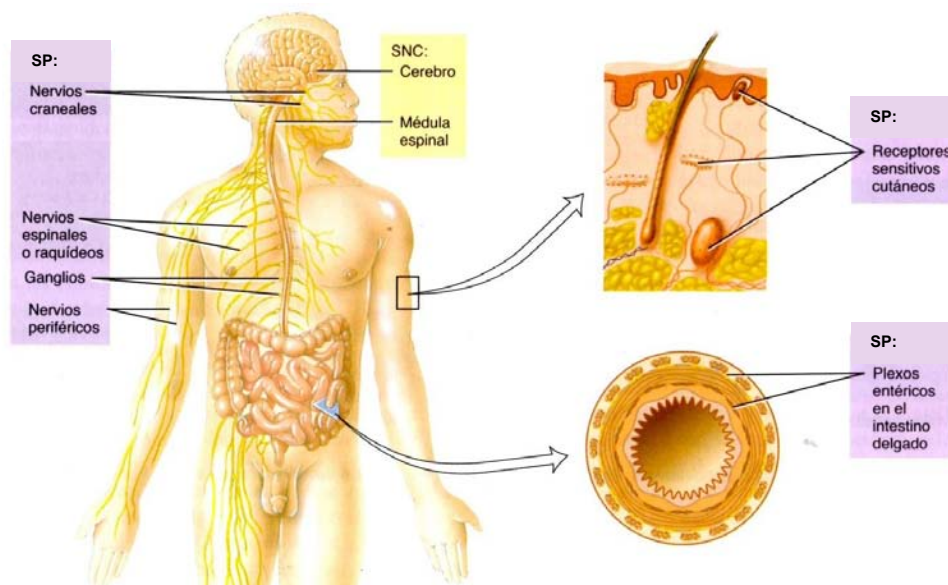


Figura 1. Estructuras del sistema nervioso. SP (Sistema Nervioso Periférico), SNC (Sistema Nervioso Central) (Tomado de: Tortora y Derrickson, 2006).

1.1 Organización del Sistema Nervioso

Las dos subdivisiones principales del sistema nervioso son: el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico (Diagrama 1).

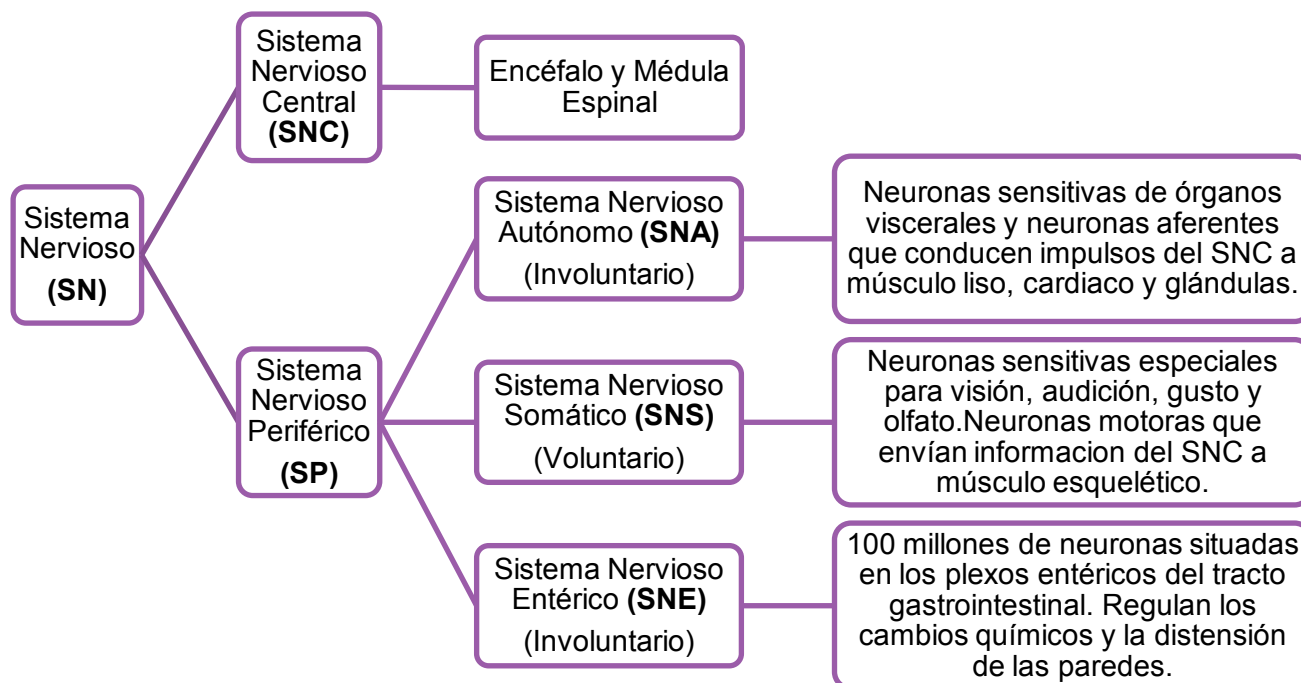


Diagrama 1. Organización del Sistema Nervioso (Tomado de: Moore y col., 2013).

1.2 Sistema Nervioso Central

El SNC procesa muchas clases distintas de información sensitiva aferente. Es también la fuente de los pensamientos, emociones y recuerdos. La mayoría de los impulsos nerviosos que estimulan a los músculos para que se contraigan y a las glándulas para que aumenten su secreción se originan en el SNC (Latarjet y Ruiz, 2006).

1.2.1 Anatomía del SNC

El encéfalo presenta cuatro porciones principales: el tronco encefálico (o tallo cerebral), el cerebelo, el diencefalo y el cerebro. El tronco encefálico se continúa con la médula espinal y está constituido por el bulbo raquídeo, el puente o protuberancia y el mesencefalo. Detrás del tronco encefálico se halla el cerebelo (cerebro pequeño) y por

encima de él, se encuentra el diencefalo formado por el tálamo, el hipotálamo y el epitálamo. Apoyado sobre el diencefalo y el tronco encefálico se encuentra el cerebro, la parte más grande del encéfalo (Figura 2).

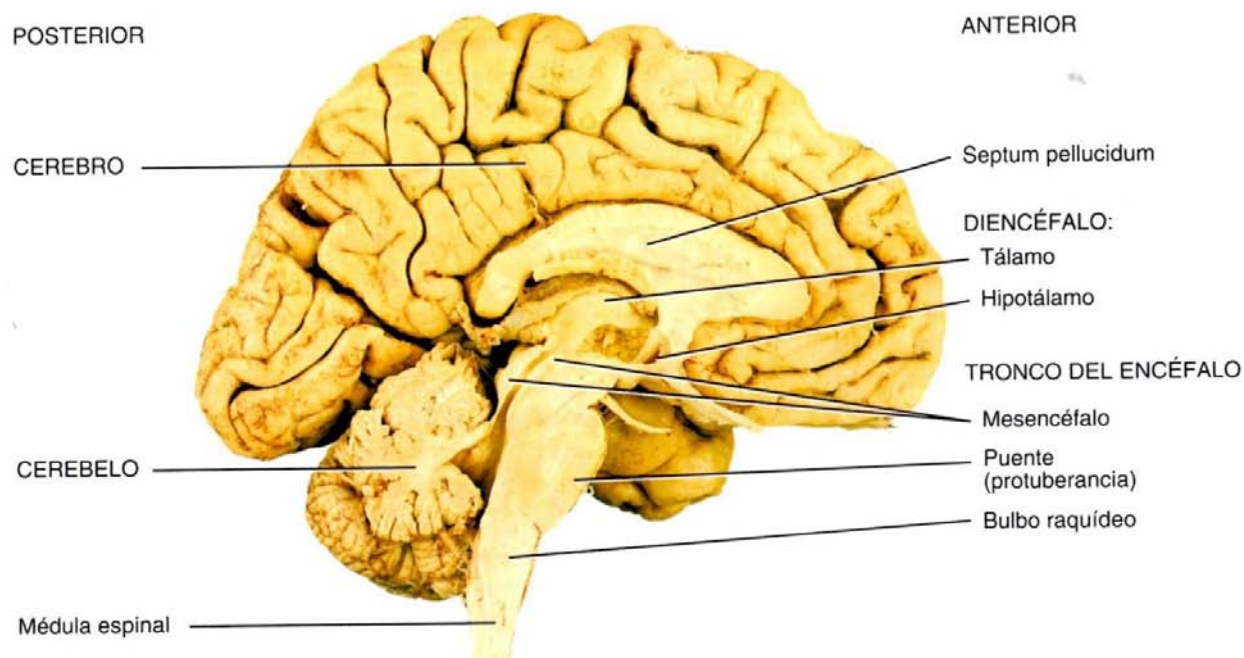


Figura 2. Corte sagital, vista medial del encéfalo
(Tomado de: Tortora y Derrickson, 2006).

El cráneo y las meninges rodean y protegen al encéfalo. Las meninges craneanas continúan con las meninges espinales y llevan los nombres de: duramadre (por fuera), aracnoides (en el medio) y piamadre (por dentro). De igual forma, la barrera hematoencefálica (BHE) protege a las neuronas de sustancias nocivas y de microorganismos porque impide el paso de muchas sustancias de la sangre al tejido nervioso (Moore y col., 2013).

Por otro lado, la médula espinal mide entre 42 a 45 centímetros de longitud y su diámetro es de 2 cm. Los nervios espinales se dividen en segmentos: 8 pares de nervios cervicales (C1-C8), 12 pares de nervios torácicos (T1-T12), 5 pares de nervios lumbares (L1-L5), 5 pares de nervios sacros (S1-S5) y 1 par de nervios coxígeos (Co1). En la figura 3, se muestra la división de los nervios espinales antes mencionados.

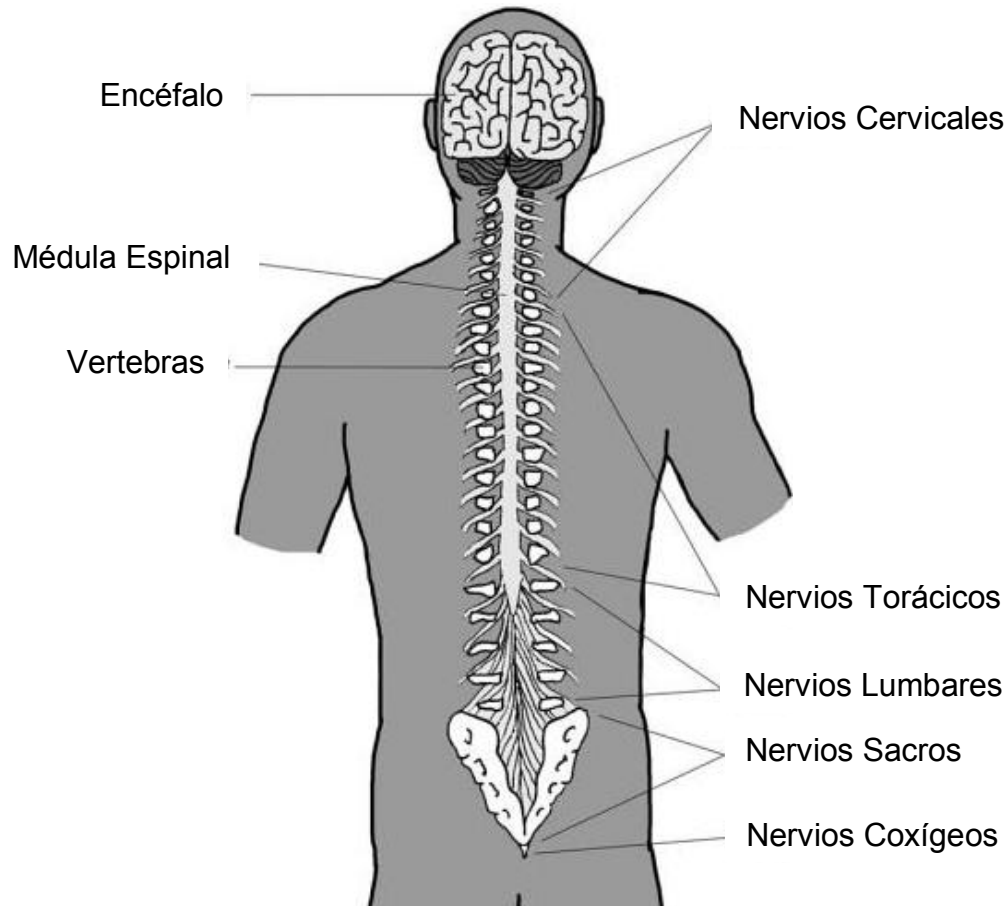


Figura 3. Médula espinal y sus 31 nervios espinales (Tomado de: lezzoni, 2010).

La médula espinal está alojada en el conducto vertebral de la columna vertebral y al igual que al encéfalo, es protegida por las meninges (lezzoni, 2010).

1.2.2 Células del SNC

El sistema nervioso central tiene dos grandes categorías de células especializadas: células nerviosas, también conocidas como neuronas y células de la neuroglia.

Las neuronas son responsables de la mayoría de las funciones propias del sistema nervioso, como la sensibilidad, el pensamiento, los recuerdos, el control de la actividad muscular y la regulación de la secreción glandular. De igual manera, tienen excitabilidad eléctrica, es decir, reciben impulsos nerviosos, señales eléctricas que se propagan a lo largo de la superficie de la membrana plasmática. Esta señal se inicia y

se desplaza como consecuencia del intercambio iónico (Na^+ y K^+) entre el líquido intersticial y el citoplasma a través de los canales iónicos de la neurona. Casi todas las neuronas tienen tres partes: un cuerpo celular, dendritas y un axón. Las dendritas conforman la porción receptora y el axón propaga los impulsos nerviosos hacia otra neurona, una fibra muscular o una célula glandular (Tortora y Derrickson, 2006).

Las neuronas se pueden clasificar de acuerdo a su estructura como se muestra en la figura 4.

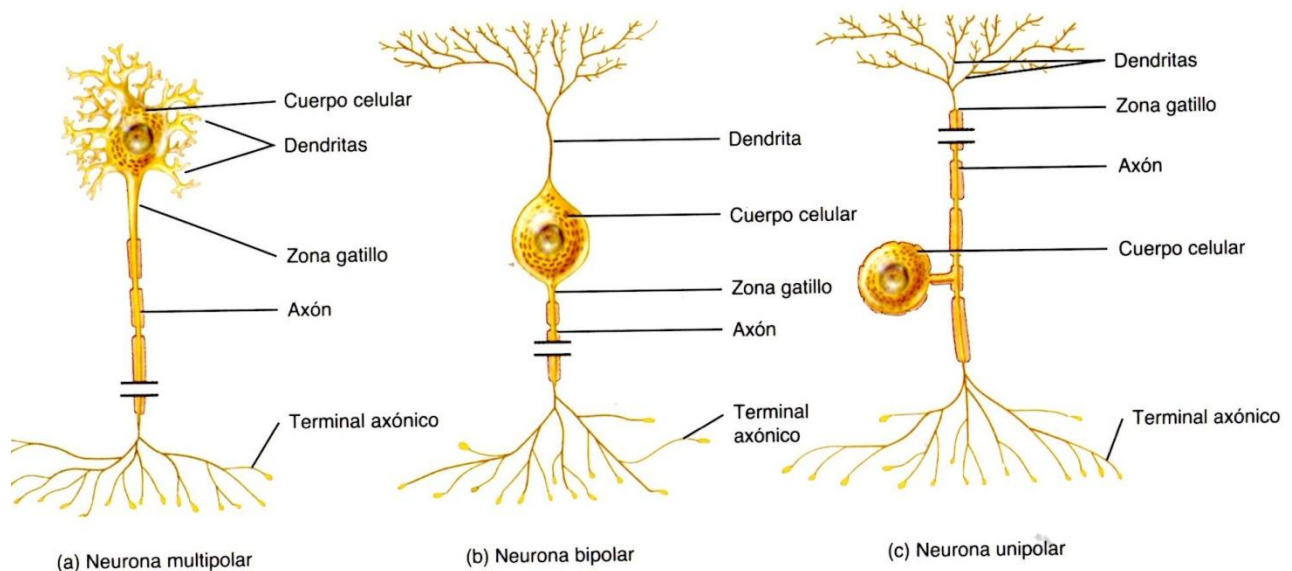


Figura 4. Clasificación estructural de las neuronas
(Tomado de: Tortora y Derrickson, 2006).

Por otro lado, las células de la neuroglia tienen menor tamaño que las neuronas, pero son más numerosas. Las células gliales no generan ni propagan potenciales de acción, se pueden multiplicar y dividir en el sistema nervioso ya maduro. Hay seis tipos de células gliales: astrocitos, oligodendrocitos, microglia, células ependimarias, células de Schwann y las células satélite. Las primeras cuatro están presentes en el SNC (Figura 5) y las últimas dos son propias del SP. Los astrocitos brindan sostén a las neuronas mediante microfilamentos, aíslan a las neuronas del SNC de sustancias nocivas de la sangre, regulan la concentración de iones y sirven como conducto para el paso de

nutrientes a las neuronas. Los oligodendrocitos son responsables de la formación y mantenimiento de la vaina de mielina que se ubica alrededor de los axones del SNC. En el caso de las células de la microglia, cumplen la función de fagocitar microorganismos y tejido nervioso dañado. Por su parte, las células ependimarias forman parte de la barrera hematoencefálica, producen y contribuyen a la circulación del líquido cefalorraquídeo (Moore y col., 2013).

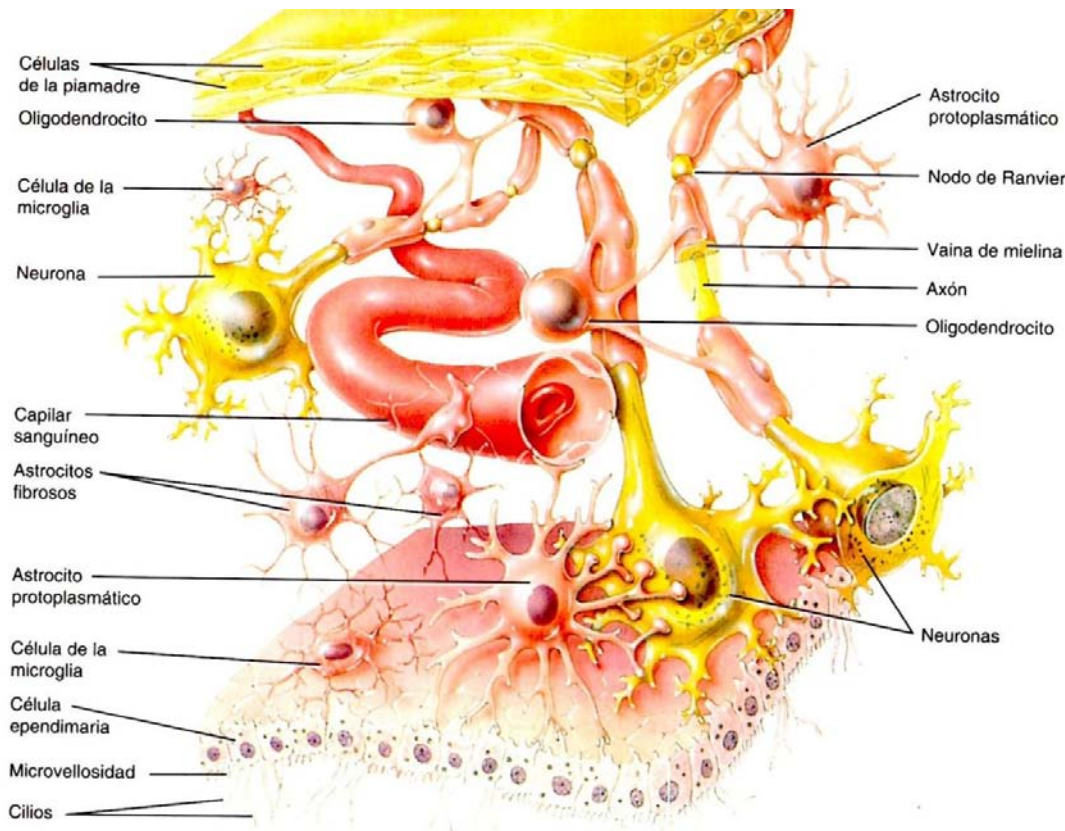


Figura 5. Neuroglia del SNC (Tomado de: Tortora y Derrickson, 2006).

1.3 Mielinización

La vaina de mielina que cubre a los axones está constituida por múltiples capas de lípidos y proteínas. Esta vaina actúa como aislante eléctrico del axón de una neurona y aumenta la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos. De igual forma, hay axones que carecen de esta cubierta y se consideran amielínicos.

Hay dos tipos de células gliales que producen vainas de mielina: las células de Schwann (en el SP) y los oligodendrocitos (en el SNC). La cantidad de mielina aumenta desde el nacimiento hasta la madurez y su presencia eleva en gran medida la cantidad de los impulsos nerviosos. Es importante mencionar que los axones del SNC tienen poca capacidad de regeneración después de una lesión (Latarjet y Ruiz, 2006).

1.4 Sustancia gris y sustancia blanca

La sustancia blanca está compuesta principalmente por axones miélinicos y le debe su nombre al color blanquecino de la mielina. La sustancia gris del sistema nervioso contiene los cuerpos celulares de las neuronas, dendritas, axones amielínicos, terminales axónicos y neuroglia. Tienen un tinte grisáceo por los cuerpos de Nissl y porque la mielina es escasa o nula en estas regiones. Ambas, la sustancia gris y la blanca contienen vasos sanguíneos. En la médula espinal, la sustancia blanca envuelve a un núcleo interno de sustancia gris, que tiene la forma de una letra H. La sustancia gris cubre la superficie de extensas porciones del encéfalo, el cerebro y el cerebelo (Iezzoni, 2010). En la figura 6 se muestran las regiones donde se encuentran la sustancia gris y blanca en el SNC.

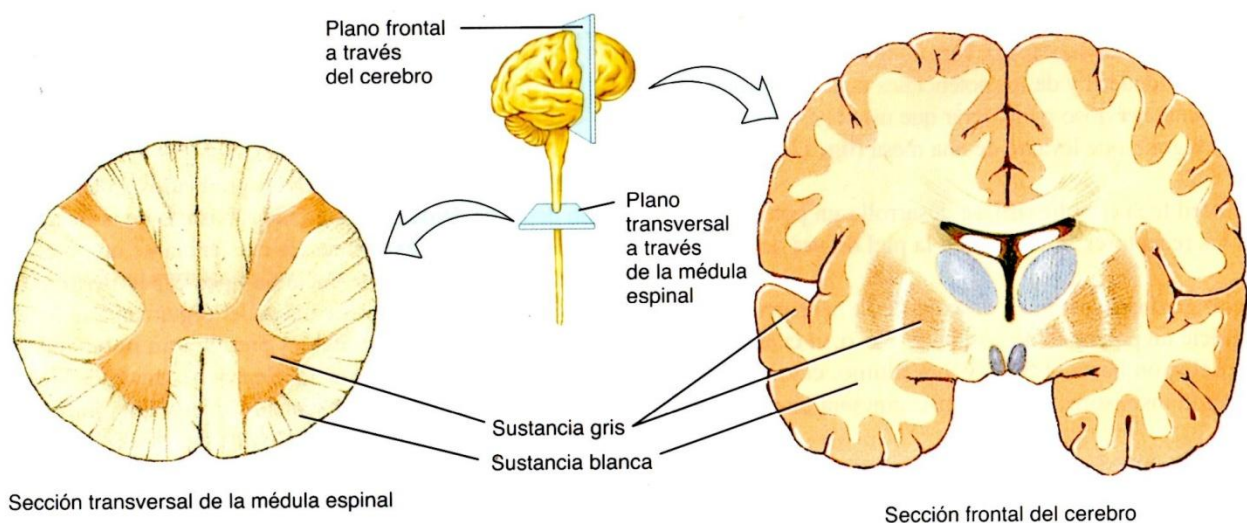


Figura 6. Distribución de la sustancia gris y blanca en el SNC (Tomado de: Tortora y Derrickson, 2006).

Capítulo 2. Enfermedades desmielinizantes

Son aquellas en las que existe un proceso patológico dirigido contra la mielina sana, produciéndose la destrucción de la misma. Entre las enfermedades desmielinizantes se encuentran: Esclerosis múltiple, Mielitis aguda recurrente y aislada, Neuritis óptica, Neuromielitis óptica, Neuropatía óptica inflamatoria recurrente crónica, Encefalomyelitis aguda diseminada, entre otras (Velasco y col., 2011).

2.1 Esclerosis Múltiple

2.1.1 Definición

Es una enfermedad desmielinizante, crónica, autoinmune e inflamatoria que afecta a todo el sistema nervioso central. Constituye la principal causa de discapacidad neurológica entre los adultos jóvenes (Moreno y col., 2012).

2.1.2 Historia

La esclerosis múltiple (EM) se conoce hace más de 100 años, una descripción de la enfermedad aparece desde el siglo XIV cuando se informa del caso de Santa Ledwina de Schiedman, en Holanda. Sin embargo, hasta 1868 el neurólogo francés Jean-Martin Charcot dio a conocer por primera vez, una descripción clínica acompañada de evidencia acerca del daño al SNC con la cual se nombró a la esclerosis múltiple como una enfermedad (Iezzoni, 2010).

2.1.3 Epidemiología

La incidencia y prevalencia de la EM varía extensamente entre distintas zonas geográficas. Se ha observado que en algunas regiones del mundo la prevalencia aumenta y se cree que la latitud es un factor importante en ello; es más frecuente al norte del ecuador (Scolding y Wilkins, 2012).

a) Frecuencia de la EM en el mundo

La EM constituye una enfermedad que aqueja aproximadamente a 2.3 millones de personas en el mundo según lo reportado en el 2013 por el atlas de EM. La prevalencia

en zonas de Norteamérica y Europa es de 140 a 108 casos por cada 100,000 habitantes, respectivamente. Por otro lado, es menos frecuente en Asia y África con 2.1 a 2.2 casos reportados por 100,000 habitantes respectivamente (Atlas de EM, 2013). La prevalencia en Latinoamérica es de 2 hasta 13 casos por cada 100,000 habitantes con reportes variables en países como Cuba, donde se reporta en algunas regiones una prevalencia de hasta 103 casos por 100,000 habitantes (Moreno y col., 2012). En la figura 7 se presenta un mapa donde se observa la frecuencia de casos de EM en el mundo.

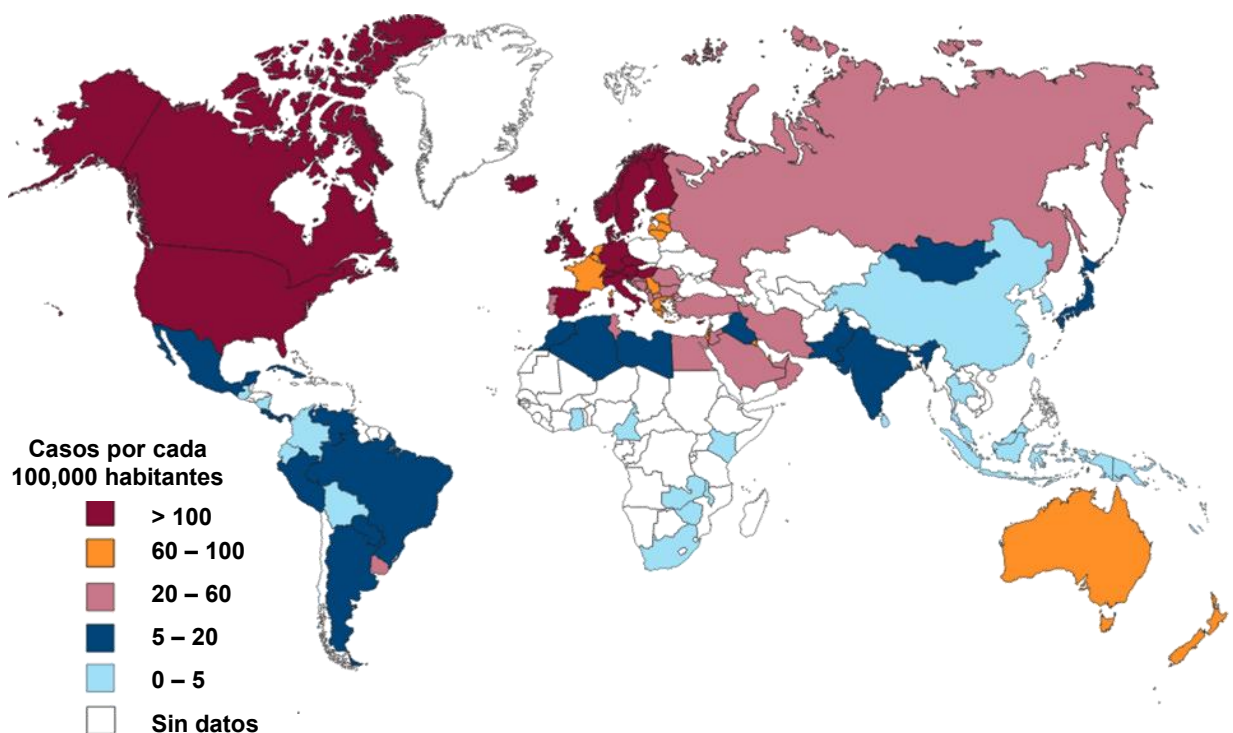


Figura 7. Incidencia de esclerosis múltiple en el mundo (Tomado de: Atlas de EM, 2013).

b) Frecuencia de la EM en México

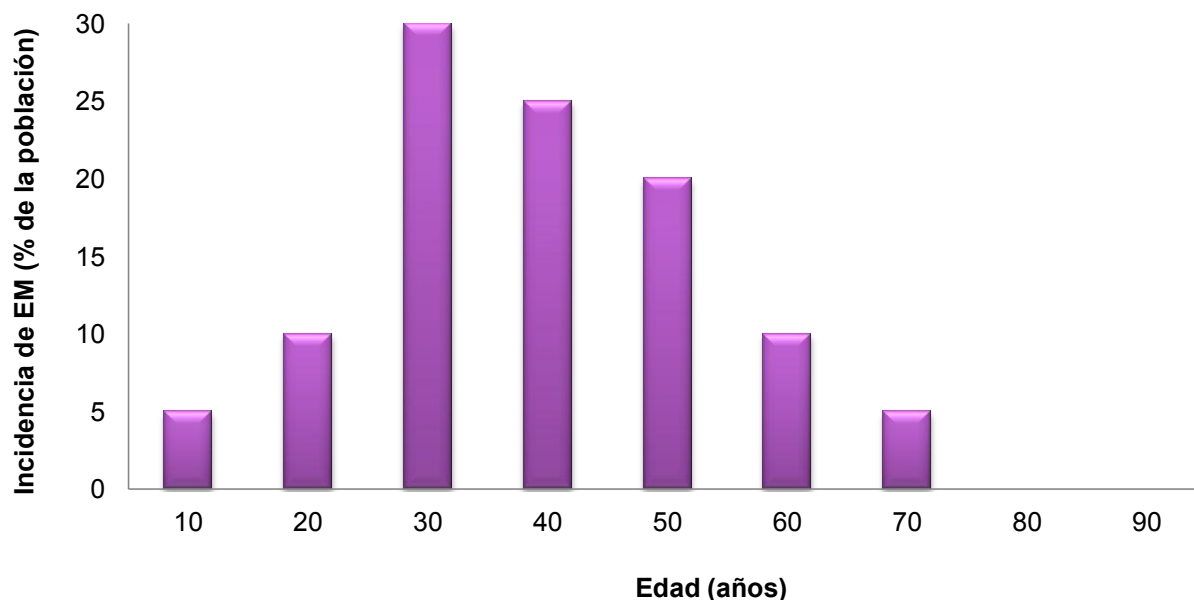
En la década de los setenta en México se creía que la EM era una enfermedad rara con una prevalencia de 1.6 casos por 100,000 habitantes. Actualmente se tiene un registro de 12 a 15 casos por cada 100,000 habitantes (Corona y Flores, 2009); esta cifra puede ser subestimada debido a la infraestructura del sistema de salud y a los

subdiagnósticos. De igual forma, el aumento de los casos es debido al mestizaje puesto que la incidencia en indígenas es nula. Se ha observado que la incidencia de EM es alta entre habitantes del norte de Europa y América de los cuales se reportan ancestros europeos o caucásicos. La prevalencia de la EM continúa incrementando en la población mestizo mexicana, ya que está compuesta por una mezcla de genes Amerindios, Caucásicos y Africanos (Flores y col., 2012).

2.1.4 Género y edad de incidencia de la EM

La EM ocurre con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, aproximadamente 3 a 1. Se han realizado estudios y no se ha encontrado alguna relación con el cromosoma X, se cree que está mayormente asociado con las hormonas femeninas (Weiner y Stankiewics, 2012). La edad de aparición generalmente se da entre los 20 y 40 años, mostrando una frecuencia de casos más alta entre los 30 y 40 años. La incidencia de la EM tiene una disminución significativa a la edad de 50 años y es extremadamente rara cuando se diagnostica en edades mayores a 70 años (Scolding y Wilkins, 2012). En la gráfica 1 se muestra la incidencia según la edad de aparición.

Gráfica 1. Porcentaje de incidencia de EM basado en la edad (Tomado de: Scolding y Wilkins, 2012).



2.1.5 Etiología

En la EM las lesiones principales se dan en la vaina de mielina que envuelve los axones de las neuronas; debido a esto, se le conoce como la enfermedad de la sustancia blanca. No se sabe con certeza cuál es la causa de la EM, pero se han descrito algunos factores por los cuales se puede originar.

a) Aspectos Ambientales

Se han descrito distintos factores ambientales que aumentan el riesgo de padecer EM, uno de ellos es la dieta ya que, el consumo elevado de grasas saturadas incrementa el riesgo. De igual forma, se ha observado que la poca o nula exposición a la luz solar y las bajas concentraciones de vitamina D son factores de riesgo ya que la vitamina D tiene propiedades inmunomoduladoras. Así mismo, existe un riesgo considerable en las personas que fuman de 20 a 40 cigarrillos por día, ya que tienen 2 veces el riesgo de desarrollar EM comparado con no fumadores, además de que el fumar empeora la progresión de la enfermedad. Fumar tiene efectos antiestrogénicos a través de la creación de formas inactivas de 2-hidroxicatecolestrógenos que afecta el balance hormonal en mujeres, causando un desequilibrio en el balance de la respuesta TH1 y TH2 en el sistema inmunológico. Por otro lado, las enfermedades de origen viral se han relacionado con la etiología de la EM, esto se debe a que la respuesta a la infección puede resultar perjudicial para el portador. Algunos de los virus con los que se ha visto esta relación son: paramyxovirus (sarampión), virus de varicela zóster, virus del herpes tipo 1, herpes virus humano 6 y 7 y virus de Epstein-Barr. Este último es el que se asocia con más frecuencia ya que cerca del 99% de los pacientes con EM son seropositivos para el mismo (Cook, 2006; Moreno y col., 2012).

b) Aspectos Inmunológicos

La EM se considera una enfermedad causada por el sistema inmunológico, puesto que ataca al propio organismo, en este caso la mielina. La mielina posee múltiples proteínas (proteína básica de la mielina, proteolípido de la mielina, glicoproteína asociada a la mielina) que son liberadas cuando la mielina es destruida. Posteriormente, estas proteínas libres son reconocidas por el complejo mayor de

histocompatibilidad tipo II (MHC II) que en humanos es llamado HLA (*human leukocyte antigen*) que activa a los receptores de las células T. Los linfocitos T activados reaccionan a estos autoantígenos y para que estos puedan ingresar al SNC es necesaria la expresión de integrinas que permiten la unión a moléculas de adhesión en la superficie endotelial (Sheremata, 2010). Esto genera la degradación de la matriz extracelular, el colágeno y la fibronectina con ayuda de metaloproteasas que llevan a cabo la proteólisis de la mielina. Una vez en el interior del SNC, las células T pueden realizar la respuesta TH1 o TH2. En la respuesta TH1 existe la producción de citocinas proinflamatorias como IL2 (Interleucina 2), TNF- α (factor de necrosis tumoral) e IFN- γ (interferon gamma), estas citocinas activan la respuesta TH1 e inhiben a la respuesta TH2. La liberación de estas citocinas proinflamatorias activa a los macrófagos que fagocitan la mielina y dan inicio a las lesiones en la EM (Figura 8). Por otro lado, cuando se lleva a cabo la respuesta TH2, se liberan proteínas antiinflamatorias como la IL4, IL5, IL6 e IL10; reduciendo la inflamación y no se lleva a cabo la destrucción de la mielina. Por tanto, en la EM el tipo de respuesta observado es TH1 (Moreno y col., 2012).

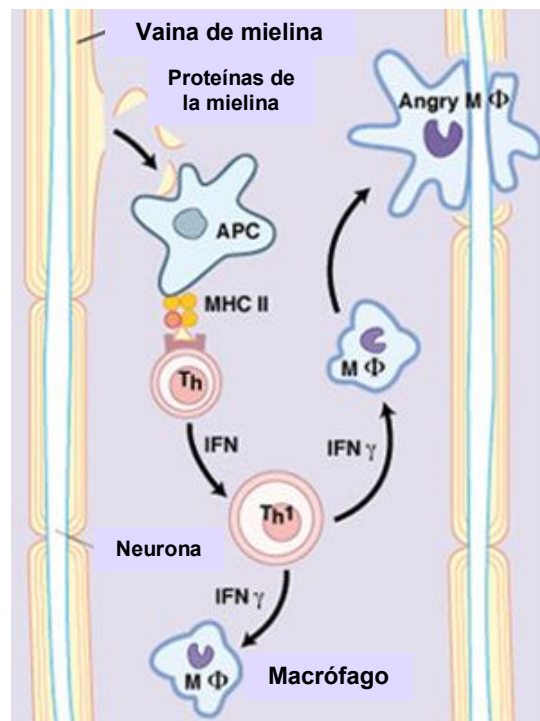


Figura 8. Destrucción de la melina por el sistema inmunológico (Tomado de: Weiner y Stankiewicz, 2012).

c) Aspectos Genéticos

Con la ayuda de herramientas como GWAS (*Genome-wide association study*) donde se hace un estudio del genoma completo, se ha podido involucrar a distintos genes del sistema inmunológico, de los cuales se ha observado que incrementan el riesgo de padecer EM. La mayoría de estos genes están localizados en los brazos cortos del cromosoma 6 y codifican para el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (HLA II). El HLA ayuda al sistema inmunológico a distinguir las proteínas propias del cuerpo de otras proteínas provenientes de virus o bacterias (Sheremata, 2010). Existen 3 haplotipos de riesgo del gen HLA-DR2 (HLADRB1*1501, HLADRB5*0101 y HLADQB1*0602) y de estos tres el alelo HLADRB1*1501 se ha observado que tiene mayor relación con la EM ya que existe mayor riesgo de padecerla cuando se tiene este alelo. De igual forma, la Asociación Internacional de Genética en Esclerosis Múltiple, IMSGC (*International MS Genetics Consortium*) realizó un estudio de asociación del genoma usando 500,000 SNPs en 931 familias y 12,000 muestras DNA. Los resultados revelaron la existencia de otros 16 SNPs que no se encontraban relacionados con el HLA, pero que se encontraban en genes que codifican para moléculas relacionadas con el sistema inmunológico como: receptores de interleucinas (IL2R) o receptores transmembranales de inmunoglobulinas que ayudan a mediar la citotoxicidad (CD226) (Hintzen y Hoppenbrouwers, 2011). Por otro lado, aproximadamente el 80% de los casos con EM ocurre de manera esporádica, es decir, que ningún otro miembro de la familia padece esta enfermedad. En el otro 20% existe una concordancia donde otro miembro de la familia padece EM además del afectado, esto sugiere que puede existir un grado de herencia que cause esta enfermedad pero aún no se sabe con certeza (Murray y col., 2012).

2.1.6 Signos y Síntomas

Las manifestaciones clínicas de la EM son muy variadas en su forma de presentación, gravedad y duración. La variabilidad de las manifestaciones clínicas depende de la localización de las lesiones desmielinizantes (Betancourt y col., 2007).

Los datos clínicos más frecuentemente encontrados se presentan en la tabla 1. Las alteraciones motoras son las más frecuentes (90-95%), posteriormente las alteraciones

sensitivas se presentan en un 77% y las cerebelosas en un 75%. Seguidas de alteraciones en el tronco cerebral, del control de esfínteres, mentales y visuales (Carretero y col., 2001).

Tabla 1. Principales signos y síntomas de la EM.

Signos y Síntomas	
Motor	<ul style="list-style-type: none"> - Debilidad muscular (pérdida de fuerza, principalmente en piernas) - Espasticidad (contracción involuntaria de los músculos) - Alteración de reflejos
Sensitivas	<ul style="list-style-type: none"> - Parestesia (sensación de hormigueo, adormecimiento o ardor en la piel) - Termoalgesia (el calor aplicado produce dolor) - Dolor - Signo de Lhermitte (descargas eléctricas por movimientos bruscos de la nuca)
Cerebeloso	<ul style="list-style-type: none"> - Ataxia (dificultad para coordinar movimientos) - Temblor - Hipotonía (tono muscular inferior al normal)
Psiquiátricos	<ul style="list-style-type: none"> - Depresión, euforia, ansiedad - Alteraciones cognitivas (memoria, percepción y resolución de problemas)
Afección a los nervios craneales	<ul style="list-style-type: none"> - Nervios craneales V, VII y VIII - Disfagia (dificultad de tragar) - Vértigo - Disartria (dificultad para la articulación de palabras) - Nistagmo (oscilación espasmódica del globo ocular) - Parálisis facial
Alteraciones autonómicas	<ul style="list-style-type: none"> - Disfunción vesical (necesidad imperiosa de orinar) - Disfunción intestinal - Disfunción sexual - Sudoración y problemas vasculares
Misceláneos	<ul style="list-style-type: none"> - Fatiga

(Tomado de: Betancourt y col., 2007).

2.1.7 Clasificación

La evolución clínica de la EM es variada, por tanto, se describen principalmente cuatro tipos basándose en el curso clínico de la enfermedad.

- **Remitente-recurrente (EMRR):** es la forma más común, afecta cerca del 85% de los pacientes con EM (Goldenberg, 2012). Se caracteriza por cuadros de brotes agudos de alteraciones en las funciones neurológicas con una remisión completa o parcial de los síntomas (Betancourt y col., 2007). Un brote se considera cuando existe la aparición de síntomas de disfunción neurológica de más de 24 horas. Y la remisión se define como la mejoría hasta la desaparición de los síntomas presentes al menos durante 24 horas (Carretero y col., 2001).
- **Secundariamente progresiva (EMSP):** aparece de 10 a 20 años después de la instalación de la forma remitente-recurrente, las remisiones se vuelven infrecuentes y por lo general son reemplazadas por un empeoramiento gradual de los síntomas a lo largo de meses a años (Moreno y col., 2012). Esto genera brotes cada vez más severos y con mayores secuelas posteriores a cada uno de ellos, condicionando gran discapacidad (Betancourt y col., 2007).
- **Primariamente progresiva (EMPP):** afecta aproximadamente al 10% de los pacientes con EM. Los síntomas continúan empeorando gradualmente desde el inicio, no existen remisiones pero puede existir una estabilidad ocasional de los síntomas. Esta forma de EM es más resistente a los fármacos empleados para tratar la enfermedad (Goldenberg, 2012) y se considera la más difícil de diagnosticar (Betancourt y col., 2007).
- **Progresiva recurrente (EMPR):** se considera una forma rara de EM, afectando a menos del 5% de los pacientes. Es progresiva al inicio con exacerbaciones intermitentes y no existen periodos de remisión (Goldenberg, 2012). A diferencia de la forma EMRR, tiene escasez de lesiones cerebrales y espinales en la resonancia magnética; también difiere patológica y clínicamente (personas de mayor edad, razón mujer:hombre 1:1) (Moreno y col., 2012).

2.1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la EM es fundamentalmente clínico ya que se basa en la confirmación de la diseminación de las lesiones en el tiempo, el espacio y en la exclusión de otras posibles etiologías. Existen diversos criterios de diagnóstico que se han desarrollado a lo largo del tiempo y que han servido como una herramienta para establecer su diagnóstico (criterios de Poser y criterios de McDonald). A continuación se presentan las pruebas de gabinete, que junto con la clínica conforman los criterios de diagnóstico para la EM:

- **Resonancia magnética nuclear (RMN):** es la prueba más sensible, sirve para determinar la extensión de las lesiones y diferenciar la naturaleza aguda o crónica (Carretero y col., 2001). En la Figura 9 se muestra la imagen de una resonancia magnética cerebral (secuencias en T1 tras la administración de contraste) en 3 pacientes diferentes que muestran lesiones con actividad inflamatoria. Se observan los diferentes tipos de realce: nodular (izquierda), en anillo (centro) y en anillo incompleto (derecha).

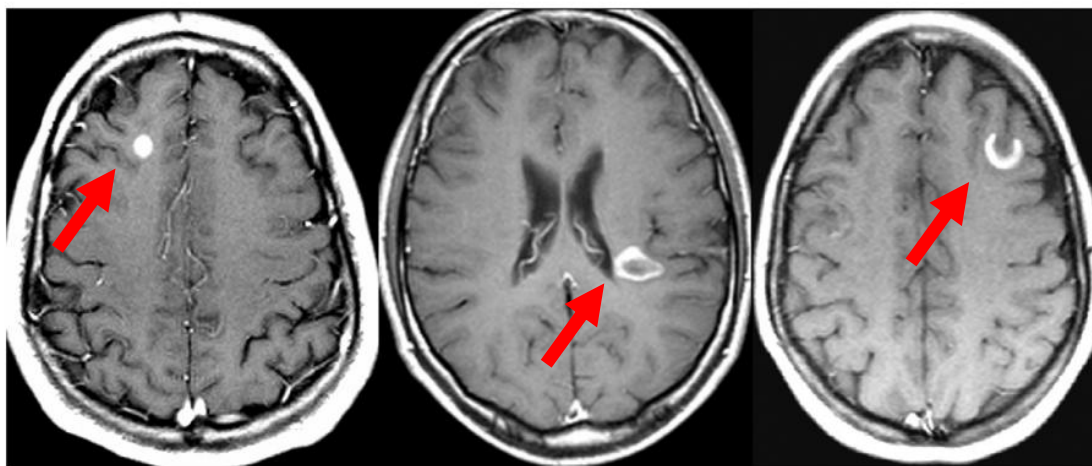
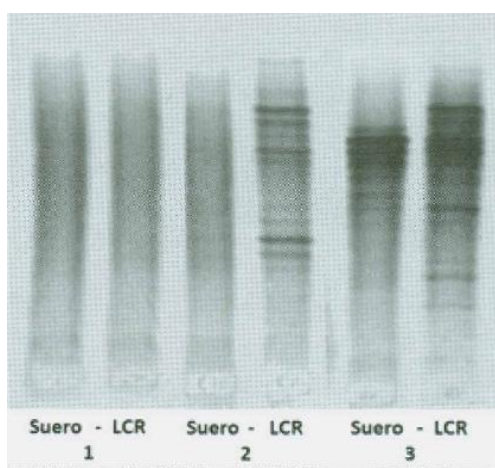


Figura 9. Resonancia magnética cerebral en pacientes con EM (Tomado de: Rovira y col., 2010).

▣ **Líquido cefalorraquídeo (LCR):** macroscópicamente (citológico) es normal en la EM. Sin embargo, en el análisis microscópico (citoquímico) se puede observar una elevación relativa de las inmunoglobulinas, sobre todo de la IgG que en condiciones normales tiene un rango de 3-5 mg/100ml. Además pueden aparecer bandas de células plasmáticas, denominadas bandas oligoclonales (Figura 10) que se pueden observar hasta en un 95% de los pacientes. Estas células plasmáticas son clones de linfocitos B que se activan dentro del SNC en el LCR (Carretero y col., 2001).



Se consideran positivos los tipos 2 y 3 siempre y cuando el número de bandas oligoclonales de IgG sean mayores o iguales en LCR que en suero.

Figura 10. Patrones de bandas oligoclonales por isoelectroenfoque en suero y LCR (Tomado de: Instituto de referencia andino, 2011).

▣ **Medición de la afectación neurológica**

La EM produce una serie de síntomas y signos que reflejan deterioro neurológico y originan con frecuencia discapacidad y minusvalía. El deterioro se refiere a la pérdida o anomalía en las funciones psicológicas, fisiológicas o anatómicas. La minusvalía es la consecuencia del deterioro y la discapacidad, que introducen limitaciones en el desempeño del papel considerado normal para una persona, hasta originar finalmente una limitación de la participación en la vida personal, familiar o social (Álvarez y col., 2007). Actualmente se dispone de escalas que miden lo antes mencionado. La más usada es la escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS, *Expanded disability*

status scale), fue desarrollada por Kurtzke en 1983 y cuantifica la afectación de 8 sistemas funcionales (piramidal, cerebelar, tronco cerebral, sensibilidad, intestino y vejiga, visual, mental y otros). La escala EDSS utiliza calificaciones que van de 0 a 10, donde un valor igual a 0, indica normalidad o buen estado de salud; un valor de 10, indica que el sujeto ha muerto. (Moreno y col., 2012)

2.1.9 Tratamiento

Los objetivos del tratamiento de la EM están enfocados a prevenir la discapacidad, reducir la frecuencia, la gravedad y la duración de las recaídas, mejorar los síntomas y restablecer la funcionalidad. El tratamiento ideal proporciona todas estas ventajas con el mínimo de efectos secundarios (Moreno y col., 2012). Se divide en 3 grupos:

a) Tratamiento de las exacerbaciones o brotes

Se basa en la administración de corticosteroides, hormona adrenocorticotropa (ACTH) y plasmaféresis.

- **Corticosteroides:** son hormonas pleiotrópicas, que en dosis suprafisiológicas son las sustancias antiinflamatorias e inmunosupresoras muy efectivas. Tienen la habilidad para inhibir una amplia variedad de genes proinflamatorios, ya que disminuyen la expresión de moléculas de adhesión de los leucocitos activados, inhiben la secreción de enzimas proteolíticas en las células endoteliales de los vasos del SNC implicadas en la lisis de la BHE y por tanto, inhiben la diapédesis de los linfocitos hacia el SNC. De igual forma, inhiben la liberación de inmunoglobulinas IgG y citocinas proinflamatorias Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2) y óxido nítrico (Álvarez y col., 2007). Un esquema útil incluye metilprednisolona vía intravenosa, seguido de dosis orales de prednisona (Moreno y col., 2012).
- **ACTH:** en caso de que el acceso al tratamiento intravenoso sea un problema, se puede emplear la ACTH (corticotropina) intramuscular. Se ha sugerido que la mejoría es menos rápida que con los corticosteroides por vía intravenosa y que la respuesta a la ACTH es variable de unos individuos a otros (Álvarez y col., 2007).

■ **Plasmaféresis:** consiste en la extracción de un volumen determinado de sangre periférica del paciente y su centrifugación posterior con separación del plasma. Este volumen de plasma es sustituido por solución de albúmina humana, que es introducido de nuevo al paciente. Mediante la plasmaféresis se eliminan los autoanticuerpos de la sangre. No se conoce el mecanismo de acción en la EM y sólo se ha utilizado en brotes graves de EM que no responden al tratamiento con corticosteroides. Está contraindicado en pacientes con trastornos de coagulación e inestabilidad hemodinámica (Álvarez y col., 2007).

b) Terapia modificadora de la enfermedad


Este tratamiento se inició en 1993, debe tomarse en cuenta el curso clínico de la enfermedad (Moreno y col., 2012) y se basa en fármacos como:


■ **Interferones:** son proteínas liberadas que tienen efecto antiviral, antiinflamatorio y regulan la respuesta inmune. Entre sus mecanismos de acción se postulan: la reducción en la activación de las células T, inhibición de los efectos del IFN γ , inhibición de la permeabilidad de la BHE y la desviación de la respuesta inmune de Th1 a Th2 (Betancourt y col., 2007). Los interferones empleados y que han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) son: IFN- β 1b (Betaferon®), IFN- β 1a (Avonex®) e IFN- β 1a (Rebif®).

■ **Acetato de glatiramer (Copaxone®):** es un polipéptido de cuatro aminoácidos semejante a la porción antigénica de las proteínas de la mielina. Su mecanismo de acción es el cambio de las células T de respuesta Th1 a Th2, con efectos antiinflamatorios y de aumento del número de células T supresoras que disminuye la reacción contra autoantígenos del SNC (Betancourt y col., 2007).

■ **Azatioprina:** es un análogo de las purinas, se cree que inhibe la síntesis de los ácidos nucleicos, incorporando tioanálogos purínicos y previniendo así la proliferación de células de la respuesta inmune (Vademécum, 2010).

■ **Mitoxantrona:** es un fármaco anticancerígeno e inmunosupresor, actúa inhibiendo la síntesis del DNA y RNA. (Vademécum, 2010).

- 
Natalizumab (Tysabri®): es un anticuerpo monoclonal que bloquea la integrina VLA4, molécula de adhesión que expresan los linfocitos y se une a la molécula VCAM-1 de la pared endotelial, para la migración de los linfocitos de la sangre periférica hacia el sistema nervioso (Álvarez y col., 2007).

- 
Ciclofosfamida: es un agente alquilante derivado de la mostaza nitrogenada. Se necesita de su metabolización a nivel hepático por el citocromo P-450, generando mostaza fosforamida y acroleína. Su acción citotóxica se debe al entrecruzamiento de las cadenas de DNA y RNA, provocando su ruptura y generando la inhibición de la síntesis de proteínas. Puede actuar en cualquier etapa del ciclo celular, aunque las células son más sensibles al final de la fase G1 y S, teniendo mayor afinidad a células en constante división interfiriendo con su crecimiento (Díaz, 2008).

c) Tratamiento de los síntomas

Se emplean diversos fármacos para el manejo de los síntomas (Tabla 2).

Tabla 2. Fármacos usados en el manejo de los síntomas de la EM.

Nombre genérico	Nombre comercial	Uso en la EM
Amantadina	Symmetrel	Fatiga
Amitriptilina	Elavil	Dolor
Clonazepam	Klonopin	Temblor, dolor, espasticidad
Desmopresina	DDAVP	Disminuir producción de orina
Diazepam	Valium	Espasticidad (músculos tensos)
Fluoxetina	Prozac	Depresión, fatiga
Fenitoína	Dilantin	Dolor (parestias)
Sertralina	Zoloft	Depresión, ansiedad
Sildenafil	Viagra	Disfunción eréctil
Tolterodina	Detrol	Disfunción vesical

(Tomado de: Moreno y col., 2012).

2.2 Neuritis Óptica

La neuritis óptica (NO) es una enfermedad inflamatoria del nervio óptico, que se presenta con una pérdida aguda o subaguda de la visión generalmente unilateral y con dolor relacionado con los movimientos oculares, alteración en la percepción de los colores y la sensibilidad al contraste a la luz (Papais y col., 2008).

Tiene una incidencia de 1 a 5 casos por 100,000 habitantes, se presenta en todo el mundo y puede afectar a cualquier grupo racial aunque es mayor en los caucásicos (Hickman y col., 2005). Es más frecuente en mujeres que en hombres en un 75% y la edad de incidencia va de los 20 a 50 años (Pleyer y Foster, 2006). La NO puede ser un evento aislado o presentarse como síntoma inicial de Esclerosis Múltiple en un 15 a 20% de los casos. De igual forma, los pacientes con EM están en riesgo de presentar NO en el mismo ojo o en el contralateral hasta en un 50% durante el curso de su enfermedad (Balcer, 2006).

Existen diversas causas de la NO incluyendo enfermedades infecciosas como sífilis y enfermedades inflamatorias no infecciosas como sarcoidosis. Sin embargo, en muchos de los casos es idiopática o está asociada con la EM. De igual forma, se relaciona con otras enfermedades desmielinizantes como neuromielitis óptica (enfermedad Devic) y encefalitis diseminada aguda (EMDA) (Biousse y Newman, 2011). Así mismo, se ha reportado el uso de algunos fármacos y de sustancias que producen toxicidad al nervio óptico como: estreptomicina, cloranfenicol, penicilamina, cloroquina, tetraciclina, alcohol, plomo, talio y tolueno (Blázquez, 2007).

El diagnóstico se realiza mayormente por examen clínico, la edad de aparición y los síntomas del paciente son de gran importancia para diagnosticar esta enfermedad. Además, se emplean algunos estudios oftalmológicos donde se mide la agudeza visual del paciente y se realiza una prueba del fondo del ojo (Pleyer y Foster, 2006).

Requiere tratamiento con corticosteroides como la metilprednisolona o prednisona. En general, el pronóstico para la recuperación visual con tratamiento es bueno; sin embargo, la mayoría de los pacientes tienen un deterioro de la visión duradero, incluso cuando la agudeza visual de un paciente se normaliza, frecuentemente quedan anomalías en la sensibilidad al contraste, la visión de los colores y el campo visual (Swanton y col. 2009).

Capítulo 3. Proteínas Transportadoras ABC

3.1 Proteínas ABC

Las proteínas ABC constituyen la familia más grande de proteínas conocidas (Henikoff y col., 1997), la mayor parte de estas proteínas membranales son activadas con el transporte de una larga variedad de sustancias a través de la membrana celular. Algunas de estas sustancias son: carbohidratos, aminoácidos, iones metálicos, péptidos, proteínas y fármacos. El nombre de transportador ABC se introdujo por primera vez por parte de Christopher Higgins en 1992 y se basó en la presencia de una secuencia altamente conservada, llamada *ATP-Binding Cassette* (región de unión a ATP) que es específica de esta superfamilia (Higgins, 1992). Los transportadores ABC han sido encontrados en todas las especies desde microorganismos hasta el hombre (Perrotton, 2007). Estas proteínas emplean el ATP para transportar moléculas al interior y exterior a través de la membrana celular; de igual forma se encuentra en las membranas del retículo endoplásmico, los peroxisomas y la mitocondria (Dean y col., 2001). La amplia presencia de estas proteínas prácticamente en todos los organismos, con una estructura muy conservada, sugiere un papel importante en la función celular. De tal forma que juegan un papel esencial en la protección de los organismos frente a metabolitos tóxicos y compuestos presentes en la dieta estando implicadas en transporte de compuestos en el intestino, barrera hematoencefálica, placenta, entre otros órganos (Glavinas y col., 2004).

3.1.1 Estructura

Todos los transportadores ABC comparten una estructura básica independientemente de que su función sea importar o exportar el compuesto transportado. Esta estructura puede estar presente en una única proteína de una cadena polipeptídica (transportadores completos) o en dos proteínas separadas (medios transportadores) (Cuesta, 2013).

Tienen en general una organización estructural común de 4 dominios (Figura 11):

- Dos dominios transmembranales hidrófobos, también llamados TMD (Dominios transmembranales).

- Dos dominios citoplasmáticos hidrofílicos de fijación a nucleótidos, también llamados NBD (Dominios de Unión a Nucleótidos).

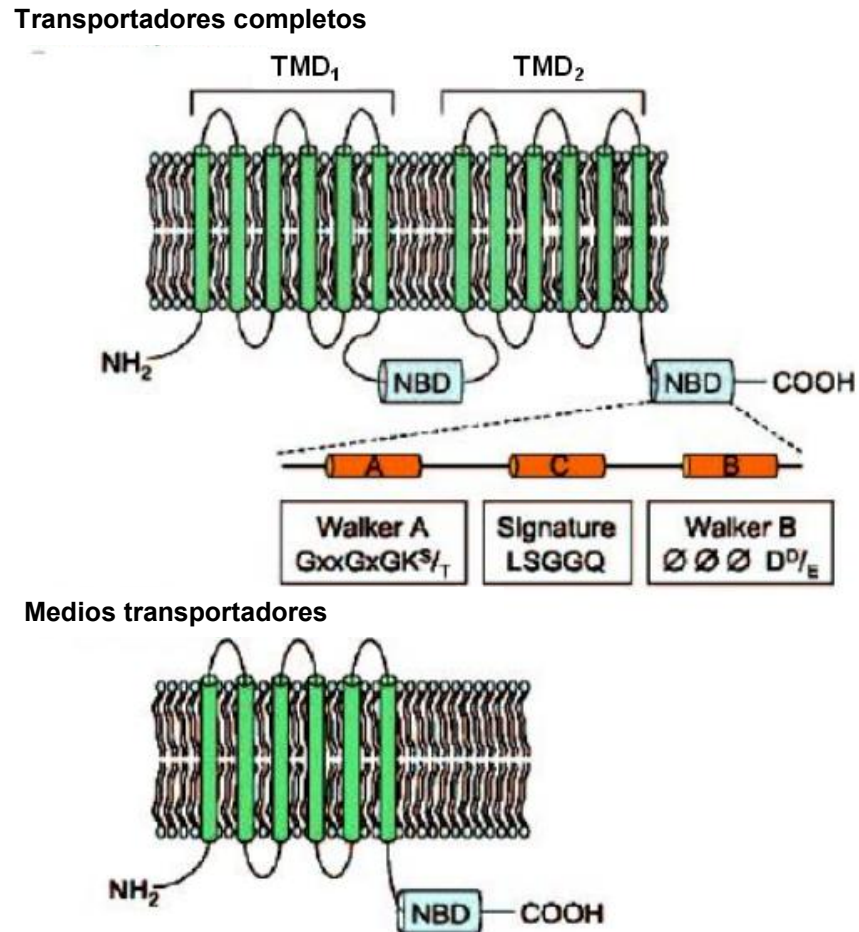


Figura 11. Estructura de los "Transportadores completos" y "Medios transportadores" (Tomado de: Cuesta, 2013).

a) *Dominios transmembranales (TMD)*

Los TMD están formados por péptidos plegados en hélice alfa que atraviesan varias veces la membrana; esta región es la más divergente de los transportadores ABC y es la que determina la especificidad hacia el sustrato. La unión de los dos TMD forma un canal que permite la traslocación del sustrato a través de la membrana (Hollenstein y

col., 2007). El número de hélices transmembrana oscila entre 8 y 20 para los transportadores cuya función es importar y 12 para los exportadores (Cuesta, 2013).

c) Dominios de fijación a nucleótidos (NBD)

Los dominios NBD están orientados hacia el citoplasma e interactúan con los bucles intracelulares de los TMD. Estos dominios están compuestos de aproximadamente 215 aminoácidos cada uno y contienen tres motivos consenso denominados Walker A, Walker B y el motivo C o LSGGQ (Figura 12). La conservación de estos tres motivos permite la distinción de esta familia de transportadores y participan en la unión e hidrólisis de ATP para la obtención de energía (Perrotton, 2007). Esta unión ocasiona cambios conformacionales en los dominios NBD haciendo que se aproximen y, a su vez, provocando que los dominios TMD abran el conducto hacia la parte exterior o interior de la célula.

- **Motivo Walker A:** El motivo Walker A, también denominado P-Loop, forma una horquilla rica en glicina, seguida de una hélice alfa. Esta estructura permite la unión electrostática del ATP. La secuencia de este motivo es la siguiente: G-X-S/T-G-X-G-K-S/T-S/T, donde la X es un aminoácido variable (Perrotton, 2007).
- **Motivo Walker B:** provee el residuo carboxilato que coordina y estabiliza el Mg^{2+} , el cual es un cofactor en la hidrólisis del ATP; además participa en el mantenimiento de la geometría del sitio activo. Tiene una secuencia: H-H-H-H-D, donde H es un aminoácido hidrófobo (Moody y col., 2002).
- **Motivo C o Firma S:** entre los motivos Walker A y B, existe una secuencia consenso de una docena de aminoácidos, presente únicamente en las proteínas transportadoras ABC. Esta es llamada comúnmente como firma S o motivo C y comienza generalmente con la secuencia: LSGG. El papel de este motivo no ha sido dilucidado completamente, pero parece que está implicado en la transducción de señales entre los NBD y los TMD (Perrotton, 2007).

- ❑ **D-loop:** ubicado debajo del motivo Walker B, contiene una secuencia conservada de aminoácidos la cual está involucrada en la actividad catalítica y la intercomunicación de los sitios activos (Uicab y col., 2010).
- ❑ **Q-loop:** ubicado cerca del motivo Walker A, media la señalización entre el TMD y el sitio activo del NBD (Perrotton, 2007).
- ❑ **H-loop:** una histidina altamente conservada, está fijada de un bucle más debajo del motivo Walker B y es llamada H-loop. Al parecer, tiene la capacidad de concentrar moléculas de agua para llevar a cabo la hidrólisis de ATP o juega el papel de realizar la transducción de señales entre los dominios NBD y TMD (Perrotton, 2007).

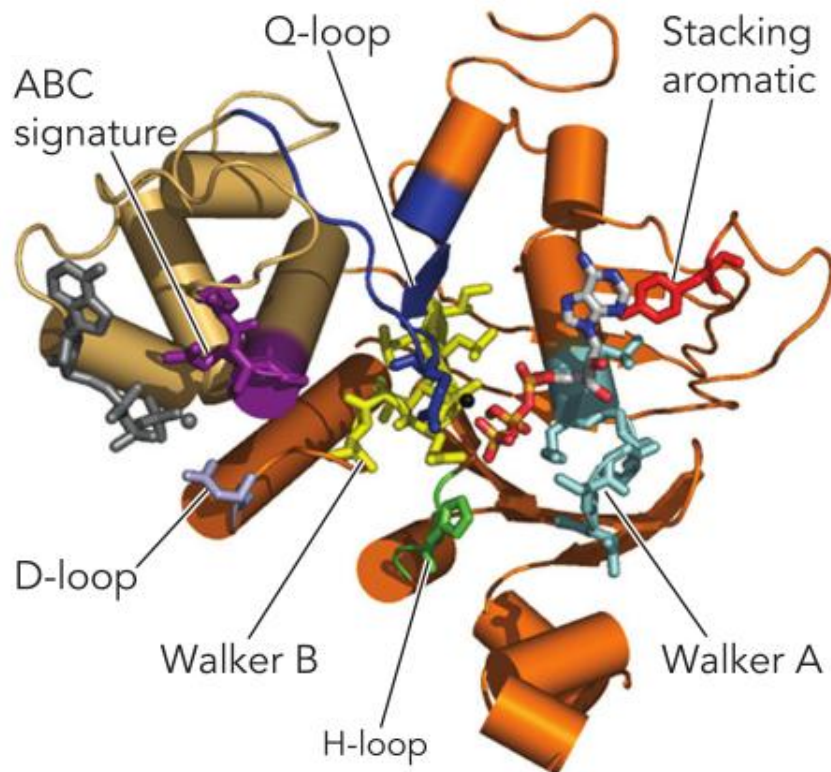


Figura 12. Posición de los motivos presentes en el dominio NBD (Tomado de: Linton, 2007).

3.2 Glicoproteína P (P-gp)

P-gp presenta una distribución tisular muy relacionada con la disposición de xenobióticos al estar localizada en la membrana apical de las células epiteliales de intestino, hígado, riñón, páncreas, glándulas suprarrenales y células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Esto influye notablemente en los procesos de absorción, distribución y eliminación de fármacos, de tal forma que, existe una limitación de la biodisponibilidad oral y la distribución cerebral, por lo que facilita la excreción biliar y la eliminación renal de los fármacos (Álvarez de Felipe y Pulido, 2008). Así mismo, se expresa en células endoteliales de cerebro, testículos, placenta, células hematopoyéticas, macrófagos, células dendríticas presentadoras de antígeno, linfocitos B y T (principalmente CD8⁺ y CD4⁺) (Bellusci y col., 2010). Es importante mencionar que P-gp tiene una gran variedad de sustratos como fármacos antitumorales, cardiovasculares, anti-retrovirales, inmunosupresores, antibióticos, esteroides y algunas citocinas como IL-2, IL-4, IFN- γ (Álvarez de Felipe y Pulido, 2008). En la tabla 3 se presenta la localización tisular de la glicoproteína P y su función en el transporte de sustancias endógenas y exógenas.

Tabla 3. Localización tisular de la P-gp y su función como transportador.

Órgano	Localización	Función
Intestino, colon	Células epiteliales	Secreción de xenobióticos en la luz intestinal
Riñón	Células del túbulo contorneado proximal	Secreción de xenobióticos en la orina
Hígado	Hepatocitos	Secreción de xenobióticos en la bilis
SNC	Células endoteliales de la BHE	Protección del SNC
Placenta	Trofoblastos	Protección del feto
Corazón	Células endoteliales del miocardio	Protección del corazón
Glándulas suprarrenales	Células de la médula y la corteza	Secreción de esteroides endógenos
Testículos	Células de capilares sanguíneos	Protección de espermatozoides

(Tomado de: Bessadok, 2012).

3.2.1 Estructura de la Glicoproteína P

La secuencia del gen de la P-gp humana ha permitido determinar la estructura primaria de la proteína, contiene 1280 aminoácidos y tiene una masa molecular de 170 kDa. La proteína está compuesta por 12 segmentos transmembranales distribuidos en dos mitades homólogas, cada una de las cuales contiene 6 segmentos transmembranales que se unen por un lazo llamado región de unión (Figura 13). De igual forma, la región hidrofílica citoplasmática está formada de un bucle intracelular donde existe un sitio de fijación a nucleótidos (NBD) (Vautier y col., 2006).

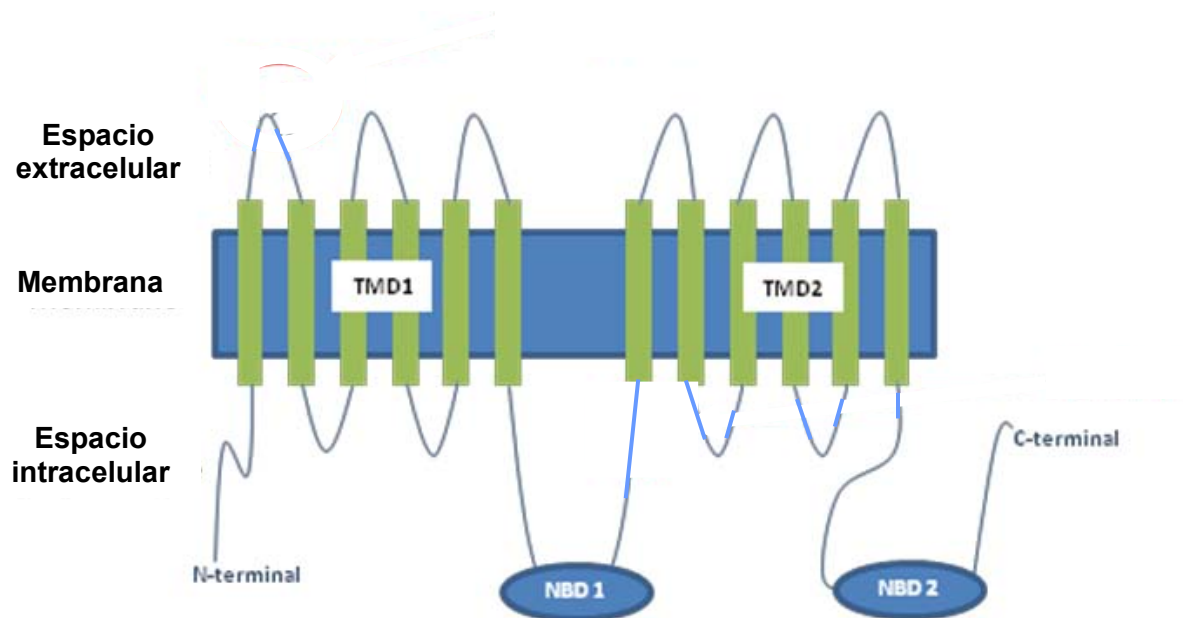


Figura 13. Representación esquemática de la P-gp (Tomado de: Bessadok, 2012).

La primera estructura tridimensional de una proteína ABC se realizó mediante microscopía electrónica en 1997 (Figura 14) y fue la de P-gp. En ella sugieren que la proteína se forma de un cilindro de 10 nm de diámetro y 8 nm de altura (Perrotton, 2007).

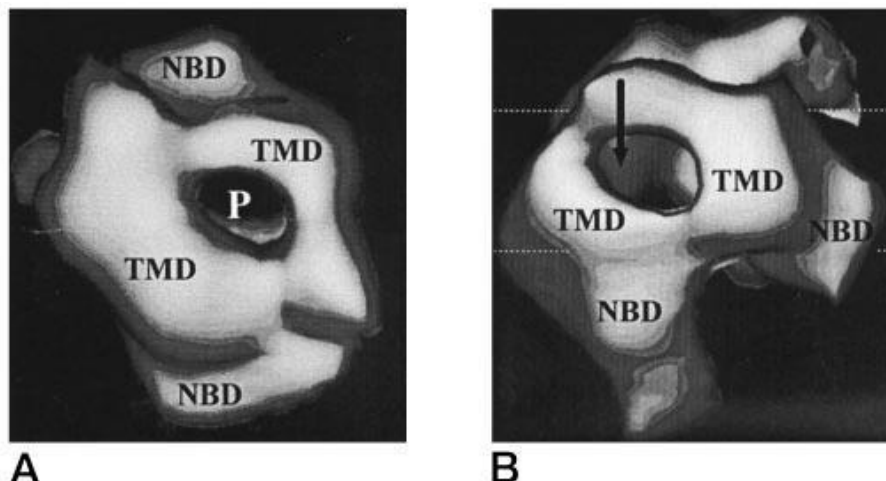


Figura 14. Representación 3D de la P-gp. **(A)** Vista de arriba, poro representado por P. **(B)** Las líneas punteadas representan las membranas celulares. (Tomado de: Bessadok, 2012).

3.2.2. Sustratos de la Glicoproteína P

P-gp reconoce una gran variedad de sustratos con una estructura y peso molecular muy distintos (250 a 4000 Da). Estos incluyen xenobióticos (fármacos) y componentes endógenos como péptidos, hormonas, carbohidratos, lípidos, fosfolípidos, colesterol, citocinas, componentes dietéticos, entre otros. Algunos fármacos pueden actuar como sustratos, inhibidores e inductores y se encuentran en la tabla 4 (Hodges y col., 2011).

Tabla 4. Sustratos, inhibidores e inductores de la glicoproteína P.

Fármacos	Sust.	Inhibidor	Inductor	Fármacos	Sust.	Inhibidor	Inductor
Anticancerígenos				Glucocorticoides			
Actinomicina D	•			Aldosterona	•		
Daunorrubicina	•			Cortisol	•		
Docetaxel	•			Dexametasona	•		•
Doxorrubicina	•			Metilprednisolona	•		
Etopósido	•			Prednisona	•		
Imatinib	•			Antivirales			
Irinotecan	•			Amprenavir	•		•
Metotrexato			•	Nelfinavir	•	•	•
Mitomicina C	•	•		Ritonavir	•	•	•
Mitoxantrona	•			Saquinavir	•	•	•

Paclitaxel	•			Antibióticos			
Tenipósido	•			Claritromicina		•	
Topotecán	•			Eritromicina	•	•	•
Vinblastina	•			Levofloxacino	•		
Vincristina	•			Rifampicina	•		•
Antihipertensivos				Inmunosupresores			
Carbedilol		•		Ciclosporina	•	•	•
Celiprolol	•			Rapamicina	•	•	
Diltiazem	•			Tacrolimus	•	•	
Losartán	•			Valspodar	•	•	
Nicardipino		•		Antiepilépticos			
Reserpina		•		Carbamazepina	•		
				Fenobarbital	•		
				Fenitoína	•		
Antiarrítmicos				Antidepresivos			
Amiodarona		•		Amitriptilina	•	•	
Digoxina	•			Citalopram	•		
Propafenona		•		Fluoxetina		•	
Quinidina	•	•		Paroxetina		•	
Verapamilo	•	•		Sertralina		•	

(Tomado de: Marzolini y col., 2004).

Capítulo 4. Familias de genes ABC

Para comprender la complejidad de la diversidad de la superfamilia ABC, los estudios filogenéticos *in silico* han permitido realizar la clasificación de más de 600 proteínas (Perrotton, 2007). De igual forma, la secuenciación del genoma humano ha permitido caracterizar 48 genes ABC y más de 50 tipos distintos de transportadores. Estos 48 genes ABC en el genoma humano se dividen en 7 subfamilias basándose en la estructura génica, alineamiento de los amino ácidos y análisis filogenético (Dean y col., 2001). A estas siete subfamilias se les ha nombrado de la A a la G (tabla 5).

Tabla 5. Subfamilias del gen ABC en humanos.

Símbolo	Alias	Locus	Expresión	Función
ABCA1	ABC1	9q31.1	Ubicuo	Salida de colesterol
ABCA2	ABC2	9q34	Cerebro	Resistente a fármacos
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3	Pulmón	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	Células de retina	Salida de N-retinilidieno-PE
ABCA5		17q24	Músculo, corazón, testículos	

ABCA6		17q24	Hígado	
ABCA7		19p13.3	Bazo, timo	
ABCA8		17q24	Ovario	
ABCA9		17q24	Corazón	
ABCA10		17q24	Músculo, corazón	
ABCA12		2q34	Estómago	
ABCA13		7p11-q11	Baja expresión en todos los tejidos	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	Glándulas adrenales, riñón, cerebro	Resistente a fármacos
ABCB2	TAP1	6p21	Todas las células	Transporte de péptidos
ABCB3	TAP2	6p21	Todas las células	Transporte de péptidos
ABCB4	PGY3	7q21.1	Hígado	Transporte de fosfatidilcolina
ABCB5		7p14	Ubicuo	
ABCB6	MTABC3	2q36	Mitocondria	Transporte de metales
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	Mitocondria	Transporte de hierro y azufre
ABCB8	MABC1	7q36	Mitocondria	
ABCB9		12q24	Corazón, cerebro	
ABCB10	MTABC2	1q42	Mitocondria	
ABCB11	SPGP	2q24	Hígado	Transporte de sales biliares
ABCC1	MRP1	16p13.1	Pulmón, testículos, Células mononucleares	Resistente a fármacos
ABCC2	MRP2	10q24	Hígado	Salida de aniones orgánicos
ABCC3	MRP3	17q21.3	Pulmones, intestino, hígado	Resistente a fármacos
ABCC4	MRP4	13q32	Próstata	Transporte de nucleósidos
ABCC5	MRP5	3q27	Ubicuo	Transporte de nucleósidos
ABCC6	MRP6	16p13.1	Riñón, hígado	
CFTR	ABCC7	7q31.2	Glándulas exócrinas	Canal iónico de cloro
ABCC8	SUR	11p15.1	Páncreas	Receptor de sulfonilureas
ABCC9	SUR2	12p12.1	Corazón, músculo	
ABCC10	MRP7	6p21	Baja expresión en todos los tejidos	
ABCC11		16q11-q12	Baja expresión en todos los tejidos	
ABCC12		16q11-q12	Baja expresión en todos los tejidos	
ABCD1	ALD	Xq28	Peroxisomas	Transporte de ácidos grasos
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11-q12	Peroxisomas	de cadena larga
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	Peroxisomas	
ABCD4	PMP69, PMP70	14q24.3	Peroxisomas	
ABCE1	OABP,RNS41	4q31	Ovario, testículos, bazo	Proteína de unión a oligoadenilato
ABCF1	ABC50	6p21.33	Ubicuo	
ABCF2		7q36	Ubicuo	
ABCF3		3q25	Ubicuo	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	Ubicuo	
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	Placenta, intestino	Salida de toxinas
ABCG4	White2	11q23	Hígado	
ABCG5	White3	2p21	Hígado, Intestino	Transporte de esteroides
ABCG8		2p21	Hígado, intestino	Transporte de esteroides

(Tomado de: Perrotton, 2007).

4.1 Subfamilia ABCB

La subfamilia ABCB también es llamada MDR (resistente a múltiples fármacos). Está compuesta por 4 transportadores completos y 7 medios transportadores; es la única subfamilia que tiene ambos tipos de transportadores (Perrotton, 2007).

4.1.1 Gen ABCB1

El gen *ABCB1* (*MDR/PGY1*) fue descubierto gracias al estudio de una proteína sobreexpresada en algunas líneas celulares tumorales resistentes a fármacos y a una amplia variedad de compuestos hidrófobos. Este gen se expresa principalmente en el hígado y en la barrera hematoencefálica; se piensa que está envuelto en la protección de células de compuestos tóxicos (Dean y col., 2001). En humanos existen dos genes *MDR*, *MDR1* y *MDR2*. El gen *MDR1*, ubicado en el cromosoma 7 (7q21.12) (Figura 15) cuenta con 28 exones, codifica para P-gp; mientras que *MDR2* codifica para una variante de P-gp que es específica para el desplazamiento de fosfatidilcolina en las células (Balram y col., 2002).

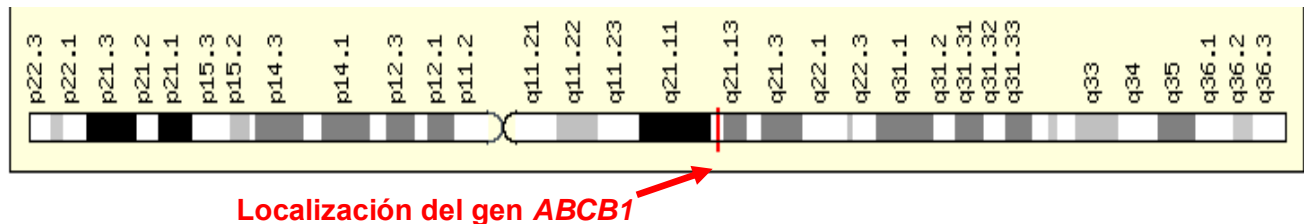


Figura 15. Localización del gen *ABCB1* en el cromosoma 7 (Tomado de: www.genecards.org).

4.1.2 Polimorfismos del gen *ABCB1*

En la región codificante del gen *MDR1* se han encontrado más de 50 SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) que se han reportado en bases bioinformáticas (Ensembl, NCBI, GeneCards). El 60% de ellos generan un cambio de sentido, el 25% son sinónimos y el 15% son no codificantes. Solo algunos de estos SNPs generan una afección en la proteína P-gp, tanto en su expresión como en la función de la misma (Bellusci y col., 2010).

La mayoría de los polimorfismos se encuentran en la región intracelular, solamente existen 3 SNPs en la primera horquilla en la parte extracelular (Figura 17). En la P-gp, 96 aminoácidos se encuentran en la región extracelular. El índice de incidencia de que exista un SNP en esta región es de 1.04% (3 SNPs entre 288 nucleótidos). Este índice es similar al índice a la incidencia (1.3%) de que exista un SNP en la región intracelular (36 SNPs entre 2757 nucleótidos). En contraste, el índice de incidencia de que se presente un SNP en los dominios transmembranales es mucho más bajo (0.053%) con 4 SNPs entre 795 nucleótidos. Esto sugiere que las funciones de los dominios transmembranales, como el anclaje de la P-gp en la membrana celular y la formación de región de unión al sustrato, son bien conservadas. En conjunto, la baja incidencia de que exista un SNP en la región transmembrana y la alta conservación de la secuencia de *MDR1* en distintos organismos, apoyan la idea de que todos los dominios y motivos presentes en esta proteína son importantes para la estructura y la función de la misma (Fung y Gottesman, 2009).

Los polimorfismos más estudiados de este gen son: *C1236T* (rs1128503), *G2677T/A* (rs2032582) y *C3435T* (rs1045642) (Figura 16). Recientemente se ha despertado el interés farmacogenético respecto a la heterogeneidad genética derivada de los polimorfismos de un solo nucleótido como una determinante potencial de variabilidad en la eficacia y disposición de fármacos (Marzolini y col., 2004). Esta heterogeneidad genética se ha observado en distintos estudios como el realizado por Lehne y colaboradores en 2007, donde se indicó que la capacidad de transporte de la proteína P-gp se ve aumentada en pacientes con un genotipo homocigoto CC para el SNP *C3435T* tratados con antineoplásicos. Y que esta capacidad de transporte se ve

disminuida si el genotipo es CT o TT para el mismo polimorfismo (Lehne, 2007), como se observa en la figura 16.

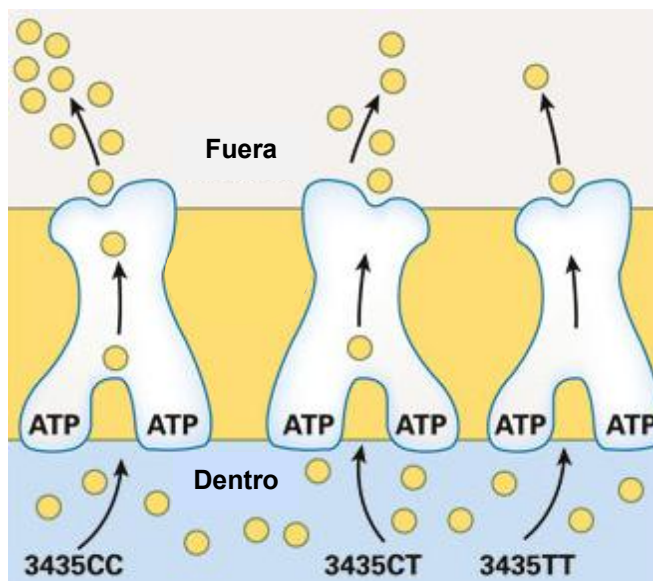


Figura 16. Capacidad de transporte de la P-gp según el genotipo del SNP C3435T (Tomado de: Lehne, 2007).

De igual forma, se ha observado que la presencia de estos SNPs genera resistencia a fármacos en distintas enfermedades como: epilepsia, cáncer, parkinsonismo, carcinoma renal y enfermedades inflamatorias intestinales como colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Marzolini y col., 2004). Por otro lado, estudios han confirmado que los cambios en los residuos de aminoácidos en los dominios transmembranales, en los dominios de unión a ATP, en los motivos Walker A y B o en el motivo C (firma S) afectan la función de la proteína. Así mismo, estos polimorfismos pueden alterar el plegamiento y la conformación de la P-gp (Fung y Gottesman, 2009).

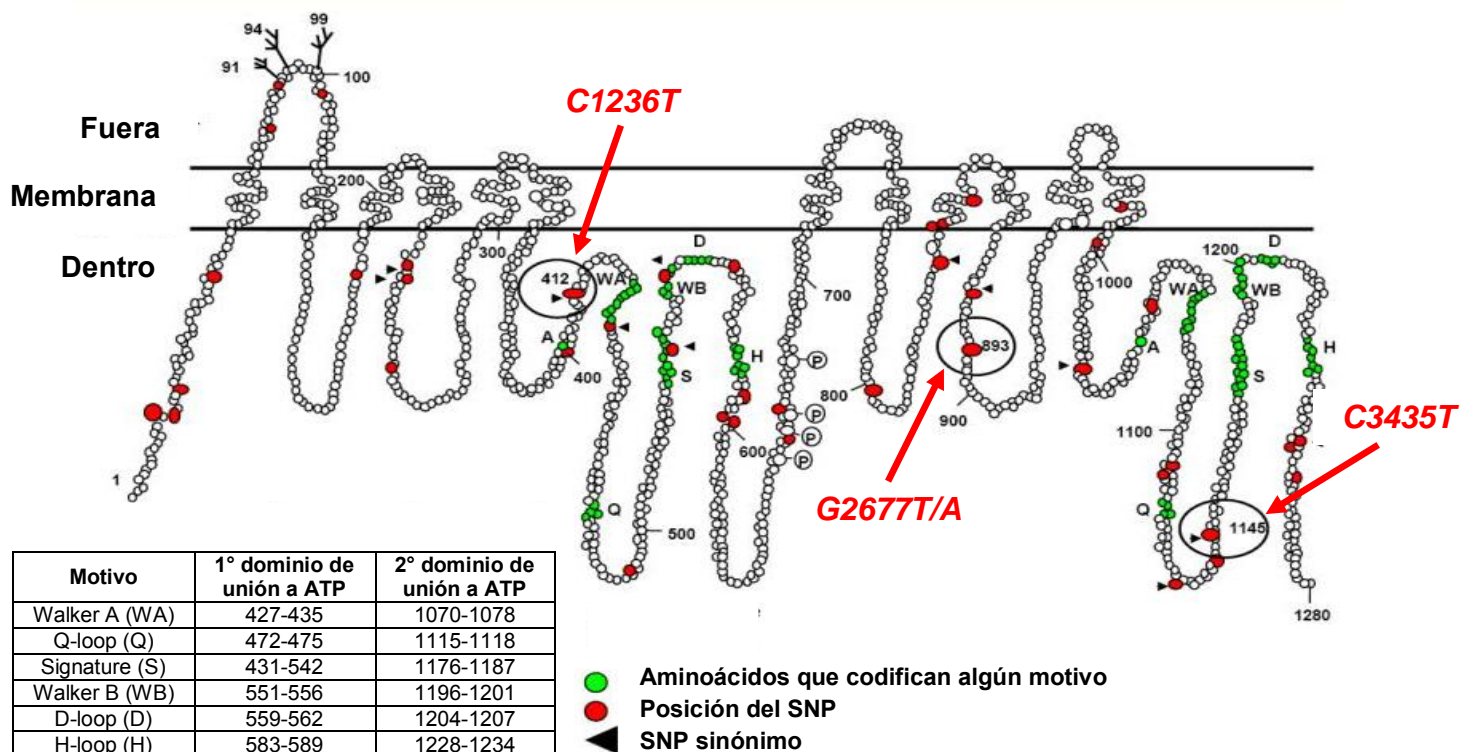


Figura 17. Estructura de P-gp donde se muestra la posición de los SNPs más estudiados (Tomado de: Fung y Gottesman, 2009).

a) SNP C1236T

El SNP *C1236T* (rs1128503) se encuentra en el exón 12 del gen *ABCB1* y se considera un polimorfismo sinónimo ya que el cambio de base no genera un cambio en el aminoácido en la posición 412 (Gly) de la proteína P-gp (Milojkovic y col., 2011). Este polimorfismo se encuentra en la región intracelular, cerca del motivo Walker A. Varios aminoácidos que se ubican cerca de este SNP son esenciales para la unión e hidrólisis del ATP (Fung y Gottesman, 2009). Así mismo, se ha ligado a la variabilidad en la respuesta de P-gp a distintos sustratos, por ejemplo, se ha observado que la frecuencia del genotipo TT es mayor en respondedores tardíos a la prednisona oral que los respondedores rápidos entre pacientes con síndrome nefrótico (Milojkovic y col., 2011). Por otro lado, se ha observado una frecuencia menor del alelo C en población asiática y de igual forma, en africanos el alelo T es menos frecuente (Hodges y col., 2011).

b) SNP G2677T/A

El polimorfismo *G2677T/A* (rs2032582) fue el primero en ser encontrado y se ubica en el exón 21 del gen *MDR1* (Milojkovic y col., 2011). Su presencia genera un cambio de aminoácido en la posición 893 de alanina a serina en P-gp, cuando de la guanina cambia a timina (posición 2677 en *ABCB1*); y si el cambio es de guanina por adenina, el aminoácido cambia de alanina a treonina (Kim y col., 2006); a esto se le conoce como variación con pérdida de sentido. Se ha observado que este cambio de aminoácido tiene grandes impactos tanto en la actividad de la ATPasa como en la especificidad de unión al sustrato con relación a gran variedad de fármacos (Milojkovic y col., 2011). La frecuencia del genotipo GG se presenta en un 81% en poblaciones africanas, comparado con asiáticos y caucásicos donde se observa una frecuencia del 10 al 32%. La presencia del alelo A es muy poco frecuente (0 a 17%) en distintas poblaciones (Hodges y col., 2011).

c) SNP C3435T

El polimorfismo *C3435T* (rs1045642) que se encuentra en el exón 26 es el más estudiado de todos los presentes en el gen *MDR1* (Bellusci y col., 2010). Este polimorfismo ha sido reportado como sinónimo y al igual que el SNP *C1236T* no genera un cambio de aminoácido con la posición 1145 (Ile) (Tapia, 2013). Se encuentra en el segundo dominio de unión a ATP, entre el Q-loop y la segunda firma S (Fung y Gottesman, 2009). La presencia de este polimorfismo cerca de la segunda firma S genera una alteración en la hidrólisis del ATP, lo cual, genera un mal funcionamiento en el transporte de los sustratos de esta proteína (Ambudkar y col., 2003). A pesar de que es sinónimo, se ha demostrado que su presencia afecta la función de P-gp ya que altera la especificidad de unión al sustrato (Milojkovic y col., 2011). De igual forma, se ha observado, que la frecuencia de este SNP está relacionada con la etnia. Se ha asociado al genotipo homocigoto 3435TT con una baja expresión de la proteína P-gp, a comparación de los que presentan el genotipo silvestre 3435CC que presentan una expresión elevada de la misma (Hisham y col., 2006).

4.1.3 Análisis por Haplotipo

Las variantes de secuencias que se encuentran en lugares cercanos entre sí, no tienden a segregarse independientemente en cada generación, esto se conoce como desequilibrio de ligamiento. Esto suele deberse a que los dos loci implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria con la separación de los cromosomas en anafase. Como resultado, múltiples variantes de alelos se heredan juntas en la misma cromátide con un patrón en particular. El descubrimiento del polimorfismo sinónimo *C3435T* y su asociación con la expresión de P-gp, deja abierta la posibilidad de que esté relacionado con otros SNPs presentes en el gen *ABCB1*. Por ejemplo, los tres SNPs más comunes presentes en el gen *MDR1* (*C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*) están en desequilibrio de ligamiento y se han observado con mayor frecuencia los haplotipos CGC y TTT en muchos grupos étnicos (Milojkovic y col., 2011).

Se ha determinado la frecuencia de estos polimorfismos en distintas poblaciones en el mundo, donde se ha observado que en personas del continente Africano el haplotipo que predomina es el CGC. Por otro lado, en caucásicos la frecuencia de CGC y TTT es aproximadamente la misma. Caso contrario a lo que se observa en poblaciones Asiáticas, donde el haplotipo predominante es TTT (Fung y Gottesman, 2009).

Capítulo 5. Farmacogenómica

5.1 Definición

Se define como el estudio del total de genes farmacológicamente relevantes, así como la forma en que dichos genes manifiestan sus variaciones y de qué manera estas variaciones pueden configurar el fenotipo de cada individuo, en cuanto a su respuesta a los medicamentos. Tiene como objetivos: aplicar la información del genoma al diseño de medicamentos para seleccionar el tratamiento óptimo para cada paciente y mejorar el coeficiente costo-efectividad (Gargiulo y Radakoff, 2010).

5.2 Historia

La primera observación documentada de una reacción farmacológica adversa, corresponde a Pitágoras, quien describió la variabilidad interindividual de la incidencia de la anemia hemolítica como respuesta a la ingestión de habas en el año 510 a.C.

Esto indica que la frecuencia de un polimorfismo genético particular y el subyacente genotipo suelen variar de una población a otra (Gurrola y col., 2010). En 1957 Motulsky indicó que la toxicidad inducida por fármacos y el fracaso de la eficacia a dosis terapéuticas normales, estaba causada por diferencias genéticas que causaban deficiencias enzimáticas. En el año 1959 cuando Fredrich Vogel usó por primera vez el término farmacogenética, para designar el estudio del papel que juega la variación de los genes individuales en la respuesta a los medicamentos (Gargiulo y Radakoff, 2010). El desarrollo del genoma humano hizo posible que se estudiara la estructura y el funcionamiento de los diferentes genes involucrados en el metabolismo de los fármacos y esto permitió el nacimiento de la farmacogenómica (Paz, 2011).

5.3 Medicina Personalizada

La farmacogenómica supone un acercamiento a la llamada Medicina personalizada, que pretende la administración del tratamiento óptimo para cada paciente, en función de la respuesta esperada a determinados fármacos, lo que requiere un análisis previo de los genes implicados y su nivel de expresión (Jouve de la Barreda, 2010). La medicina personalizada permite la administración a cada individuo del medicamento adecuado para la patología que padece, a la dosis adecuada para salvaguardar la eficacia y seguridad del mismo. Las áreas terapéuticas de aplicación incluirían oncología, psiquiatría, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias crónicas, del sistema nervioso y diabetes, entre otras (Fundación OPTI, 2009).

5.4 Aplicación de la farmacogenómica en México

En México se llevan a cabo investigaciones relacionadas con farmacogenómica en distintas instituciones, pero se debe tomar en cuenta que es un tema reciente en nuestro país. El desarrollo de la farmacogenómica permitirá aplicaciones como individualización del tratamiento en base a criterios de eficacia y toxicidad, reutilización

de fármacos rechazados por sus efectos tóxicos, mejora del diseño de ensayos clínicos mediante una mejor selección de pacientes y, en definitiva, un mejor conocimiento de la enfermedad a través de la identificación de subtipos genéticos y descubrimiento de nuevas terapéuticas. Se pretende que la prescripción de fármacos evolucione desde el diagnóstico basado en síntomas y signos, a una prescripción dirigida y complementada con el perfil genético individual. La posibilidad de asociar un polimorfismo genético con la capacidad de respuesta a un medicamento permitirá determinar el tipo de metabolismo y riesgo de toxicidad o de fracaso terapéutico, diferenciando a cada paciente como individuo “respondedor” o “no respondedor” por su perfil molecular. Su aplicación en el sistema sanitario contribuirá a mejorar la calidad asistencial y previsiblemente a una reducción en los costos a medio o largo plazo (Fundación OPTI, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

Existe gran variación interindividual en la respuesta a los medicamentos; el gen *ABCB1* presenta varios SNPs que involucran variabilidad interétnica y que le confieren a P-gp un fenotipo de resistencia a multifármacos. En población mexicana no se han realizado estudios sobre la genotipificación de los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* en casos con enfermedades desmielinizantes como la Esclerosis múltiple y la Neuritis óptica y la frecuencia de estos SNPs no se ha reportado en población mestizo mexicana, solamente en mexicanos americanos (Dong y col., 2009; Pauli y Kroetz, 2004; Zhang y col., 2012).

La genotipificación incluye a individuos homocigotos para la variante, heterocigotos y homocigotos normales, y cada genotipo se caracteriza por tener distintos niveles de expresión de la P-gp. Debido a la variabilidad fenotípica de P-gp, es importante estudiar los polimorfismos de *ABCB1* en población mestizo mexicana, ya que podría tener importantes implicaciones terapéuticas en el uso de los fármacos que son sustratos de P-gp y se podrían establecer estrategias de tratamiento más efectivas y menos costosas para estas enfermedades.

3. HIPÓTESIS

Si la frecuencia de homocigotos para los SNPs *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1* es diferente en controles y pacientes, entonces estos polimorfismos pueden estar asociados con la respuesta al tratamiento para enfermedades desmielinizantes como la Esclerosis múltiple y la Neuritis óptica.

4. OBJETIVOS

GENERAL

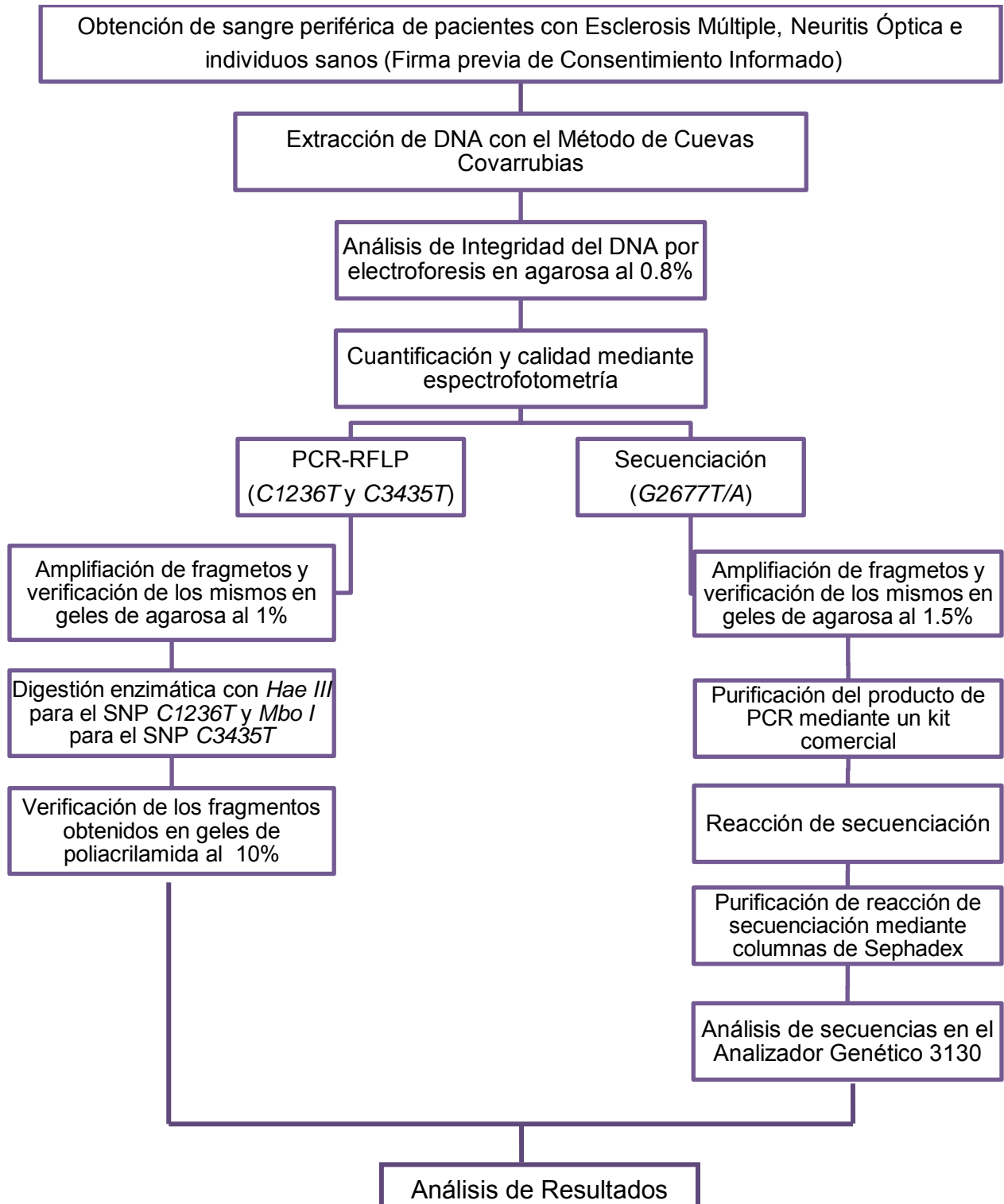
Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen *ABCB1* (*C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*) en pacientes mestizo mexicanos con enfermedades desmielinizantes (Esclerosis Múltiple y Neuritis Óptica) y en individuos sanos, mediante las técnicas de PCR-RFLP y secuenciación para evaluar el posible impacto de la presencia de los mismos en la respuesta al tratamiento farmacológico.

PARTICULARES

1. Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen *ABCB1* (*C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*) en pacientes mestizo mexicanos con enfermedades desmielinizantes.
2. Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1* en individuos sanos.
3. Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas con las reportadas en otras poblaciones del mundo.
4. Calcular la frecuencia de individuos genotípicamente farmacorresistentes en la muestra de pacientes de la población mestizo mexicana.
5. Estimar el impacto de la presencia de estos polimorfismos en la respuesta al tratamiento farmacológico en pacientes con enfermedades desmielinizantes.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama de Flujo Experimental



5.2 Material, reactivos y equipo empleado

Tabla 6. Lista de material, reactivos y equipos empleados en este estudio.

Material	Reactivos	Equipo
- Espátula	- Acetato de sodio 3M	- Agitador magnético
- Matraz aforado: 1 y 2 L.	- Acrilamida SIGMA	- Agitador orbit Shaker Lab-line
- Matraz Erlenmeyer: 500 ml.	- Agarosa Nara Biotec	- Balanza analítica Sartorius BP2105
- Micropipetas: 10, 20, 100, 200 y 1000 µl.	- Agua bidestilada estéril	- Cámaras horizontales electroforesis Labnet
- Pipeta graduada: 10 ml.	- Agua inyectable	- Cámaras verticales de electroforesis Labnet
- Probetas: 10, 50, 100, 250 y 500 ml.	- BigDye Terminator v3.1 Applied Biosystems	- Centrifuga de vacío Heto VR-1
- Tubos eppendorf: 0.2, 0.5 y 1.5 ml.	- Bromuro de etidio	- Centrifuga 5804 R Eppendorf
- Tubos Falcon: 15 ml.	- Cloroformo/alcohol isoamílico (49:1)	- Centrifuga SORVALL MC 12V
- Vaso de precipitado: 25, 50, 100, 250, 500 ml. 1 y 2 L.	- Colorante de carga (Xilencianol, azul de bromofenol y glicerol)	- Espectrofotómetro JENWAY Genova Nano
- Puntas para Micropipetas de 200 y 1000	- Etanol absoluto	- Fuente de poder Labnet Power Station 300
	- Etanol 70%	- Termoblock LAB-LINE
	- Mix Kit QIAGEN (Master Mix)	- Termociclador eppendorf Martercycler gradient
	- NaCl 5mM y saturado	- Transiluminador Dual Intensity UV Labnet
	- N,N,N,N-Tetrametilendiamina SIGMA	- Analizador Genético 3130 Applied Biosystems
	- Persulfato de amonio 10%	- Vortex Genie 2
	- SDS 10% (dodecil sulfato de sodio)	
	- Sephadex G-50 SIGMA	
	- TBE (Tris-Acido Bórico-EDTA) 1 y 0.5 X.	
	- TTS (Tris-Tritón-Sacarosa)	
	- 5X Sequencing Buffer Applied Biosystems	

5.3 Obtención de muestras

En este estudio la muestra de población evaluada fue de origen mestizo mexicana, donde los individuos son hijos de padres mexicanos por al menos tres generaciones. Las muestras de pacientes fueron proporcionadas por la Clínica de Esclerosis Múltiple del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) donde los pacientes ingresados son diagnosticados con EM o NO mediante estudios clínicos. De igual forma, son evaluados con la escala de progresión de esclerosis múltiple denominada EDSS (*Expanded Disability Status Scale*). Posterior a ello, se les invita a formar parte de este protocolo de investigación y si aceptan participar, se les brinda una carta de consentimiento informado donde aprueban que se les tome una muestra de sangre periférica. Es importante señalar que este protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del INNN. Se trabajó con 2 grupos, el primero de ellos de 155 pacientes con EM y el segundo con 111 pacientes con NO. En el caso de las muestras de EM, 65% (101) fueron mujeres y 35% (54) hombres; y en las muestras de NO, 75% (83) eran mujeres y 25% (28) hombres. De igual forma, se trabajó con un grupo control de 200 individuos, 65% (129) muestras de mujeres y 35% (71) muestras de hombres. Las muestras de controles fueron tomadas del Banco de DNA con el que cuenta el Departamento de Genética del INNN.

Las 155 muestras de EM se dividieron en 4 grupos dependiendo el diagnóstico de cada una:

1. EM - EM/NO (100 muestras)
2. EMBR y EMRR (25 muestras)
3. Mielitis Transversa (17 muestras)
4. EMSP (10 muestras)

Cabe mencionar que 3 muestras contaban con un diagnóstico distinto al de estos 4 grupos y por tanto, se analizaron de manera independiente.

De igual forma, las 111 muestras de NO se dividieron en 2 grupos dependiendo si el diagnóstico era NO o NMO:

1. NO (76 muestras)
2. NMO (35 muestras)

5.4 Extracción de DNA

Método de Covarrubias modificado de Buffone y Darlington; Millar y Polesky; Maniatis y Fritsch.

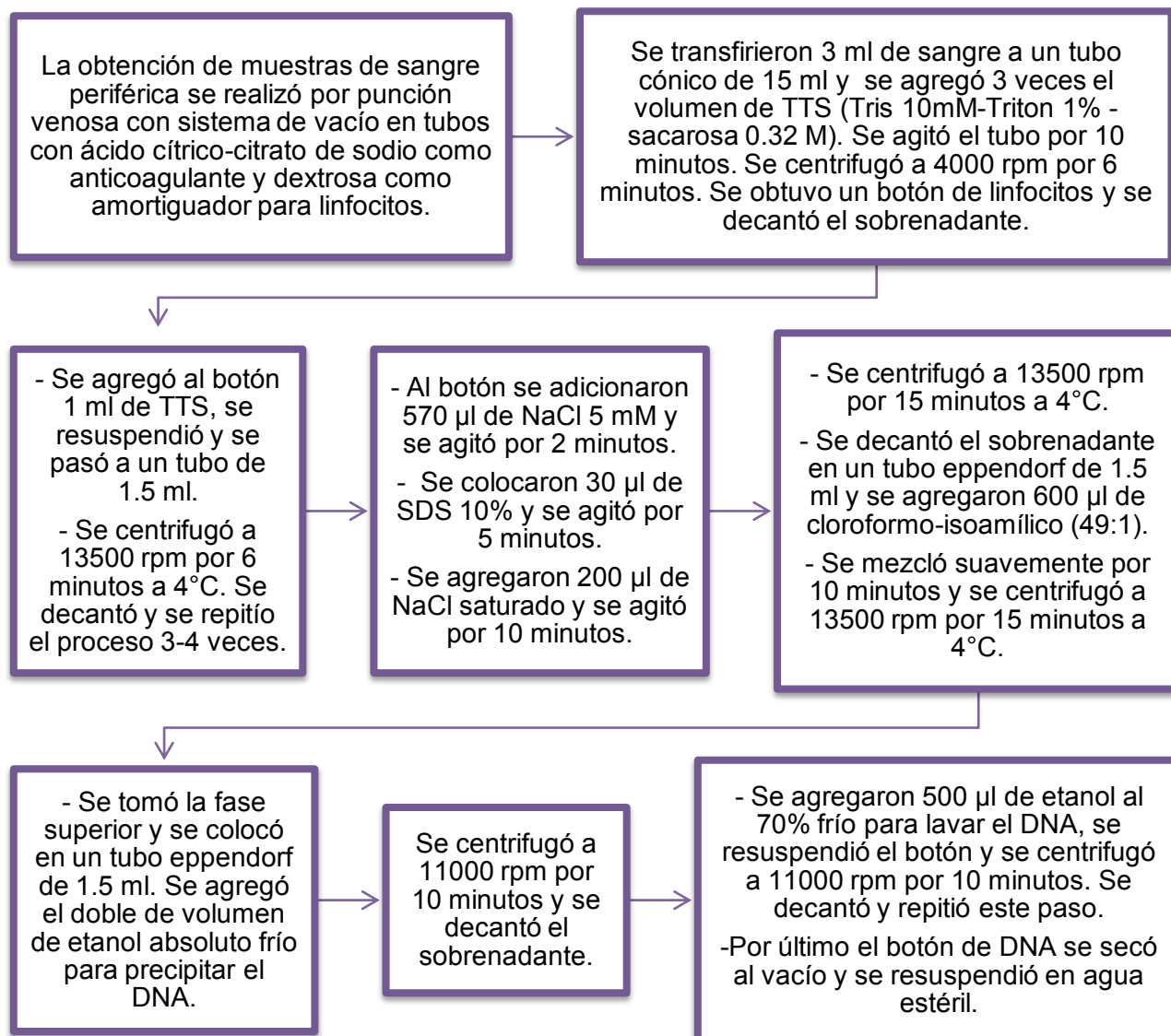


Diagrama 2. Metodología para la extracción de DNA (Modificado de: Maniatis y col., 1982).

En este método empleado para la extracción de DNA, se utilizó una mezcla de: Tris 10mM - Triton X100 1% - sacarosa 0.32 M (TTS). El Triton X100 es un detergente no iónico usado para desnaturalizar membranas celulares. Esta mezcla ayudó a lisar los eritrocitos de la muestra de sangre mediante choque hipotónico. Posteriormente se colocó NaCl y SDS (Dodecil sulfato de sodio), un detergente iónico que solubiliza los fosfolípidos de las membranas formando micelas y permite el acceso al DNA. El SDS también contribuye a desnaturalizar proteínas al romper uniones no covalentes intramoleculares que estabilizan su estructura tridimensional (Wilson y Walker, 2005). Una vez terminado este proceso, se agregó cloroformo y alcohol isoamílico, estos ayudan a que se formen 3 interfases (Figura 18); el alcohol isoamílico favorece la separación nítida de las fases, en la fase acuosa (superior) se encontrará disuelto el DNA, en la fase orgánica (inferior) quedan los lípidos de membrana y en la interfase se encuentran las proteínas que fueron desnaturalizadas por el cloroformo. Por último, se adicionó etanol absoluto frío para precipitar el DNA ya que es insoluble en el mismo y se lava con etanol al 70% (Luque y Herráez, 2002).

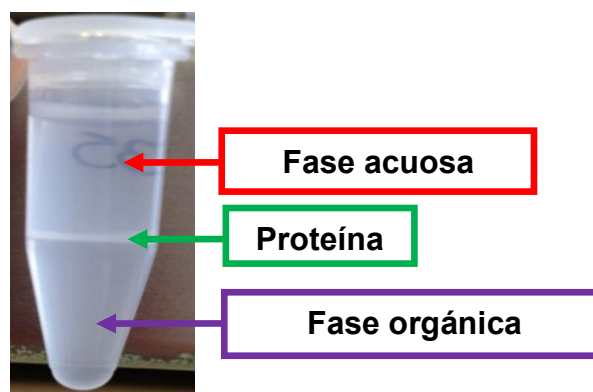


Figura 18. Esquema de separación de fases con cloroformo-alcohol isoamílico para la extracción de DNA.

5.5 Cuantificación y análisis de integridad de DNA

En el análisis de integridad del DNA se asegura que no se haya degradado durante el proceso de extracción y que la pureza y concentración sean adecuadas. La cuantificación del DNA se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro (Figura 19).



Figura 19. Espectrofotómetro JENWAY Genova Nano empleado en la cuantificación de DNA.

Es importante señalar que una relación de DO 260/280 nm que va de 1.8 a 2.0, indica que la muestra de DNA tiene pureza aceptable. Una relación fuera de este rango indica contaminación (Étienne, 2001).

Por otro lado, para saber que tan íntegro es el DNA genómico se elaboró una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La agarosa es un polisacárido de estructura lineal, componente principal del agar, que se obtiene de las algas marinas. Es insoluble en medios acuosos a temperatura ambiente, pero se disuelve en ellos a 100°C. Cuando enfría, la agarosa gelifica, formando un reticulado microscópico en cuyos poros pueden desplazarse moléculas de ácidos nucleicos cuando se les aplica un campo eléctrico. Las muestras de DNA se colocaron en los pocillos del gel con un colorante de carga, que es una mezcla de (xilen-cianol, glicerol y azul de bromofenol), éste ayuda a que la muestra permanezca en el fondo del pozo y a observar el corrimiento de las mismas. Se colocó un buffer para que se pudiera llevar a cabo la migración del DNA, éste tiene una carga negativa; por tanto, migra del cátodo al ánodo cuando se le aplica una corriente eléctrica (Solari, 2011). En la Figura 20 se presenta un esquema de las cámaras de electroforesis empleadas para el análisis de integridad del DNA.

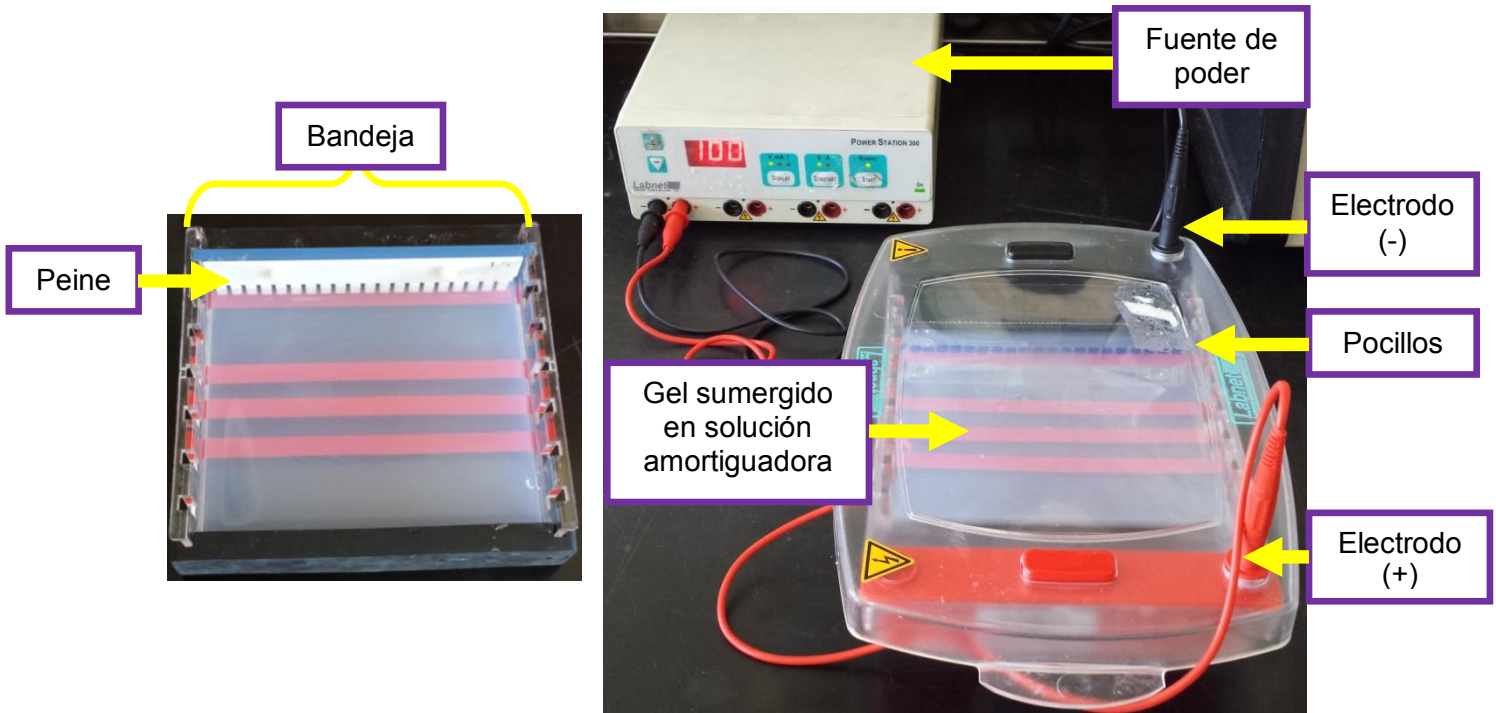


Figura 20. Esquema de cámara electroforética horizontal Labnet.

Una vez transcurrido el tiempo de electroforesis, los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio, que es una sustancia fluorescente en luz ultravioleta y su molécula plana se puede intercalar entre los pares de bases del DNA, lo cual, permite visualizarlo (Solari, 2011). A continuación se presenta un diagrama que explica el modo en el que se llevó a cabo el análisis de integridad del DNA (Diagrama 3).

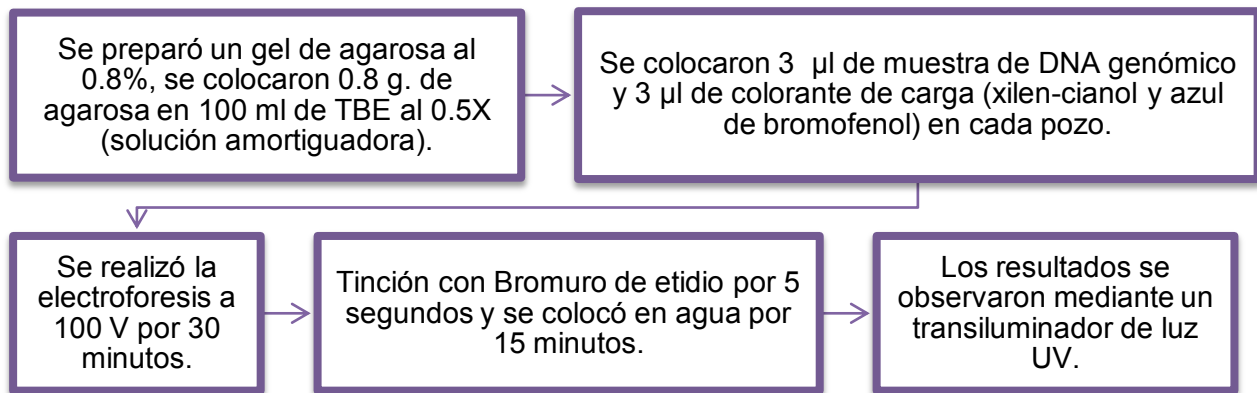
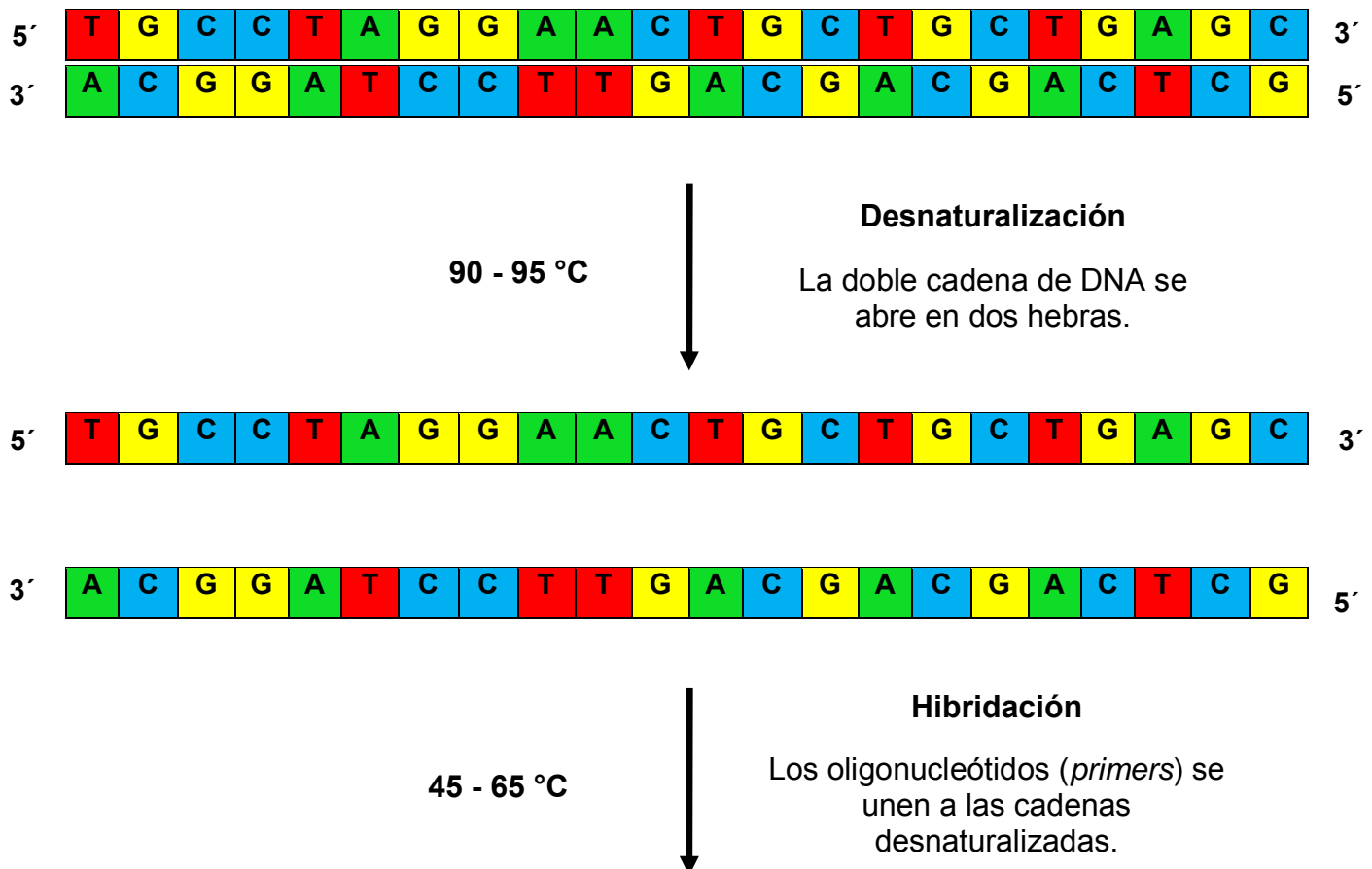


Diagrama 3. Análisis de integridad del DNA.

5.6 Amplificación de DNA por PCR

En 1985 K. Mullis, inventó un método para lograr la multiplicación *in vitro* de secuencias de DNA, llamada Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una reacción enzimática que amplifica el número de moléculas de DNA en forma exponencial durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.

Cada ciclo se lleva a cabo en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión (Figura 21), se generan 2 cadenas sencillas a partir de una doble cadena en el primer ciclo. Los elementos de la reacción son: el DNA molde, enzima Taq polimerasa, oligonucleótidos (*primers*), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), ión magnesio, solución amortiguadora y agua. Los oligonucleótidos se unen al DNA por complementariedad de bases, uno en cada hebra de DNA, en sentidos 5' a 3' y 3' a 5' respectivamente (Tamay y col., 2013).



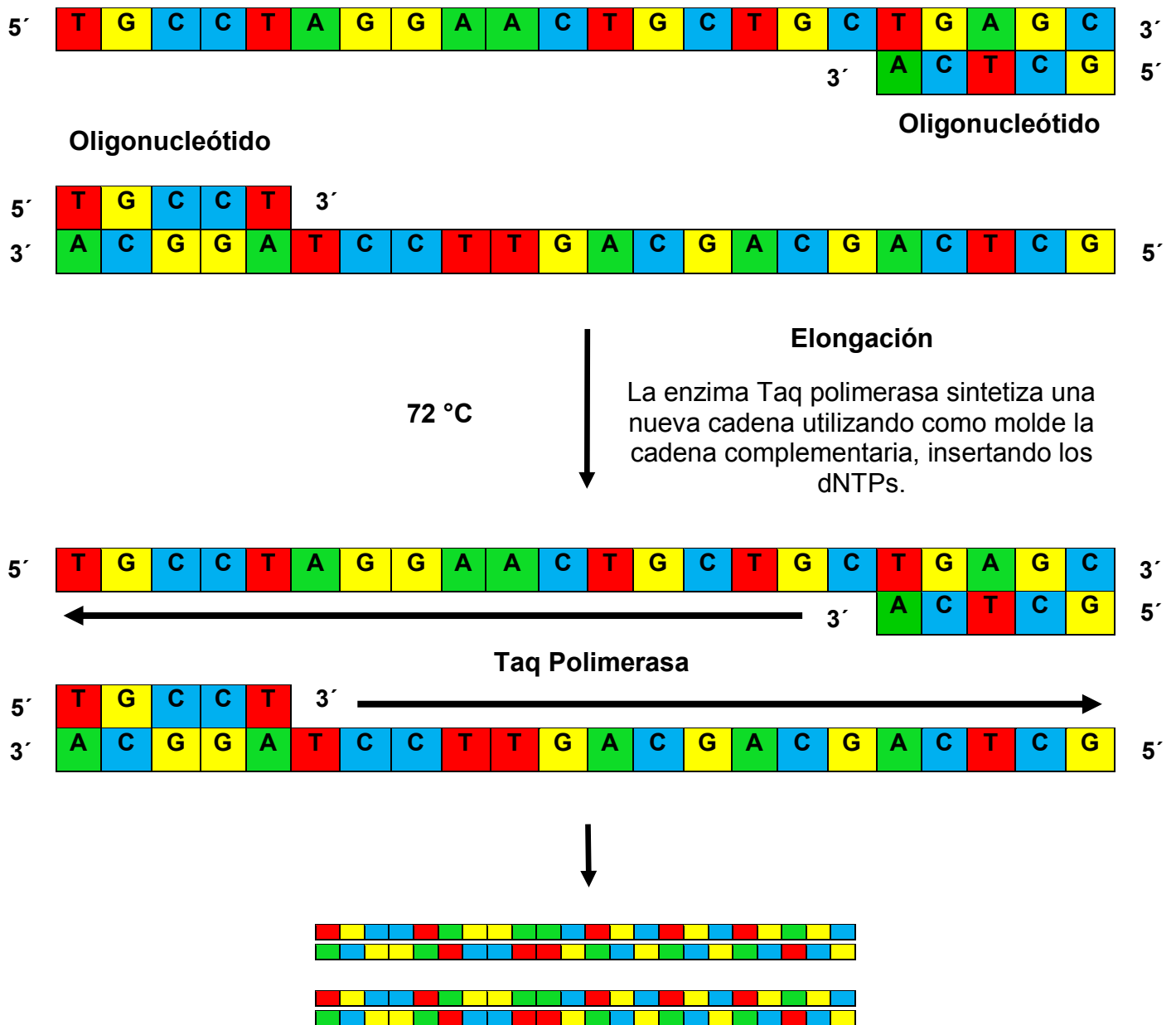


Figura 21. Esquema de un ciclo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Para amplificar la secuencia de cada uno de los polimorfismos estudiados se emplearon dos oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos, estos y las condiciones de la PCR fueron obtenidas del artículo publicado en 2001 por Cascorbi y colaboradores (Tablas 7 y 8) (Cascorbi y col., 2001).

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos empleados en la amplificación de los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1*.

Polimorfismo	Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño
<i>C1236T</i>	ABC1236F	5'-TATCCTGTCTCTGTGAATTGCC-3'	22 pb
	ABC1236R	5'-CCTGACTCACCACACCAATG-3'	20 pb
<i>G2677T/A</i>	ABC2677F	5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG-3'	20 pb
	ABC2677R	5'-GTTTGACTCACCTTCCCAG-3'	19 pb
<i>C3435T</i>	ABC3435F	5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG-3'	20 pb
	ABC3435R	5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'	20 pb

Tabla 8. Condiciones de PCR para los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*.

SNP	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos	Amplificación
<i>C1236T</i>	Desnaturalización Inicial	95	2 minutos	40	370 pb
	Desnaturalización	94	30 segundos		
	Alineamiento	60	30 segundos		
	Extensión	72	30 segundos		
	Extensión final	72	5 minutos		
<i>G2677T/A</i>	Desnaturalización Inicial	94	2 minutos	35	220 pb
	Desnaturalización	94	30 segundos		
	Alineamiento	59	45 segundos		
	Extensión	72	30 segundos		
	Extensión final	72	7 minutos		
<i>C3435T</i>	Desnaturalización Inicial	95	1 minuto	40	197 pb
	Desnaturalización	95	20 segundos		
	Alineamiento	55	30 segundos		
	Extensión	72	30 segundos		
	Extensión final	72	5 minutos		

A continuación se presenta la metodología para realizar la reacción de amplificación para cada polimorfismo (Diagrama 4).

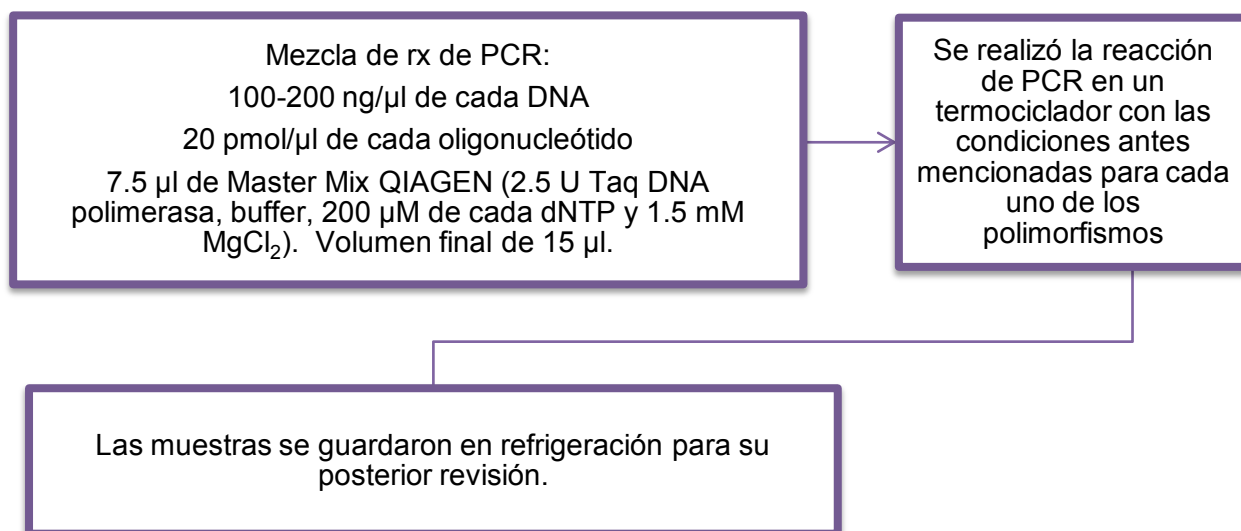


Diagrama 4. Metodología para la reacción en cadena de la polimerasa.

Una vez que la reacción de PCR se llevó a cabo, se elaboró un gel de agarosa al 1%, donde se colocaron 2 μl de DNA amplificado y 2 μl de colorante de carga en cada pozo y así poder corroborar que la reacción haya resultado de manera favorable (Figura 26).

5.7 RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica)

Posterior a la reacción de amplificación, se realizó la detección de la presencia de los polimorfismos *C1236T* y *C3435T* mediante restricción enzimática. Para elaborar esta técnica se emplean endonucleasas de restricción, que son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster internos en las dos hebras de una molécula de DNA. Estas enzimas se aíslan de microorganismos y se clasifican en tres grupos: tipo I, II, III. Se les denomina con los nombres de las primeras 3 o 4 letras del microorganismo del cual fueron aisladas. Las endonucleasas de restricción son capaces de reconocer en toda la longitud de DNA ciertas secuencias cortas de nucleótidos. Generalmente estas

secuencias son palíndromas, es decir, que puede leerse invertida en la cadena complementaria. Se realizan dos cortes, uno en cada cadena; estos se hacen en forma simétrica respecto al centro de la secuencia reconocida (Solari, 2011). En las tablas 10 y 11 se muestra la secuencia de reconocimiento de las enzimas empleadas para los polimorfismos *C1236T* y *C3435T* y los fragmentos generados al momento de realizar la digestión.

Para llevar a cabo esta técnica, se realizó una mezcla de DNA amplificado, la enzima de restricción, un amortiguador 10X, este está compuesto por NaCl, Tris-HCl, MgCl₂ y ditioneitol (DTT). El Tris-HCl es una solución amortiguadora empleada para mantener un valor de pH constante y adecuado a las condiciones óptimas de la enzima que generalmente es de un pH igual a 7.5 (Wilson y Walker, 2005). El MgCl₂ es empleado ya que los iones Mg²⁺ son requeridos como cofactor por todas las endonucleasas, a una concentración de alrededor de 10 mM (Perera y col., 2003). Por último, el DTT es un agente reductor, en cuya presencia la reacción de restricción es más eficaz (Bennett y Moore, 2002). Posteriormente, el DNA con la mezcla de restricción fue incubada por tres horas a 37 °C. Para ambos polimorfismos (*C1236T* y *C3435T*) se emplearon las mismas condiciones y cantidades de reactivos, lo único distinto fue la enzima de restricción. En el caso del polimorfismo *C1236T* la enzima empleada fue *Hae III* y en el caso del SNP *C3435T* la enzima utilizada fue *Mbo I*. En la tabla 9 se presentan las condiciones empleadas en la digestión enzimática para cada uno de ellos.

Tabla 9. Condiciones de la digestión enzimática para los SNPs *C1236T* y *C3435T*.

SNP	Enzima	Buffer	Agua	DNA amplificado	Vol. Total	Temperatura	Tiempo
<i>C1236T</i>	0.2 µl (<i>Hae III</i>)	1 µl	9.8 µl	9.0 µl	20 µl	37 °C	3 horas
<i>C3435T</i>	0.2 µl (<i>Mbo I</i>)	1 µl	9.8 µl	9.0 µl	20 µl	37 °C	3 horas


5.7.1 RFLP del polimorfismo C1236T


Tabla 10. Sitio de corte y fragmentos generados por la enzima *Hae III* en el SNP C1236T.


Enzima <i>Hae III</i>	
Secuencia de reconocimiento	5'GG/CC 3'
Longitud del fragmento amplificado en la PCR	370 pb
Fragmentos generados por el corte de la enzima	272, 98, 63 y 35 pb

TATCCTGTGTCTGTGAATTGCC TTGAAGTTTTTTTCTCACTCG
 TCCTGRTAGATCTTGAAG **GG** **CC** TGAACCTGAAGGTGCAGA
 GTGGGCAGACRGT **GG** **CC** CTGGTTGAAACAGTGGCTGTG
 GGAAGAGCACAACRGTCCACTGATGCAGAGRCTCTATGACC
 CCACARAGGGGATGGTGAGATGACCCATGC RAGCTAGACCC
 TGCGGTGATCAGCAGKYACATTGCACATCTTTCTGATGTTGC
 CCTTTCAATTACAAATGTATGAAAGTCACACTTACKTTTTATT
 CCAGGTCAGTGTTGATGGACAGGAYATTAGGACCATAAATG
 TAAGGTTTCTACGGGAAAT **CATTGGTGTGGTGAGTCAGG**

Oligonucleótidos

 Secuencias de reconocimiento de la enzima *Hae III*

 SNP C1236T

 Sitio de corte

En la figura 22 se muestra un esquema de los sitios de corte de la enzima *Hae III* utilizada para el polimorfismo C1236T. En este caso la enzima reconoce dos sitios de corte en el producto amplificado de 370 pb.

Para el genotipo homocigoto C/C (silvestre), se observaron 3 fragmentos (272, 63 y 35 pb). Por otro lado, para el genotipo homocigoto T/T, como existe el cambio de base de C por T, la enzima no reconoce el sitio de corte donde se encuentra el polimorfismo y por tanto, solo se generan dos fragmentos (272 y 98 pb). Por último, para el genotipo heterocigoto C/T se observan 4 fragmentos (272, 98, 63 y 35 pb), debido a que un alelo presenta el cambio de base y el otro no.

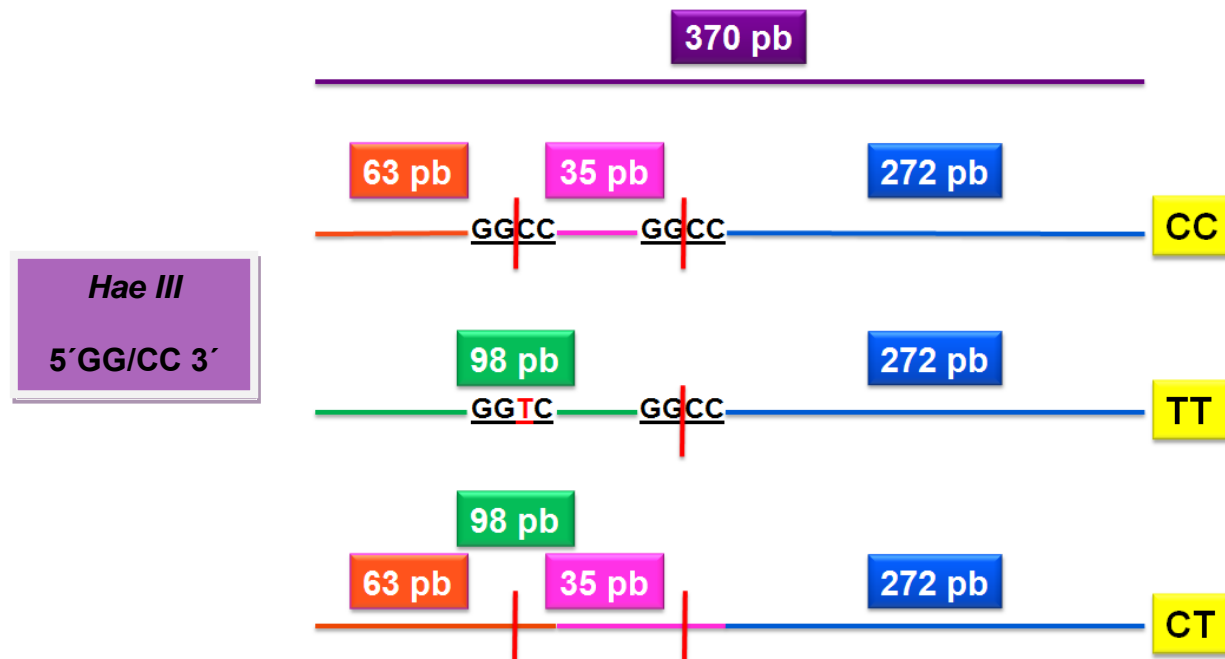


Figura 22. Esquema de los sitios de corte de la enzima *Hae III* y los fragmentos generados para cada genotipo del polimorfismo *C1236T*.

5.7.2 RFLP del polimorfismo *C3435T*

Tabla 11. Sitio de corte y fragmentos generados por la enzima *Mbo I* en el SNP *C3435T*.

Enzima <i>Mbo I</i>	
Secuencia de reconocimiento	5' - ↓GATC - 3'
Longitud del fragmento amplificado en la PCR	197 pb
Fragmentos generados por el corte de la enzima	158 y 39 pb

TGTTTT**CAGCTGCTTGATGG**CAAAGAAATAAAGCGACTGAAT
 GTTCAGTGGCTCCGAGCACACCTGGGCATCGTGTCCCAGGA
 GCCATCCTGTTTGACTGCAGCATTGCTGAGAACATTGCCTA
 TGGAGACAACAGCCGGGTGGTGT**CACAGGAAGA** **GATC**
 GTGAGGGCAGCAAAG**GAGGCCAACATACATGCCTT**

Oligonucleótidos

- Secuencia de reconocimiento de la enzima *Mbo I*
- SNP *C3435T*
- Sitio de corte

Para el polimorfismo *C3435T* se empleó la enzima *Mbo I*; en la figura 23 se muestra un esquema de los sitios de corte de la misma y los fragmentos obtenidos para cada genotipo. La enzima solo reconoce un sitio de corte en el fragmento de 197 pb

En el caso del genotipo homocigoto C/C (silvestre), la enzima reconoce el sitio de corte y se generaron dos fragmentos (158 y 39 pb). En el genotipo homocigoto T/T, el cambio de base inhibe el sitio de corte de la enzima y por tanto, se observa el producto amplificado de 197 pb. Por otro lado, cuando se presenta el genotipo heterocigoto C/T, un alelo presenta el cambio de C por T y la enzima no reconoce el sitio de corte y el otro alelo no presenta el cambio de base; por tanto, se observaron 3 fragmentos (197, 158 y 39 pb).

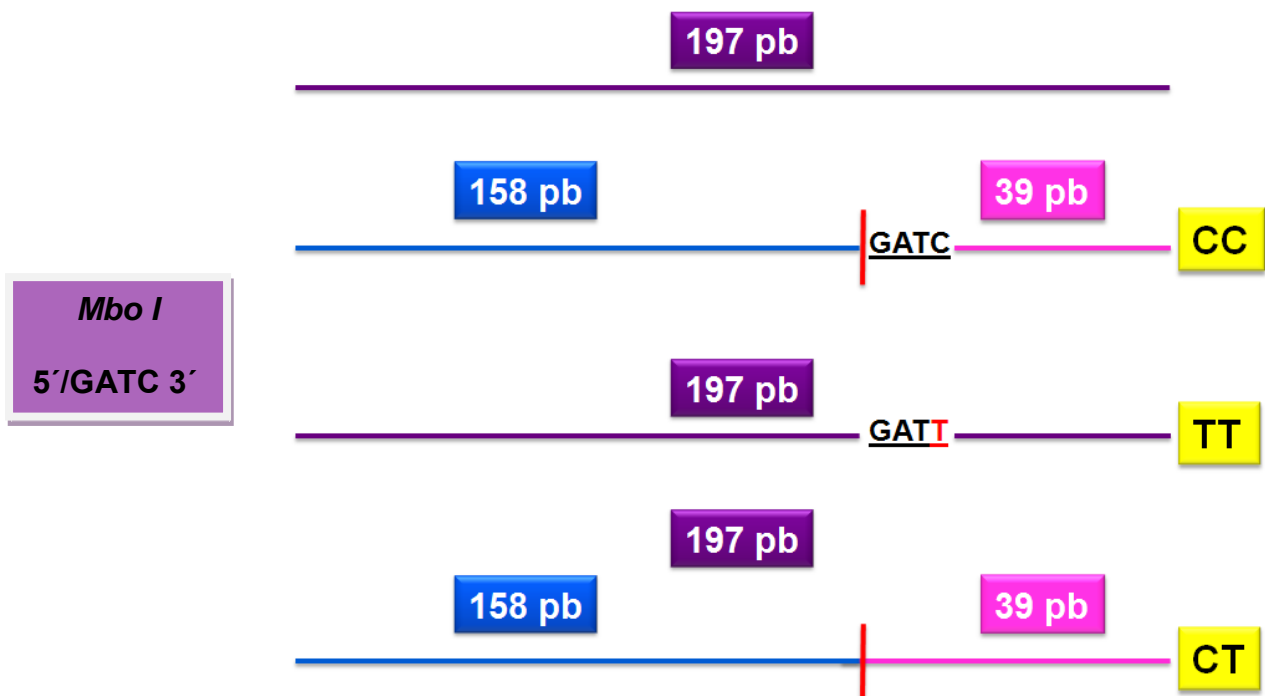


Figura 23. Esquema de los sitios de corte de la enzima *Mbo I* y los fragmentos generados para cada genotipo del polimorfismo *C3435T*.

5.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Una vez transcurrido el tiempo de la digestión enzimática para los polimorfismos *C1236T* y *C3435T*, se realizó una electroforesis vertical en geles de poliacrilamida para observar los fragmentos obtenidos e identificarlos según su peso molecular. La poliacrilamida es un polímero formado a partir de la acrilamida y N,N-metilenbisacrilamida. La concentración de ambos reactivos define el grado de reticulación del gel y éste es superior al conseguido en los geles de agarosa. La ventaja que presentan frente a los geles de agarosa es que presentan un mayor poder de separación ya que los poros son más pequeños (Etienne, 2001). Estos geles se emplean principalmente para observar fragmentos que difieran entre sí hasta en un solo par de bases, aproximadamente de 5 a 500 bp. Debido a que los fragmentos generados después de la digestión fueron muy pequeños, se decidió elaborar este tipo de geles para observar mejor las bandas. Otra diferencia entre estos geles y los de agarosa es que estos se realizan de manera vertical como se muestra en la figura 24.

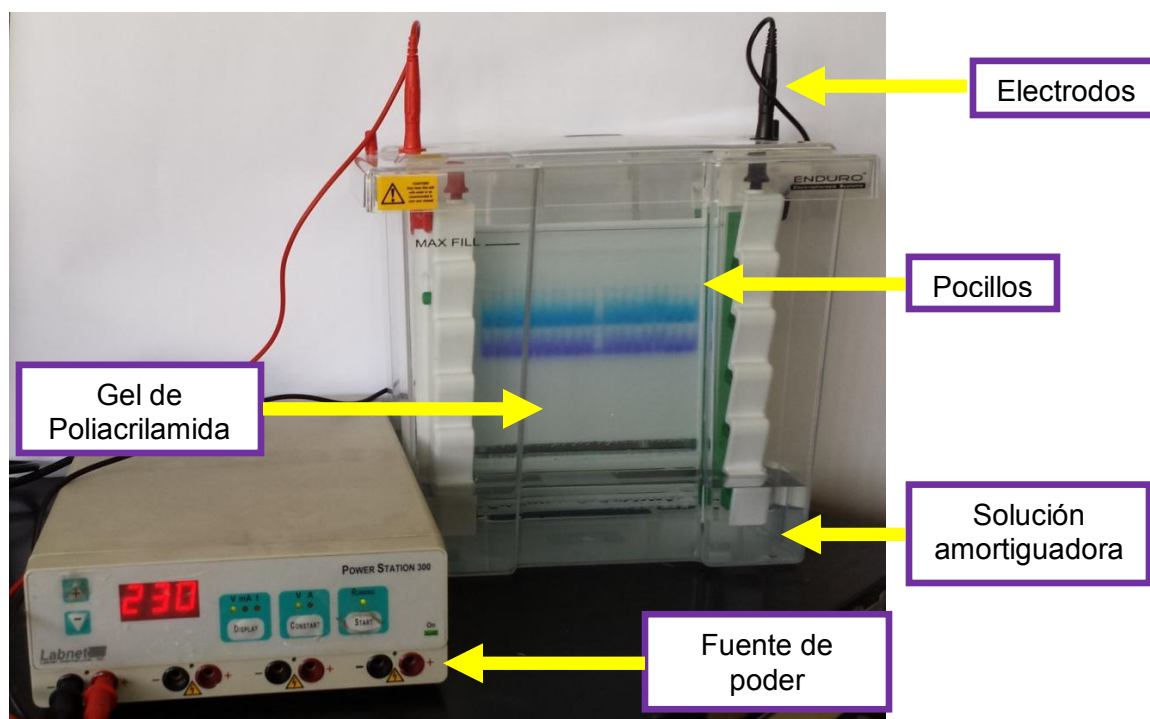


Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Estos geles se elaboraron a una concentración al 10% (Tabla 12).

Tabla 12. Condiciones para la elaboración de un gel de poliacrilamida al 10% y su corrimiento electroforético.

	Cantidad	Corriente	Tiempo
Acrilamida 40%	17 ml	230 V	3 horas
Agua	45.4 ml		
TBE 10X	7 ml		
Persulfato de amonio 10%	0.55 ml		
TEMED	0.035 ml		

Una vez elaborado el gel, se cargaron los 20 μ L de la digestión con 8 μ L de colorante de carga. De igual forma, se colocó un marcador de peso molecular conocido para corroborar que los fragmentos obtenidos en la digestión correspondan con el tamaño esperado en pares de bases.

5.9 Secuenciación

La presencia del polimorfismo *G2677T/A* se determinó mediante la técnica de secuenciación. El método de secuenciación empleado fue el desarrollado por Frederick Sanger a mediados de la década de 1970 y se conoce como método enzimático o dideoxi. Este consiste en la incorporación de dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente a una cadena de DNA durante el proceso de amplificación de la misma. Los dideoxinucleótidos no poseen un grupo 3'-OH necesario para la formación del enlace fosfodiéster que permite la unión entre nucleótidos, por lo tanto se interrumpe la elongación de la cadena cada vez que uno de estos dideoxinucleótidos es incorporado en ella; de este modo, se generan secuencias de diferentes tamaños (Duque, 2009). La secuenciación automatizada del DNA incluye cuatro fluoróforos, uno para cada una de las bases nitrogenadas (ddATP verde, ddCTP azul, ddGTP negro y ddTTP rojo). En este caso se empleó el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing,

que contiene los cuatro ddNTPs, la enzima DNA polimerasa, $MgCl_2$, un buffer y los 4 dNTPs. Cuando la reacción de secuenciación se ha purificado y secado, se emplea formamida para desnaturalizar al DNA. La formamida es una molécula sencilla altamente polar, con grupos amino y carbonilo; estos permiten competir en la formación de puentes de hidrógeno con los grupos amino y carbonilo propios de las bases, lo que facilita la separación de las hebras de DNA (Herráez, 2012). Las muestras con formamida se colocan en placas de secuenciación para su posterior lectura en el Analizador Genético 3130 (Figura 25), donde se realiza una electroforesis capilar.

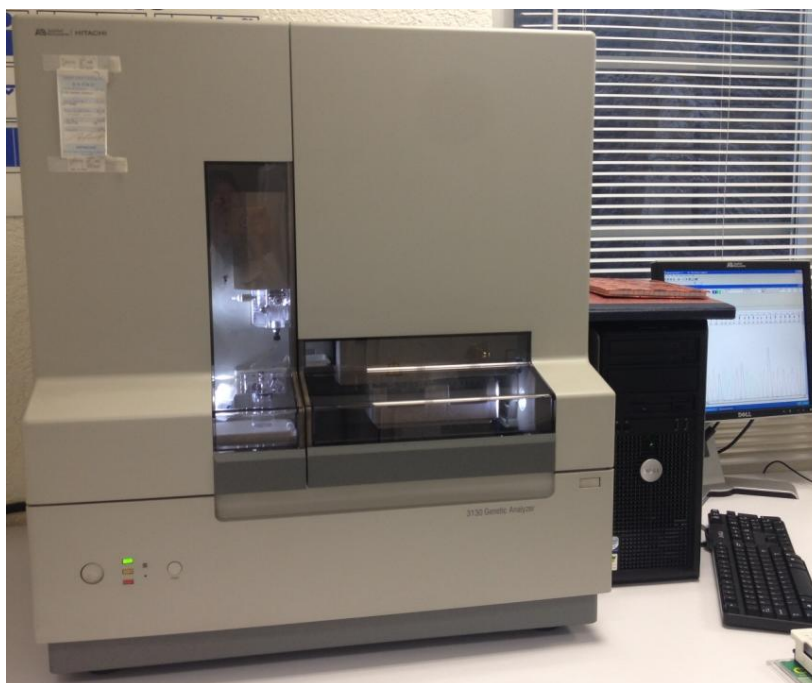


Figura 25. Analizador Genético 3130 AB
utilizado en la secuenciación de las muestras.

La migración electroforética de las cadenas marcadas con ddNTP pasa frente a un rayo láser enfocado en una posición fija. El láser induce una señal fluorescente dependiente de la marca específica, que representa uno de los cuatro nucleótidos. La secuencia es leída y registrada en forma electrónica; se visualiza como picos de distintos colores que conforman el electroferograma, como se observa en la figura 26 (Passarge, 2009).

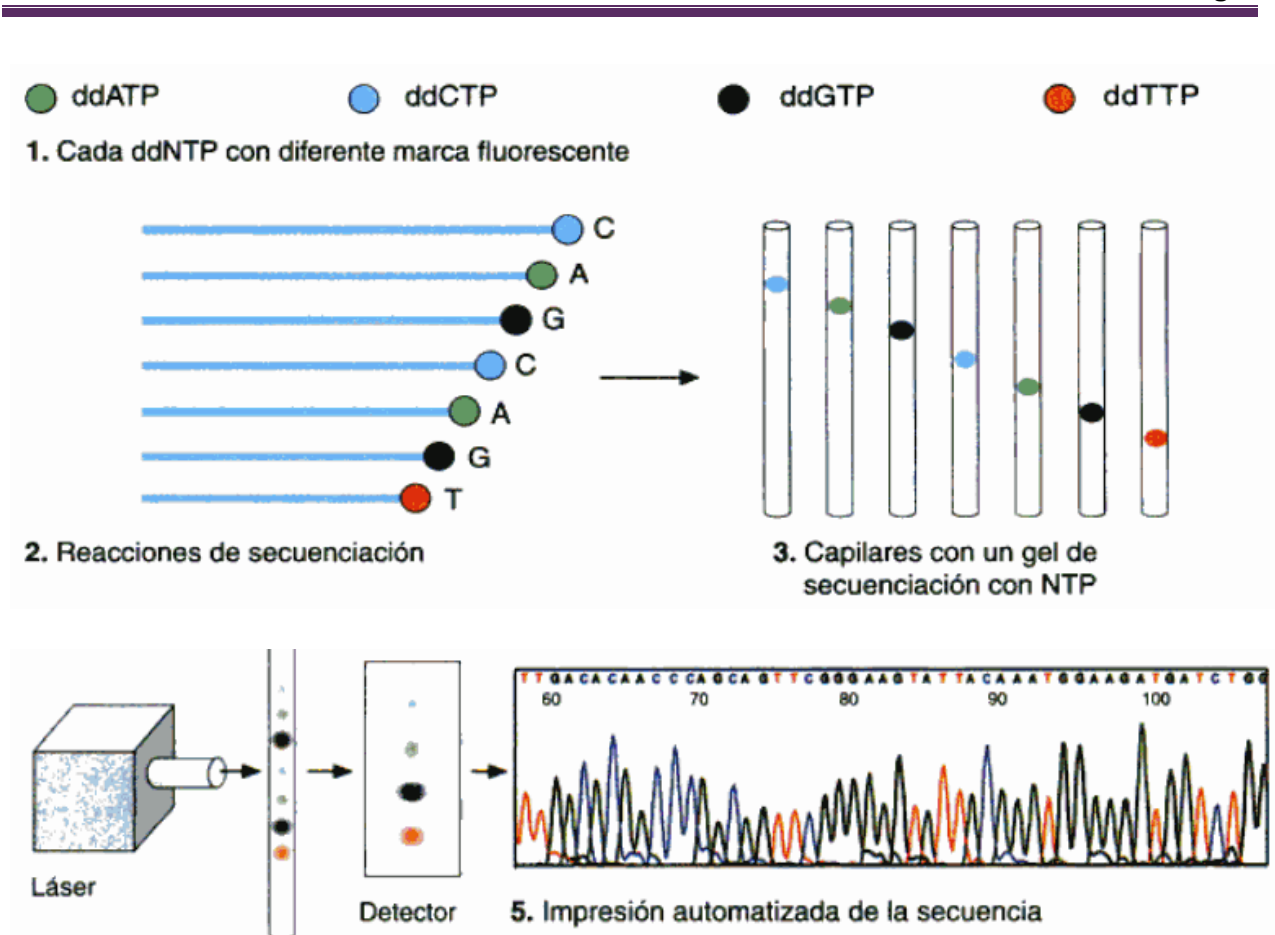


Figura 26. Electroforesis capilar de la secuenciación automatizada (Tomado de: Passarge, 2009).

Para llevar a cabo la técnica de secuenciación usada en la identificación del polimorfismo *G2677T/A* se emplearon los dos procedimientos que se muestran en los diagramas 5 y 6 para realizar la purificación de la reacción de PCR. El primero de ellos es un kit comercial de purificación (Kit Wizard® Promega) y el segundo es un método implementado en el laboratorio por dos alumnos, el cual resultó de manera favorable y a un menor costo que el kit comercial.

Purificación mediante el Kit Wizard® Promega.

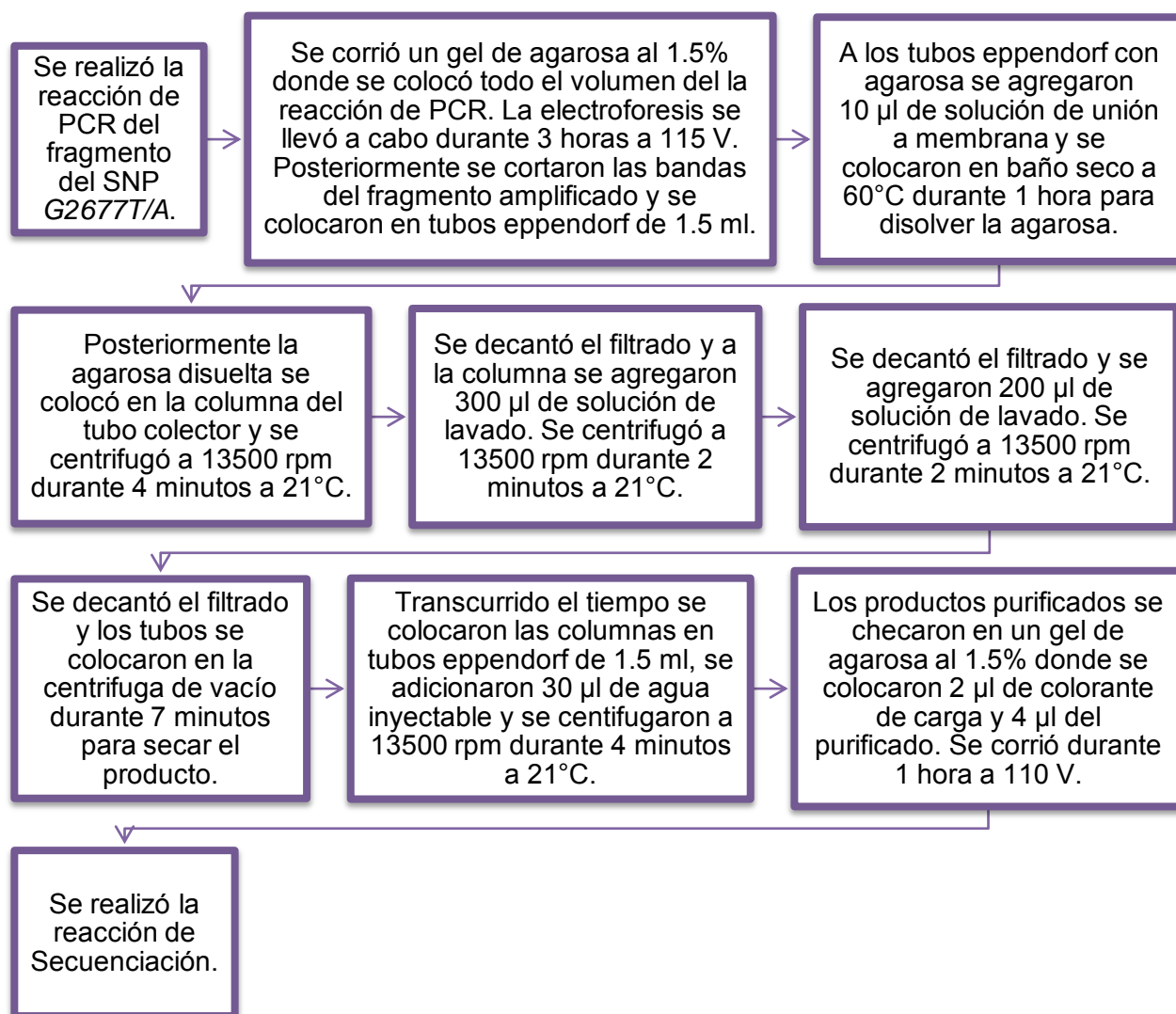


Diagrama 5. Metodología para la purificación del fragmento amplificado del SNP G2677T/A mediante el Kit Wizard® Promega.

■ Purificación mediante puntas para micropipeta con filtro estériles.

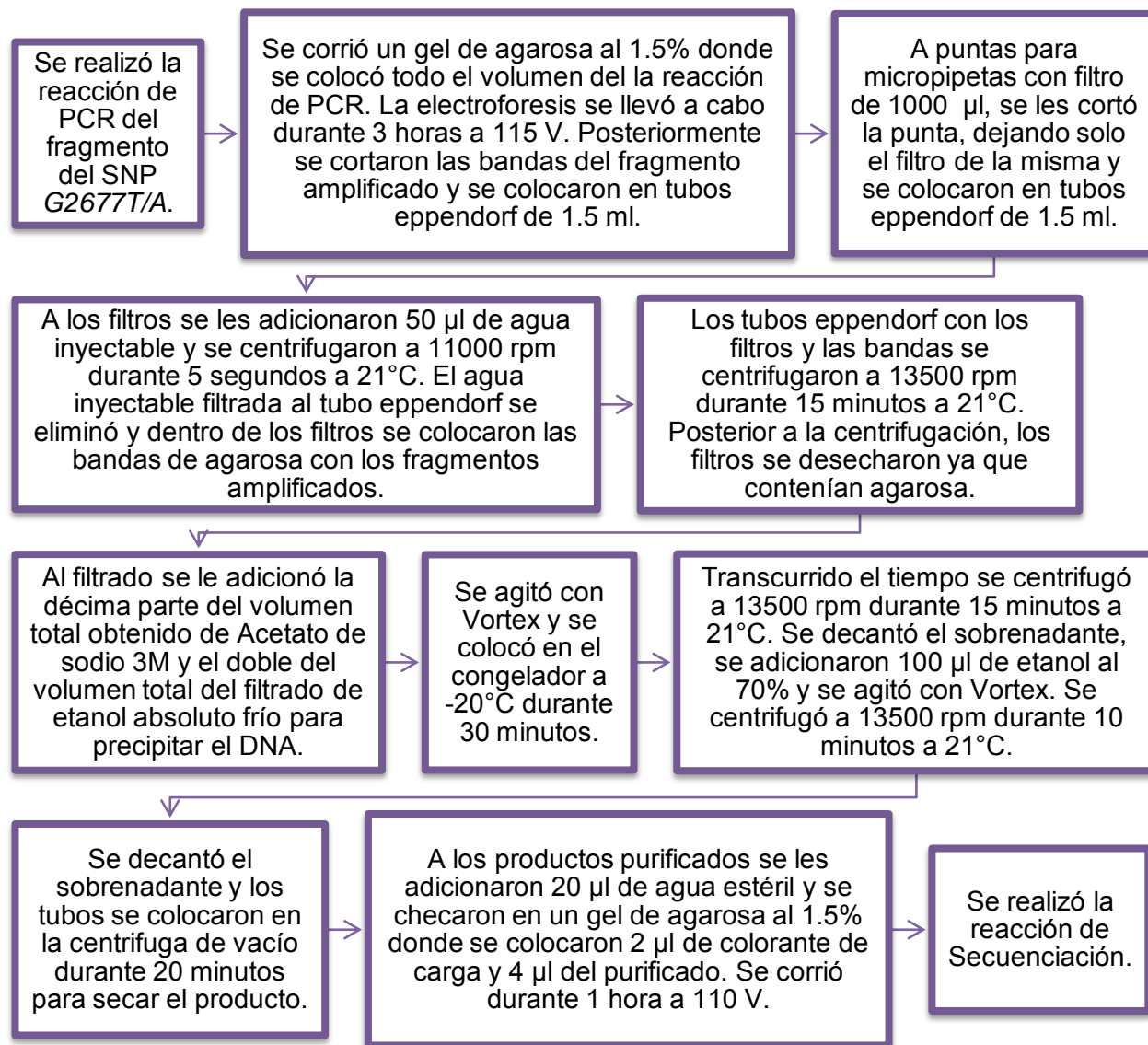


Diagrama 6. Metodología para la purificación del fragmento amplificado del SNP G2677T/A mediante filtros de puntas para micropipetas.

Una vez que se llevó a cabo la purificación de la reacción de PCR, se realizó la reacción de secuenciación. Las condiciones de esta reacción se muestran en la tabla 13 y la metodología para elaborarla se muestran en el diagrama 7.

Tabla 13. Condiciones de la reacción de secuenciación para el polimorfismo *G2677T/A*.

SNP	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
G2677T/A	Desnaturalización Inicial	96	30 segundos	25
	Desnaturalización	95	30 segundos	
	Alineamiento	50	10 segundos	
	Extensión	60	4 minutos	
	Extensión final	72	1 minuto	

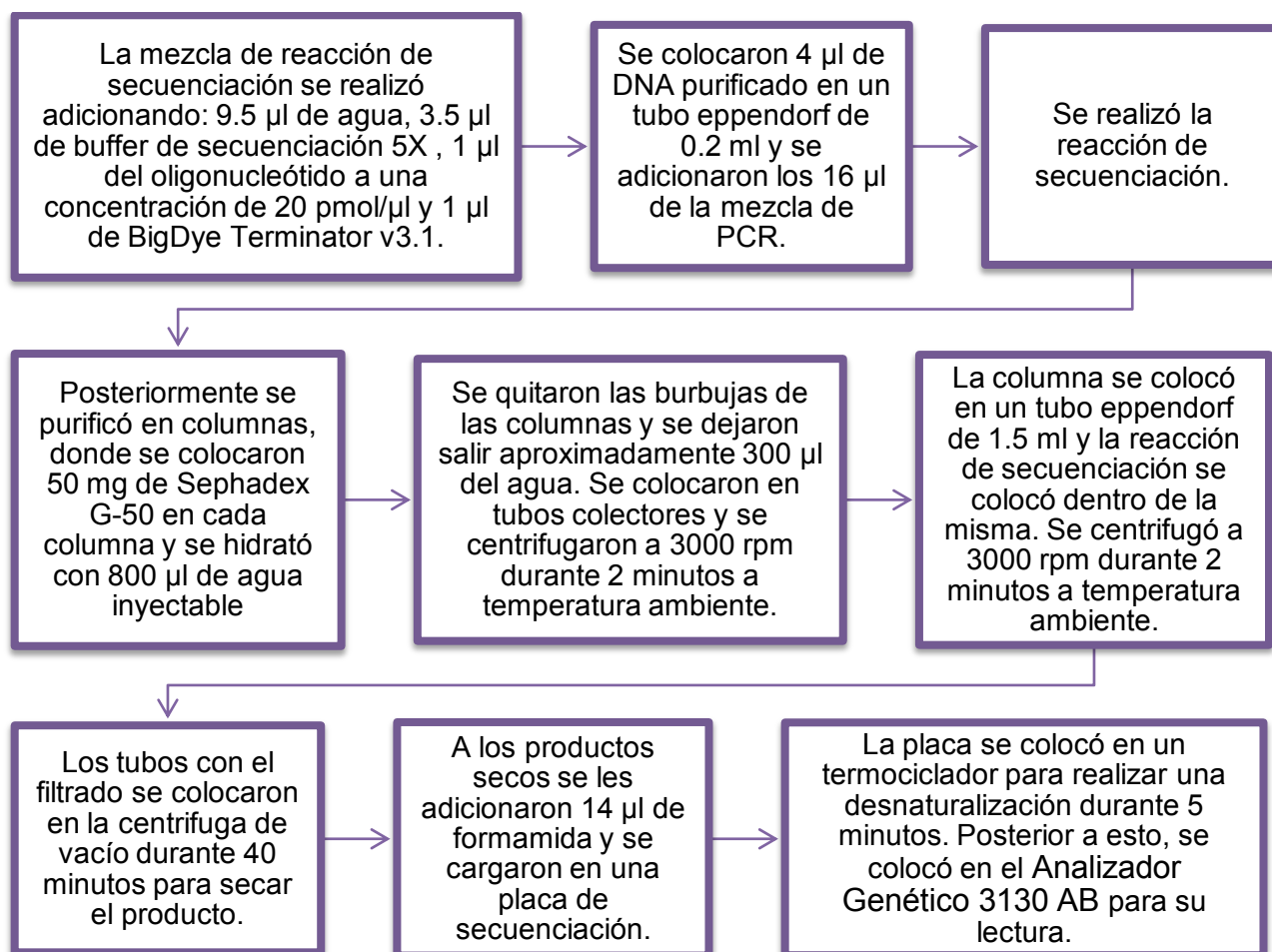


Diagrama 7. Metodología para la reacción de secuenciación y su purificación en columnas.

5.9.1 Análisis de Electroferogramas

Para poder realizar el análisis de los electroferogramas se empleó el programa *Sequencing Analysis 5.3*. El polimorfismo *G2677T/A* se localizó primero en la base de datos bioinformática <http://www.ensembl.org> para empatarla con el electroferograma y de este modo se determinó el cambio de base.

5.10 Análisis Estadístico

Una vez obtenidos los resultados de los genotipos de los tres polimorfismos, se determinó:

- El equilibrio Hardy-Weinberg para pacientes con EM, NO y controles.
- La frecuencia genotípica, alélica y por haplotipos para cada SNP, en los tres grupos estudiados.
- Análisis de asociación de los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* con la Esclerosis Múltiple y la Neuritis Óptica, con un nivel de confianza al 95%. En los casos donde el número de sujetos sea menor a 5, se tomará en cuenta el valor de la prueba exacta de Fisher (tablas de 2x2).
- Se realizó la comparación de las frecuencias alélicas con otras poblaciones.

Para realizar el análisis de asociación se empleó el software OpenEpi versión 3.03:

http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm

En el caso del análisis por haplotipos se empleó la herramienta SNPStats:

<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de integridad de DNA

En la figura 27 se muestra un gel representativo de las electroforesis de DNA realizadas tanto en casos como en controles para observar su integridad.

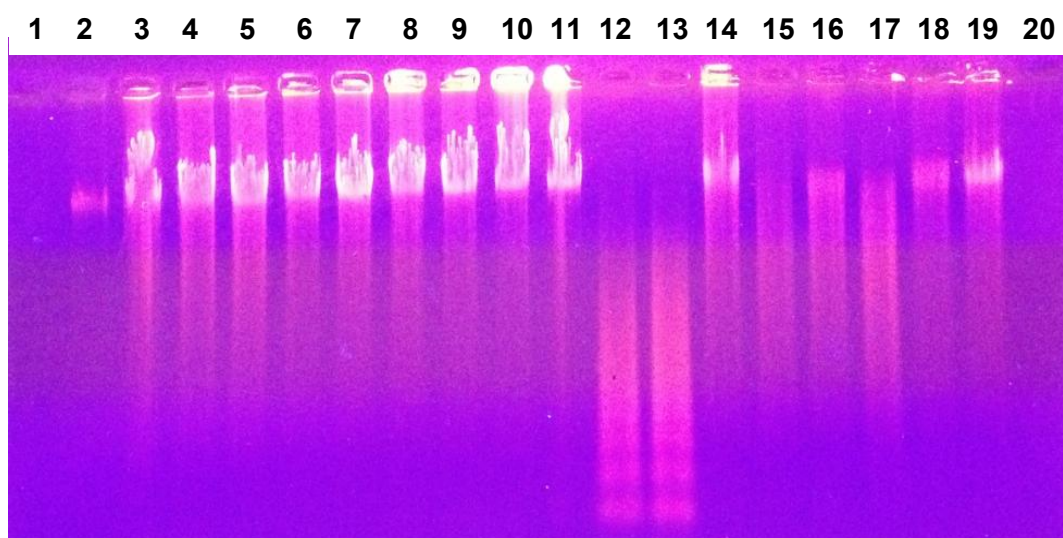


Figura 27. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, donde se verificó la integridad del DNA. En el carril 2 se observa DNA íntegro y en los demás carriles se observa DNA degradado. La intensidad de las bandas está directamente relacionada con la cantidad de DNA presente en las muestras.

6.2 Reacción de PCR

En la siguiente figura (28) se muestra una fotografía de un gel de agarosa con muestras representativas de DNA amplificado para el polimorfismo *C3435T*.

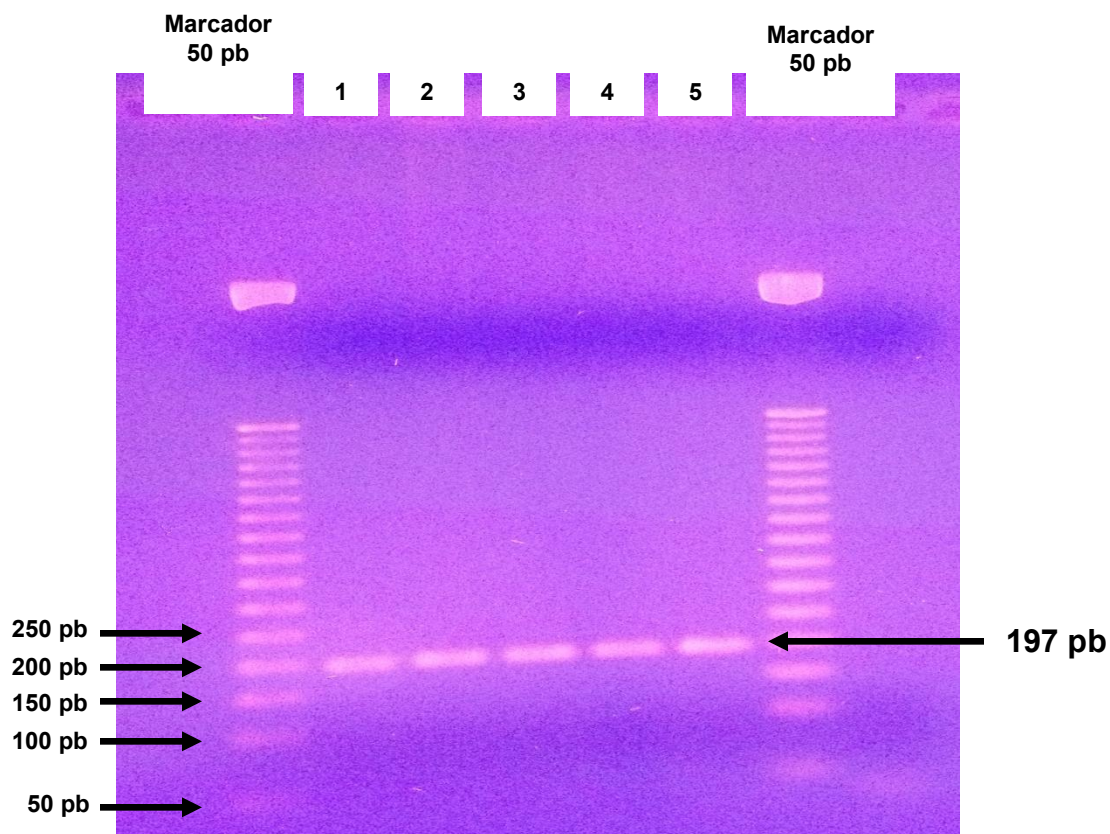


Figura 28. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observan 5 muestras del fragmento amplificado de 197 pb del polimorfismo *C3435T*. En ambos extremos del gel se colocó un marcador de peso molecular de 50 pb.

6.3 RFLP

En la figura 29 se observa un gel de poliacrilamida donde se muestran los tres posibles genotipos del polimorfismo *C1236T*.

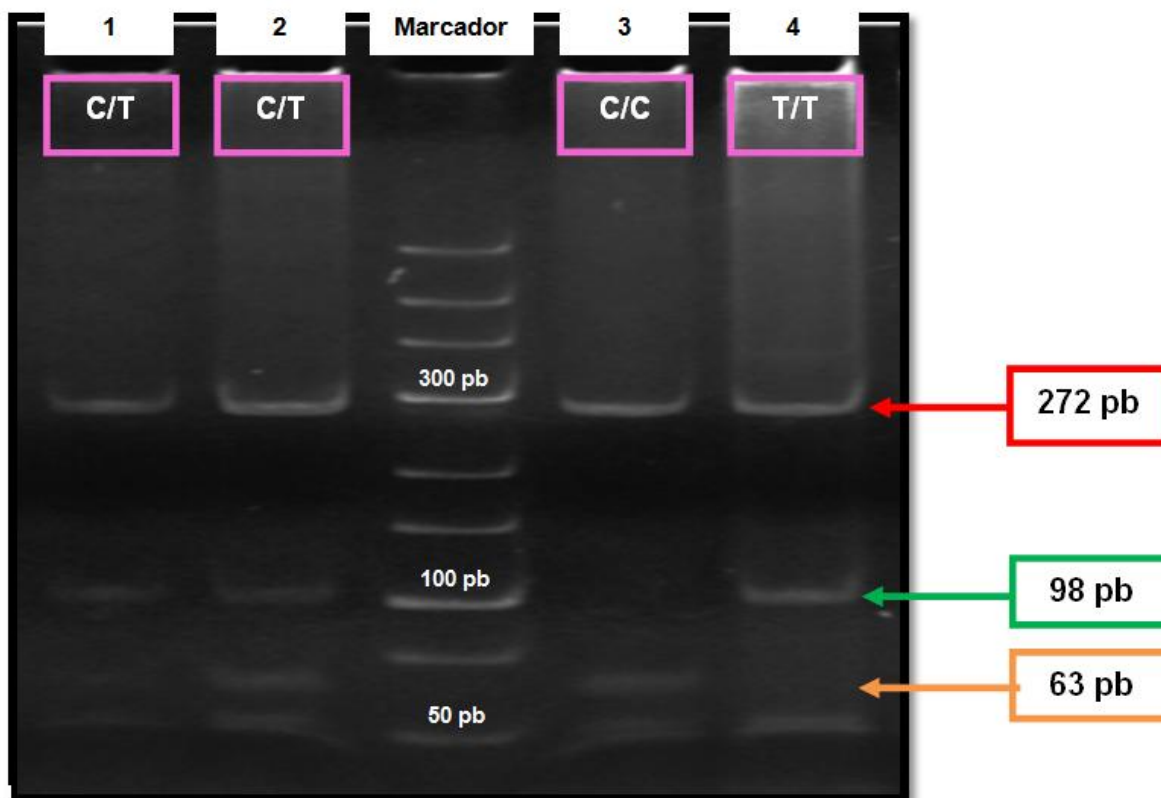


Figura 29. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1 y 2 se observan dos muestras con genotipo heterocigoto (C/T), en el carril 3 se observa una muestra homocigota C/C y en el carril 4 una muestra homocigota T/T.

A continuación se muestra un gel de poliacrilamida al 10% con los tres posibles genotipos del polimorfismo *C3435T* obtenidos con la enzima *Mbo I* (Figura 30).

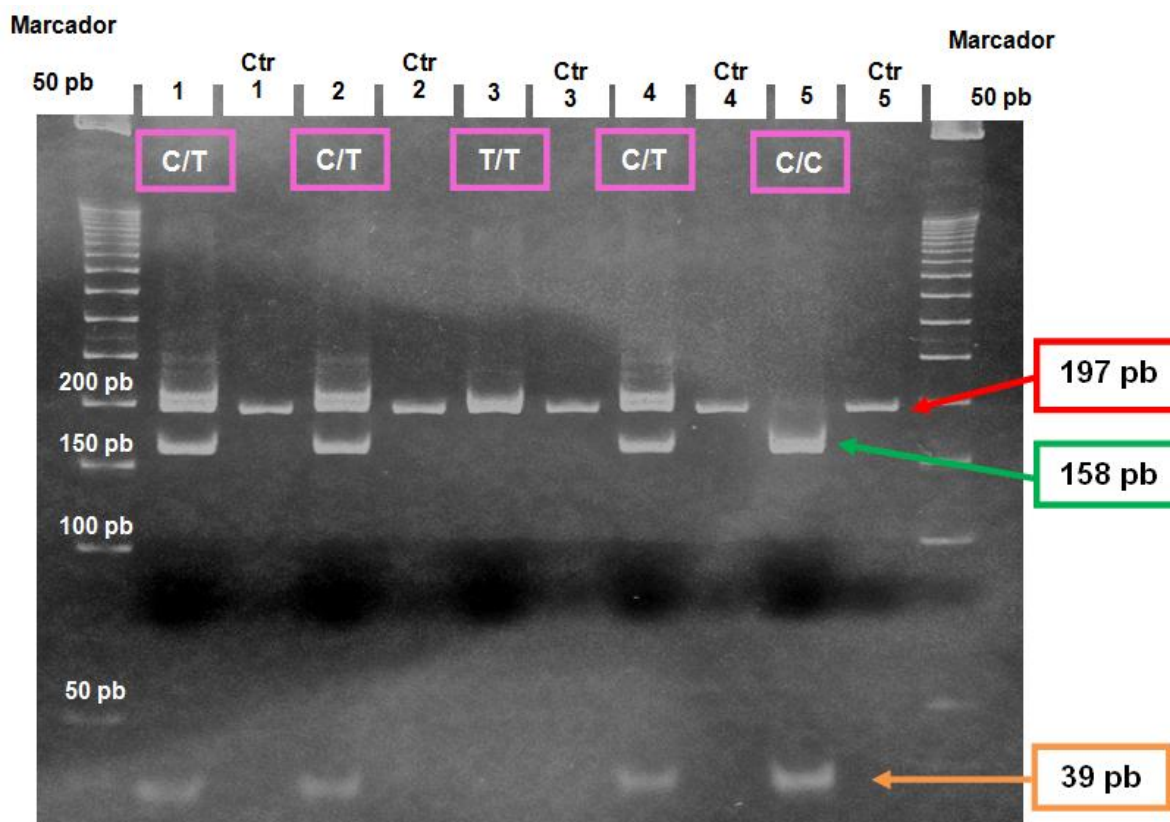


Figura 30. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1, 2 y 4 se observan tres muestras con genotipo heterocigoto (C/T), en el carril 3 una muestra homocigota (T/T) y en el carril 5 una muestra homocigota (C/C). Cada muestra cuenta con su control (Ctr), que es la misma muestra sin digerir.

6.4 Análisis de Secuencias

En el SNP *G2677T/A* el cambio de base de G por T o A, genera 6 posibles genotipos: G/G, T/T, A/A, G/T, G/A y T/A (Figura 31).

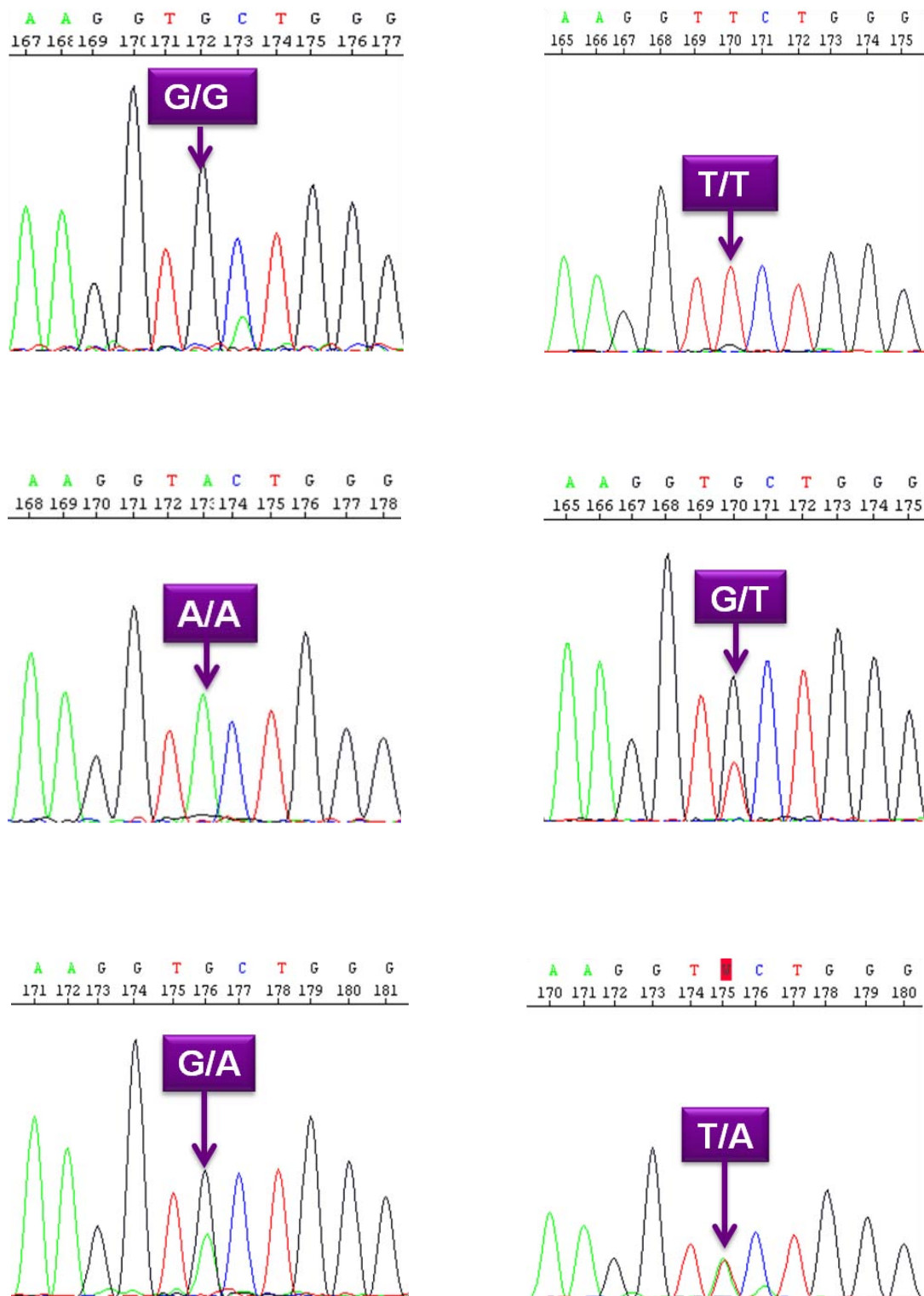


Figura 31. Electroferogramas de distintas muestras donde se observan los 6 posibles genotipos del polimorfismo G2677T/A.

6.5 Frecuencias genotípicas y alélicas

Una vez que se obtuvieron los resultados de los tres polimorfismos, se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas para cada uno (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*.

Variable		EM	NO	Controles
<i>C1236T</i>				
Genotípicas	C/C	30 (19.4 %)	23 (20.7 %)	36 (18.0 %)
	C/T	75 (48.4 %)	50 (45.0 %)	89 (44.5 %)
	T/T	50 (32.3 %)	38 (34.2 %)	75 (37.5 %)
Total		155	111	200
Alélicas	C	135 (43.5 %)	96 (43.2 %)	161 (40.3 %)
	T	175 (56.5 %)	126 (56.8 %)	239 (59.8 %)
<i>G2677T/A</i>				
Genotípicas	G/G	40 (25.8 %)	29 (26.1 %)	44 (22.0 %)
	T/T	27 (17.4 %)	17 (15.3 %)	46 (23.0 %)
	A/A	0 (0 %)	1 (0.9 %)	0 (0 %)
	G/T	76 (49.0 %)	57 (51.3 %)	86 (43.0 %)
	G/A	7 (4.5 %)	5 (4.5 %)	13 (6.5 %)
	T/A	5 (3.2 %)	2 (1.8 %)	11 (5.5 %)
Total		155	111	200
Alélicas	G	163 (52.5 %)	120 (54.0 %)	187 (46.7 %)
	T	135 (43.5 %)	93 (41.8 %)	189 (47.2 %)
	A	12 (3.8 %)	9 (4.0 %)	24 (6.0 %)
<i>C3435T</i>				
Genotípicas	C/C	41 (26.5 %)	33 (29.7 %)	39 (19.5 %)
	C/T	78 (50.3 %)	48 (43.2 %)	112 (56.0 %)
	T/T	36 (23.2 %)	30 (27.0 %)	49 (24.5 %)
Total		155	111	200
Alélicas	C	160 (51.6 %)	114 (51.4 %)	190 (47.5 %)
	T	150 (48.4 %)	108 (48.6 %)	210 (52.5 %)

■ Muestras de pacientes con Esclerosis Múltiple

En la tabla 15 se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas de los 3 polimorfismos, tomando en cuenta los 4 grupos de diagnóstico de EM.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* en los 4 grupos de diagnóstico de muestras de pacientes de EM.

	Variable	EM y EM/NO	EMBR y EMRR	MT	EMSP
C1236T					
Genotípicas	C/C	21 (21.0 %)	4 (16.0 %)	3 (17.6 %)	1 (10.0 %)
	C/T	43 (43.0 %)	14 (56.0 %)	12 (70.6 %)	5 (50.0 %)
	T/T	36 (36.0 %)	7 (28.0 %)	2 (11.8 %)	4 (40.0 %)
Total		100	25	17	10
Alélicas	C	85 (42.5 %)	22 (44.0 %)	18 (52.9 %)	7 (35.0 %)
	T	115 (57.5 %)	28 (56.0 %)	16 (47.1 %)	13 (65.0 %)
G2677T/A					
Genotípicas	G/G	27 (27.0 %)	5 (20.0 %)	4 (23.5 %)	2 (20.0 %)
	T/T	16 (16.0 %)	7 (28.0 %)	2 (11.7 %)	2 (20.0 %)
	A/A	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	G/T	48 (48.0 %)	12 (48.0 %)	10 (58.8 %)	5 (50.0 %)
	G/A	4 (4.0 %)	1 (4.0 %)	1 (5.8 %)	1 (10.0 %)
	T/A	5 (5.0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Total		100	25	17	10
Alélicas	G	106 (53.0 %)	23 (46.0 %)	19 (55.8 %)	10 (50.0 %)
	T	85 (42.5 %)	26 (52.0 %)	14 (41.1 %)	9 (45.0 %)
	A	9 (4.5 %)	1 (2.0 %)	1 (2.9 %)	1 (5.0 %)
C3435T					
Genotípicas	C/C	28 (28.0 %)	4 (16.0 %)	5 (29.4 %)	3 (30.0 %)
	C/T	45 (45.0 %)	16 (64.0 %)	10 (58.8 %)	5 (50.0 %)
	T/T	27 (27.0 %)	5 (20.0 %)	2 (11.8 %)	2 (20.0 %)
Total		100	25	17	10
Alélicas	C	101 (50.5 %)	24 (48.0 %)	20 (58.8 %)	11 (55.0 %)
	T	99 (49.5 %)	26 (52.0 %)	14 (41.2 %)	9 (45.0 %)

■ Muestras de pacientes con Neuritis Óptica

A continuación se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas de los 3 polimorfismos, tomando en cuenta los 2 grupos de diagnóstico de NO (Tabla 16).

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* en los 2 grupos de diagnóstico de muestras de pacientes de NO.

Variable		NO	NMO
<i>C1236T</i>			
Genotípicas	C/C	16 (21.1 %)	7 (20.0 %)
	C/T	35 (46.1 %)	15 (42.9 %)
	T/T	25 (32.9 %)	13 (37.1 %)
Total		76	35
Alélicas	C	67 (44.1 %)	29 (41.4 %)
	T	85 (55.9 %)	41 (58.6 %)
<i>G2677T/A</i>			
Genotípicas	G/G	17 (22.3 %)	12 (34.28 %)
	T/T	10 (13.1 %)	7 (20.0 %)
	A/A	1 (1.3 %)	0 (0 %)
	G/T	42 (55.2 %)	15 (42.8 %)
	G/A	5 (6.5 %)	0 (0 %)
	T/A	1 (1.3 %)	1 (2.8 %)
Total		76	35
Alélicas	G	81 (53.2 %)	39 (55.7 %)
	T	63 (41.4 %)	30 (42.8 %)
	A	8 (5.2 %)	1 (1.4 %)
<i>C3435T</i>			
Genotípicas	C/C	23 (30.3 %)	10 (28.6 %)
	C/T	32 (42.1 %)	16 (45.7 %)
	T/T	21 (27.6 %)	9 (25.7 %)
Total		76	35
Alélicas	C	78 (51.3 %)	36 (51.4 %)
	T	74 (48.7 %)	34 (48.6 %)

6.6 Análisis Estadístico

En la tabla 17 se presenta el análisis estadístico con las frecuencias genotípicas y alélicas, tanto de los grupos generales como de los subgrupos de EM y NO.

Tabla 17. Análisis de asociación de los SNPs del gen *ABCB1* en individuos mexicanos.

	Variable	n	Frec.	OR	IC 95%	P
EM	Pacientes MT C/T para C1236T (n=17)	12	70.6 %	2.979	1.03 - 9.71	0.02183
	Controles C/T para C1236T (n=200)	89	44.5 %			
	Pacientes MT T/T para C1236T (n=17)	2	11.8 %	0.2234	0.03 - 0.88	0.01497
	Controles T/T para C1236T (n=200)	75	37.5 %			
	Pacientes EM C/T para C3435T (n=100)	45	45.0 %	0.6438	0.39 - 1.04	0.03712
	Controles C/T para C3435T (n=200)	112	56.0 %			
NO	Pacientes NO General C/C para C3435T (n=111)	33	29.7 %	1.743	1.01 - 2.98	0.02207
	Controles C/C para C3435T (n=200)	39	19.5 %			
	Pacientes NO General C/T para C3435T (n=111)	48	43.2 %	0.5996	0.37 - 0.95	0.01605
	Controles C/T para C3435T (n=200)	112	56.0 %			
	Pacientes NO C/T para C3435T (n=76)	32	42.1 %	0.5726	0.33 - 0.97	0.02033
	Controles C/T para C3435T (n=200)	112	56.0 %			
	Pacientes NO C/C para C3435T (n=76)	23	30.3 %	1.787	0.96 - 3.26	0.03121
	Controles C/C para C3435T (n=200)	39	19.5 %			
	Pacientes NO General Alelo G G2677T/A (n=222)	120	54.0 %	1.339	0.96 - 1.86	0.04094
	Controles Alelo G para G2677T/A (n=400)	187	46.7 %			
	Pacientes NO T/T para G2677T/A (n=76)	10	13.1 %	0.5084	0.23 - 1.04	0.03349
	Controles T/T para G2677T/A (n=200)	46	23.0 %			
Pacientes NO G/T para G2677T/A (n=76)	42	55.2 %	1.635	0.95 - 2.79	0.03533	
Controles G/T para G2677T/A (n=200)	86	43.0 %				

6.7 Análisis por haplotipos

Se realizó mediante la herramienta bioinformática SNPstats; en las tablas 18 y 19 se presentan las frecuencias de los haplotipos resultantes en casos de EM, NO y controles.

Tabla 18. Haplotipos de los SNPs del gen *ABCB1* en casos de EM e individuos normales.

	<i>C1236T</i>	<i>G2677T/A</i>	<i>C3435T</i>	Total	Casos EM	Controles	Cumulative frequency
1	T	T	T	0.391	0.3965	0.3857	0.391
2	C	G	C	0.2936	0.3346	0.2612	0.6845
3	T	G	C	0.112	0.1233	0.1014	0.7965
4	C	G	T	0.0649	0.0579	0.0716	0.8614
5	T	T	C	0.054	0.0315	0.0729	0.9155
6	C	A	C	0.0255	0.0267	0.0212	0.941
7	T	G	T	0.0225	0.01	0.0333	0.9635
8	C	A	T	0.0216	0.0088	0.0345	0.9851
9	C	T	C	0.0058	0	0.014	0.9909
10	C	T	T	0.0055	0.0075	0	0.9964
11	T	A	C	0.002	0	0.0043	0.9984
12	T	A	T	0.0016	0.0032	NA	1

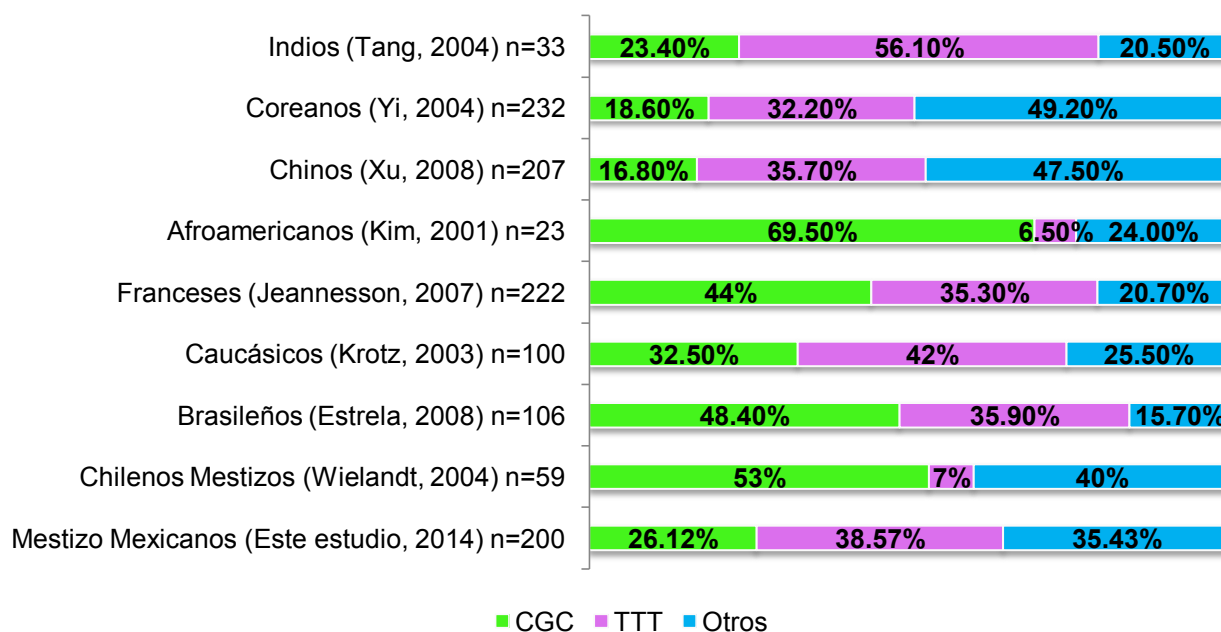
Tabla 19. Haplotipos de los SNPs del gen *ABCB1* en casos de NO e individuos normales.

	<i>C1236T</i>	<i>G2677T/A</i>	<i>C3435T</i>	Total	Casos NO	Controles	Cumulative frequency
1	T	T	T	0.374	0.3515	0.3857	0.374
2	C	G	C	0.275	0.299	0.2612	0.649
3	T	G	C	0.108	0.1195	0.1014	0.7569
4	C	G	T	0.0744	0.0804	0.0716	0.8314
5	T	T	C	0.0644	0.0503	0.0729	0.8957
6	T	G	T	0.0362	0.0416	0.0333	0.9319
7	C	A	C	0.0262	0.0293	0.0212	0.9581
8	C	A	T	0.0226	0.0065	0.0345	0.9807
9	C	T	C	0.011	0.0107	0.014	0.9918
10	T	A	C	0.0043	0.0047	0.0043	0.996
11	C	T	T	0.004	0.0065	0	1

Tabla 20. Análisis de asociación por haplotipos de casos y controles en pacientes con EM.

	C1236T	G2677T/A	C3435T	Freq	OR (95% CI)	P-value
1	T	T	T	0.3907	1	---
2	C	G	C	0.2943	0.78 (0.54 - 1.14)	0.2
3	T	G	C	0.1116	0.85 (0.50 - 1.45)	0.56
4	C	G	T	0.0642	1.09 (0.55 - 2.14)	0.81
5	T	T	C	0.0542	2.28 (1.00 - 5.20)	0.05
6	C	A	C	0.0248	0.97 (0.33 - 2.82)	0.95
7	T	G	T	0.0229	3.55 (0.80 - 15.78)	0.097
8	C	A	T	0.0223	4.09 (0.98 - 17.08)	0.054
rare	*	*	*	0.015	1.37 (0.32 - 5.93)	0.67

En el análisis por haplotipos de los diferentes subtipos clínicos de EM y NO solo se obtuvieron resultados con tendencia a ser significativos en pacientes con EM y el haplotipo TTC.

Gráfica 2. Frecuencias de los haplotipos formados por los tres SNPs del gen *ABCB1* en distintas poblaciones del mundo (Tomado de: Fung, 2009).

7. DISCUSIÓN

El estudio de los polimorfismos del gen *ABCB1* se ha realizado en distintas poblaciones y se ha relacionado con enfermedades inflamatorias y cáncer en diferentes tejidos. Los tres SNPs más estudiados son: *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* y se sabe que se encuentran en desequilibrio de ligamiento (Ambudkar y col., 2003); debido a esto, se han estudiado en conjunto. En nuestro país, existen muy pocos estudios donde se involucren estos tres SNPs y no se han realizado estudios relacionados con Esclerosis múltiple o Neuritis óptica que implique una asociación de estos polimorfismos con la respuesta al tratamiento farmacológico. En este estudio se determinó si existe asociación entre los polimorfismos del gen *ABCB1* y las enfermedades desmielinizantes antes mencionadas, con la finalidad de poder realizar posteriores estudios con relación a la respuesta al tratamiento farmacológico, la edad de inicio y la severidad de la enfermedad.

Previo al establecimiento de alguna asociación entre casos y controles, se debe conocer la frecuencia normal o de referencia de los polimorfismos del gen *ABCB1* y compararla con la reportada para otras poblaciones, así que en la tabla 21 se presentan las frecuencias alélicas de los tres polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* en la muestra de población sana de este estudio y se comparan con las frecuencias alélicas de poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas.

Tabla 21. Comparación de las frecuencias alélicas de los SNPs *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* en distintas poblaciones del mundo y población mestizo mexicana.

Población	n	<i>C1236T</i> (exón 12)		<i>G2677T/A</i> (exón 21)			<i>C3435T</i> (exón 26)		Referencia
		C	T	G	T	A	C	T	
Caucásicos									
Italia	106	N.D.	N.D.	0.56	0.41	0.03	0.54	0.46	Furuno, 2002
Alemania	67	0.66	0.34	0.56	0.40	0.04	0.49	0.51	Siegmund, 2002
Rusia	290	N.D.	N.D.	0.55	0.42	0.03	0.46	0.54	Gaikovitch, 2003
Reino Unido	190	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.48	0.52	Ameyaw, 2001

Nueva Zelanda	160	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.47	0.53	Roberts, 2002
Portugal	100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.43	0.57	Ameyaw, 2001
España	408	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.52	0.48	Bernal, 2003
Estados Unidos	37	0.58	0.42	0.54	0.46	N.D.	0.46	0.54	Kim, 2001
Asiáticos									
Japón	117	N.D.	N.D.	0.44	0.36	0.20	0.62	0.38	Horinouchi, 2002
China	104	0.31	0.69	0.50	0.44	0.06	0.60	0.40	Tang, 2002
India	87	0.33	0.67	0.33	0.60	0.07	0.37	0.63	Chowbay, 2003
Malasia	93	0.31	0.69	0.58	0.36	0.06	0.63	0.37	Tang, 2002
Africanos									
Kenia	80	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.83	0.17	Ameyaw, 2001
Afroamericanos	23	0.85	0.15	0.85	0.15	N.D.	0.74	0.26	Kim, 2001
Mestizo Mexicana	200	0.40	0.60	0.50	0.45	0.05	0.47	0.53	Éste estudio

(Tomado de: Marzolini y col., 2004)

En el caso del polimorfismo *C1236T* el alelo T (0.60) se encuentra con mayor frecuencia que el alelo C (0.40) en la población mestizo mexicana. Las frecuencias alélicas para este polimorfismo son similares a las reportadas por Chowbay y colaboradores en población Hindú ($P>0.05$) y diferentes a las reportadas para poblaciones de China, Malasia, Alemania, Estados Unidos y los Afroamericanos ($P<0.05$).

El alelo *G2677* tuvo una frecuencia del 50% en la muestra analizada de la población mexicana que difiere de las frecuencias reportadas en poblaciones de Italia, Rusia, Malasia, India y los Africanos americanos ($P<0.05$). Por el contrario, la frecuencia en mexicanos es similar a las de las poblaciones de Alemania, Estados Unidos, Japón y China ($P>0.05$). Aunque las frecuencias alélicas entre Italia, Alemania y Rusia prácticamente son las mismas, el tamaño de muestra en población alemana es demasiado pequeño y no permite establecer una diferencia estadística.

Por otro lado, el alelo *T2677* está presente en el 45% de la muestra de mestizos mexicanos analizada, similar a lo que ocurre en poblaciones caucásicas, así como en China ($P>0.05$). A diferencia de lo reportado en poblaciones de Japón, Malasia, India y los Africanos americanos, donde las frecuencias para este alelo son diferentes

($P < 0.05$). Por su parte, el alelo *A2677* en mestizos mexicanos tuvo un valor de frecuencia diferente a lo reportado en poblaciones de Rusia y Japón ($P < 0.05$). La frecuencia en mexicanos resultó similar a la de India, China, Malasia, Italia y Alemania ($P > 0.05$). Para el polimorfismo *C3435T*, la frecuencia de la variante alélica T fue significativamente mayor a la reportada en poblaciones de Japón, China, Malasia y de origen africano; significativamente menor que la población Hindú ($P < 0.05$) y similar a la de poblaciones caucásicas ($P > 0.05$).

La comparación de estas frecuencias con las de otras poblaciones aporta evidencia de que el fondo genético de la población mestizo mexicana está constituida por genes caucásicos y amerindios, básicamente, siendo estos últimos una mezcla de genes asiáticos y genes indígenas. En la muestra analizada predomina la similitud entre las frecuencias alélicas de los tres polimorfismos con poblaciones caucásicas y asiáticas.

En este estudio, las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs *C1236T* y *C3435T*, se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Por su parte, el polimorfismo *G2677T/A* no está en equilibrio Hardy-Weinberg, debido a que el tamaño de la muestra de población es pequeño, lo que causa un cambio aleatorio en las frecuencias genotípicas.

En el análisis de asociación entre casos y controles (tabla 17), de manera general, en pacientes con EM no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de genotipos y alelos de los tres SNPs. Cuando analizamos las frecuencias genotípicas y alélicas en casos con NO en general, encontramos lo siguiente. El polimorfismo *C1236T* no es distinto entre pacientes y controles. El alelo G del polimorfismo *G2677T/A* es ligeramente mayor en casos que en controles (54% vs. 46.7%), observando tendencia a ser significativo. Mientras que para el polimorfismo *C3435T* sí existen diferencias estadísticamente significativas entre los casos de NO en general heterocigotos C/T (43.2% vs. 56%; $P < 0.05$) y homocigotos C/C (29.7% vs 19.5%; $P < 0.05$), respecto a controles. La presencia de un genotipo homocigoto C/C, se puede considerar como un factor de susceptibilidad para la NO; mientras que el genotipo C/T es un factor protector para la misma.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de un genotipo CC aumenta la capacidad de transporte de la P-gp (Lehne, 2007). Esta glicoproteína está presente en células del sistema inmunológico como los linfocitos T que ingresan al SNC cuando la mielina es destruida; generando una respuesta proinflamatoria (TH1) observada en estas enfermedades desmielinizantes. De tal forma que, el genotipo C/C podría estar implicado en la NO, debido al aumento del transporte de proteínas proinflamatorias como la IL-2 y el IFN- γ ; que activan a los macrófagos que fagocitan la mielina (Moreno y col., 2012). En el caso de los genotipos C/T y T/T la capacidad de transporte se ve disminuida y el paso de estas proteínas proinflamatorias se ve limitado. La inflamación producida afecta a la BHE, ocasionando la permeabilidad de la misma. Tanto el SNP *C1236T* como el *C3435T* se encuentran en regiones intracelulares de la proteína cerca de aminoácidos esenciales donde se lleva a cabo la hidrólisis de ATP, lo cual disminuye el transporte de sustratos (Fung y Gottesman, 2009). De este modo se podría decir que, la presencia del alelo C en ambos polimorfismos influye en el aumento del transporte de proteínas proinflamatorias, convirtiéndose en factor de susceptibilidad para estas enfermedades desmielinizantes.

Cabe mencionar que se realizó el mismo análisis de asociación por género y no se encontraron diferencias estadísticas, aunque la proporción de sujetos enfermos sea de tres mujeres por un hombre afectado.

También se analizó la asociación entre casos y controles en los distintos subtipos clínicos de estas dos enfermedades desmielinizantes. En los pacientes con EM, las frecuencias genotípicas y alélicas se comportan de diferente manera entre los subtipos clínicos. El polimorfismo *C1236T* se encontró asociado a la mielitis transversa como factor de susceptibilidad en los casos con genotipo heterocigoto C/T (OR= 2.98, P= 0.022), mientras que el genotipo homocigoto T/T está asociado como factor de protección (OR= 0.22, P= 0.015). Nuevamente se observa el efecto protector de la timina, pero a diferencia de la neuritis óptica, la protección se presenta con el alelo T en estado homocigoto en la mielitis transversa y basta la ausencia de una timina, en el caso de los heterocigotos, para que esté presente la susceptibilidad.

Sin embargo, el tamaño de la muestra es muy pequeño (17 pacientes) por lo que se debe ampliar este subgrupo de estudio y comprobar si se mantiene la asociación.

Por otro lado, en los subtipos de EM idiopática, EMBR, EMRR y EMSP las frecuencias son similares y no se encontraron diferencias estadísticas. El polimorfismo *G2677T/A* presentó frecuencias similares entre los subtipos de EM, donde no hubo presencia de sujetos homocigotos *A/A*; solo se encontró una muestra con éste genotipo en un paciente con NO. Respecto al polimorfismo *C3435T*, las frecuencias de genotipos y alelos son semejantes entre los grupos, pero la frecuencia de casos EM heterocigotos *C/T* es ligeramente menor en pacientes que en controles (45% vs. 56%) con tendencia a ser significativo. Si se aumenta el tamaño de la muestra, es probable que existan diferencias estadísticamente significativas.

Por otra parte, una de las tres muestras que no pertenecían a ninguno de los 4 subtipos de EM analizados contaba con genotipos heterocigotos para los tres polimorfismos y diagnóstico de EMPP (esclerosis múltiple primaria progresiva). Las otras dos muestras contaban con los siguientes genotipos 1236/2677/3435: *CC/GG/CT*, para la muestra con diagnósticos de EMDA (encefalomielitis diseminada aguda) y *TT/GG/CC* para la muestra EMPR (esclerosis múltiple progresiva recurrente). Se tiene que ampliar el tamaño de la muestra de estos grupos para poder determinar si la presencia del alelo C en los SNPs *C1236T* y *C3435T* puede ser un factor de susceptibilidad como en la mielitis transversa.

En los portadores de genotipos *G/T* y *T/T2677* de pacientes con un diagnóstico NO general, se observan diferencias entre frecuencias respecto a controles pero que no son estadísticamente significativas. Respecto al subtipo NMO, no hubo ninguna diferencia estadística en las frecuencias genotípicas y alélicas entre casos y controles, pero hay que recordar que la muestra fue pequeña. Además, ahora se sabe que la NMO es un trastorno autoinmune y desmielinizante que semeja a la EM, pero que presenta importantes diferencias inmunopatológicas, clínicas, de pronóstico y respuesta al tratamiento, en comparación con la EM.

Sin embargo, las opciones actuales de tratamiento para la NMO aún distan de ser las ideales (Chiquete y col., 2010).

Nuestros resultados sugieren que existe variabilidad considerable en la muestra de estudio. Es decir, la heterogeneidad genética derivada de estos SNPs puede ser condicionante en la eficacia y disposición de los fármacos empleados en estas enfermedades. Lehne y colaboradores en 2007 observaron que esta heterogeneidad puede disminuir la capacidad de transporte de la glicoproteína P, dependiendo del genotipo que se exprese (Lehne, 2007).

Los SNPs *C1236T* y *C3435T* son de tipo sinónimo, es decir, el cambio de base no genera un cambio en el aminoácido de la proteína P-gp. Debido a esto, se ha sugerido que los cambios en la función de una proteína causados por un polimorfismo sinónimo pueden ser debido a un cambio en el codón, el cual, altera la cinética de la traducción, deteniendo la función del complejo ribosomal (Fung y Gottesman, 2009). Existen tres factores que pueden alterar el proceso de traducción: *splicing* alternativo, la estructura del RNAm y la cinética del proceso. El cambio de nucleótido en estos SNPs sinónimos puede alterar la estructura del RNAm y generar estructuras secundarias, por ejemplo horquillas. Esto puede afectar el tiempo requerido por la Aminoacil ARNt sintasa para anclarse en el sitio A del ribosoma. El cambio en la cinética del proceso de traducción puede tener múltiples consecuencias como: la disociación del RNAt del ribosoma, que el ribosoma omita el reconocimiento de algún codón y que el ribosoma no siga realizando el proceso de traducción debido a una señal de paro en los codones (Figura 32). Esto genera proteínas truncadas o mal plegadas que no realizan su función de manera adecuada (Fung y Gottesman, 2009).

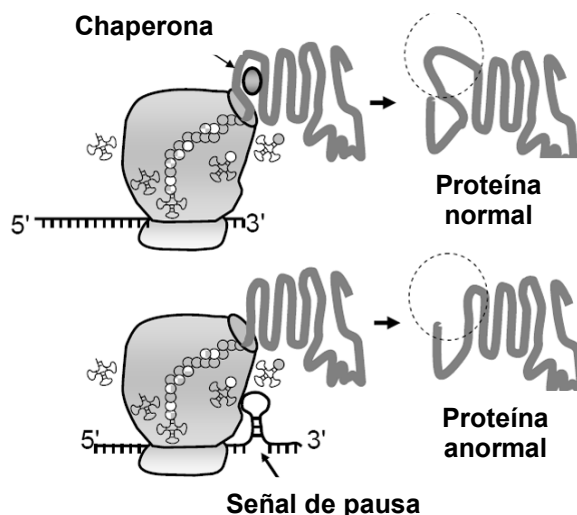


Figura 32. Consecuencias de un SNP sinónimo en los procesos de traducción (Tomado de: Fung y Gottesman, 2009).

De tal forma que, la presencia de estos dos polimorfismos sinónimos (*C1236T* y *C3435T*) disminuye la capacidad de transporte, debido a errores en el proceso de traducción y la generación de proteínas mal plegadas. Esto se podría traducir en cuestión de fenotipo como transportadores rápidos a aquellos que no presentan estos polimorfismos, transportadores intermedios a los que tienen un genotipo heterocigoto y transportadores lentos a los homocigotos para la variante.

Por otro lado, en el polimorfismo *G2677T/A* el cambio de G a T o A, origina un cambio de aminoácido (alanina a serina o treonina). El aminoácido alanina es no polar e hidrofóbico; en cambio, los aminoácidos treonina y serina son polares e hidrofílicos (Lehninger, 2003). Este aminoácido se localiza en la posición 893 en la región intracelular entre los dominios transmembranales 10 y 11, aquí existe un sitio de fijación a nucleótidos (NBD), donde se lleva a cabo la hidrólisis de ATP (Vautier y col., 2006). El análisis *in silico* de este cambio de aminoácidos por PolyPhen dice que el cambio es benigno (0.148); mientras que por SIFT el cambio resulta dañino para la proteína (0.03) cuando está presente el aminoácido treonina (Transcrito: ENST00000265724).

Sakurai y colaboradores en 2007 realizaron un estudio con el cual observaron que el cambio de aminoácido en esta posición provoca múltiples torceduras en la región helicoidal citoplasmática y esto modifica la interacción de acoplamiento con el dominio de unión a ATP, lo cual repercute en la hidrólisis del mismo. Esto, genera un gran impacto tanto en la actividad como en la especificidad de unión al sustrato. Observaron que la actividad de la ATPasa se veía aumentada con algunos vasodilatadores y que disminuía cuando se trataba de anticancerígenos; de tal forma que, el efecto de este polimorfismo en la actividad de transporte de la P-gp aparentemente depende del sustrato que se esté probando (Sakurai y col., 2007).

Con esto se puede decir que la presencia de estos tres SNPs, altera la función de la proteína de tal forma que la respuesta al tratamiento farmacológico en pacientes con EM y NO se podría ver afectada. Es posible que en la unión de la P-gp con los fármacos empleados en estas enfermedades y el transporte de los mismos, se vea limitado y por tanto, no se pueda adquirir el efecto farmacológico deseado.

Como ya se mencionó anteriormente, estos tres polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento y se ha observado que el estudio por haplotipos es una mejor manera de detectar una posible asociación a ciertas enfermedades a diferencia de estudiarlas de manera independiente (Fung y Gottesman, 2009). En el análisis de asociación por haplotipos entre casos y controles (Tabla 20), solo se encontró un resultado con tendencia a ser significativo en la muestra general de EM y el haplotipo TTC (OR= 2.28, P= 0.05). La presencia de este haplotipo podría ser un factor de susceptibilidad para el desarrollo de esta enfermedad, pero habría que ampliar el grupo de estudio para determinar si existen diferencias.

De igual forma, se compararon los resultados obtenidos de los haplotipos en población mestizo mexicana con los de otras poblaciones del mundo (gráfica 2). La frecuencia del haplotipo CGC en población mestizo mexicana normal es del 26.12%, caso contrario a la frecuencia obtenida en población afroamericana (69.50%) donde es mucho mayor que en otras poblaciones. No muy alejados de los resultados reportados para el haplotipo CGC de las poblaciones afroamericanas, se encuentran las frecuencias de

chilenos mestizos (53%), brasileños (48.40%), franceses (44%) y caucásicos (32.50%). Por otro lado, el haplotipo TTT se encuentra con mayor frecuencia en poblaciones asiáticas como los indios (56.10%), chinos (35.70%) y coreanos (32.20%). Estas frecuencias son parecidas a las reportadas en caucásicos (42%), brasileños (35.90%) y franceses (35.30%). Caso contrario a lo reportado en poblaciones como los chilenos mestizos (7%) y los afroamericanos (6.50%) donde la frecuencia de TTT es mucho más baja; es importante mencionar que el tamaño de la muestra analizada en estas dos poblaciones es muy baja en comparación con este estudio. En el caso de la población mestizo mexicana normal la frecuencia del haplotipo TTT fue la mayor, con un 38.57%, muy parecida a las reportadas en brasileños, chinos, franceses, coreanos y caucásicos. Al llevar a cabo la comparación de las frecuencias obtenidas en población mestizo mexicana con las reportadas en otras poblaciones, se puede observar la variabilidad interétnica con la que la que está formada. Flores y colaboradores en el 2012, indicaron que la población mestizo mexicana está compuesta por una mezcla de genes Amerindios y Caucásicos (Flores y col., 2012). Tomando en cuenta esto, podemos observar que las frecuencias de los haplotipos CGC y TTT de la población mestizo mexicana, son similares a las de las poblaciones asiáticas y caucásicas.

Por último, es importante mencionar que en este estudio se implementó una nueva técnica de purificación de la reacción de secuenciación, esto se debe a que los kits de purificación fueron insuficientes y se tuvo que buscar otro método. En esta técnica se emplearon filtros de puntas para micropipetas y se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que, los electroferogramas se observaron limpios. En las figuras 33 y 34 se observan dos electroferogramas purificados con ambas técnicas, el primero donde se empleó el Kit Wizard® Promega y el segundo con la técnica implementada con puntas para micropipeta. Ambos electroferogramas se observan sin ruido. La ventaja de ésta nueva técnica es que los materiales son más baratos y los reactivos son comunes y de fácil acceso en un laboratorio. De tal forma, que este estudio, también permitió conocer un método más barato, con el cual se obtienen resultados satisfactorios para la purificación de la reacción de secuenciación.

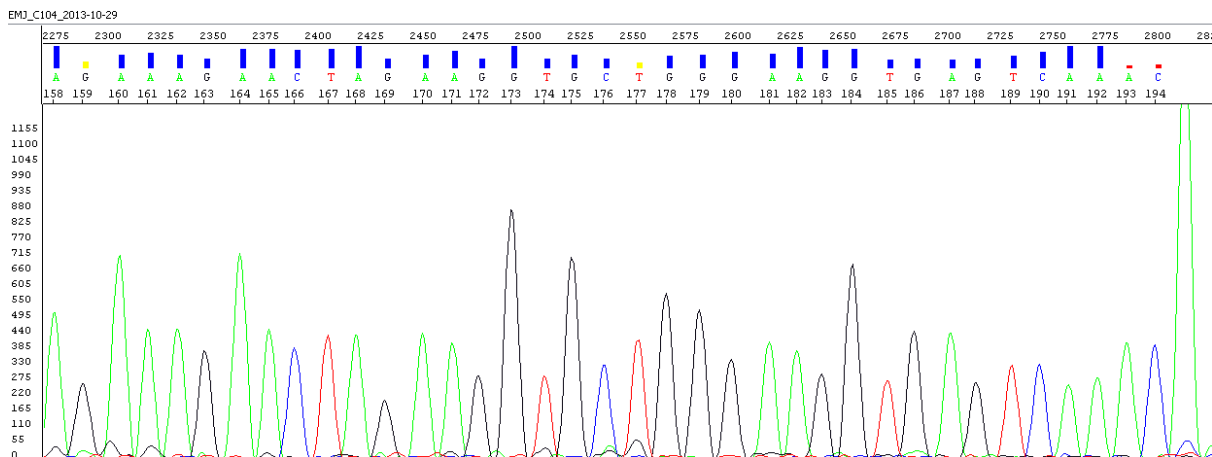


Figura 33. Imagen de electroferograma de una muestra secuenciada con el Kit Wizard® Promega.

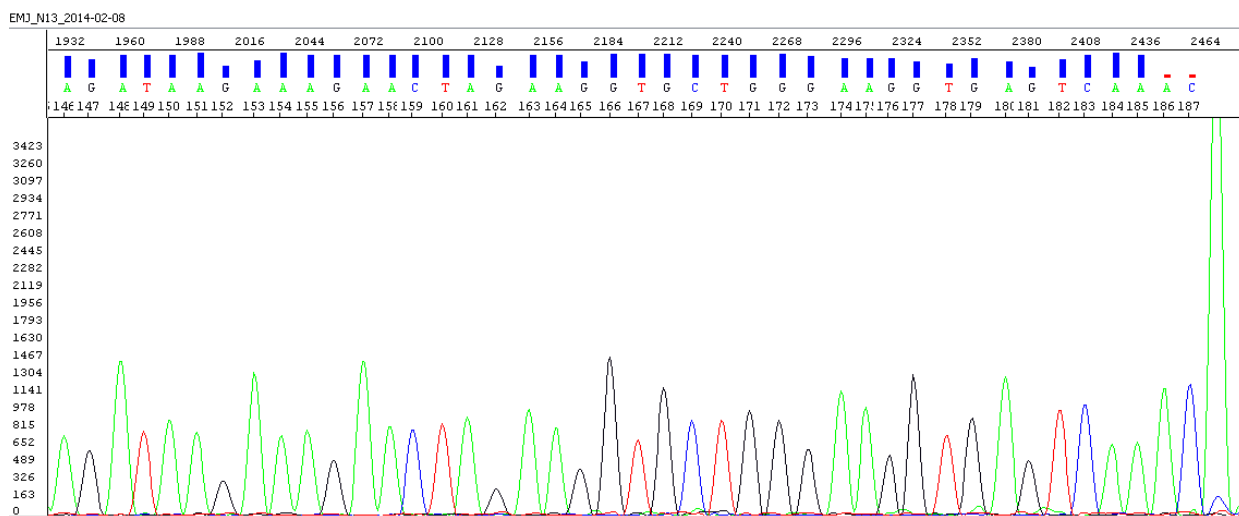


Figura 34. Imagen de electroferograma de una muestra secuenciada con filtros de puntas para micropipetas.

8. CONCLUSIONES

- Se encontraron diferencias significativas entre controles y casos con Mielitis Transversa y Neuritis Óptica para los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*. Esto podría sugerir que la presencia de estos SNPs genera un impacto en la función de la proteína transportadora P-gp y esto podría causar una respuesta no favorable en el tratamiento farmacológico de estas enfermedades desmielinizantes.
- Se puede sugerir que la presencia del alelo C en el genotipo C/T del polimorfismo *C1236T* es un factor de susceptibilidad para la mielitis transversa; así como el genotipo C/C del SNP *C3435T* para NO. Por su parte, el alelo T se consideraría un factor protector para las mismas.
- Se pudo observar la variabilidad interétnica con la que la muestra analizada de población mestizo mexicana está formada al realizar la comparación de las frecuencias alélicas obtenidas en los controles de este estudio y otras poblaciones del mundo. Esto confirma de que la población mestizo mexicana está compuesta por una mezcla de genes caucásicos y amerindios.
- Se validó un método alternativo de purificación de reacción de PCR para secuenciar, empleando reactivos y materiales menos costosos que los kits comerciales.

9. PERSPECTIVAS














- Se sugiere ampliar el tamaño de muestras de los distintos subtipos clínicos en los que se dividieron las 155 muestras de Esclerosis múltiple y las 111 muestras de Neuritis óptica, para determinar si se conservan las diferencias significativas entre casos y controles. De igual forma, ampliar las muestras en los grupos en donde se obtuvieron resultados que tienden a ser significativos, para determinar si esos genotipos son un factor de susceptibilidad o de protección en enfermedades desmielinizantes.

- Realizar estudios para buscar una asociación de estos tres polimorfismos del gen *ABCB1* con relación a la respuesta al tratamiento farmacológico, edad de inicio y severidad de la enfermedad. Con la finalidad de determinar si la presencia de estos tres SNPs son condicionantes para estas tres variables.

- Realizar el mismo estudio de estos tres SNPs del gen *ABCB1* en población mestizo mexicana, relacionándolos con otras enfermedades; por ejemplo, del sistema inmunológico, cardiovasculares y algunos tipos de cáncer.














10. Referencias

- Álvarez J.C., Arroyo R., Arbizu T., de Andrés C., Blasco R., Casanova B., Coret F., Fernández O., García A., Hernández M., Izquierdo G., Matías J., Prieto J. y Rodríguez A. 2007. "Guía para el diagnóstico y tratamiento de la esclerosis múltiple" Ed. Prous Science. Barcelona, España.
- Álvarez de Felipe A. I. y Pulido M. 2008. Transportadores de tipo ABC: consecuencias de su interacción con flavonoides. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas. **7(6)**: 296-311.
- Ambudkar S. V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z. E. y Gottesman M. M. 2003. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. Oncogene. **22**: 7468-7485.
- Balcer L. 2006. Optic Neuritis. The New England Journal of Medicine. **354(12)**:1273-80.
- Balram C., Sharma A., Sivathasan C. y Lee E. J. 2002. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic–genotypic correlates. J Clin Pharmacol. **56**: 78-83.
- Bellusci C. P., Rocco C. A., Aulicino P.C., Mecikovsky D., Bologna R., Sen L. y Magano A. 2010. MDR1 3435T and 1236T alleles delay disease progression to pediatric AIDS but have no effect on HIV-1 vertical transmission. AIDS. **24**: 833-840.
- Bennett B. y Moore G. 2002. "Biología Molecular para Perinatólogos". Ed. Masson. Barcelona, España.
- Bessadok M. A. 2012. "La multiplicité de transport de la P-glycoprotéine: Etudes de modélisation comparative et de docking au sein de la famille des protéines ABC". Université Pierre & Marie Curie. París, Francia.
- Betancourt M., Orozco L., Álvarez N., Aguilar S. y Suárez S. 2007. Esclerosis múltiple. Rev Mex Neuroci. **8(1)**: 57-66.
- Biousse V. y Newman N. 2011. "Neuro-Ophthalmology Illustrated". Ed. Thieme Medical Publishers. Nueva York, E.U.A.
- Blázquez S.V. 2007. Efectos secundarios a nivel ocular de diversos grupos de fármacos. Gaceta óptica. **412**: 20-25.
- Carretero J. L., Bowakim W. y Acebes J. M. 2001. Actualización: esclerosis múltiple. Medifam. **11**: 516-529.
- Chiquete E., Navarro J., Ayala R., Gutiérrez N., Solórzano A., Rodríguez D., Gómez M. y Ruiz J. 2010. Neuromielitis óptica: actualización clínica. Rev Neurol. **51 (5)**: 289-294.
- Cook S. 2006. "Handbook of Multiple Sclerosis". Ed. CRC Press. Nueva York, E.U.A.

-  Corona T. y Flores J. 2009. Esclerosis múltiple (EM) en América Latina. Revista española de Esclerosis Múltiple. **12**: 5-8.
-  Cascorbi I., Gerloff T., Johne A., Meisel C., Hoffmeyer S., Schwab M., Schaeffeler E., Eichelbaum M., Brinkmann U. y Roots I. 2001. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *MDR1* gene in white subjects. Clinical Pharmacology & Therapeutics. **69(3)**: 169-174.
-  Cuesta B. 2013. "Interacción del antihelmíntico triclabendazol, el analgésico URB937 y sus derivados con transportadores de membrana dependientes de ATP". Universidad de León. León, España.
-  Dean A.G., Sullivan K.M. y Soe M.M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Disponible desde: http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm
-  Dean M., Hamon Y. y Chimini G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Journal of Lipid Research. **42**: 1007-1017.
-  Díaz C. 2008. Mecanismos de acción de los fármacos inmunosupresores. Revista Chilena de Reumatología. **24(2)**: 73-88.
-  Dong C., Wong M. L. y Licinio J. 2009. Sequence variations of ABCB1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, CREB1, CRHR1 and NTRK2: association with major depression and antidepressant response in Mexican-Americans. Molecular Psychiatry. **14**: 1105-1118.
-  Duque D. 2009. Protocolos de secuenciación de ADN. Recuperado el 18 de agosto de 2014, de Protocolos de laboratorio UEG Sitio web: <http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/formatos/Protocolos%20de%20secuenciacion%20de%20ADN.pdf>
-  Etienne J. 2001. "Manual de Bioquímica Genética y Biología Molecular". Ed. Masson. Barcelona, España.
-  Flores J., González S., Morales X., Yescas P., Ochoa A. y Corona T. 2012. Absence of Multiple Sclerosis and Demyelinating Diseases among Lacandonians, a Pure Amerindian Ethnic Group in Mexico. Multiple Sclerosis International. **2012**: 1-4.
-  Fundación OPTI y la Fundación del Genoma España. 2009. Farmacogenómica y Medicina Personalizada en la Sanidad española. Recuperado el 5 de octubre de 2014, de <http://www.opti.org/publicaciones/pdf/resumen123.pdf>
-  Fung K. L. y Gottesman M. M. 2009. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. Biochim Biophys. **1794(5)**: 860–871.
-  Gargiulo L. y Radakoff de Doldan D. 2010. Farmacogenómica: aspectos éticos de la medicina personalizada. Vida y Ética. **1**: 82-99.

- GeneCards (s.f.) Recuperado el 3 de septiembre de 2014, de <http://www.genecards.org/>
- Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J. y Sarkadi B. 2004. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. Curr Drug Deliv. **1**: 27-42.
- Goldenberg M. M. 2012. Multiple Sclerosis Review. P&T. **37(3)**: 175-184.
- Gurrola S. B., Torres E. J. y Chávez H. J. 2010. Farmacogenética y farmacogenómica: hacia una medicina personalizada. Rev Fac Med UNAM. **53(2)**: 55-59.
- Henikoff S., Greene E.A., Pietrokovski S., Bork P., Attwood T.K. y Hood L. 1997. Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras. Science. **278**:609-614.
- Herráez A. 2012. "Biología molecular e Ingeniería genética". Ed. Elsevier. Barcelona, España.
- Hickman S.J., Miskiel K.A., Plant G.T. y Miller D.H. 2005. The optic nerve sheath on MRI in acute optic neuritis. Neuroradiology. **47(1)**:51–55.
- Higgins C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol. **8**:67113.
- Hintzen R. Q. y Hoppenbrouwers I. A. 2011. Genetics of multiple sclerosis. Biochimica et Biophysica. **1812**: 194-201.
- Hisham B., Rosline H., Hohd R., Norsa B., Aziz A. y Narazah M. 2006. Screening for 3435C>T and 2677G>T/A Polymorphisms of Multi-Drug Resistance (MDR1) Gene in Malay Patients with Leukemia. Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology. **14**: 18-24.
- Hodges L.M., Markova S. M., Chinn L. W., Gow J. M. Kroetz D. L., Klein T. E. y Altman R. B. 2011. Very important pharmacogene summary: *ABCB1* (*MDR1*, Pglycoprotein). Pharmacogenet Genomics. **21(3)**: 152-161.
- Hollenstein K., Frei D.C. y Locher K.P. 2007. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. Nature. **446(7132)**: 213-216.
- Iezzoni, L. 2010. "Multiple Sclerosis". Ed. Greenwood Publishing Group. California, E.U.A.
- Institut Català d'Oncologia. SNPStats: Your web tool for SNP analysis. Disponible desde: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>
- Instituto de referencia andino. 2011. Significancia de las bandas oligoclonales en Esclerosis Múltiple. Boletín informativo. **5(1)**.
- Jouve de la Barreda N. 2010. "Explorando los genes: Del big-bang a la nueva Biología". Ed. Encuentro Ciencia. Madrid, España.

- ▣ Kim Y. O., Kim M. K., Woo Y. J., Lee M. C., Kim J. H., Park K.W., Kim E. Y., Roh Y. I. y Kim C. J. 2006. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance 1 gene in Korean epileptics. Seizure. **15**: 67-72.
- ▣ Latarjet M. y Ruiz Liard A. 2006. "Anatomía Humana". Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- ▣ Lehne G. 2007. Cytostatikadosering etter farmakogenomiske markører eller kroppsoverflate? Medisin og Vitenskap. **8**: 1041-1044.
- ▣ Lehninger A.L. 2003. "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". Ed. Omega. Barcelona, España.
- ▣ Linton K. J. 2007. Structure and Function of ABC Transporters. Physiology. **22(2)**: 122-130.
- ▣ Luque J. y Herráez A. 2002. "Biología molecular e Ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud". Ed. Harcourt. Madrid, España.
- ▣ Maniatis T., Fritsch E. y Sambrook J. 1982. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual". Ed. Cold Spring Harbor. Nueva York, E.U.A.
- ▣ Marzolini C., Paus E., Buclin T. y Kim R. B. 2004. Polymorphisms in human *MDR1*(P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. Clinical Pharmacology & Therapeutics. **75(1)**: 13-33.
- ▣ Milojkovic M., Stojnev S., Jovanovic I., Ljubisavljevic S., Stefanovic V. y Plassman R. 2011. Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T *MDR1* gene polymorphisms in the Serbian population. Pharmacological Reports. **63**: 808-814.
- ▣ Moody J.E., Millen L., Binns D., Hunt J.F. y Thomas P.J. 2002. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATPbinding cassette transporters. J Biol Chem. **277**: 21111-21114.
- ▣ Moore K., Dailey A. y Agur A. 2013. "Anatomía con orientación clínica". Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, E.U.A.
- ▣ Moreno R., Esponda M., Echazarreta N., Triano R. y Morales J. 2012. Esclerosis múltiple: revisión de la literatura médica. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. **55**: 26-35.
- ▣ Multiple Sclerosis International Federation. 2013. "Atlas of MS". Ed. Summers Editorial & Design.
- ▣ Murray T., Saunders C. y Holland N. 2012. "Multiple Sclerosis: A guide for the newly diagnosed". Ed. Demos Medical Publishing. Nueva York, E.U.A.

-  Papais R.M., Carellos S.C., Alvarenga M.P., Holander C., Bichara R.P. y Thuler L.C. 2008. Clinical Course of Optic Neuritis in Patients with Relapsing Neuromyelitis Optica. Arch ophthalmol. **126 (1)**:12-16.
-  Passarge E. 2009. "Genética. Texto y Atlas". Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
-  Pauli C. y Kroetz D. L. 2004. Functional Implications of Genetic Polymorphisms in the Multidrug Resistance Gene *MDR1 (ABCB1)*. Pharmaceutical Research. **21(6)**: 904-913.
-  Paz B. 2011. De la doble Hélice a la Farmacogenómica. Academia Nacional de Medicina. 86-91.
-  Perera J., Tormo A. y García J. 2003. "Ingeniería Genética. Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA". Ed. Síntesis. Barcelona, España.
-  Perrotton M.T. 2007. "Etude du transporteur de multiples drogues MRP1: caractérisation des NBD, et étude de modulateurs conduisant à la mort des cellules surexprimant le transporteur". L'universite Claude Bernard. Lyon, Francia.
-  Pleyer U. y Foster C. S. 2006. "Uveitis and Immunological Disorders". Ed. Springer Science & Business Media. Nueva York, E.U.A.
-  Rovira A., Tintoré M., Álvarez-Cermeño J.C., Izquierdo G. y Prieto J.M. 2010. Recomendaciones para la utilización e interpretación de los estudios de resonancia magnética en la esclerosis múltiple. Neurología. **25(4)**: 248-265.
-  Sakurai A., Onishi Y., Hirano H., Seigneuret M., Obayama K., Kim G, Liew E., Sakaeda T., Yoshiura K., Niikawa N., Sakurai M. y Ishikawa T. 2007. Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis and Molecular Dynamics Simulation To Functionally Validate Nonsynonymous Polymorphisms of Human ABC Transporter ABCB1 (P-Glycoprotein/MDR1). Biochemistry. **46**: 7678-7693.
-  Scolding, N. y Wilkins A. 2012. "Multiple Sclerosis". Ed. Oxford University Press. Gran Bretaña.
-  Sheremata, W. A. 2010. "100 Questions & Answers about Multiple Sclerosis". Ed. Jones & Bartlett Learning. E.U.A.
-  Solari A. J. 2011. "Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en Medicina". Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
-  Swanton J.K., Fernando K.T., Dalton C. M., Miszkiel K.A., Altmann D.R., Plant G.T., Thompson A.J. y Miller D.H. 2009. Early MRI in Optic Neuritis. Neurology. **72(6)**:542-550.

- ▣ Tamay L., Ibarra C. y Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad. **2(2)**: 70-78.
- ▣ Tapia A.J. 2013. MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications. Rev Invest Clin. **65(5)**: 445-454.
- ▣ Tortora G. J. y Derrickson B. 2006. "Principios de Anatomía y Fisiología". Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- ▣ Uicab Y. L., Canto B. B. E islas I. 2010. Review of characteristics of ABC transporters involved in fungal pathogenesis. Tecnociencia. **2**: 87-95.
- ▣ Vademécum. (3 de Diciembre de 2010). *Vidal Vademecum Spain*. Recuperado el 16 de agosto de 2014, de <http://www.vademecum.es/>
- ▣ Vautier S., Fernández C., Milane A., Lacomblez L., Davrinche C. y Farinotti R. 2006. ABCB1 (P-glycoprotéine) et barrière hémato-encéphalique: implication dans les maladies neurologiques et leurs traitements. J Pharm Clin. **25 (4)**: 225-235.
- ▣ Velasco, P.E., Quílez, M.R., López, A.J. y Merino, A. 2011. Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. Concepto, clasificación y epidemiología. Medicine. **10**: 5065-5068.
- ▣ Weiner H. y Stankiewicz J. 2012. "Multiple Sclerosis. Diagnosis and Therapy". Ed. Wiley-Blackwell. Noida, India.
- ▣ Wilson K. y Walker J. 2005. "Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biolo y". Ed. Cambridge University Press. Nueva York, E.U.A.
- ▣ Zhang B., Shi Y. y Lei T.C. 2012. Detection of active P-glycoprotein in systemic lupus erythematosus patients with poor disease control. Exp Ther Med. **4(4)**:705-71.

