



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

**Determinación de los polimorfismos C1236T, G2677A/T y  
C3435T de *ABCB1*, y A6986G de *CYP3A5* en una muestra de  
pacientes mexicanos con Neuromielitis Óptica**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**ESTRADA OLVERA JESUS ABRAHAM**

**ASESOR: Dr. JORGE LUIS GUERRERO CAMACHO**

**COASESOR: M. en C. MARÍA LLASBETH HERNÁNDEZ CALDERÓN**



**UNAM  
CUAUTITLÁN**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



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  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



UNAM  
CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALENTÍN BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
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 y examen profesional**

**Determinación de los polimorfismos C1236T, G2677A/T y C3435T de ABCB1, y A6986G de CYP3A5 en una muestra de pacientes mexicanos con Neuromielitis Óptica.**

Que presenta el pasante: **Jesus Abraham Estrada Olvera**

Con número de cuenta: **412014439** para obtener el título de: **Licenciado 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 19 de Mayo de 2023.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>Dra. María Lucero Paniagua García</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*

## **Agradecimientos al Instituto**

El presente proyecto fue realizado en el laboratorio del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez bajo la asesoría del Dr. Jorge Luis Guerrero Camacho, mi más sincera gratitud y agradecimiento por haberme dado la oportunidad de tan valiosa experiencia.

## **Agradecimientos Personales**

A mi familia con especial mención a mis padres que me apoyaron y me tuvieron la paciencia de terminar este importante proyecto.

A mis amigos de la Universidad Amaya, Jimmy, Chris y Lalo; no podría pedir mejores amigos con quien pasar tantas aventuras tan surreales y que hacemos nuestra vida mutuamente divertida e interesante.

A mi amiga Mariana quien considero una hermana que no ha parado de echarme porras desde el kinder, que siempre olvida que estudie, pero con mucho gusto siempre le respondo.

A mi amiga Karen con quien chismeo y que siempre que nos juntamos reímos sin parar, que me ha apoyado y que es de las pocas personas con las que me siento libre de hablar absolutamente de todo.

A mi amigo Pablin, quien ha pasado a ser un socio y que me ha ayudado a tener una nueva meta que compartimos y queremos hacer crecer.

A mi amigo el Gabo un gran amigo con quien me siento plenamente identificado como si tuviera un gemelo mayor a mí.

A mi compañerita de tesis Andy que me asesoro y me enseñó tanto cuando apenas estaba empezando y que tuvimos una buena sinergia mientras trabajamos.

A mi psicóloga Diana que me ayudó a recuperar mi confianza y tener más claridad en mi mente y que si no fuera por ella no habría tenido cabeza para retomar este proyecto.

A toda la sección de bioquímica y farmacología de la FESC en donde pase buen tiempo haciendo gran parte de mi prueba escrita y que encontraba un buen lugar para concentrarme. Con una mención a la profesora Lucero Paniagua que no tuve el placer de que me diera clase, pero que me dio varias enseñanzas de vida con su peculiar sentido del humor. Y una mención especial a mi gran mentora Llasbeth que me dio guía en un camino que parecía eterno y que me tuvo fe incluso cuando yo la perdía conmigo y a la que veo como una hermana mayor.

A todo el departamento de neurogenética, nunca había hablado con personas tan inteligentes con habilidades increíbles. Con una especial mención al Dr. Jorge que tuvo una paciencia infinita al tratar conmigo y al que agradezco la oportunidad de aceptarme y trabajar con él.

“No te rindas, Hueco \[T]”

## ÍNDICE

<b>I) RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>II) ANTECEDENTES .....</b>	<b>7</b>
<b>III) MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>9</b>
1) DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD .....	9
1.1) <i>Epidemiología</i> .....	9
1.2) <i>Presentación clínica</i> .....	10
1.3) <i>Patogenia</i> .....	11
1.4) <i>Diagnóstico de la Enfermedad</i> .....	14
1.5) <i>Tratamiento de la Enfermedad</i> .....	17
2) GLUCOPROTEINA P .....	18
2.1) <i>Función</i> .....	18
2.2) <i>Estructura</i> .....	19
2.3) <i>Genética</i> .....	21
2.3.1 Polimorfismos de <i>ABCB1</i> .....	22
3) CYP3A5.....	23
3.1) <i>Función</i> .....	23
3.2) <i>Estructura</i> .....	24
3.3) <i>Genética</i> .....	26
3.3.1 Polimorfismos de <i>CYP3A5</i> .....	27
<b>IV) JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>V) HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>VI) OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
1) GENERAL: .....	29
2) ESPECÍFICOS:.....	29
<b>VII) MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
1) POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	30
1.1) <i>Procedencia de la población</i> .....	30
1.2) <i>Consideraciones éticas</i> .....	30
2) EVALUACIÓN DE ADN.....	31
2.1) <i>Cuantificación</i> .....	31
2.2) <i>Integridad</i> .....	31
3) REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE PUNTO FINAL .....	32
3.1) <i>Cebadores</i> .....	33
3.2) <i>Reacción de PCR</i> .....	33
3.3) <i>Verificación de Productos de PCR</i> .....	35
4) FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA .....	35

4.1) Selección de Enzima .....	35
4.2) Mezcla de reacción .....	37
4.3) Electroforesis .....	38
5) SECUENCIACIÓN DE SANGER .....	38
5.1) Reacción de Secuenciación.....	39
5.2) Purificación de Reacción de Secuenciación .....	40
5.3) Obtención de electroferogramas.....	41
5.4) Procedencia de la Población Control.....	41
<b>VIII) RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>IX) DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>X) CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>XI) PROPUESTAS A FUTURO.....</b>	<b>52</b>
<b>XII) REFERENCIAS .....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Examen ocular.....	11
Figura 2: Mecanismo inmunopatogénico del CDC Y ADCC.....	13
Figura 3: Mecanismo inmunopatogénico desmielinizante de la Neurona.....	14
Figura 4: Paciente con neuritis óptica monofásica positiva para anticuerpo AQP4.	16
Figura 5: Mielitis en paciente seropositivo a anticuerpo AQP4.....	17
Figura 6: Diagrama bidimensional de P-GP.....	20
Figura 7: Estructura 3D de la glucoproteína P.....	20
Figura 8: Motivo Q en el dímero NBD .....	21
Figura 9: Locación de los polimorfismos en la Glucoproteína P .....	23
Figura 10: Reacción de oxidación catalizada por CYP3A5.....	24
Figura 11: Estructura 3D de CYP3A5 en esquema de color arcoíris.....	26
Figura 12: Localización del Polimorfismo A6986G.....	27
Figura 13: Evaluación de integridad de ADN genómico.....	32
Figura 14: Producto de amplificación del polimorfismo C1236T del gen ABCB1.....	36
Figura 15: Producto de amplificación del polimorfismo C3435T del gen ABCB1.....	36
Figura 16: Producto de amplificación del polimorfismo A6986G del gen CYP3A5...37	
Figura 17: Producto de amplificación del polimorfismo G2677T/A del gen ABCB1..39	
Figura 18: RFLP del polimorfismo C1236T del gen ABCB1.....	42
Figura 19: RFLP del polimorfismo C3435T del gen ABCB1.....	43
Figura 20: RFLP del polimorfismo A6986G del gen CYP3A5.....	44
Figura 21: Electroferogramas de la secuencia G2677A/T del gen ABCB1.....	45



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios actuales del consenso de 2015 para el diagnóstico de NMO .....	15
Tabla 2: Cebadores utilizados para cada uno de los fragmentos de interés.....	33
Tabla 3: Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de <i>ABCB1</i> .....	33
Tabla 4: Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de <i>CYP3A5</i> *3.....	34
Tabla 5: Condiciones necesarias para la reacción de amplificación.....	34
Tabla 6: Mezcla de reacción para RFLP.....	37
Tabla 7: Mezcla para preparación de gel de poliacrilamida.....	38
Tabla 8: Mezcla de reacción de secuenciación.....	39
Tabla 9: Condiciones para reacción de secuenciación.....	40
Tabla 10: Tamaño de los fragmentos de restricción del polimorfismo <i>C1236T</i> .....	42
Tabla 11: Tamaño de los fragmentos de restricción del polimorfismo <i>C3435T</i> .....	43
Tabla 12: Tamaño de los fragmentos de restricción del polimorfismo <i>A6986G</i> .....	44
Tabla 13: Frecuencia y análisis de asociación para <i>ABCB1</i> .....	46
Tabla 14: Frecuencia y análisis de asociación para <i>CYP3A5</i> .....	47
Tabla 15: Comparación de frecuencias de diferentes poblaciones.....	51

## ABREVIATURAS

ABCB1	Casete de Unión a ATP subfamilia B miembro 1
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
anti-AQP4	Anticuerpos contra AQP4
anti-MOG	Anticuerpos contra MOG
AQP4	Acuaporina 4
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
BHE	Barrera Hematoencefálica
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
CYP3A5	Citocromo P450 familia 3 subfamilia A miembro 5
EM	Esclerosis Múltiple
FcR	Receptor de la célula efectora
MAC	Complejo de ataque a membrana
MTA	Mielitis Transversa Aguda
MTLE	Mielitis Transversa Longitudinalmente Extendida
MOG	Glicoproteína de la mielina del oligodendrocito
MPM	Marcador de Peso Molecular
MTA	Mielitis Transversa Aguda
NBD	Dominio de Unión a Nucleótido
NMO	Neuromielitis Óptica
NO	Neuritis Óptica
OR	Razón de Oportunidades
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica
P-GP	Glucoproteína-P
RM	Resonancia magnética
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Único
TBE	Tris-ácido-Bórico-EDTA
Temed	Tetrametiletildiamina
TMD	Dominio transmembrana

## I) RESUMEN

La enfermedad de Devic posteriormente llamada neuromielitis óptica (NMO) constituye un trastorno desmielinizante, inflamatorio e idiopático del sistema nervioso central (SNC), caracterizado por ataques de neuritis óptica (NO) y mielitis transversa aguda (MTA). Actualmente, es considerada como un espectro de desorden que se concibe como una entidad con características inmunopatológicas, comportamiento clínico, pronóstico y respuesta a diversos tratamientos diferente a la esclerosis múltiple (EM) enfermedad con la que se solía confundir (Chiquete et al., 2010).

El objetivo de este estudio es la determinación de los polimorfismos C1236T, G2677A/T y C3435T de ABCB1 y A6986G de CYP3A5 en una población de mexicanos con NMO.

Se analizaron estos genes debido a que las proteínas para las que codifican están implicadas en el transporte y metabolismo de corticoesteroides propios del organismo que sirven como moduladores del sistema inmune.

Para obtener los genotipos y alelos de estos polimorfismos de nucleótido único (SNPs por sus siglas en inglés) se realizó la técnica de PCR-RFLP excepto para el caso de G2677A/T, para el cual se utilizó la técnica de secuenciación de Sanger.

Al obtener las frecuencias genotípicas y alélicas estas se compararon con las frecuencias ya reportadas en otros estudios en mexicanos sanos.

Se calculó la significancia estadística y se realizó un análisis de asociación usando la prueba de  $\chi^2$  con una  $p < 0.05$ , además se realizó la prueba de OR con IC95%. No se obtuvo significancia estadística para los SNPs G2677A/T ni A6986G, pero sí para los SNPs C1236T y C3435T.

## II) ANTECEDENTES

En 1870, Sir Thomas Clifford Allbut expresó el interés de la ciencia al analizar la asociación de dos alteraciones neurológicas que se iniciaban en la médula espinal (mielitis), en cinco pacientes. Doce a trece semanas después los pacientes presentaron el compromiso ocular (neuritis). En 1889, Achard y Guinon describieron un estudio clínico-patológico de esta nueva entidad. Posteriormente Eugene Devic fue el primero en utilizar los términos de “neuromielitis óptica” (Iglesias et al., 2011).

Con los adelantos tecnológicos para estudiar enfermedades el nombre de Friedrich Schanz está estrechamente asociado con el aumento de equipo médico, ya que construyó uno de los primeros microscopios de córnea. En 1893, Schanz consideró un hecho ya bien establecido que las enfermedades de la médula espinal y las enfermedades de los nervios ópticos pueden estar relacionados (Jarius & Wildemann, 2017).

Las afecciones agudas que conducen a neuritis y mielitis se consideraban raras si no eran ocasionadas por traumatismos. Como evidencia de la rara asociación de mielitis aguda no traumática y neuritis, Schanz señaló el famoso caso comunicado en una reunión de neurólogos en 1879 por el padre fundador de Neurología clínica alemana, Wilhelm Heinrich Erb, que fue considerado por mucho tiempo la primera descripción completa de un paciente con neuromielitis óptica (NMO) (Jarius & Wildemann, 2017).

Devic y Gault basaron su revisión de la literatura, en una investigación previamente publicada por el oftalmólogo alemán Friedrich Albin Schanz en un semanario médico bajo el nombre de “En la coincidencia de neuritis óptica y mielitis aguda” (Jarius & Wildemann, 2017). De la producción científica de Eugene Devic la NMO fue su trabajo coloquial; publicó dos artículos y con su estudiante Fernand Gault describieron diecisiete casos de NMO, que para esa época era una serie excelente (Iglesias et al., 2011).

En 1914, Holden informa sobre cinco casos en los cuales la mielitis se complicó por una ceguera completa. En 1936, Balser, después de estudiar a varios pacientes, pensaba que era parte de la esclerosis múltiple (EM). Desde 1936, muchos observadores de diferentes continentes consideraban que la neuritis de Devic pudiese ser una forma aguda de la esclerosis múltiple, o de una encefalomielitis, y que era difícil establecer una diferenciación entre los tres grupos de entidades de acuerdo con los estudios del Neurólogo Russel Brain en 1929 (Iglesias et al., 2011).

Muchos pacientes con NMO pueden diagnosticarse como esclerosis múltiple, pero los estudios comparativos de Seze y colaboradores en 2001 y 2003 plantean la posibilidad de que son dos enfermedades diferentes. Bergamaschi y Ghezzi un año después demostraron que la NMO puede asociarse con enfermedades autoinmunes y con la presencia de anticuerpos antinucleares y anticélulas parietales (Iglesias et al., 2011).

En 1992, Preston y cols. identificaron el primer miembro de la familia de las acuaporinas. La acuaporina 4 (AQP4) se expresa en el sistema nervioso central, músculo esquelético, pulmones, riñones, estómago y glándulas exocrinas. El nervio óptico y los cordones espinales tienen antígeno o autoantígeno de AQP4, que son blancos para los procesos inmunitarios mediados por vía humoral y explican por qué la NMO es una enfermedad órgano-específica. Cabe mencionar que la AQP4 no se expresa en los oligodendrocitos. Lennon y cols. en 2004 y 2005 mostraron que los anticuerpos IgG (anti-AQP4) se observan en pacientes con NMO y este anticuerpo ayuda a diferenciar a los pacientes con síndrome de Devic (una enfermedad inflamatoria, desmielinizante y autoinmune del sistema nervioso) de las otras alteraciones desmielinizantes (Iglesias et al., 2011).

Confirmando la opinión de otros neurólogos del siglo XIX, incluidos Devic y Gault, que la EM y la NMO son enfermedades distintas, la NMO es ahora reconocida como una entidad en sí misma que difiere de la EM en términos de inmunopatogenia, inmunohistopatología, óptimo tratamiento y pronóstico (Jarius & Wildemann, 2017).

### III) MARCO TEÓRICO

#### 1) Descripción de la enfermedad

La neuromielitis óptica se define como una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central que afecta principalmente a los nervios ópticos y la columna vertebral. La NMO causa mielitis y neuritis óptica y, si no se trata, puede dejar a los pacientes invidentes y en silla de ruedas. En al menos el 80 % de casos, la NMO es causada por anti-AQP4, el canal de agua más abundante en el sistema nervioso central (Jarius & Wildemann, 2017).

#### 1.1) Epidemiología

La NMO es una enfermedad poco frecuente, con una prevalencia aproximada de 1/100 000 habitantes en países del occidente, siendo más común en personas como indios del oeste (40 %), japoneses (20-30 %), africanos caribeños, africanos americanos y asiáticos del este, incluyendo Hong Kong (36 %), Singapur (48 %) e India (10.23 %) (Vásquez, 2018).

Existen escasos estudios epidemiológicos que describan su incidencia y su prevalencia a nivel mundial. Algunos estudios poblacionales han reportado una prevalencia de 0.52 a 4.4 por 100 000 habitantes y una incidencia de 0.053 a 0.4 por 100 000 habitantes. Específicamente en Cuba se reportó una incidencia de 0,5 por cada 100 000 habitantes, 1 en México, 1.4-2.8 en Estados Unidos, 0.9 en Japón y 4.4 en Dinamarca (Vásquez, 2018).

En México no existen estudios que determinen la prevalencia o incidencia exacta de esta enfermedad. Un estudio realizado por médicos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” estima que la incidencia aproximada es de 1.3 casos por cada 100,000 habitantes. Sin embargo, debemos considerar que tal cual no es un estudio epidemiológico.

## 1.2) Presentación clínica

Los ataques de NO son más comunes de forma unilateral y posteriormente hay una MTA. Lo más común es que la presentación de ambos episodios sea secuencial y no simultánea, calculando que la forma monofásica se presenta en menos del 30% de los casos (Chiquete et al., 2010). Generalmente la NO precede a la MTA en meses o años, sin embargo, cuando el curso es monofásico típicamente están separados solo por escasos días y esta forma es la más frecuente en jóvenes (Carnero et al., 2013).

La NO se caracteriza por pérdida de la agudeza visual, dolor a la movilización ocular y discromatopsia en uno o ambos ojos. Generalmente es unilateral y luego rápidamente se afecta el contralateral. El estudio ocular revela que el fondo de ojo puede ser normal o patológico (fondo de ojo pálido) (ver figura 1). En tanto la MTA se presenta con paraplejía o paraparesia, pérdida de la sensibilidad por debajo de la lesión y alteración de esfínteres que en conjunto con la NO son las típicas manifestaciones de la NMO (Carnero et al., 2013). Las consecuencias clínicas de las recaídas suelen ser severas, en la NMO en más del 50 % se muestra una agudeza visual < 20/200 llegando a la midriasis y la paraplejía que generan secuelas severas. Cuando la mielitis cervical se extiende hacia el encéfalo, puede originar fallo respiratorio agudo neurogénico, lo cual se presenta rara vez en la EM (Chiquete et al., 2010).

La forma monofásica tiene mejor pronóstico y un mejor resultado a largo plazo y la tasa de supervivencia es 5 años superior a la de los pacientes con ataques agudos recurrentes (Bruscolini et al., 2018).

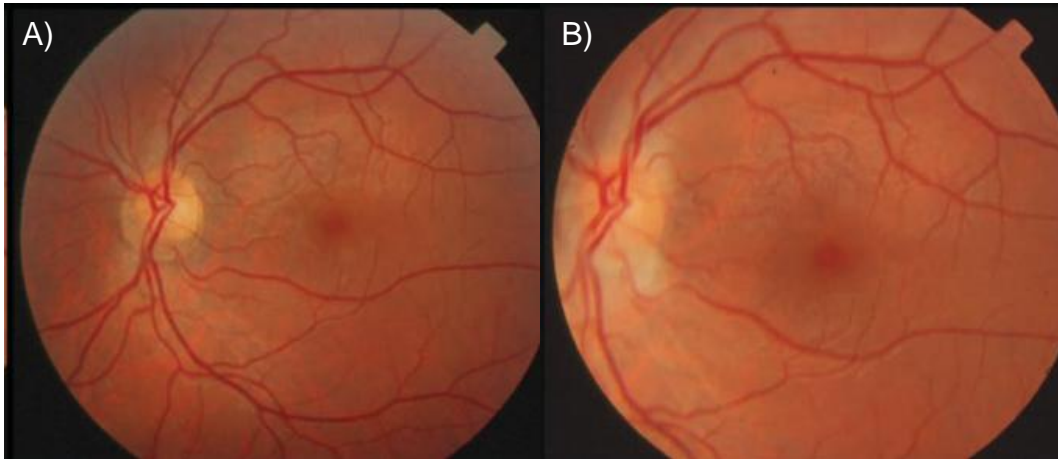


Figura 1: Examen ocular. A) Fondo de ojo normal, B) Fondo de ojo con NO. (Modificado de Escalante et al., 2006).

### 1.3) Patogenia

Las causas de NMO aún se desconocen, pero es ampliamente reconocido que estas afecciones son principalmente trastornos mediados por anticuerpos que desempeña el sistema inmune humoral y que van dirigidos a la AQP4 (Bruscolini et al., 2018). Algunos autores han propuesto que la enfermedad debería reclasificarse como un padecimiento astrocitopático que como una enfermedad desmielinizante porque el grado de daño a los astrocitos es equiparable al de la mielina y neurona (Pereira et al., 2015).

Las acuaporinas constituyen una familia de canales que regulan el transporte de agua en muchos órganos, incluidos el sistema nervioso, los ojos, riñón, tracto gastrointestinal, glándulas secretoras, oído interno y músculos. En específico la AQP4 es el objetivo principal en la patogénesis de NMO, ésta se encuentra principalmente en los astrocitos y las células endoteliales de los ventrículos del cerebro y el conducto central de la médula espinal; células de Müller en la retina, y en las células de Hensen del surco interno del oído (Bruscolini et al., 2018).

Las células T específicas de antígeno activado pueden ingresar al cerebro y causar trastornos en la barrera hematoencefálica. Los pacientes con NMO albergan células



T activadas específicas para AQP4 en la periferia de la BHE. Los eventos que inician la producción anti-AQP4, su acceso al SNC, el mecanismo preciso por las cuales la cascada inflamatoria se presenta en NMO, la forma en que produce lesiones y la desmielinización siguen sin estar claros (Pereira et al., 2015). El canal de AQP4 se halla en el endotelio del espacio perivascular, ahí se lleva a cabo la acción del complemento y la inflamación con macrófagos, eosinófilos y linfocitos aumentando la permeabilidad de BHE. La sustancia gris se ve alterada secundariamente por el edema y la inflamación de sustancia blanca (Alemán-Iñiguez et al., 2015).

La patogénesis de NMO implica la unión de anti-AQP4 a AQP4 en los pies de los astrocitos, lo que activa el complemento y conduce a la formación del complejo de ataque a membrana (MAC) que lesiona a los astrocitos, este evento desencadena el reclutamiento de células de inflamación, primero de neutrófilos y eosinófilos (granulares) seguido de los macrófagos los cuales alteran aún más la BHE, la reacción inflamatoria daña de manera secundaria oligodendrocitos y neuronas (Pereira et al., 2015).

La anti-AQP4 produce pérdida de mielina que puede causar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (ver figura 2). La capacidad de la Anti-AQP4 unida a AQP4 para causar CDC y ADCC se explica por el hecho de que la región IgG Fc se une a la proteína del complemento C1q y al receptor de la célula efectora (FcR) produciendo así pérdida de mielina mediada por el complemento, y muerte de astrocitos y neuronas (Pereira et al., 2015).

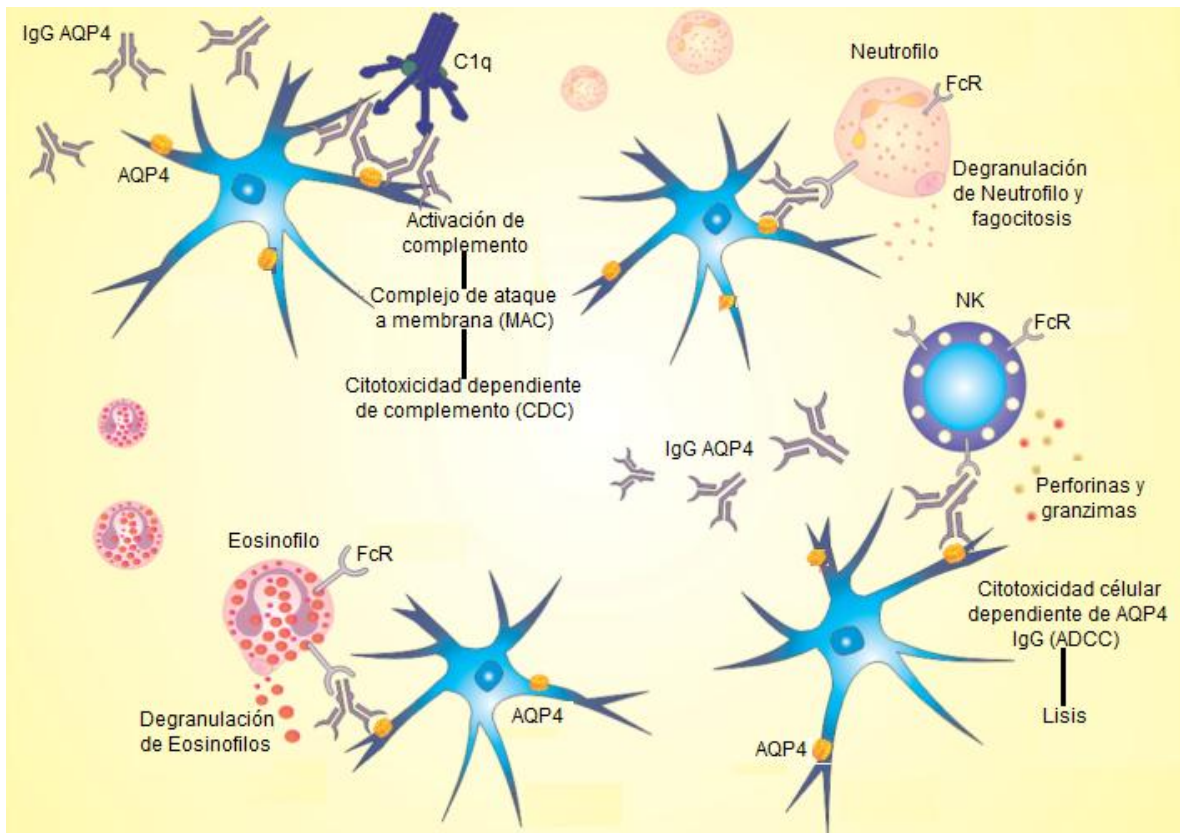


Figura 2: Mecanismo inmunopatogénico del CDC Y ADCC (Modificado de Pereira et al., 2015).

Estudios experimentales han demostrado que la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG), localizada en la superficie externa de la vaina de mielina y los oligodendrocitos, podría ser un antígeno objetivo en la NMO especialmente en los pacientes seronegativos a anti-AQP4. Los anticuerpos anti-MOG IgG causan cambios en la mielina y altera la expresión de proteínas axonales, pero no produce pérdida axonal, muerte neuronal o inflamación presentando características clínicas distintas, que incluyen menos recaídas y una mejor recuperación, (ver figura 3) (Pereira et al., 2015).

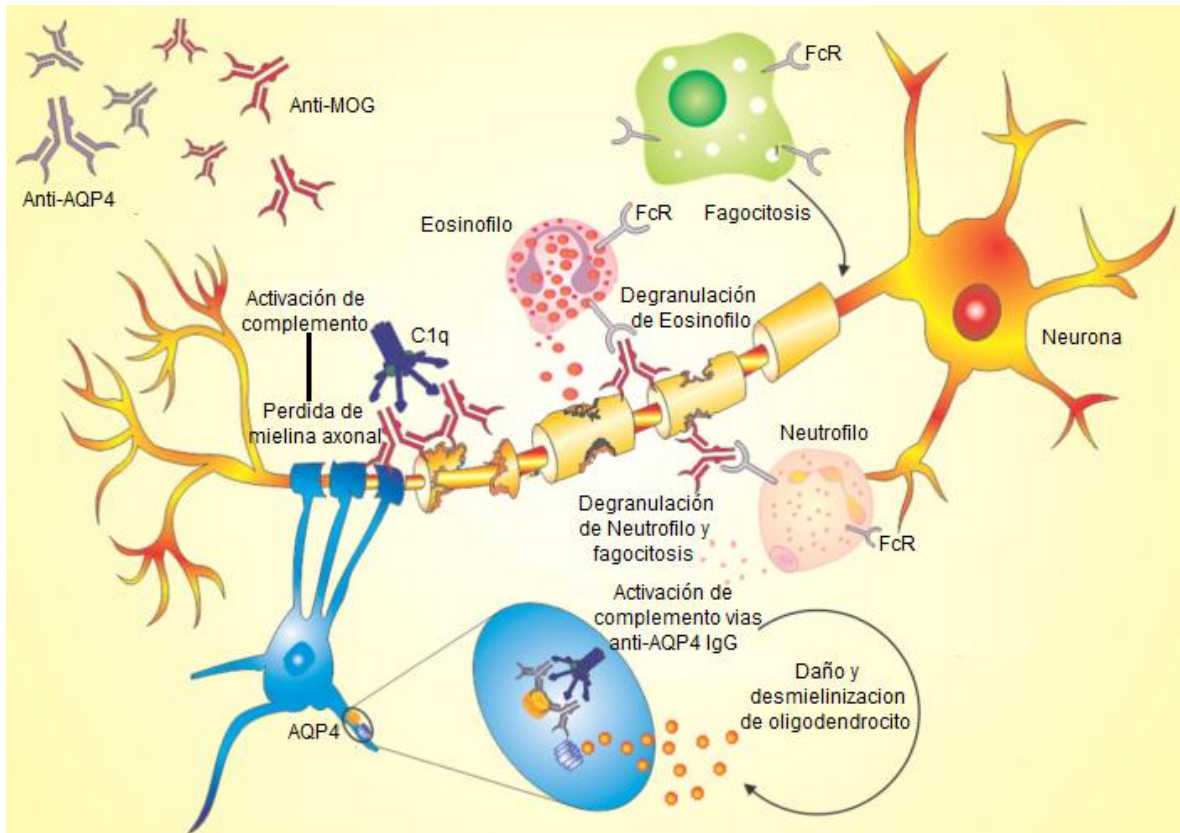


Figura 3: Mecanismo inmunopatogénico desmielinizante de la Neurona (Modificado de Pereira et al., 2015).

#### 1.4) Diagnóstico de la Enfermedad

Actualmente la NMO ha sido unificada como un espectro de trastornos de etiología autoinmune, producida por autoanticuerpos patógenos específicos contra los canales de AQP4 (Uribe San Martín et al., 2017).

Los primeros criterios diagnósticos fueron elaborados en 1999, inicialmente basado en las descripciones de Eugène Devic quien apreció la aparición de neuritis óptica y mielitis transversa, ambas de presentación temporalmente cercana (Uribe San Martín et al., 2017). En el 2006 se complementaron con el descubrimiento de los anticuerpos de AQP4 (Medina et al., 2018). Sin embargo, después de su mayor utilización clínica, se comenzó a reconocer en pacientes seropositivos una afectación más allá de los nervios ópticos y la médula espinal que podía desarrollar

frecuentemente una NMO “típica” de mediano a largo plazo (Uribe San Martín et al., 2017).

Después de distintas modificaciones en el año 2015 se afinaron diferentes puntos que incluyen ahora a los pacientes con presentaciones clínicas (náusea, vómitos irresistibles, síncope de repetición, entre otros) que previamente no se consideraban dentro del diagnóstico de NMO, pero que hasta el día de hoy forman parte de los ya conocidos trastornos del espectro de la NMO dando como resultado los criterios que se muestran en la tabla 1 (Medina et al., 2018).

Tabla 1: Criterios actuales del consenso de 2015 para el diagnóstico de trastornos del espectro de neuromielitis óptica (Medina et al., 2018).

#### **Criterios diagnósticos para NMO con anti-AQP4**

1. Al menos 1 característica clínica.
2. Prueba positiva para anti-AQP4.
3. Excluir otros diagnósticos posibles.

#### **Criterios diagnósticos para NMO sin anti-AQP4**

1. Al menos 2 características clínicas que ocurran como resultado de 1 o más ataques clínicos y que cumplan con los siguientes requisitos:
  - a) Al menos 1 característica clínica que incluya neuritis óptica, mielitis aguda con MTLE o síndrome del área postrema.
  - b) Diseminación espacial (2 o más características clínicas diferentes).
  - c) Criterios de resonancia magnética (RM), si es aplicable.
2. Prueba negativa para anti-AQP4.
3. Excluir otros diagnósticos posibles.

#### **Características clínicas**

1. Neuritis óptica.
2. Mielitis aguda.
3. Síndrome del área postrema: episodios inexplicables de singulto, náusea o vómito.

- 
4. Síndrome de tallo cerebral agudo.
  5. Narcolepsia sintomática o síndrome diencefálico agudo con lesiones de NMO en región diencefálica vistas en resonancia magnética.
  6. Síndrome cerebral agudo con lesiones típicas de NMO.

**Requisitos adicionales de resonancia magnética para NMO sin anti-AQP4 y NMO con estatus desconocido de anti-AQP4**

1. Neuritis óptica aguda: lesiones en resonancia magnética que muestre: a) cambios normales o no específicos en lesiones de sustancia blanca, o b) nervio óptico con lesión en secuencia T2 hiperintensa de resonancia magnética o lesión en secuencia T1 en una resonancia contrastada que se extienda por más de la mitad de la longitud del nervio óptico o que involucre al quiasma óptico. (Figura 4)
2. Mielitis aguda: requiere lesión intramedular vista en resonancia magnética que se extienda por más de 3 segmentos (MTLE) o 3 o más segmentos continuos de atrofia espinal en pacientes con historia compatible con neuritis. (Figura 5)
3. Síndrome de área postrema: lesiones en el área postrema o en bulbo raquídeo dorsal.
4. Síndrome de tallo cerebral agudo: requiere lesiones periependimarias.

---

\*MTLE: Mielitis Transversa Longitudinalmente Extendida.

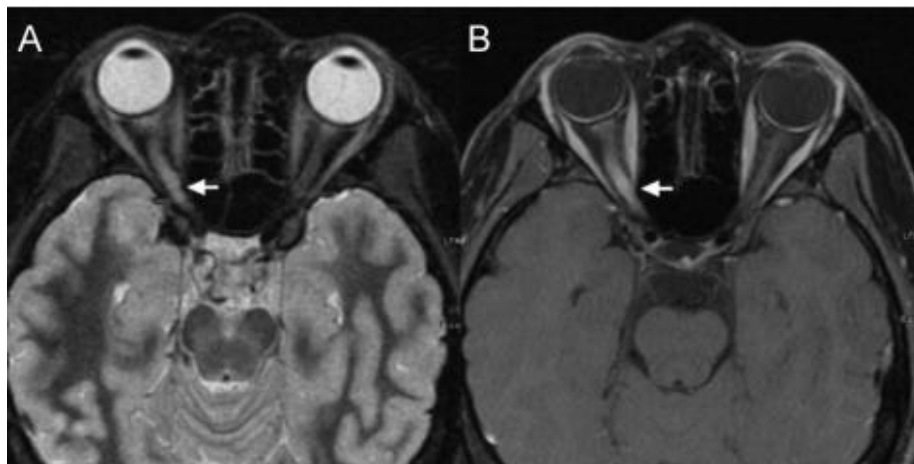


Figura 4: Paciente con neuritis óptica monofásica positiva para anticuerpo AQP4. Corte tau lesiones que realzan el contraste A) lesión hiperintensa edematosa B) Realce de contraste de la RM; paciente con primer episodio de NO (Tomado de Sato et al., 2013).



Figura 5: Mielitis en paciente seropositivo a anticuerpo AQP4. Lesiones sagitales ponderadas en T2 hiperintensas en la región posterocentral de la columna vertebral que se extiende sobre C2-3 (Tomado de Sato et al., 2013).

Algunos médicos adicionalmente usan la escala Expanded Disability Status Scale (EDSS) para ver el grado de avance de la enfermedad, pero no se utiliza como valor de diagnóstico ya que se utiliza principalmente para EM.

#### 1.5) Tratamiento de la Enfermedad

En pacientes con NMO la terapia se divide en dos formas distintas dependiendo el enfoque clínico: el tratamiento a ataques agudos y el tratamiento a largo plazo de prevención (Bruscolini et al., 2018).

Una vez que se tiene el primer ataque agudo se recomienda tratamiento intenso de inmunosupresores a base de corticosteroides (Alemán-Iñiguez et al., 2015). Es relevante disminuir el número de ataques agudos para prevenir las secuelas acumulativas y las discapacidades consiguientes, por lo tanto, también es de primordial importancia reducir la gravedad de un ataque agudo (Bruscolini et al., 2018). En los ataques agudos se recomienda metilprednisolona en una dosis de

1g/día por 5 días consecutivos. Si el paciente es seropositivo a anti-AQP4 se recomienda realizar una plasmaféresis (Alemán-Iñiguez et al., 2015).

Una vez recuperado del ataque, se inicia el tratamiento de prevención el cual suele ser de prednisona, sin embargo, como alternativa también se utilizan la azatioprina, la mitoxantrona o micofenolato (de Andrés et al., 2015). Otra alternativa es el uso de anticuerpos monoclonales siendo rituximab el más usado, pero actualmente se está evaluando la eficacia de otros tales como: tocilizumab, eculizumab y aquaporumab (Bruscolini et al., 2018). Anteriormente se llegó a usar interferón, pero se ha comprobado la ineficacia de este tratamiento (de Andrés et al., 2015). En particular, se debe suponer que los pacientes seropositivos a anti-AQP4 están en riesgo de recaída indefinidamente y, por lo tanto, el tratamiento debe considerarse a largo plazo después del primer ataque agudo (Bruscolini et al., 2018).

## 2) Glucoproteína P

La glucoproteína-P (P-GP) fue descubierta en 1971 por Victor Ling, también se le conoce como MDR1 (por sus siglas en inglés multidrug resistance protein 1). La P-GP es un miembro de la superfamilia de transportadores dependientes de ATP también conocidas como ABC (por sus siglas en inglés *ATP-binding cassette*). Las proteínas ABC transportan diversas moléculas a través de membranas extra e intracelulares. Los genes ABC se dividen en siete subfamilias distintas: *ABC1* (A), *MDR/TAP* (B), *MRP*(C), *ALD*(D), *OABP*(E), *GCN20*(F), *White*(G). Esta proteína es miembro de la subfamilia *MDR/TAP* (B) (NCBI., 2019).

### 2.1) Función

Los miembros de la subfamilia MDR/TAP están involucrados en la resistencia a múltiples fármacos (NCBI, 2019) y funcionan como una bomba de transporte para una gran variedad de sustancias (OMIM, 2019).

La P-GP es una parte integral de la barrera hematoencefálica. Otros órganos donde tiene una expresión elevada es en: hígado, epitelio intestinal, riñón y barrera hematoplacentaria (NCBI, 2019). P-GP se expresa en muchas barreras de membrana y órganos encargados de desintoxicación del cuerpo, por lo tanto, la función fisiológica de P-GP es para proteger los tejidos sensibles y el feto de toxicidad endógena y exógena (Kim & Chen, 2018).

Es responsable de la disminución de la acumulación de fármacos en células resistentes a múltiples fármacos y, a menudo, media el desarrollo de resistencia a los fármacos, más de 300 compuestos han sido identificados como posibles sustratos de P-GP en su mayoría hidrófobos tales como: lípidos, esteroides, xenobióticos, péptidos, bilirrubinas, glucósidos cardíacos como la digoxina, agentes inmunosupresores, glucocorticoides (Dean, 2001).

## 2.2) Estructura

Los transportadores ABC están constituidos mínimamente por dos regiones conservadas: un dominio de unión a ATP altamente conservado (ABC/NBD) y un dominio transmembrana (TMD) menos conservado. La mayoría de los transportadores ABC funcionan como un dímero y, por lo tanto, están constituidos por cuatro dominios, dos módulos ABC/NBD y dos TMD (PROSITE, 2019).

El P-GP se compone de dos mitades homólogas, cada una conteniendo seis dominios transmembranales y un dominio de unión a ATP, separadas por el polipéptido flexible del enlazador (Ambudkar et al., 1999). Los estudios de la función de la P-GP indican que los residuos que recubren la abertura de la cámara propuesta (residuos de TM2, TM5 y TM6) juegan un papel importante en el reconocimiento del sustrato (PROSITE, 2019) (ver figura 6). El modelado molecular de la proteína muestra que estos TMD se organizan formando un poro que atraviesa la membrana celular.



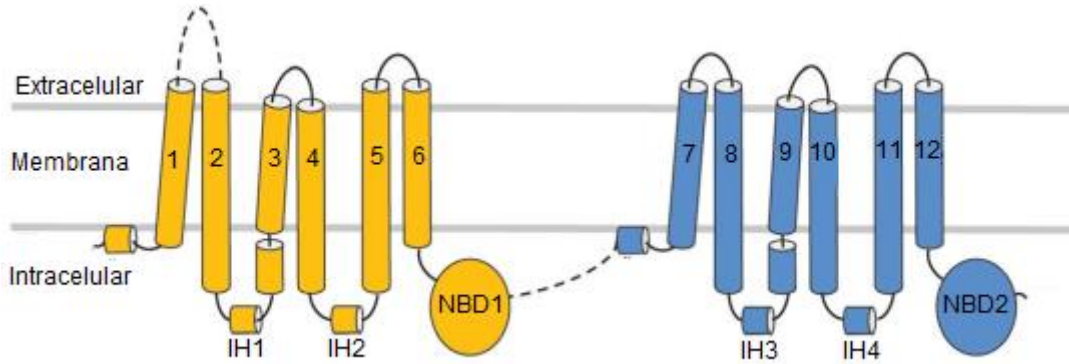


Figura 6: Diagrama bidimensional de P-GP. Las líneas discontinuas muestran secuencias no resueltas. Se muestran los 12 TMD y los 2 ABC/NBD. Los segmentos de hélice intracelular (IH) están involucrados en interacciones con ABC/NBD (Modificada de Kim & Chen, 2018).

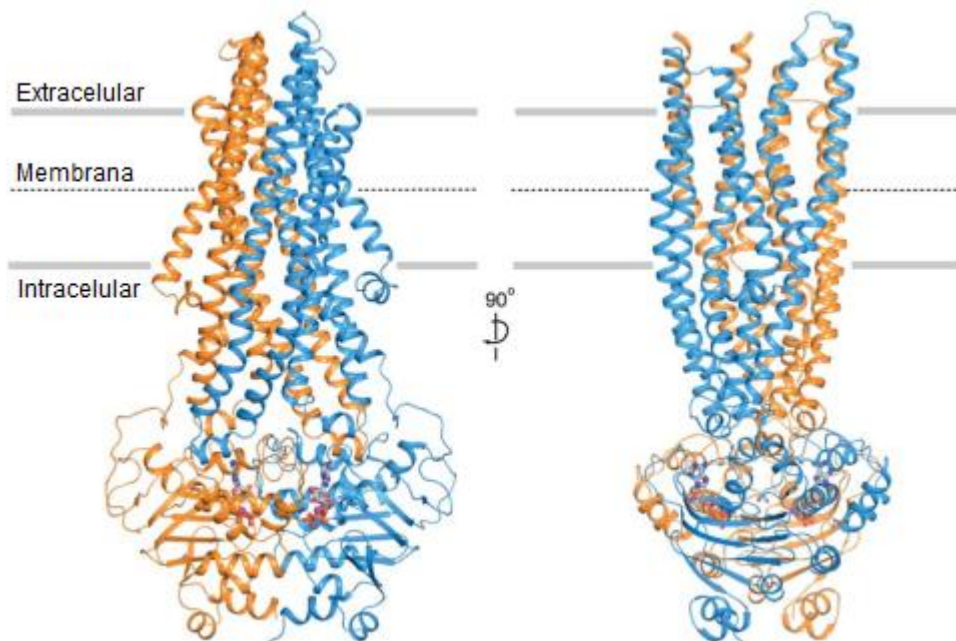


Figura 7: Estructura 3D de la glucoproteína P. La mitad N-terminal (TMD1 y NBD1) es de color naranja y la mitad C-terminal (TMD2 y NBD2) en azul (Modificada de Kim & Chen, 2018).

Se sabe que el módulo ABC/NBD se une a ATP y lo hidroliza, por lo tanto, acopla el transporte a la hidrólisis de ATP en un gran número de procesos biológicos. El dominio está duplicado en varias subfamilias. Su secuencia primaria es altamente

conservada, mostrando un típico lazo de unión de fosfato: Walker A, y un sitio de unión de magnesio: Walker B. Además de estas dos regiones, otros tres motivos conservados están presentes en el dominio ABC/NBD: la región del interruptor que contiene un lazo de histidina, destinado para captar la molécula de agua para la hidrólisis, el motivo conservado Leu-Ser-Gly-Gly-Gln (LSGGQ) específico para el transportador ABC/NBD, y el motivo Q, que interactúa con el fosfato gamma a través de un enlace de agua. El Walker A, Walker B, motivo Q y la región del interruptor forman el sitio de unión de nucleótidos (ver figura 8) (Pfam, 2019).

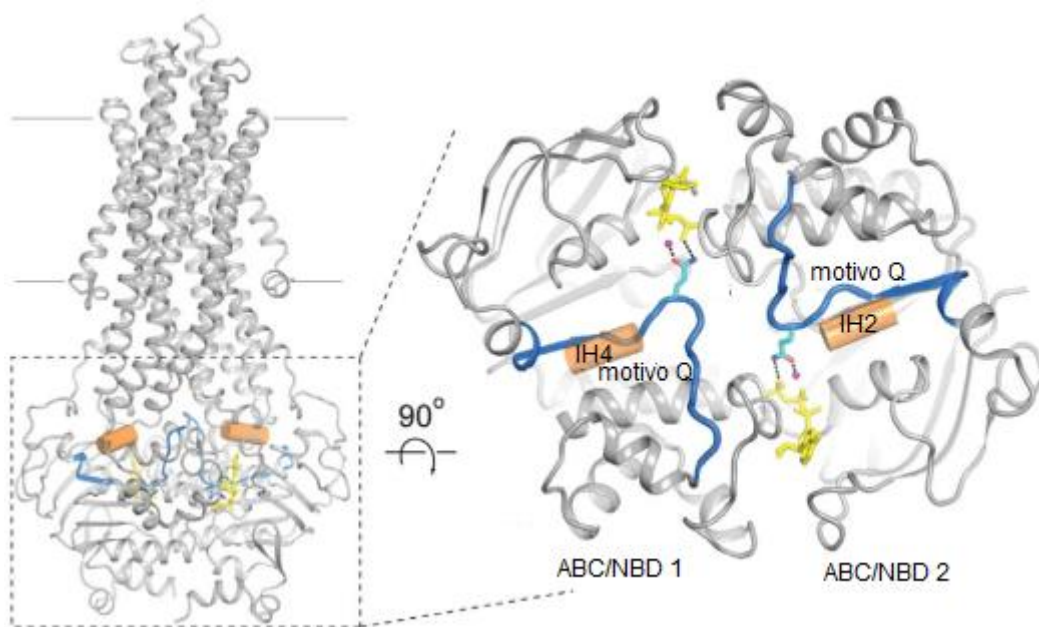


Figura 8: Motivo Q (azul) en el dímero NBD están posicionados para interactuar con  $Mg^{2+}$  y ATP (magenta y amarillo) y los TMD a través de las dos hélices intracelulares IH2 y 4 (naranja). Los residuos de glutamina altamente conservados (Q475 y Q1118) en los motivos Q están indicados (azul claro) (Modificado de Kim & Chen, 2018).

### 2.3) Genética

El gen *ABCB1* fue clonado por primera vez por Riordan y colegas en 1985. El análisis de líneas celulares humanas, tejido hepático y linfocitos muestran consistentemente que *ABCB1* contiene 29 exones en una región genómica que

abarca un aproximado de 209691 pb y se encuentra en 7q21-21.1 (PHARMGKB, 2019).

Los 29 exones varían de tamaño de 49 pb a 587 pb (Fung & Gottesman, 2009). Los dos exones más cercanos al extremo 5' se pierden en modificaciones post-transcripcionales y no se traducen como parte de la proteína. El ARN mensajero (ARNm) es de 4872 pb de longitud, incluyendo la región 5' no traducida (UTR) que da lugar a una proteína que es 1280 aminoácidos de longitud (PHARMGKB, 2019).

### 2.3.1 Polimorfismos de *ABCB1*

Un polimorfismo de un solo nucleótido también llamado SNP (por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) es una variación en la secuencia de ADN y afecta a un solo nucleótido (Helal et al., 2017). Se tienen reportes de SNPs localizados en regiones exónicas, que han sido relacionados con un plegamiento anormal de la proteína, así como la presencia de un codón raro, marcado por un polimorfismo sinónimo, que afecta la estructura de la proteína (García, 2013).

Los SNPs del gen *ABCB1* que se han estudiado ampliamente son el *C1236T*, el *G2677T/A* y el *C3435T* presentes en los exones 12, 21 y 26 respectivamente. Estos SNPs han sido asociados con la estabilidad del ARNm y con el plegamiento de la proteína. Los polimorfismos *C1236T* y *C3435T* son mutaciones silenciosas, mientras que el polimorfismo *G2677T/A* da como resultado un cambio de Alanina en el aminoácido 893 por una Serina o Treonina que se han asociado a un cambio en la actividad de la P-GP (ver figura 9) (García, 2013).

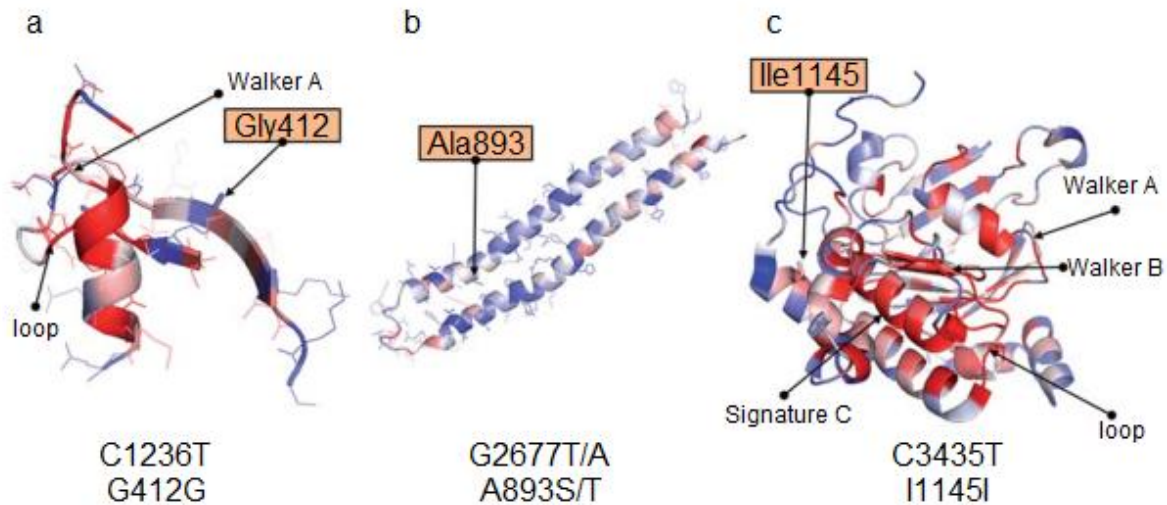


Figura 9: Locación de los polimorfismos en la proteína: a) *C1236T* (*G412G*), b) *G2677T/A* (*A893S/T*), c) *C3435T* (*I1145I*) (Modificado de Wolf et al., 2011).

### 3) CYP3A5

El término citocromo P450 se refiere al hecho de que estas enzimas tienen un pico de absorción de luz a 450 nm cuando se unen al monóxido de carbono (Ebi, 2022).

Las enzimas del citocromo P450 son una superfamilia de monooxigenasas que contienen un grupo hemo. En los mamíferos, estas proteínas se encuentran principalmente en microsomas de hepatocitos y otros tipos de células, donde oxidan esteroides, ácidos grasos y xenobióticos, y son importantes para la desintoxicación y eliminación de diversos compuestos (Ebi, 2022).

Las enzimas CYP3A son las enzimas más abundantemente expresadas del citocromo P450 y son responsables del metabolismo de más del 50 % de todos los medicamentos clínicamente utilizados (OMIM, 2022).

#### 3.1) Función

Esta proteína se localiza en el retículo endoplasmático y su expresión es inducida por glucocorticoides y algunos agentes farmacológicos (NCBI, 2022).

Esta monooxigenasa del citocromo P450 está implicada en el metabolismo de las hormonas esteroides, corticoides y de las vitaminas. Mecánicamente, utiliza oxígeno molecular insertando un átomo de oxígeno en un sustrato, y reduciendo el segundo en una molécula de agua, con dos electrones proporcionados por NADPH a través del citocromo P450 reductasa (NADPH-hemoproteína reductasa). Cataliza la hidroxilación de los enlaces carbono-hidrógeno (ver figura 10) (Uniprot, 2022).

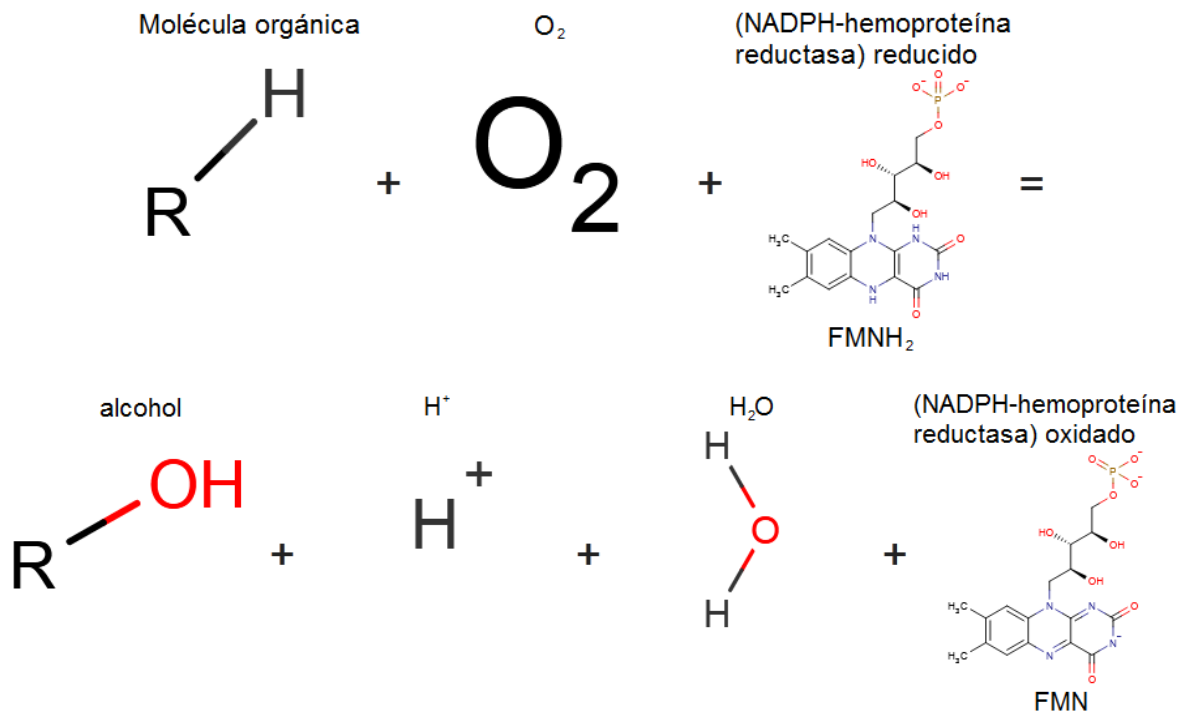


Figura 10: Reacción de oxidación catalizada por CYP3A5 (Modificada de Uniprot, 2022).

### 3.2) Estructura

El citocromo P450 es un grupo de proteínas de 400 a 530 aminoácidos, son proteínas hemo-tiolato. La conservación de la secuencia es relativamente baja dentro de la familia, solo hay 3 residuos conservados, pero su topografía general y plegamiento estructural se conservan altamente (NCBI, 2022). CYP es estructuralmente similar y altamente conservado en todas las formas de vida encontradas. La estructura terciaria está conformada en su mayoría por hélices- $\alpha$  (80%), un pequeño dominio con abundantes pliegues- $\beta$  (15%) y bucles y vueltas

(5%). A pesar de las diferencias en las secuencias de aminoácidos entre cada CYP, se conserva una alta flexibilidad y estabilidad en las estructuras secundarias necesarios para su función (Wright et al., 2019).

El núcleo conservado se compone de una bobina llamada 'meandro', la cual está constituida por un conjunto de cuatro hélices, formado por dos hélices J y dos K, y dos conjuntos de láminas beta. Estos constituyen el bucle de unión hemo con una cisteína absolutamente conservada que sirve como el quinto ligando para el hierro hemo, la ranura de transferencia de protones y un motivo EXXR en la hélice K (NCBI, 2022). Existen variaciones significativas en la construcción de las hélices- $\alpha$  diferenciándose en la longitud y tamaño de éstas, especialmente notable en las helices A, B, G y K siendo algunas de estas dos hélices más cortas unidas por un péptido corto (Wright et al., 2019).

Las normativas de la nomenclatura actual sugieren que los miembros de las nuevas familias de CYP comparten más del 40% de su identidad en aminoácidos, mientras que los miembros de las subfamilias comparten más del 60% de identidad en aminoácidos. Un comité de nomenclatura es el organismo encargado de hacer seguimiento y asignar nuevos nombres (Jaimes-Santoyo et al., 2014).

Entre las principales características de la familia de CYP3A es que sus hélices G'-G y F'-F están unidas por un péptido corto mientras que en otras familias estas hélices son una sola de un tamaño mayor, otorgándole a CYP3A una mayor flexibilidad en el sitio activo. La explicación a la prevalencia de esta mayor flexibilidad en las hélices de CYP3A es por su implicación en el metabolismo de una gran variedad de sustratos, lo cual requiere de un sitio activo flexible que facilite su unión (Wright et al., 2019).

Las principales diferencias entre CYP3A5 y CYP3A4 son dos: residuos diferentes en las posiciones 108, 120, 210 y 369; y una discrepancia en los residuos iónicos

en las posiciones 76, 106 y 374. Estas dos diferencias hacen que el sitio activo de CYP3A5 sea más largo y estrecho (ver figura 11) (Xue et al., 2019).



Figura 11: Estructura 3D de CYP3A5 en esquema de color arcoíris: Peso 57 109 Da; longitud de 502 a.a. Contiene grupo Hemo, medio glicerol. (Tomado de SWISS-MODEL, 2022).

### 3.3) Genética

Al examinar una biblioteca de ADNc hepático con CYP3A4 como sonda, Toshifumi Aoyama aisló un ADNc que codificaba para CYP3A5, que denominaron PCN3. El análisis de inmunoblot de microsomas hepáticos mostró que CYP3A5 se expresa como una proteína de 52,5 kDa, mientras que CYP3A4 migra como una proteína de 52,0 kDa, esto dado que comparten 85% de similitud entre sí (OMIM, 2022).

El CYP3A5 es codificado por el gen del mismo nombre, que está localizado en el cromosoma 7q21, produce un transcrito de 1720 pb de 13 exones, los cuales codifican para una proteína de 502 aminoácidos. Se conocen algunas variantes en las regiones intrónicas, las cuales afectan el empalme del ARN mensajero alterando la función de la proteína (García, 2013).

La expresión de CYP3A5 es regulada por factores genéticos fisiopatológicos y epigenéticos. La variabilidad genética a nivel de expresión o función de los CYP3A5 tienen un gran efecto en la eficacia de los fármacos y en la transformación de algunos de ellos a sus especies activas (García, 2013).

### 3.3.1 Polimorfismos de CYP3A5

Las diferencias en el metabolismo de fármacos pueden conducir a una severa toxicidad o, por el contrario, a una resistencia a tratamientos por la alteración en la relación entre la dosis y la concentración sanguínea del fármaco. Esto ha sido explicado en función de las modificaciones genéticas (polimorfismos) en los genes que codifica a esta proteína (García, 2013).

Se conocen algunas variantes en las regiones intrónicas, las cuales afectan el empalme del ARNm alterando la función de la proteína, entre ellas la variante alélica CYP3A5\*3. El CYP3A5\*3 es uno de los polimorfismos más estudiados en relación al metabolismo de fármacos. Este polimorfismo se debe al cambio de una adenina (A) por una guanina (G) en la posición 6986 del gen (A6986G o también identificado como rs776746), lo que produce un codón prematuro de paro en el exón 3, promoviendo la producción de una proteína no funcional ver figura 11 (García, 2013).

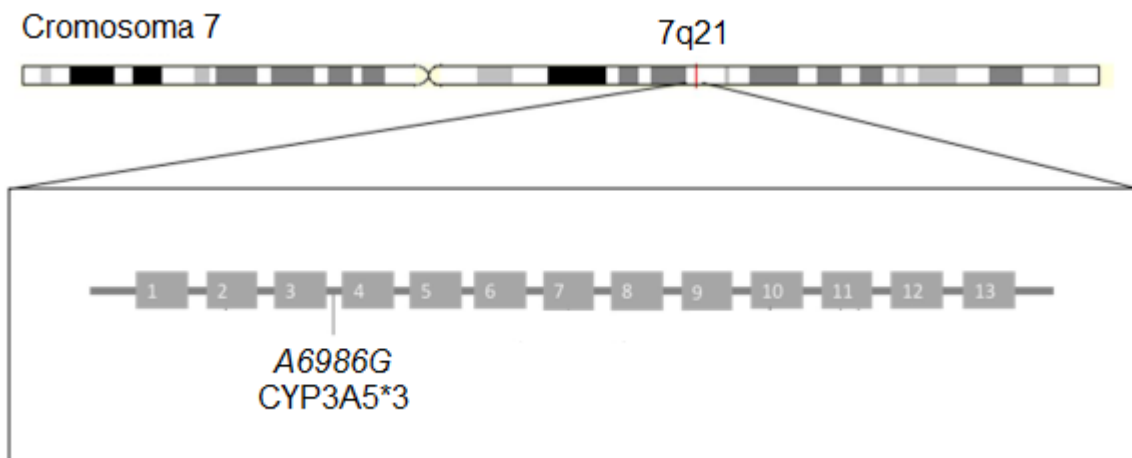


Figura 12: Localización del Polimorfismo A6986G (Modificado de Saiz et al., 2018).



#### IV) JUSTIFICACIÓN

La Neuromielitis Óptica es una enfermedad poco frecuente en población mexicana, presentándose con una prevalencia de 1/100 000 habitantes (Vásquez, 2018), pero al ser una enfermedad crónica con ataques agudos altamente incapacitantes es importante mantener una medicación adecuada a base de corticosteroides.

Entre los factores que intervienen en el óptimo tratamiento de esta enfermedad se encuentran el transporte y el metabolismo de estos fármacos, los cuales son llevados a cabo principalmente por la glucoproteína-p y CYP3A5 respectivamente. Por una parte, *ABCB1* codifica para una proteína transportadora importante a nivel de barrera hematoencefálica: la glucoproteína P. Un desequilibrio en la disponibilidad o función de la glucoproteína P podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de NMO debido a la acumulación de sustratos endógenos y exógenos en las células de la barrera hematoencefálicas. Por lo que respecta a *CYP3A5* este gen codifica para una proteína metabolizadora del mismo nombre, la importancia de ella y su relación con la NMO está en su amplio rango de sustratos que metaboliza.

La eficacia de estas proteínas está influenciada por polimorfismos siendo los más importantes C1236T, G2677T/A y C3435T para *ABCB1* que codifica para la glucoproteína-P y A6986G para *CYP3A5*, el determinar dichos polimorfismos en pacientes mexicanos con NMO podría contribuir a que la terapia farmacológica sea más eficiente, y para ello el primer paso es conocer las frecuencias alélicas y genotípicas para tales SNPs en esta muestra de estudio para poder compararla con otros estudios.

#### V) HIPÓTESIS

Se espera que la frecuencia de variantes genotípicas y alélicas de los polimorfismos en los genes *ABCB1* y *CYP3A5* en los pacientes con NMO de este estudio es mayor que la reportada en personas sanas.

## VI) OBJETIVOS

### 1) General:

Determinar los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T de *ABCB1* y A6986G de *CYP3A5* en una muestra de pacientes mexicanos con Neuromielitis Óptica.

### 2) Específicos:

- Genotipificar los polimorfismos C1236T, C3435T y A6986G mediante la técnica de PCR-RFLP en pacientes mexicanos con neuromielitis óptica
- Genotipificar el polimorfismo G2677T/A mediante la técnica de secuenciación de Sanger en pacientes mexicanos con neuromielitis óptica
- Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T en pacientes mexicanos con neuromielitis óptica
- Determinar la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo A6986G de *CYP3A5* en pacientes mexicanos con neuromielitis óptica
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas con las reportadas en otros estudios de población mexicana

## VII) MATERIAL Y MÉTODOS

### 1) Población de estudio

Se realizó un estudio de casos y controles, transversal y retrospectivo. La población de estudio quedó conformada de la siguiente manera:

- Criterios de inclusión de los casos: Participan pacientes cuyo diagnóstico final sea de NMO (se eliminan en caso de cambiar), de ambos géneros, sin distinción de edad, y cuya nacionalidad sea mexicana con padres y abuelos igualmente de nacionalidad mexicana.

#### 1.1) Procedencia de la población

- Población de casos: Las muestras se obtuvieron del banco de ADN del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (por sus siglas INNNMVS).
- Población control: Las frecuencias alélicas y genotípicas de la población control fueron tomadas del estudio realizado por Ortega et al. (2015) para el gen *ABCB1* y por Fricke et al. (2016) para el gen *CYP3A5*.

#### 1.2) Consideraciones éticas

Este protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía para garantizar el respeto de los derechos humanos de los pacientes. La información proporcionada por los pacientes, así como los resultados obtenidos de la investigación se manejaron de manera confidencial y con fines de investigación únicamente. Todos los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado, que explica de forma adecuada y entendible cual es el fin de utilizar los datos.

## 2) Evaluación de ADN

Las muestras fueron evaluadas en cuanto a integridad y concentración a través de técnicas de electroforesis y con espectrofotometría respectivamente.

### 2.1) Cuantificación

Se determinó la concentración de las muestras de ADN mediante espectrofotometría de luz UV en el espectrofotómetro Jenway Genova Nano serie 73. Se efectuó una calibración que, de acuerdo con las especificaciones del equipo y la muestra, fueron realizadas con 3  $\mu$ l de agua inyectable. Para la medición se utilizaron 3  $\mu$ l de la muestra en el lector.

Se realizó la lectura a 260nm para la cuantificación de ADN debido a que en el espectro de absorción éste último se encuentra a esa longitud de onda. Comúnmente se realizan lecturas de 280nm y 230nm, esto para determinar la presencia de contaminantes en las muestras. Se utilizó una relación 260/280 para determinar si existen proteínas contaminantes, el resultado de este cociente debe estar en el rango de 1.8 a 2.0 para una muestra con una pureza permisible. Por otro lado, se utiliza la relación 260/230 para determinar el contenido de sales o carbohidratos, el resultado de este cociente debe estar en el rango de 1.9 a 2.1 para una muestra con buena pureza.

La concentración de ADN ideal para poder realizar la amplificación mediante PCR oscila entre los 200 y 300 ng/ $\mu$ l. Si alguna muestra presenta concentración superior a ese rango, esta se diluye para obtener la concentración de trabajo.

### 2.2) Integridad

Para la integridad se realizaron electroforesis en horizontal con agarosa al 0.8% de concentración con buffer TBE 0.5X. Se utilizaron 2  $\mu$ l de ADN genómico y se le

agregaron 2  $\mu$ l colorante de carga y 2  $\mu$ l GelRed 3X. Terminado el tiempo de electroforesis se procedió a visualizar el gel en transiluminador de luz UV, lo ideal es que se visualice una sola banda de alto peso molecular sin degradación, en caso de la existencia de barrido se toma en cuenta la intensidad del brillo del barrido y la intensidad y nitidez de la banda de alto peso molecular para determinar el grado de degradación y si es aún viable usar la alícuota.

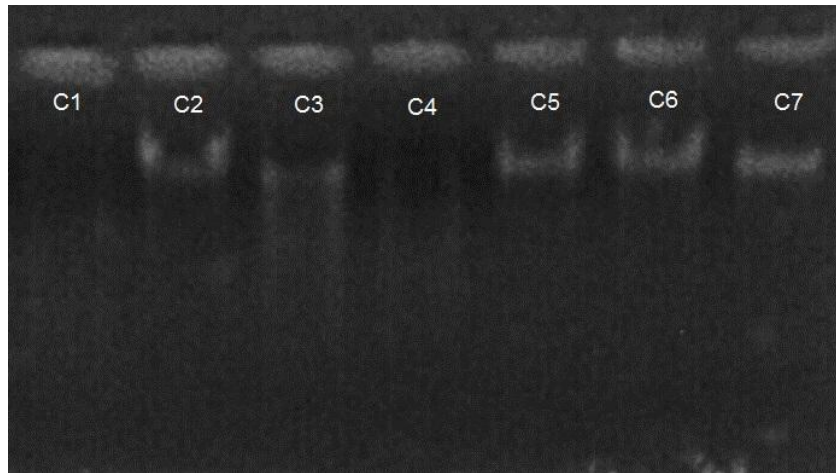


Figura 13: Evaluación de integridad cualitativa de ADN genómico: C1: 1, C2: 4, C3: 3, C4: 2, C5: 4, C6: 5, C7: 5. Donde 1 es muy mala y 5 es muy buena. Foto obtenida en fotodocumentador.

### 3) Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final

Se utilizó la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de punto final, con el fin de amplificar los polimorfismos *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* de *ABCB1* y el *A6986G* de *CYP3A5* de las muestras seleccionadas. Cada reacción de amplificación incluyó un control negativo sin ADN que verifica que la mezcla de reacción no se contaminó con ADN ajeno a la muestra y que asegura que el producto amplificado es el de interés.

### 3.1) Cebadores

Para realizar la amplificación se utilizaron los *cebadores* que se muestran en la tabla 2

Tabla 2: Cebadores utilizados para cada uno de los fragmentos de interés

Polimorfismo	Cebadores		Tm	Tamaño del amplicón
C1236T	F	5' TATCCTGTCTCTGTGAATTGCC 3'	47 °C	370 pb
	R	5' CCTGACTCACACACCAATG 3'	56 °C	
G2677T/A	F	5' TGCAGGCTATAGGTTCCAGG 3'	57 °C	220 pb
	R	5' GTTTGACTCACCTTCCCAG 3'	53 °C	
C3435T	F	5' TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG 3'	55 °C	197 pb
	R	5' AAGGCATGTATGTTGGCCTC 3'	56 °C	
A6986G	F	5' CATCAGTTAGTAGACAGATGA 3'	48 °C	293 pb
	R	5' GGTCCAAACAGGGAAGAAATA 3'	52 °C	

F: Forward, R: Reverse

### 3.2) Reacción de PCR

La mezcla de reacción para los polimorfismos de *ABCB1* se realizó como se indica en la tabla 3:

Tabla 3: Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de *ABCB1*

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
Agua	-----	4.5	-----
<i>Cebador Forward</i>	6.1 ng/µl	0.7	0.25 ng/µl
<i>Cebador Reverse</i>	6.1 ng/µl	0.7	0.25 ng/µl
Master Mix de QIAGEN	2X	8.5	1X
ADN genómico	40-240 ng/µl	0.5 – 3.0	7.7 ng/µl
Volumen Total	-----	14.9 – 17.4	-----

La mezcla de reacción para el polimorfismo de *CYP3A5*\*3 se realizó de acuerdo a la tabla 4

Tabla 4: Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de *CYP3A5*\*3

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
Agua	-----	4.5	-----
<i>Cebador Forward</i>	20 ng/µl	0.7	0.84 ng/µl
<i>Cebador Reverse</i>	20 ng/µl	0.7	0.84 ng/µl
Master Mix	2 X	8.5	1 X
ADN genómico	40-240 ng/µl	0.5 – 3.0	7.7 ng/µl
Volumen Total	-----	14.9 – 17.4	-----

Se utilizó un termociclador el cual se programó para dar las condiciones necesarias para las variantes *ABCB1* y *CYP3A5* las cuales se observan en la tabla 5:

Tabla 5: Condiciones necesarias para la reacción de amplificación

Gen	<i>ABCB1</i>			<i>CYP3A5</i>
SNP	<i>C1236T</i>	<i>G2677T/A</i>	<i>C3435T</i>	<i>A6986G</i>
Fase				
Desnaturalización inicial	95°C / 2'	95°C / 2'	95°C / 2'	94°C / 3'
Ciclos	45	40	40	40
Desnaturalización	94°C / 30''	94°C / 30''	94°C / 30''	94°C / 20''
Alineación	54°C / 30''	60°C / 30''	60°C / 30''	47.5°C / 40''
Elongación	72°C / 30''	72°C / 30''	72°C / 30''	72°C / 40''
Elongación Final	72°C / 7'	72°C / 5'	72°C / 5'	72° / 5'
Conservación	4°C / ∞	4°C / ∞	4°C / ∞	4°C / ∞

### 3.3) Verificación de Productos de PCR

Se utilizó electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0 % con buffer TBE 0.5 X. Para la preparación de la muestra se realizó una mezcla de 2µl de producto de PCR, 2 µl de buffer de carga (mezcla de xilencianol 0.25%, azul de bromofenol 0.25% y glicerol 30%) y 2 µl de GelRed 3X dejándose correr por 20 min a 100 V.

Para la revelación del gel de agarosa se analizó por medio de luz UV con ayuda de un transiluminador para verificar que se haya llevado a cabo la reacción de PCR.

### 4) Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica

Se utilizó la técnica de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) la cual se realiza haciendo uso de una enzima de restricción que reconoce secuencias específicas de ADN. Se emplearon enzimas de restricción cuyos sitios de reconocimiento coincidieran con las variantes *C1238T*, *C3435T* y *A6986G*, de modo que la presencia o ausencia del polimorfismo generará ganancia o pérdida del sitio de corte.

#### 4.1) Selección de Enzima

Se seleccionó la enzima de acuerdo a la secuencia en la que se encuentra el polimorfismo de interés y a la pérdida o ganancia de sitio de reconocimiento y que generó un corte (ver figuras: 14, 15, 16)





Figura 14: Producto de amplificación del polimorfismo *C1236T* del gen *ABCB1*. En el recuadro se observa el sitio de reconocimiento de la enzima *HaeIII* y la forma del corte se resalta con una línea roja, el nucleótido del polimorfismo se destaca en color rojo. Imagen obtenida del programa SnapGene 1.1.3

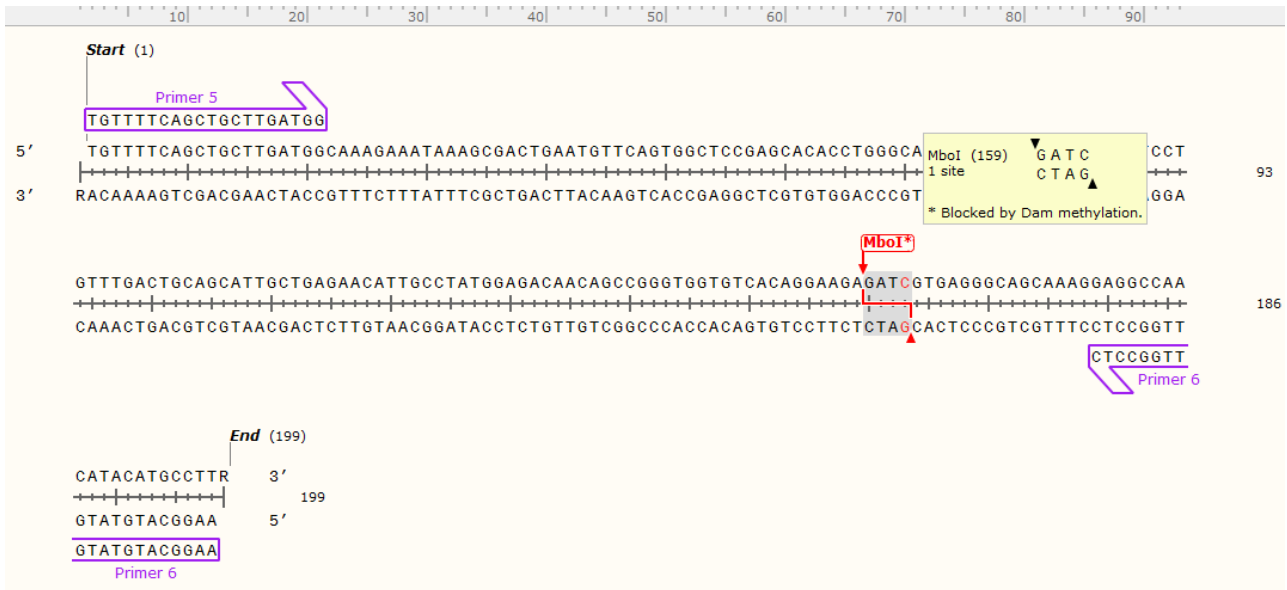


Figura 15: Producto de amplificación del polimorfismo *C3435T* del gen *ABCB1*. En el recuadro se observa el sitio de reconocimiento de la enzima *MboI* y la forma del corte se resalta con una línea roja, el nucleótido del polimorfismo se destaca en color rojo. Imagen obtenida del programa SnapGene 1.1.3



Figura 16: Producto de amplificación del polimorfismo A6986G del gen *CYP3A5*. En el recuadro se observa el sitio de reconocimiento de la enzima *SspI* y la forma del corte se resalta con una línea roja, el nucleótido del polimorfismo se destaca en color rojo. Imagen obtenida del programa SnapGene 1.1.3

#### 4.2) Mezcla de reacción

Se realizaron mezclas de reacción de acuerdo con la tabla 6 y se incubaron a 37°C durante 4 horas

Tabla 6: Mezcla de reacción para RFLP

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
Agua	7.8	-----
Buffer*	2.0	1X
Enzima**	0.2	2.0U/µl
ADN amplificado	10	-----
Volumen Total	20	-----

\*Buffer específico de cada enzima.

\*\*Enzima específica para cada polimorfismo

#### 4.3) Electroforesis

El gel de poliacrilamida se preparó de acuerdo con las especificaciones en la tabla 7 y en agitación constante:

Tabla 7: Mezcla para preparación de gel de poliacrilamida

<b>Reactivo</b>	<b>C1236T</b>	<b>C3435T</b>	<b>A6986G</b>
<b>Agua</b>	45.2ml	45.2ml	40ml
<b>TBE10X</b>	7ml	7ml	7ml
<b>Bis-acrilamida (40%)</b>	17ml	17ml	22.1ml
<b>Persulfato de Amonio (10%)</b>	700µl	700µl	700µl
<b>Temed*</b>	42µl	42µl	42µl
<b>Concentración Final</b>	10%	10%	13%

\* Se agrega al final

A 20 µl de ADN amplificado y digerido se le agregaron 9 µl buffer de carga y 6 µl GelRed 3 X de Sigma, además en cada corrida se agregaron dos controles negativos, que consistieron en ADN amplificado sin digerir y un marcador de peso molecular para verificar el tamaño. Se dejó correr por un tiempo aproximado de 3 horas, una vez transcurrido el tiempo de electroforesis se procedió a visualizar el gel en un fotodocumentador.

#### 5) Secuenciación de Sanger

Para secuenciar el polimorfismo de *G2677T/A* se usó el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems cuyos terminadores son ddNTPs marcados con fluorocromos.

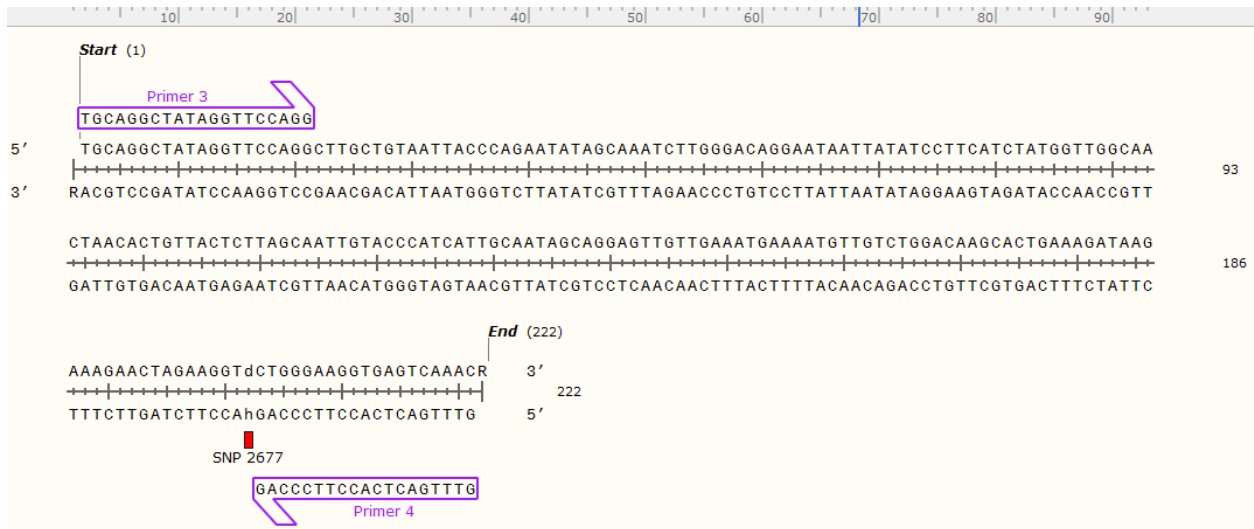


Figura 17: Producto de amplificación del polimorfismo *G2677T/A* del gen *ABCB1*. En el recuadro rojo se señala el sitio de interés para reconocimiento en el electroferograma, señalado con la letra “d” para referirse a los nucleótidos posibles (Guanina, Timina o Adenina). Imagen obtenida del programa SnapGene 1.1.3

### 5.1) Reacción de Secuenciación

La mezcla de reacción para el polimorfismo *G2677T/A* de *ABCB1* se realizó de acuerdo a la tabla 8.

Tabla 8: Mezcla de reacción de secuenciación

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)
Agua	-----	6.5
<i>Cebador Forward</i>	6.1ng/µl	1.0
Buffer*	5X	4.5
BigDye	-----	1.1
ADN Amplificado	-----	5.0 – 9.0
Volumen Total	-----	18.1 – 22.1

\*Buffer incluido en el kit de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems

Se utilizó un termociclador el cual se programó para dar las condiciones necesarias para la reacción de secuenciación las cuales se observan en la tabla 9.

Tabla 9: Condiciones para reacción de secuenciación

<b>Fase</b>	<b>Variante</b>	<b>G2677T/A</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>		96°C / 30''
<b>Ciclos</b>		26
<b>Desnaturalización</b>		95°C / 30''
<b>Alineación</b>		50°C / 10''
<b>Elongación</b>		60°C / 4'
<b>Elongación Final</b>		72°C / 1'
<b>Conservación</b>		4°C / ∞

## 5.2) Purificación de Reacción de Secuenciación

Una vez terminada la reacción de secuenciación se procedió a purificar las muestras. La técnica que se usó fue por columnas centri-sep con Sephadex G-50 de Sigma.

Se pesaron 0.05 g de Sephadex G-50 en una balanza analítica y posteriormente se colocó en una columna de separación de 1ml, cada columna se hidrató con 800µl de agua inyectable, se agitaron y se retiraron todas las burbujas formadas, se dejaron reposar por 24 horas para que la hidratación del Sephadex sea uniforme. Transcurrido el tiempo se confirmó la ausencia de burbujas y se retiraron las dos tapas de la columna. Se colocaron sobre tubos colectores y se centrifugaron a 1500 rpm por 2 min para quitar el exceso de agua y tener la columna lista para la purificación, se sustituyó el tubo colector por un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se colocó la reacción de secuencia al centro del Sephadex y se procedió a centrifugar a 3000

rpm por 2 min obteniendo el eluido en el tubo Eppendorf, posteriormente se secó la muestra en un *speedvac* (secado al vacío con centrifugación) hasta que no hubiera rastro de agua.

### 5.3) Obtención de electroferogramas

La muestra se resuspendió con 15 µl de formamida, tallando la pared del tubo con la punta de la micropipeta y procurando llevarse todo el contenido y se pasó a una placa de lectura de 96 pozos usando un pozo para cada muestra, se le colocó una septa de silicón y se centrifugó a 1500 rpm por 1 min. Posteriormente se pasó a un termociclador para calentar las muestras a 96 °C de 5-10 min, para su montaje en el secuenciador el cual realizó una electroforesis capilar para obtener los datos de la secuencia.

Una vez obtenido los archivos se usó el programa Sequencing Analysis 5.3 para analizar los datos y obtener un electroferograma, el cual se comparó con una secuencia obtenida de una base de datos y se obtuvo el genotipo.

### 5.4) Procedencia de la Población Control

Para llevar a cabo el análisis de asociación se usaron los controles de Ortega-Vázquez et al., 2015 para *ABCB1* y de Fricke-Galindo et al., 2016 para *CYP3A5* porque fueron obtenidos en una colaboración con el INNN en un periodo de tiempo similar al que se trabajaron las muestras de pacientes con NMO.

## VIII) RESULTADOS

Se presentan imágenes de los RFLPs obtenidos para los SNPs C1236T, C3435T y A6986G junto con tablas que muestran el tamaño de los fragmentos correspondientes a cada genotipo para su correcta distinción



Figura:18: a) RFLP del polimorfismo *C1236T* del gen *ABCB1*: C1: -, C2: CC, C3: -, C4: TT, C5: CT, C6: CC, C7: -, C8: MPM, C9: CC, C10: TT, C11: CT, C12: TT, C13: TT, C14: TT. b) Marcador de Peso Molecular VIII de Roche. En la tabla 10 se presentan los tamaños de los fragmentos. Foto obtenida en fotodocumentador.

Tabla 10: Tamaño de los fragmentos de restricción del polimorfismo *C1236T*

Polimorfismo	Enzima	Secuencia de reconocimiento	Fragmentos y Genotipo
<b><i>C1236T</i></b>	<i>HaeIII</i>	GG   CC CC   GG	CC=272, 63, 35 pb CT=272, 98, 63, 35 pb TT=272, 98 pb

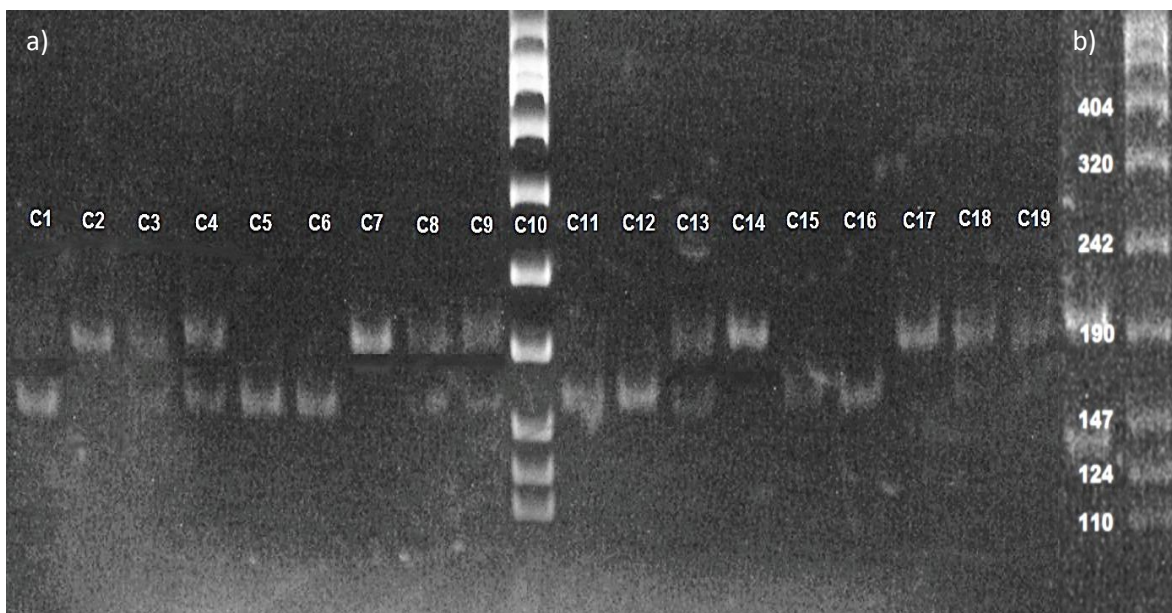


Figura 19: a) RFLP del polimorfismo *C3435T* del gen *ABCB1*: C1: CC, C2: TT, C3: CT, C4: CT, C5: CC, C6: CC, C7: TT, C8: CT, C9: CT, C10: MPM, C11: CC, C12: CC, C13: CT, C14: TT, C15: CC, C16: CC, C17: TT, C18: CT, C19: CT. b) Marcador de Peso Molecular VIII de Roche. En la tabla 11 se presentan los tamaños de los fragmentos. Foto obtenida en fotodocumentador.

Tabla 11: Tamaño de los fragmentos de restricción del polimorfismo *C3435T*

Polimorfismo	Enzima	Secuencia de reconocimiento	Fragmentos y Genotipo
<b><i>C3435T</i></b>	<i>Mbol</i>	<pre> ┌ GATC └ CTAG </pre>	CC=158, 39 pb CT=197, 158, 39 pb TT=197 pb



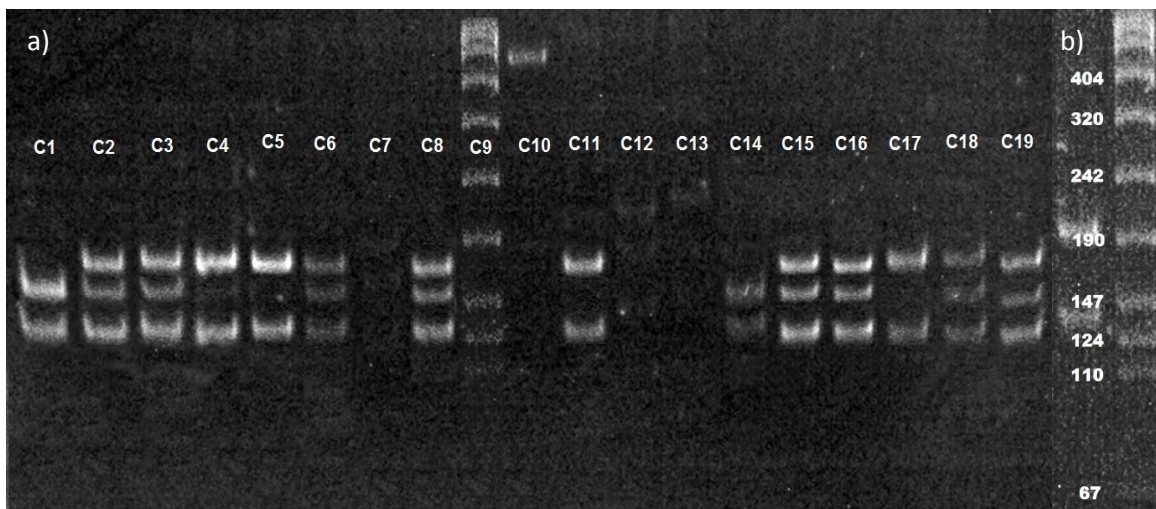


Figura 20: a) RFLP del polimorfismo A6986G del gen *CYP3A5*: C1: AA, C2: AG, C3: AG, C4: GG, C5: GG, C6: AG, C7: -, C8: AG, C9: MPM, C10: control de negativo, C11: GG, C12: -, C13: -, C14: AA, C15: AG, C16: AG, C17: GG, C18: AG, C19: AG. b) Marcador de Peso Molecular VIII de Roche. En la tabla 12 se presentan los tamaños de los fragmentos. Foto obtenida en fotodocumentador.

Tabla 12: Tamaño de los fragmentos de restricción del polimorfismo A6986G

Polimorfismo	Enzima	Secuencia de reconocimiento	Fragmentos y Genotipo
<b>A6986G</b>	<i>SspI</i>	ATT   ATT TAA   TAA	AA=148, 125, 20 pb AG=168, 148, 125, 20 pb GG=168, 125 pb

A continuación, se presentan imágenes de los electroferogramas correspondientes a las variantes identificadas en la posición 2677

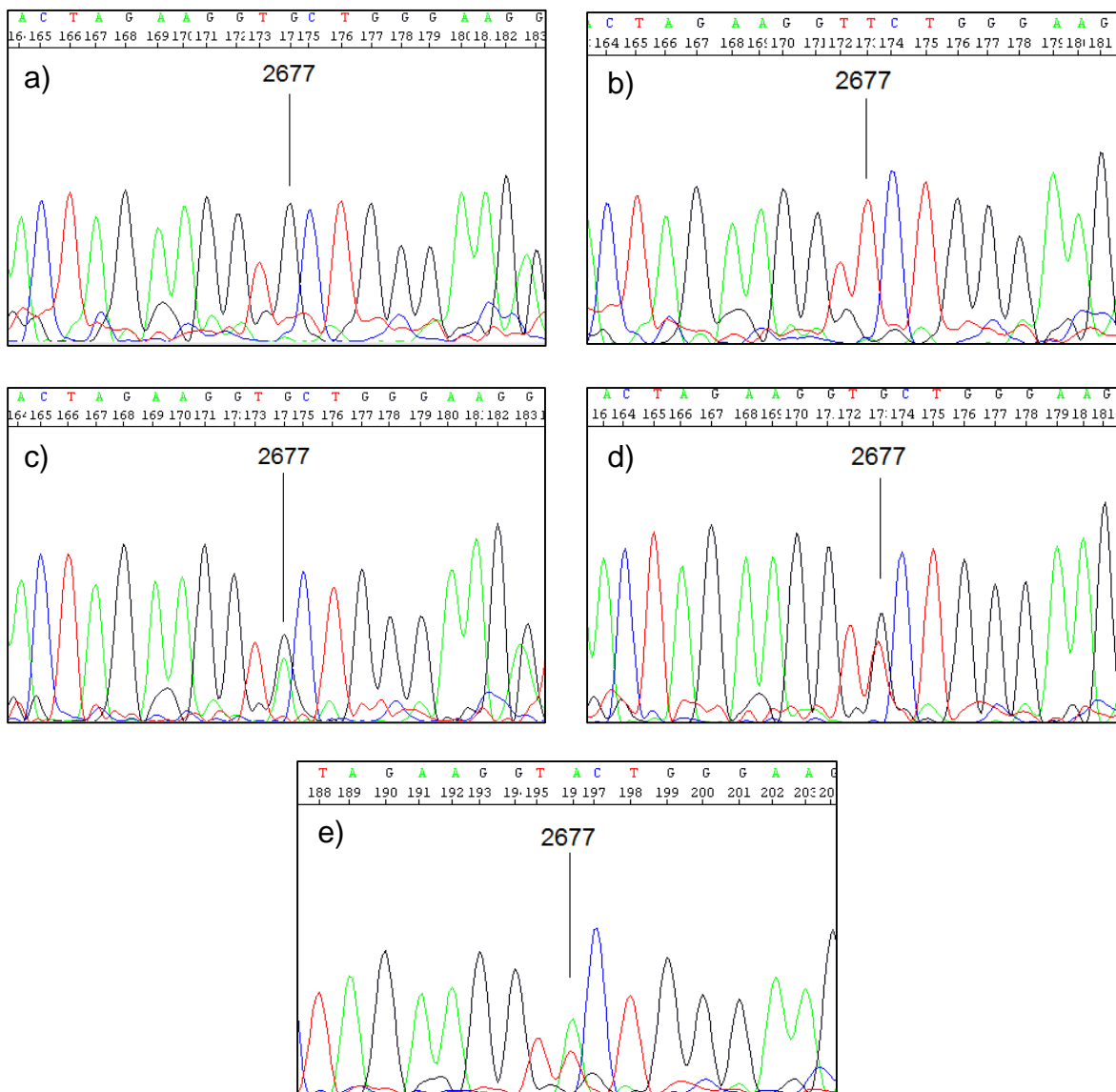


Figura 21: Electroferogramas resultantes de la secuencia *G2677A/T* del gen *ABCB1*. Se señala el sitio de interés a) Genotipo GG, b) Genotipo TT, c) Genotipo AG, d) Genotipo GT, e) Genotipo AT. Electroferogramas obtenidos del programa Sequencing Analysis 5.3

Una vez que se obtuvieron todos los genotipos se realizó un análisis estadístico de significancia y asociación usando la prueba de  $\chi^2$  y la prueba de OR (ver tabla 13 y 14)

Tabla 13: Frecuencia y análisis de asociación de genotipos y alelos para *ABCB1*

Variante	Caso		Control		Análisis de Asociación				
	n	%	n	%	OR	IC 95%		p	$\chi^2$
<b>C1236T</b>									
<b>CC</b>	12	24.00	71	23.67	1.019	0.505	2.054	0.959	0.003
<b>CT</b>	18	36.00	155	51.67	0.526	0.283	0.978	0.04*	4.208
<b>TT</b>	20	40.00	74	24.67	2.036	1.091	3.799	0.024*	5.129
<b>Total</b>	50	100.00	300	100.00					
<b>C</b>	42	42.00	297	49.50	0.739	0.481	1.134	0.165	1.93
<b>T</b>	58	58.00	303	50.50	1.354	0.882	2.077	0.165	1.93
<b>Total</b>	100	100.00	600	100.00					
<b>G2677T/A</b>									
<b>GG</b>	15	30.00	69	23.00	1.435	0.74	2.781	0.283	1.151
<b>AA</b>	0	0.00	0	0.00					
<b>TT</b>	11	22.00	49	16.33	1.445	0.692	3.016	0.325	0.969
<b>GA</b>	3	6.00	28	9.33	0.62	0.181	2.122	0.442	0.59
<b>GT</b>	18	36.00	137	45.67	0.669	0.36	1.245	0.203	1.623
<b>AT</b>	3	6.00	17	5.67	1.063	0.3	3.767	0.925	0.009
<b>Total</b>	50	100.00	300	100.00					
<b>G</b>	51	51.00	303	50.50	1.02	0.668	1.558	0.926	0.009
<b>A</b>	6	6.00	45	7.50	0.787	0.327	1.897	0.593	0.286
<b>T</b>	43	43.00	252	42.00	1.042	0.679	1.598	0.851	0.035
<b>Total</b>	100	100.00	600	100.00					
<b>C3435T</b>									
<b>CC</b>	7	14.00	70	23.33	0.535	0.23	1.242	0.14	2.176
<b>CT</b>	24	48.00	155	51.67	0.864	0.474	1.572	0.631	0.231
<b>TT</b>	19	38.00	75	25.00	1.839	0.981	3.446	0.055	3.687
<b>Total</b>	50	100.00	300	100.00					
<b>C</b>	38	38.00	295	49.17	0.634	0.41	0.978	0.038	4.285
<b>T</b>	62	62.00	305	50.83	1.578	1.022	2.437	0.038	4.285
<b>Total</b>	100	100.00	600	100.00					

OR: Razón de Oportunidades; IC: Intervalo de Confianza; p: significancia estadística  $\chi^2$ : chi cuadrada

\*Diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de asociación obtenidos con el programa SPSS 26v.

Controles de *ABCB1* obtenidos de (Ortega et al., 2015).

Tabla 14: Frecuencia y análisis de asociación de genotipos y alelos para *CYP3A5*

Variante	Caso		Control		Análisis de Asociación				
	n	%	n	%	OR	IC 95%		p	$\chi^2$
<b>A6986G</b>									
<b>AA</b>	5	10.87	18	6.00	1.911	0.673	5.425	0.217	1.524
<b>AG</b>	20	43.48	122	40.67	1.122	0.6	2.101	0.718	0.13
<b>GG</b>	21	45.65	160	53.33	0.735	0.394	1.37	0.331	0.943
<b>Total</b>	46	100.00	300	100.00					
<b>A</b>	30	32.61	158	26.33	1.354	0.844	2.171	0.208	1.588
<b>G</b>	62	67.39	442	73.67	0.739	0.461	1.185	0.208	1.588
<b>Total</b>	92	100.00	600	100.00					

OR: Razón de Oportunidades; IC: Intervalo de Confianza; p: significancia estadística  $\chi^2$ : chi cuadrada  
 Análisis de asociación obtenidos con el programa SPSS 26v.

Controles de *CYP3A5* obtenidos de (Fricke et al., 2016)

La mayoría de los resultados no muestran una tendencia clara a que cierto genotipo o alelo esté asociada a la enfermedad de NMO de manera significativa, a excepción de *C1236T* que muestra asociación de riesgo y protección dependiendo el genotipo; y el *C3435T* mostrando relación de riesgo dependiendo del alelo presente

## IX) DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que el genotipo más frecuente del SNP C1236T de *ABCB1* en el grupo con NMO es el 1236TT y el alelo de mayor frecuencia es el 1236T; a diferencia del grupo control cuyo genotipo más abundante es el 1236CT y no hay diferencias entre las frecuencias alélicas con respecto al grupo con NMO.

Por lo que respecta al análisis de asociación, éste mostró que existe una diferencia significativa entre el genotipo 1236TT del grupo con NMO y los controles, ya que el valor de OR obtenido fue de 2.036 (IC95% 1.091-3.799) por lo que con base a este resultado se puede establecer una asociación de riesgo para el desarrollo de la NMO. Por otra parte, se mostró que existe una diferencia significativa entre el genotipo 1236CT del grupo con NMO y los controles, el valor de OR obtenido fue de 0.526 (IC95% 0.283-0.978) por lo que se establece una asociación protectora; teniendo en cuenta la asociación de riesgo del genotipo 1236TT significaría que el efecto protector contra la NMO se encuentra en el alelo 1236C.

En condiciones normales la glucoproteína P expulsa gran variedad de sustancias endógenas y exógenas del interior al exterior de la célula. El SNP C1236T resultó con significancia estadística, sin embargo, éste cambio representa una mutación sinónima, en la que la proteína final no tiene alteración alguna en la secuencia de aminoácidos por lo que el efecto de este SNP podría ocurrir a nivel de ARNm o en la traducción. García, (2013) y Vihinen, (2022) establecen dos posibles consecuencias de las variantes sinónimas: podrían pausar la traducción en el ribosoma debido a que se ve limitada la disponibilidad del ARNt y/o disminuir la actividad de la proteína debido a un cambio conformacional causado por un plegamiento incorrecto (García, 2013; Vihinen, 2022). Por otra parte, Guerrero et al. (2023) mencionan que la variante C1236T genera cambios conformacionales en el ARNm que conducen a inestabilidad y alteran la vida media de la proteína (Guerrero et al., 2023).

El SNP C3435T también es una mutación sinónima, la cual no genera un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. En los resultados obtenidos se encontró que el genotipo más abundante para casos con NMO y controles fue el 3435CT. En cuanto a las frecuencias alélicas entre los grupos, estas son muy similares. La frecuencia del genotipo 3435TT en el grupo con NMO es mayor comparada con los controles, sin embargo, esta diferencia no alcanza una significancia estadística al presentar una  $P=0.055$ , por lo que se debe ampliar la muestra. El alelo 3435T muestra una diferencia significativa entre el grupo de NMO y los controles, el valor de OR obtenido fue de 1.578 (IC95% 1.022-2.437) por lo que se establece una asociación de riesgo ( $P= 0.038$ ).

Guerrero et al. (2023) reportaron que el haplotipo (1236/2677/3435) más frecuente en población mexicana con enfermedad desmielinizante y controles es el TTT, seguido del haplotipo CGC, similar a poblaciones asiáticas (Guerrero et al., 2023). Genotípicamente, esto se traduce como la combinación de genotipos 1236TT/2677TT/3435TT es la más frecuente seguida de 1236CC/2677GG/3435CC, sin embargo, y volviendo a este estudio de casos con NMO, los genotipos 1236TT y 3435TT, así como el alelo 3435T, se comportan como factores de riesgo, mientras que el alelo C en ambos SNPs (1236 y 3435) parece actuar como protector. Esto sugiere que puede haber un grupo de sustratos de P-GP que en los casos de NMO pueden estar interactuando con algún factor endógeno y de alguna manera promover alguna alteración, mientras que para personas sanas y personas con enfermedades desmielinizantes diferentes a NMO pueden pasar inadvertidos, lo que puede ser menor en los portadores del alelo C para 1236 y 3435.

Guerrero et al. (2023) apoyan la idea de que uno de los mecanismos etiológicos de las enfermedades desmielinizantes puede ser el acúmulo de sustratos de P-GP dentro del SNC donde existe un ambiente lo suficientemente tóxico para degenerar el sistema (Guerrero et al., 2023), sin embargo, en el caso de la NMO podría haber una diferencia muy sutil entre los sustratos de P-GP, el acúmulo de los mismos y su interacción con otros factores genéticos y/o ambientales.

Varios estudios han reportado la importancia de analizar las combinaciones de genotipos ABCB1 para predecir la actividad de P-GP, la farmacocinética, la respuesta a tratamientos y la asociación a enfermedades (Guerrero et al., 2023), lo que sería de utilidad en un estudio más amplio sobre NMO.

Diversos estudios se han realizado a nivel mundial para estos SNPs, en los que se realiza una comparación de frecuencias genotípicas y alélicas en grupos de diferentes poblaciones. Los estudios poblacionales de estos SNPs han sido realizados principalmente en población sana o en población que ha tenido trasplantes renales y que están en tratamiento inmunosupresor. Las frecuencias alélicas de CYP3A5 y ABCB1 están influenciadas por la etnicidad por lo que no es raro encontrar diferencias dentro de un mismo país (ver tabla 15).

Comparando las frecuencias de mexicanos sanos del presente estudio se observan similitudes con los SNPs reportados por:

- Belmonte et al. (2018) en el C3435T para españoles.
- Favela et al. (2018) en el C1236T para mexicanos mayos; en el C3435T para mexicanos nahuas.
- Turolo et al. (2010) en el C1236T para rusos; en el G2677T/A para británicos caucásicos con trasplante renal; en el C3435T para españoles sanos; en el A6986G para británicos del sur de Asia.

Mientras que, comparando las frecuencias de los mexicanos con NMO del presente estudio se observan similitudes con los reportados por:

- Favela et al. (2018) en el C1236T para mexicanos mayas; en el C3435T para mexicanos huicholes.
- Turolo et al. (2010) en el C1236T para chilenos mapuche; en el G2677T/A para británicos caucásicos con trasplante renal; en el C3435T para indios sanos; en el A6986G para coreanos sanos.

Tabla 15: Comparación de frecuencias de diferentes poblaciones

Población	C1236T		G2677A/T			C3435T		A6986G		Referencia
	C	T	A	G	T	C	T	A	G	
<b>Casos</b>	0.42	0.58	0.06	0.51	0.43	0.38	0.62	0.3261	0.6739	Este estudio
<b>Controles</b>	0.495	0.505	0.075	0.505	0.42	0.4917	0.5083	0.2633	0.7367	
<b>Mexicanos Mayos</b>	0.4884	0.5116	0.0581	0.6163	0.3256	0.6047	0.3953	-	-	(Favela et al., 2018)
<b>Mexicanos Huicholes</b>	0.3065	0.6935	0.1129	0.2742	0.6129	0.3871	0.6129	-	-	
<b>Mexicanos Nahuas</b>	0.3077	0.6923	0	0.4808	0.5192	0.4808	0.5192	-	-	
<b>Mexicanos Mayas</b>	0.4268	0.5732	0.0854	0.4634	0.4512	0.5732	0.4268	-	-	
<b>Chilena Mapuche</b>	0.4	0.6	0.15	0.69	0.16	0.65	0.35	-	-	(Turolo et al., 2010)
<b>Británicos Caucásicos</b>	0.56	0.44	0.04	0.52	0.43	0.41	0.59	0.11	0.89	
<b>Indios</b>	0.33	0.67	0.07	0.29	0.6	0.37	0.63	-	-	
<b>Coreanos</b>	0.31	0.69	0.12	0.40	0.45	0.57	0.43	0.31	0.69	
<b>Rusos</b>	0.52	0.48	0.03	0.53	0.42	0.46	0.54	-	-	
<b>Españoles</b>	-	-	-	-	-	0.5	0.5	0.09	0.91	
<b>Británicos de Sur asia</b>	0.38	0.62	0.05	0.35	0.6	0.45	0.55	0.28	0.72	
<b>Españoles</b>	0.5777	0.4222	0.0135	0.5878	0.3986	0.5135	0.4864	0.1486	0.8513	(Belmonte et al., 2018)

- No se evaluó en este estudio

En el presente trabajo se tiene una población de estudio pequeña que podría repercutir en la precisión de los resultados afectando a la confianza de los datos obtenidos, también se podría ver el sesgo de cierta población que impide realizar cálculos tal y como pasó con el genotipo 2677AA el cual no se encontró.



## X) CONCLUSIONES

- El genotipo 1236TT y el alelo 3435T son factores de riesgo para el desarrollo de NMO en esta muestra de población mexicana, pero se debe ampliar la muestra para confirmar este hallazgo.
- El genotipo 1236CT actúa como factor de protección contra la NMO en esta muestra, pero un estudio más amplio sería de utilidad.
- No se encontró asociación genotípica ni alélica en los polimorfismos G2677T/A de ABCB1 y A6986G de CYP3A5 entre los grupos de estudio.

## XI) PROPUESTAS A FUTURO

- Para finalizar se propone aumentar la N poblacional para definir la significancia de los resultados, pues en el caso del genotipo se busca reforzar el resultado del polimorfismo C1236T.
- Siendo los corticosteroides inmunomoduladores endógenos y parte del tratamiento para la NMO, se podría hacer un estudio de metabolismo y biodisponibilidad en relación a los genotipos de la Glucoproteína-P y CYP3A5.

## XII) REFERENCIAS

- Alemán Iñiguez, J.M., Alemán-Iñiguez, V.A. and Díaz-Heredia, F. (2015) “Manejo de recaída en enfermedad de devic. primer Tratamiento exitoso, Reportado Con plasmaféresis en Ecuador; Revisión bibliográfica, actualidad Y Reporte de Caso,” *Revista Mexicana de Oftalmología*, 89(1), pp. 63–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mexoft.2014.08.002>.
- Ambudkar, S.V. *et al.* (1999) “Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the Multidrug transporter,” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), pp. 361–398. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361>.
- Belmonte, C. *et al.* (2018) “Influence of *cyp2d6*, *cyp3a4*, *cyp3a5* and *abcb1* polymorphisms on pharmacokinetics and safety of Aripiprazole in Healthy Volunteers,” *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 122(6), pp. 596–605. Available at: <https://doi.org/10.1111/bcpt.12960>.
- Bruscolini, A. *et al.* (2018) “Diagnosis and management of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders - an update,” *Autoimmunity Reviews*, 17(3), pp. 195–200. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.01.001>.
- Carnero Contentti, E. *et al.* (2013) “Neuromielitis óptica: Actualización Clínica Y Terapéutica,” *Neurología Argentina*, 5(4), pp. 259–269. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2013.08.008>.
- Chiquete, E. *et al.* (2010) “Neuromielitis óptica: Actualización Clínica,” *Revista de Neurología*, 51(05), p. 289. Available at: <https://doi.org/10.33588/rn.5105.2010268>.
- de Andrés, C. *et al.* (2015) “Cambios en las subpoblaciones de Linfocitos b y t en el título de anticuerpos anti-acuaporina-4 tras el tratamiento de un brote agudo con inmunoglobulinas y rituximab,” *Neurología*, 30(5), pp. 276–282. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2013.12.022>.

- Dean, M. (2001) "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily," *Genome Research*, 11(7), pp. 1156–1166. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.gr-1649r>.
- ebi. Recuperado el 13 de abril de 2022 de <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR008072/>.
- Escalante, M., Garza León, M.A. and Salinas Gallegos, J.L. (2006) "Neuritis óptica bilateral secundaria a tóxicos. Caso clínico," *Rev Mex Oftalmol*, 80(4), pp. 214–217.
- Favela-Mendoza, A.F. *et al.* (2018) "Genetic variability among Mexican mestizo and Amerindian populations based on three ABCB1 polymorphisms," *Molecular Biology Reports*, 45(6), pp. 2525–2533. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4419-x>.
- Fricke-Galindo, I. *et al.* (2016) "Allele and genotype frequencies of genes relevant to anti-epileptic drug therapy in Mexican-mestizo healthy volunteers," *Pharmacogenomics*, 17(17), pp. 1913–1930. Available at: <https://doi.org/10.2217/pgs-2016-0078>.
- Fung, K.L. and Gottesman, M.M. (2009) "A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5), pp. 860–871. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.02.014>.
- García Roca, M. (2013). *Correlación Del Genotipo MDR1(ABCB1) Y CYP3A5 Con El Perfil Farmacocinético Del Tacrolimus En Niños Con Trasplante Renal*. (tesis de maestría). Cinvestav, Distrito Federal.
- Guerrero Camacho, J. L., Corona Vázquez, T., Flores Rivera, J. J., Ochoa Morales, A., Martínez Ruano, L., Torres Ramírez de Arellano, I., Dávila Ortiz de Montellano, D. J., & Jara Prado, A. (2023). Variantes del Gen ABCB1 Como factores de Riesgo y factores moduladores de la edad de inicio en pacientes mexicanos con enfermedad desmielinizante. *Neurología*, 38(2), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.05.013>
- Helal, M., Obada, M., Elrazek, W. A., Safan, M., El-Hakim, T. A., & El-Said, H. (2017). Effect of ABCB1 (3435c>T) and CYP3A5 (6986a>g) genes

polymorphism on tacrolimus concentrations and dosage requirements in liver transplant patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 18(3), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2016.10.005>

- Iglesias Rodríguez, A., Gil, D., Félix Restrepo, J., & Iglesias Gamarra, A. (2011). Historia de la enfermedad de Devic. *Revista Colombiana De Reumatología*, 18(4), 271–284. [https://doi.org/10.1016/s0121-8123\(11\)70043-3](https://doi.org/10.1016/s0121-8123(11)70043-3)
- Jaimes-Santoyo, J., De Montesinos-Sampedro, A., Barbosa-Cobos, R. E., Moreno-Mutio, S., & Rodríguez-Ballesteros, D. (2014). El Citocromo P-450. *Rev Hosp Jua Mex*, 81(4), 250–256.
- Jarius, S., & Wildemann, B. (2017). Devic's disease before Devic: On the contribution of Friedrich Albin Schanz (1863–1923). *Journal of the Neurological Sciences*, 379, 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.05.044>
- Kim, Y., & Chen, J. (2018). Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science*, 359(6378), 915–919. <https://doi.org/10.1126/science.aar7389>
- Medina Rioja, R., Sánchez Jordán, A., Bertado Cortés, B., Martínez Cortés, C. E., & Martínez Marino, M. (2018). *Enfermedad De Devic Reporte De Caso y Revisión De Literatura*, 61(1), 26–32.
- Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – Recuperado el 10-10-2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5243>
- Lu S et al. (2020). "CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020.", *Nucleic Acids Res.* 48(D1): D265-D268. Recuperado el 05-05-2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/pfam00067>
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Numero: \*171050: Recuperado el 10-10-2019 Disponible en: <https://www.omim.org/entry/171050>

- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Numero: \*605325: Recuperado el 12-04-2022 Disponible en: <https://www.omim.org/entry/605325>
- Ortega-Vázquez, A., Dorado, P., Fricke-Galindo, I., Jung-Cook, H., Monroy-Jaramillo, N., Martínez-Juárez, I. E., Familiar-López, I., Peñas-Lledó, E., Llerena, A., & López-López, M. (2015). CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 genetic polymorphisms and phenytoin plasma concentrations in Mexican-mestizo patients with epilepsy. *The Pharmacogenomics Journal*, 16(3), 286–292. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.45>
- Pereira, W. L., Reiche, E. M., Kallaur, A. P., & Kaimen-Maciél, D. R. (2015). Epidemiological, clinical, and immunological characteristics of Neuromyelitis Optica: A Review. *Journal of the Neurological Sciences*, 355(1-2), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.05.034>
- The Pfam protein families database in 2019: S. El-Gebali, J. Mistry, A. Bateman, S.R. Eddy, A. Luciani, S.C. Potter, M. Qureshi, L.J. Richardson, G.A. Salazar, A. Smart, E.L.L. Sonnhammer, L. Hirsh, L. Paladin, D. Piovesan, S.C.E. Tosatto, R.D. Finn *Nucleic Acids Research* (2019) doi: 10.1093/nar/gky995 Recuperado el 22-10-2019 Disponible en: <http://pfam.xfam.org/family/PF00005>
- M. Whirl-Carrillo<sup>1</sup>, R. Huddart<sup>1</sup>, L. Gong, K. Sangkuhl, C.F. Thorn, R. Whaley and T.E. Klein. "An evidence-based framework for evaluating pharmacogenomics knowledge for personalized medicine" *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (2021) online ahead of print. Recuperado el 11-11-2019 Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/vip/PA166170352>
- Sigrist CJA, de Castro E, Cerutti L, Cucho BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I. New and continuing developments at PROSITE *Nucleic Acids Res.* 2012; doi: 10.1093/nar/gks1067 PubMed:23161676. Recuperado el 18-10-2019 Disponible en: <https://prosite.expasy.org/doc/PS00211>
- Saiz-Rodríguez, M., Ochoa, D., Herrador, C., Belmonte, C., Román, M., Alday, E., Koller, D., Zubiaur, P., Mejía, G., Hernández-Martínez, M., & Abad-Santos, F. (2018). Polymorphisms associated with fentanyl

pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse effects. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 124(3), 321–329. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13141>

- Sato, D. K., Nakashima, I., Takahashi, T., Misu, T., Waters, P., Kuroda, H., Nishiyama, S., Suzuki, C., Takai, Y., Fujihara, K., Itoyama, Y., & Aoki, M. (2013). Aquaporin-4 antibody-positive cases beyond current diagnostic criteria for NMO Spectrum Disorders. *Neurology*, 80(24), 2210–2216. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e318296ea08>
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 45, D313-D319 (2017). Recuperado el 18-04-2022 Disponible en <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P20815>
- Turolo, S., Tirelli, A. S., Ferrareso, M., Ghio, L., Belingheri, M., Groppali, E., Torresani, E., & Edefonti, A. (2010). Frequencies and roles of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms in Italian teenagers after kidney transplantation. *Pharmacological Reports*, 62(6), 1159–1169. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(10\)70378-9](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(10)70378-9)
- The UniProt Consortium UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 *Nucleic Acids Res.* 49: D480–D489(2021). Recuperado el 12-04-2022 Disponible en <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P20815/entry>
- Uribe San Martín, R., Ciampi, E., Galilea, A., Sandoval Rubio, P., Miranda, H., Mellado, P., Cruz, J. P., Huete Lira, I., & Cárcamo Rodríguez, C. (2017). Espectro de neuromielitis óptica: Descripción de una cohorte según los criterios diagnósticos de 2015. *Revista De Neurología*, 65(05), 193. <https://doi.org/10.33588/rn.6505.2017037>
- Vihinen, M. (2022). When a synonymous variant is nonsynonymous. *Genes*, 13(8), 1485. <https://doi.org/10.3390/genes13081485>
- Vásquez Céspedes, J. (2018). Epidemiología de la neuromielitis óptica en Costa Rica: Un Análisis Multicéntrico. *Neurología Argentina*, 10(4), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2018.06.001>

- Wolf, S. J., Bachtiar, M., Wang, J., Sim, T. S., Chong, S. S., & Lee, C. G. (2011). An update on ABCB1 pharmacogenetics: Insights from a 3D model into the location and evolutionary conservation of residues corresponding to snps associated with drug pharmacokinetics. *The Pharmacogenomics Journal*, 11(5), 315–325. <https://doi.org/10.1038/tpj.2011.16>
- Wright, W. C., Chenge, J., & Chen, T. (2019). Structural perspectives of the CYP3A family and their small molecule modulators in drug metabolism. *Liver Research*, 3(3-4), 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.08.001>
- Xue, Y., Li, J., Wu, Z., Liu, G., Tang, Y., & Li, W. (2019). Computational insights into the different catalytic activities of cyp 3A4 and cyp 3A5 toward *schisantherin e*. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(5), 854–864. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13475>