



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**CIENCIAS MÉDICAS**

**EXPRESIÓN DEL GEN *MDR1* EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA  
COMO FACTOR PREDICTIVO DE REFRACTARIEDAD EN PACIENTES  
PEDIÁTRICOS CON EPILEPSIA DE RECIENTE DIAGNÓSTICO**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**JOSÉ ALBERTO ISRAEL ROMERO RANGEL**

**TUTOR: DR. FIACRO JÍMENEZ PONCE**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**CO-TUTOR: DR. ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MÉXICO D.F. ABRIL, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



## AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Pepe (Papa)

Chepi (Mama)

Omar, Vania, Antoine, Gabriel (Hermanos),

Moyo y Pocho (Bodoque y Abril... mis perritos... mis hijos)

Gracias... por permanecer siempre junto a mí... por darme aliento en mis tiempos más difíciles y entender y apoyarme cuando no pude compartir tiempo con ustedes robando tiempo de familia para realizar mis estudios, y más que todo por amarme incondicionalmente pese a mis malos gestos, mis defectos y mi mal genio así como por no demostrarles cuanto los amo... este gran honor es mi regalo para ustedes...

A mi Gran Familia:

Abues Mago y José

Por amarme y consentirme desde que era un niño, por desvivirse y descuidar una necesidad suya por darme un gusto a mí...

Abues Blanca y Pepe

Gracias por estar al pendiente y cuidar de mí...

Tí@s, Prim@s y Sobrin@s

Amigos

Gracias... por apoyarme en todo momento y por saberme hacer sentir amado y acompañado, así como por levantarme el ánimo en mis periodos de tristeza... Gracias Oli, Esme, Nancy, Adrián y Familia

A mi tutor mi gran Amigo y Mentor:

Dr. Fiacro... Muchas Gracias por ser mi único amigo en un mundo donde todo era adversidad... por ser el único que siempre confío en mí pese a lo oscuro del ambiente... luchando cada uno de los días más difíciles de mis estudios de residencia y maestría a mi lado, sobreponiendo el criterio propio a la razón común, y no dejarse guiar por la mayoría por el solo hecho de serlo... por ser mi gran apoyo e inclusive un gran amigo quien me levanto en aquel momento de debilidad emocional, por mantener esa honestidad, rectitud, amabilidad, y fraternidad que lo caracteriza, y sobre todo por haber actuado de corazón siendo una persona íntegra que no escatima esfuerzos cuando pugna por lo que considera una causa justa... es un verdadero amigo, leal, por el que agradezco haber pasado tales penurias para poder conocerlo de tal forma, y tener el honor de llamarlo con el título que curiosamente dios o el destino nos puso como punto de encuentro, aquel que integra a este programa, y aquel grado que mediante esta tesis pretendo, pero que nadie más que usted lo merece por todo su esfuerzo y apoyo incondicional, aquel que nunca tendrá más significado que cuando al recordar todos esos hechos me escucho decir...

*Mi Amigo Fiacro... Mi Maestro.*

Este proyecto Fue Realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad 204 del servicio de Hematología del Hospital General de México bajo la dirección y apoyo del Dr. Fiacro Jiménez Ponce y el Dr. Adolfo Martínez Tovar, También bajo la asesoría del Dr. Jorge Zamora Domínguez, Agradezco también al CONACyT por su apoyo en este proyecto 162269 y  
DIC/12/204/05/01, DIC/09/04/03/131



## INDEX

MARCO TEÓRICO.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	12
METODOLOGÍA.....	15
PROCEDIMIENTO.....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD.....	27
RELEVANCIA Y EXPECTATIVAS.....	28
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	30
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	52
ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	53
ANEXO 2. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56



## MARCO TEÓRICO

Epilepsia es una enfermedad neurológica caracterizada predominantemente por interrupciones impredecibles y recurrentes de la función cerebral normal, llamadas crisis epilépticas [1]. La epilepsia no es una entidad única sino una variedad de anormalidades que reflejan la disfunción cerebral subyacente que puede resultar de muy diversas causas [2]. Se estima que la epilepsia afecta a 50 millones de personas, lo que representa el 1% de la población mundial. Aproximadamente el 30% de quienes sufren epilepsia cursan con un padecimiento refractario a tratamiento convencional [3], [4], [5]. La misma circunstancia ha sido descrita en la población pediátrica [6], [7].

La prevalencia de la epilepsia en los países desarrollados se estima de 3-9/1000 personas. Particularmente, en México en este mismo rubro las cifras de varían entre 3.5 y 18/1000 personas [8]. En la población pediátrica la prevalencia de epilepsia se reporta entre el 0.5 y el 4%. También se ha observado que la primera crisis epiléptica aparece en los primeros 15 años de vida, así el 90% de los pacientes epilépticos debutan antes de los 20 años de edad [7].

La clasificación de la epilepsia es difícil debido a que no siempre corresponde un síndrome epiléptico con una etiología específica, al igual que la presentación puede ser muy variada, por lo que el diagnóstico de epilepsia dependerá de diferentes clasificaciones dependiendo del objetivo que la clasificación tenga, tal como lo describe Engel en su revisión de terminología de la Liga internacional contra la Epilepsia (ILAE), quien la evalúa dependiente de 5 ejes diagnósticos, ya sea por: fenómeno ictal, tipo de crisis epiléptica, síndrome, etiología y compromiso o déficit neurológico [9]. Dada la dificultad diagnóstica referida previamente es pertinente llevar a cabo un algoritmo diagnóstico terapéutico en el que se evalúen los 5 ejes mencionados con fin de

establecer e identificar el patrón de epilepsia de forma precisa, evaluando una correspondencia entre los antecedentes personales, la presentación clínica, el patrón epiléptico, el patrón electrofisiológico y los estudios de imagen, esto con el fin de orientar el tratamiento apropiado. De entre las variantes de la epilepsia, la epilepsia del lóbulo temporal tiene un patrón característico y bien definido de presentación; además es una variedad de epilepsia que es reproducible en modelos animales, por lo que resulta una patología ideal para el estudio de la refractariedad, dicho modelo epileptógeno habitualmente se desarrolla en ratas, a las cuales se les induce estimulación eléctrica en la amígdala basolateral mediante estereotaxia, lo que resulta en un status epilepticus, el cual producirá – posterior a un periodo de latencia - crisis epilépticas espontáneas recurrentes [10], o bien mediante inducción farmacológica, tal como lo describe Wang con la inyección intramuscular de Lactona Coriaria [11]. La epilepsia del lóbulo temporal es uno de los tipos más frecuentes de este desorden y puede estar descontrolada en una alta proporción de pacientes adultos y pediátricos [12]. De entre las causas pediátricas más frecuentes de la epilepsia del lóbulo temporal están: Los tumores astrocíticos bien diferenciados, la displasia cortical, la esclerosis mesial temporal (MTS) y algunos trastornos combinados como la presencia de lesiones extra-Hipocampales y MTS [13]. La MTS representa del 50 al 70% de los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. Aunque la MTS es rara antes de los 5 años, puede ser motivo de tratamiento quirúrgico entre el 10 y el 20% de los pacientes entre 5 y 10 años de edad. También se ha demostrado que en muchas ocasiones la MTS es subdiagnosticada retrasando su tratamiento quirúrgico[13]. En la evaluación diagnóstica, un paciente típico con epilepsia del lóbulo temporal se presentara con crisis epilépticas parciales simples o complejas, con o sin generalización de las mismas, electrofisiológicamente presentan un patrón de puntas y ondas



ubicado en la corteza mesial temporal o neocortical, las características habitualmente observadas en adultos - tales como la sensación epigástrica ascendente, sensación de miedo, los movimientos oroalimentarios y las alteraciones conductuales - pueden pasar desapercibidas o ser sutiles en los niños y la Resonancia Magnética mostrara cualquiera de las etiologías antes mencionadas[14]

En la última década, la cirugía de epilepsia ha ganado gran impulso principalmente en el grupo pediátrico y ha sido considerada la opción terapéutica para la epilepsia refractaria [13], principalmente en la epilepsia del lóbulo temporal. Se considera refractario a aquel paciente que persiste con crisis epilépticas a pesar del tratamiento farmacológico hasta con dos agentes antiepilépticos de primera elección para el tipo específico de epilepsia, ya sea en esquemas terapéuticos de monoterapia o politerapia [7], [12]. Una característica importante, demostrada en múltiples estudios sobre farmacodinamia, es que los pacientes epilépticos que son refractarios, lo son a la mayoría de los medicamentos antiepilépticos, independientemente de que actúen por diferentes mecanismos de acción intracelular, lo que resulta relevante puesto que un mecanismo inespecífico subyacente debe estar involucrado, resaltando francamente la importancia de los transportadores de eflujo [10]

La refractariedad al tratamiento epiléptico se ha intentado explicar genéticamente a través de dos teorías: La teoría de la farmacodinamia, la cual explica que la disminución en la sensibilidad a los fármacos antiepilépticos es debido a diversas alteraciones en los *sitios blancos* de cada fármaco [12], [15]. Por otro lado, la teoría de la farmacocinética, hipotetiza que la acción de un fármaco sobre el tejido cerebral es alterada por una sobreexpresión adquirida o intrínseca de las proteínas

transportadoras de dichos fármacos que finalmente impiden la liberación local del medicamento de un fármaco específico sobre los sitios objetivo [16], [17]. En esta última se cree que la P-glicoproteína, miembro de los transportadores de eflujo, actúa disminuyendo la acumulación intracelular de los fármacos, esta proteína pertenece a la superfamilia de casete de unión a adenosina trifosfato (ABC) la cual está codificada por dos genes designados de resistencia a múltiples drogas 1 y 2 (MDR1 y MDR2) localizados en el cromosoma 7q21.1, de estos el MDR1 es el gen que codifica para el transportador asociado con resistencia a múltiples drogas en humanos [12], [18] (ver imagen 1 y 2).

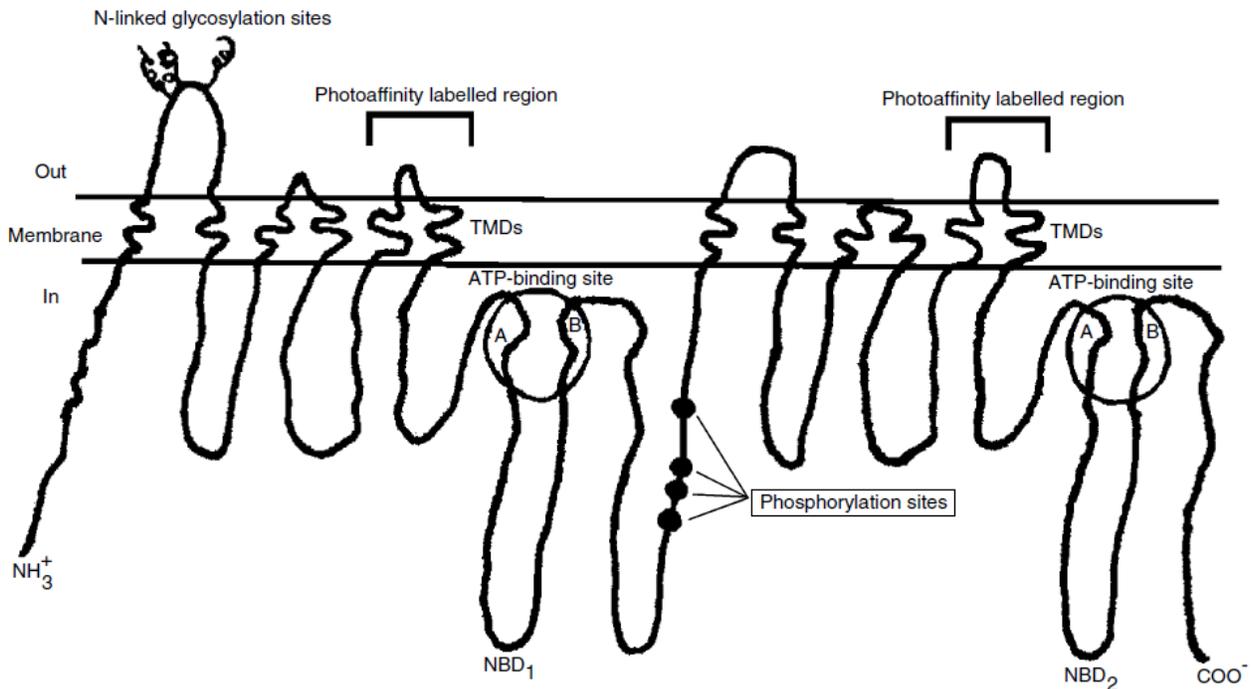


Imagen 1. Estructura bidimensional de la p-Glicoproteína en relación a la membrana citoplasmática [19].



La reacción en cadena a la polimerasa (PCR) - una técnica de biología molecular que permite amplificar una sola copia de DNA a lo largo de diferentes órdenes de magnitud, generando miles de millones de copias de una secuencia particular de DNA – ha permitido determinar la presencia del gen MDR1 mediante fluorescencia [20] y subsecuentemente un refinamiento de esta técnica, la PCR en Tiempo Real (PCR-RT) ha permitido la cuantificación precisa de la misma, lo que ha favorecido los estudios de determinación y asociación con la presencia de refractariedad en diversas enfermedades, en los diferentes tejidos estudiados [21]. El aumento en la expresión de los transportadores multidroga en pacientes epilépticos refractarios puede ser consecuencia de la epilepsia misma, de las crisis no controladas, o del tratamiento crónico con fármacos antiepilépticos, así como a la suma de todos estos factores [22]. Se ha demostrado la sobreexpresión de MDR1 en células endoteliales de la barrera hemato-encefalica, así como en neuronas y astrocitos de tejido cerebral epileptógeno [23]. Incluso se ha demostrado una adecuada correlación en linfocitos de sangre periférica, determinándose que estos pudieran considerarse un tejido apropiado para estudios sobre la expresión de transportadores de fármacos múltiples en epilepsia, así mismo los linfocitos de sangre periférica al ser un tejido accesible (fácil obtención del tejido cerebral) podría servir como marcadores de respuesta a fármacos antiepilépticos [22]. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los estudios sobre MDR1 esta asociación mostro una expresión disminuida de MDR1 y la proteína de resistencia a multidrogas 1 (MRP1) en pacientes refractarios a tratamiento antiepiléptico, esta observación aunque aparentemente contradictoria con base en los resultados de otros estudios de MDR1 en epilepsia, que muestran mayor expresión de MDR1 en tejido cerebral de pacientes refractarios podría estar asociada a que la sobreexpresión se encuentra alrededor del foco epileptógeno y no en el resto del

tejido cerebral ni en otros tejidos como son los linfocitos [22]. Otros análisis han mostrado que la variante C del MDR1 (la cual está asociada con una alta expresión y actividad de P-Glicoproteína) es más común en los pacientes con epilepsia refractaria, demostrando que la presencia de polimorfismo C3435T está asociada a epilepsia refractaria [24]. Finalmente estudios de genética (realizados con métodos de detección rápida con base en PCR de tiempo real) han podido aislar los polimorfismos: G2677T y C3435T del nucleótido único (SNP) los cuales se encuentran relacionados al alelo aberrante de la g-glicoproteína referido como MDR1\*2. Este polimorfismo estaría asociado con la actividad de eflujo aumentada, lo que impediría la concentración de fármacos en el tejido epileptógeno [25].

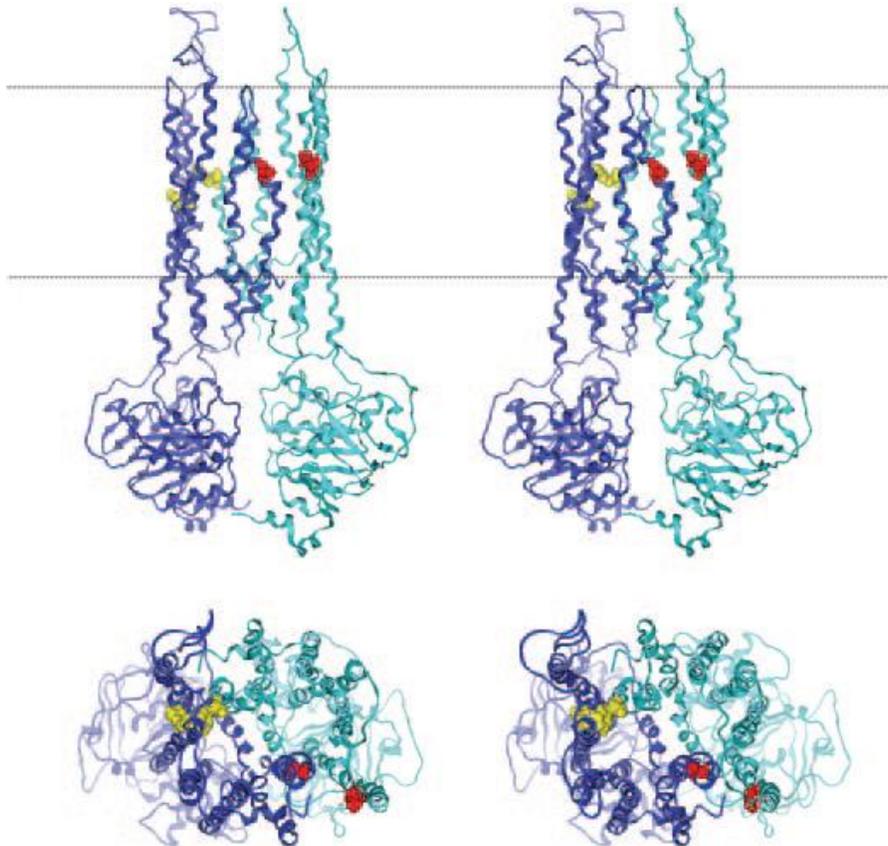


Imagen 2. Estructura 3D de la p-Glicoproteína en relación a membrana citoplasmática [26]

## JUSTIFICACIÓN

Estudios que evalúan el impacto sobre la función cognitiva han mostrado que el tratamiento quirúrgico de la epilepsia para crisis parciales en niños y pacientes de inicio temprano, está asociada a mejor calidad de vida comparada con los que no se operan [27], [28], [29], [30]. Una indicación adecuada de lobectomía temporal puede conducir hasta el 78% de curación de los pacientes menores de 12 años [31].

Así mismo se han demostrado que el tratamiento farmacológico conlleva un progresivo deterioro cognitivo y psicoconductual comparado con el nivel basal alcanzado [32], determinándose que el principal factor asociado a este desenlace es el control de las crisis [33], por lo que es indispensable instaurar tratamientos alternativos tempranamente para prevenir los daños psicoconductuales asociados a la falta de control de crisis, destacando dentro de ellos el tratamiento quirúrgico por su efectividad y eficacia en este grupo especial de pacientes refractarios [34], a este respecto es importante considerar que en ocasiones la falta de eficacia del tratamiento es consecuente con los efectos adversos derivados de los fármacos integrándose dentro de los mismos las alteraciones psicocognitivas[35]. Por otro lado, es importante considerar las implicaciones económicas del tratamiento farmacológico comparadas con el tratamiento quirúrgico combinado, demostrándose mediante técnicas de costo efectividad y estudios de meta análisis las ventajas de este último [35]

El reconocimiento efectivo y temprano de la epilepsia del lóbulo temporal refractaria y su referencia a cirugía de epilepsia puede prevenir años de actividad epiléptica innecesaria y tratamiento prolongado así como sus consecuencias [12].



## HIPOTESIS

La expresión del gen *MDR1* en linfocitos de sangre periférica de pacientes pediátricos con epilepsia de reciente diagnóstico mostrara una correlación directa e inversamente proporcional con la refractariedad al tratamiento farmacológico al cabo de 6 meses de tratamiento antiepiléptico específico en epilepsia del lóbulo temporal, siendo así mayor en los controles, seguidos de los respondedores y menor en los refractarios.



## OBJETIVOS

### Principales

- A. Corroborar la relación inversa entre los niveles de expresión de MDR1 por PCR Tiempo Real con presencia de refractariedad, siendo mayores los niveles en los controles sin epilepsia, seguidos de los epilépticos respondedores y más bajos en los epilépticos refractarios.
- B. Determinar el valor predictivo que tiene la expresión del gen MDR1 en linfocitos de sangre periférica de pacientes pediátricos con epilepsia de reciente inicio para determinar la presencia de refractariedad después del tratamiento antiepiléptico específico.

### Específicos

- 1.1 Identificar la expresión de MDR1 en linfocitos de sangre periférica por PCR Punto Final en
  - 1.1.1 Los sujetos Epilépticos Refractarios a tratamiento médico
  - 1.1.2 Los sujetos Epilépticos Respondedores a tratamiento médico
  - 1.1.3 Los sujetos Control
- 1.2 Determinar la cuantificación relativa de dicha expresión en cada grupo por densimetría por pixel
- 1.3 Corroborar una correlación inversa entre el nivel (semi-cuantitativo, por PCR punto final) de expresión de MDR1 en linfocitos de sangre periférica y la respuesta al tratamiento farmacológico, siendo mayor su expresión en sanos, seguidos de los respondedores y menor



en los refractarios, en cuyo caso se procederá a realizar al Estándar de Oro, PCR Tiempo Real.

1.4 Determinar el Coeficiente de Correlación entre el nivel de expresión de MDR1 por Densimetría y la presencia de refractariedad (interpretando la respuesta al tratamiento con una variable nominal categórica)

1.1 Determinar la expresión de MDR1 normalizada para GAPDH en linfocitos de sangre periférica de cada grupo por PCR Punto Final en:

2.1.1 Los sujetos Epilépticos Refractarios a tratamiento médico

2.1.2 Los sujetos Epilépticos Respondedores a tratamiento médico

2.1.3 Los sujetos Control

1.2 Determinar la cuantificación relativa de dicha expresión en cada grupo por densimetría por pixel

1.3 Corroborar una correlación inversa entre el nivel (semi-cuantitativo, por PCR punto final) de expresión de MDR1 normalizada (a GAPDH) en linfocitos de sangre periférica y la respuesta al tratamiento farmacológico, siendo mayor su expresión en sanos, seguidos de los respondedores y menor en los refractarios, en cuyo caso se procederá a realizar al Estándar de Oro, PCR Tiempo Real.



1.4 Determinar el Coeficiente de Correlación entre el nivel de expresión de MDR1 normalizada por Densimetría y la presencia de refractariedad (interpretando la respuesta al tratamiento con una variable nominal categórica)

3.1 Determinar la expresión de MDR1 en linfocitos de sangre periférica de PCR tiempo real en:

3.1.1 Los sujetos Epilépticos Refractarios a tratamiento médico

3.1.2 Los sujetos Epilépticos Respondedores a tratamiento médico

3.1.3 Los sujetos Control

3.2 Corroborar una correlación inversa entre el nivel (cuantitativo, por PCR Tiempo Real) de expresión de MDR1 en linfocitos de sangre periférica y la respuesta al tratamiento farmacológico, siendo mayor su expresión en sanos, seguidos de los respondedores y menor en los refractarios

3.3 Determinar el Coeficiente de Correlación entre el nivel de expresión de MDR1 por Tiempo Real y la presencia de refractariedad (interpretando la respuesta al tratamiento con una variable nominal categórica)



## METODOLOGÍA

### *Tipo y diseño del Estudio*

Estudio Piloto seguido de un estudio prospectivo, de casos y controles, anidado en una cohorte.

### *Tamaño de la Muestra*

$$n = \frac{(Z\alpha)^2 P (1-P)}{i^2}$$

$i^2$

Donde  $Z\alpha = 1.96$ ,

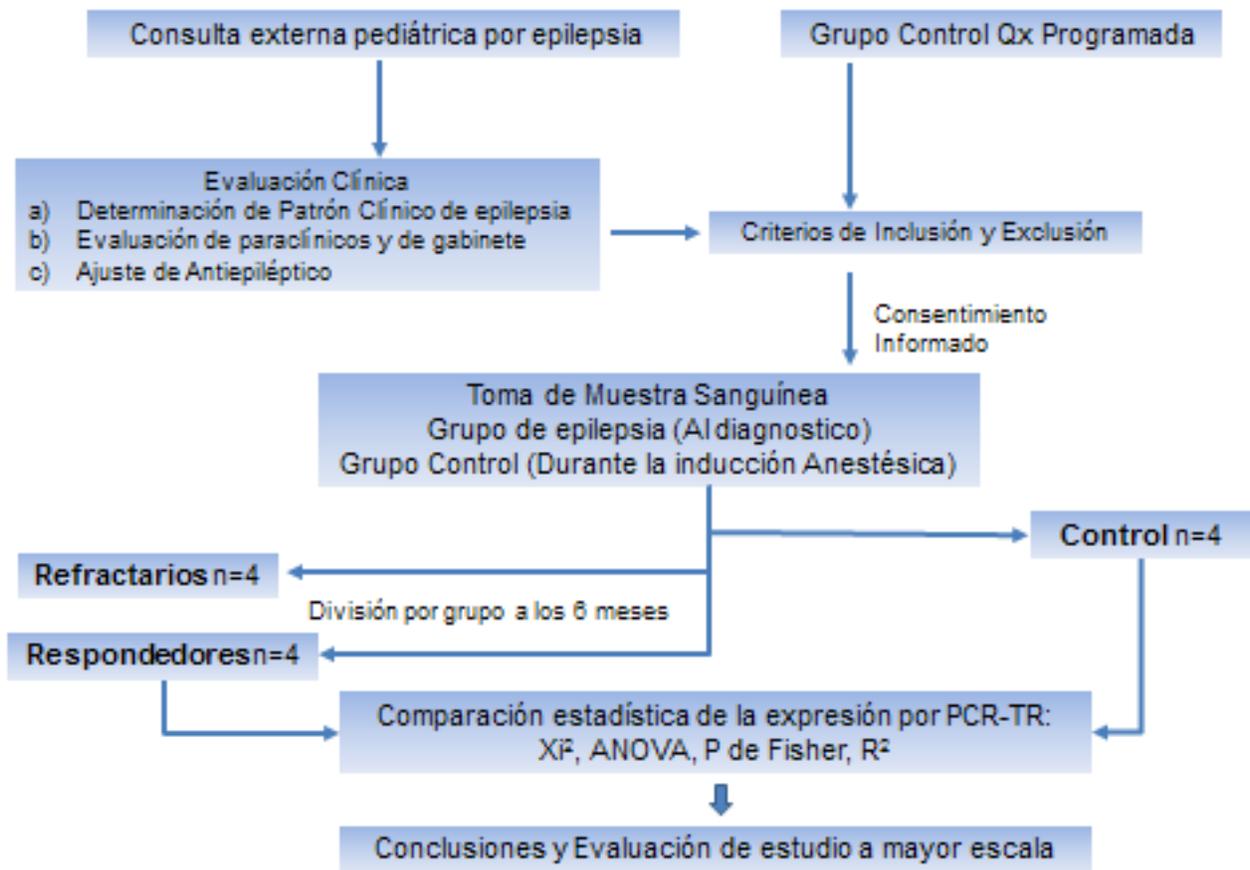
$P = 0.3$  (porcentaje de refractariedad)

$i =$  mínima diferencia esperada  $= 0.05$

Por tanto  $n = 32.26$  de tal forma se consideran 32 pacientes como casos y 32 pacientes como controles.

***Para el estudio Piloto se tomaran 4 pacientes por grupo, con los resultados del cual se verá la factibilidad de continuar con un estudio con la N de 32 por grupo.***

### Algoritmo de Estudio Piloto





## *Criterios de selección*

### *Criterios de Inclusión:*

1. Pacientes pediátricos de entre 3 y 16 años de edad que acudan a consulta de primera vez por crisis epilépticas con alguna de las siguientes características:
2. Epilepsia del lóbulo temporal con crisis parciales complejas que pueden o no ser secundariamente generalizadas (consideradas tipo IC de acuerdo a la Liga Internacional de la Lucha Contra la Epilepsia) (ILAE) y con un patrón EEG temporal o frontotemporal.
3. Vírgenes a tratamiento farmacológico (consulta de primera vez) ó
4. Con tratamiento farmacológico menor a 6 meses sin importar el antiepiléptico usado
5. Con tratamiento farmacológico menor de 1 año y medio habiéndose usado cualquiera de los esquemas en monoterapia de antiepilépticos de elección.

### *Criterios de exclusión:*

1. Pacientes en los cuales se determine epilepsia sintomática (lesiones identificables, ej. tumores, malformaciones arteriovenosas, etc.) por medio de estudio de Resonancia Magnética (RM).
2. Otros tipos de epilepsia de acuerdo a la ILAE



*Criterios de Eliminación:*

1. Pacientes que abandonen el seguimiento o no cumplan apego a tratamiento indicado.
2. Pacientes que deban abandonar el tratamiento de monoterapia por idiosincrasia.
3. Pacientes que no completen protocolo de estudio incluyendo dentro del mismo:
4. EEG
5. RM / TAC



## Definición de Variables

<i>Variable</i>	<i>Característica</i>	<i>Tipo</i>
<i>Refractariedad</i>	<i>Independiente</i>	<i>Nominal Categórica</i>  <i>(0. Refractario; 1, Respondedor y 2, Control)</i>
<i>Expresión de MDR1</i>  (Densimetría)	<i>Dependiente</i>	<i>Numérica Discontinua</i>
<i>Expresión de</i>  GAPDH	<i>Co-Variable</i>  <i>Dependiente</i>	<i>Numérica Discontinua</i>
<i>Expresión de MDR1</i>  Normalizada a	<i>Dependiente</i>	<i>Numérica Continua</i>
<i>Expresión de MDR1</i>  (PCR-TR)	<i>Dependiente</i>	<i>Numérica Continua</i>



## PROCEDIMIENTO

### Identificación de los sujetos

Se elaboró un protocolo de estudio del presente estudio, el cual fue sometido al y aprobado por los Comités de Investigación y de Ética en Investigación del Hospital General de México. Mediante dicho protocolo se obtuvo acceso a las bases de datos del departamento de Planeación del Hospital y consecuentemente se obtuvieron los registros de la consulta del servicio de Pediatría del año 2011 a 2013, de entre los cuales se seleccionaron a los sujetos de entre 3 y 16 años que hubiesen acudido de primera vez, y a los cuales se les hubiera clasificado en el diagnóstico como epilepsia en la clave de CIE 10 de diagnóstico, posteriormente se obtuvieron los números telefónicos de sus tutores a través del servicio de Trabajo Social, y ulteriormente se estableció comunicación vía telefónica con los padres y/o tutores de los sujetos pediátricos para una subsecuente cita en las instalaciones del Hospital – toda vez que fuera de su interés altruista participar en el estudio - donde se confirmaría la información de la pre-consulta telefónica y se recabaría el consentimiento informado (Anexo 1) con asentimiento del menor (verbal), habiéndose verificado que cumplieran con los criterios de inclusión - considerándose estos como aquellos con menos de un año y medio de diagnóstico y/o tratamiento y que estuvieran recibiendo tratamiento médico de primera elección en monoterapia según el tipo específico de epilepsia, considerándose como tratamiento de primera elección para epilepsia del lóbulo temporal a la oxcarbazepina a dosis de 10-30 mg/kg de peso al día administrada por vía oral y corroborada por niveles séricos entre 15 y 45 µg/dl o Valproato de magnesio a dosis de 10-60mg/kg de peso al día por vía oral. Al incluirse un paciente al estudio se llenó la forma de recolección de datos (Anexo 2) para cada individuo y se dio cita a laboratorio para la toma de muestra sanguínea lo antes posible.



Toda vez completada esta fase se procedería a dar seguimiento por 6 meses y determinar la respuesta o la falta de la misma al tratamiento farmacológico. Los sujetos control se consideraron aquellos que no fueran epilépticos y que no estuvieran consumiendo medicamentos, por lo cual fueron seleccionados a partir de los pacientes de Cirugía Pediátrica que fueran programados para cirugía electiva y que cumplieran con los criterios antes mencionados, la toma de muestra se efectuó en el momento de la inducción anestésica.

En el presente estudio no se solicitaron estudios paraclínicos ni de gabinete fuera de los previamente solicitados por el tratante, el único estudio paraclínico efectuado fue la determinación de PCR y PCR-RT por muestra sanguínea, mismo que fue efectuado sin costo para para los participantes del estudio y sus tutores / representantes legales.



## Toma de la Muestra Sanguínea

El día citado, el sujeto y sus padres y/o tutores acudieron al Laboratorio Central del Hospital donde parte del personal del protocolo adquirió la muestra sanguínea de 4ml aproximadamente en Tubo Verde Heparinizado Vacutainer de 10 ml mediante técnica aséptica, esta muestra fue codificada y etiquetada para posteriormente ser trasladada al departamento de Estudios Especiales de Hematología, donde se realizó la separación de células blancas

La toma de la muestra sanguínea de los sujetos control fue efectuada el día de su cirugía programada previo al procedimiento quirúrgico al ser canalizados posterior a sedación leve por el servicio de Anestesiología. Posteriormente la muestra fue igualmente trasladada al departamento de Estudios Especiales de Hematología, para su procesamiento.

## Separación de la Muestra

Las muestras se mezclaron en una proporción 1:1 suavemente con solución de fosfatos PBS 1X. Una vez homogeneizadas las muestras se empleó Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, densidad 1.077g/l) utilizando aproximadamente 1/3 del volumen total de sangre. Los gradientes se centrifugaron a 1500 rpm por 30 minutos a una temperatura de 18 a 20 C. Al término del tiempo se separó la interfase de mononucleares con pipeta Pasteur y se transfirió a tubos limpios. Los mononucleares se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 2500rpm durante 10 minutos. Al término del tiempo se decantó el sobrenadante y los mononucleares se re-suspendieron en PBS 1X y fueron almacenados a -70 C hasta su uso



## Aislamiento del mRNA y transcripción Reversa (RT)

De las muestras crío-preservadas se aisló el RNA celular total por medio del método de Trizol, cloroformo, alcohol isoamílico. A partir de 1ug de RNA se sintetizo el cDNA por adición de 1ul de oligo dT, buffer de reacción), 1ul de la mezcla de dNTP,10mM y 1ul de supertranscriptasa (200U/ul) (Gibco BRL). Los perfiles térmicos de la reacción fueron treinta y siete grados por 50 minutos para la realización de cDNA El cDNA se almaceno a menos veinte grados hasta su uso.

## Seguimiento de la Cohorte

El seguimiento y tratamiento continuó indemne a cargo del Servicio de Neurología Pediátrica del Hospital General de México, realizándose solamente seguimiento del mismo, y después de 6 meses de la muestra inicial se contactaría nuevamente a los Padres y/o tutores de los pacientes para evaluar la respuesta al final de este periodo.

## División de los Grupos Anidados en la Cohorte

Una vez conocido la respuesta al tratamiento médico al cabo de los 6 meses de seguimiento, los sujetos fueron separados según su respuesta en refractarios (quienes presentaron crisis epilépticas durante el seguimiento) y respondedores (sin una sola crisis durante el seguimiento), y se seleccionaron 4 sujetos de cada grupo incluyendo 4 sujetos del grupo control.



## Selección de las muestras de mRNA para procesamiento de PCR Punto Final (Densimetría) y Tiempo Real

Las muestras procesadas hasta mRNA de dichos sujetos fueron seleccionadas y etiquetadas por grupo de manera codificada por una persona ajena al procesamiento subsecuente de tal forma que este fuese efectuado de manera cegada.

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Densimetría

Se empleó un décimo de cDNA para llevar a cabo el análisis de la expresión de los genes *MDR1* y *GPDH+* (constitucional de Control) en 100ul de una mezcla de reacción que contendrá 30 pMol de cada oligonucleótido sentido y antisentido y 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL) en el buffer adecuado (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 200uM de cada dNTP. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV y se practicó análisis densimétrico de la proteína *MDR1* y el control de actina, capturando la imagen en el equipo Gel doc (Bio Rad Laboratorios) y analizándola con el software Quantity One (BioRad Laboratorios). Este análisis es tipo semi-cuantitativo ya que nos permite medir en forma aproximada el nivel de expresión del gen *MDR1*.



## Recodificación de Muestras

Una vez obtenidos los resultados de PCR Punto Final (Densimetría) que sustentaron realizar (por su mayor costo) PCR Tiempo Real; las muestras procesadas hasta mRNA fueron nuevamente seleccionadas y etiquetadas por grupo de manera codificada por una persona ajena al procesamiento cegado subsecuente

## Procesamiento de PCR Tiempo Real.

Para la cuantificación del gen *MDR1* se utilizó el cDNA a una concentración de  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies),  $0.2\mu\text{l}$  de primer forward ( $10\text{pM}/\mu\text{l}$ ) y  $0.2\mu\text{l}$  primer reverse ( $10\text{pM}/\mu\text{l}$ ) en un volumen de 20. Las condiciones de amplificación fueron las utilizadas en PCR punto final. Las muestras se corrieron por triplicado. Se hizo una cuantificación relativa por medio de  $\Delta\Delta\text{Ct}$  en el equipo StepOne™, (Applied Biosystems® Life Technologies)

## Análisis de Resultados por PCR Tiempo Real

Finalmente habiéndose practicado la PCR Tiempo Real, se obtuvieron los resultados individuales y por grupo, se analizaron los resultados y se retiró el cegado para la interpretación de resultados



## *Análisis Estadístico*

Se realizó análisis descriptivo de las variables demográficas, se realizó análisis estadístico inferencial para la semi-cuantificación de expresión de PCR Punto Final (Densimetría), y subsecuentemente al demostrarse asociación se practicaron los mismos análisis al contarse con los resultados PCR Tiempo Real consecuentes; las pruebas constaron de un Análisis de Covarianza para las medias de los tres grupos (Controles, Respondedores y Refractarios), donde posteriormente se aplicó un análisis PosHoc del Tipo LSD por ser el más robusto e incluyente, así como del tipo Tukey S-B por tratarse de grupos pequeños y homogéneos. Ulteriormente se practicó P de Pearson para evidenciar el coeficiente de correlación de la asociación así como una regresión lineal de expresión lineal y cubica para adjudicar causalidad dependiendo del poder explicativo de la variable en la ecuación.



## Aspectos éticos y de bioseguridad

El estudio de la expresión del gen *MDR1* en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal de reciente diagnóstico fue de riesgo mínimo para el paciente, ya que solo se obtuvieron muestras de sangre periférica y se emplearon las técnicas de asepsia y antisepsia convencionales para la adquisición de las mismas.

Las muestras fueron transportadas y procesadas teniendo los cuidados que se tienen normalmente para el manejo de nuestras potencialmente infecto-contagiosas. Los residuos sobrantes serán desechados de acuerdo a como se manejan en general este tipo de materiales, y para lo cual el Servicio de Hematología cuenta con amplia experiencia, la cobertura de los costos fue bajo apoyo del CONACyT 62269 y DIC/12/204/05/01, DIC/09/04/03/131



## Relevancia y Expectativas

El presente estudio podría ayudar a identificar tempranamente a los pacientes con epilepsia refractaria lo cual se reflejaría en:

Pronosticar la falta de respuesta al tratamiento Farmacológico mediante la determinación de la expresión de *MDRI* en una muestra de sangre periférica.

Disminuir el periodo de evaluación de la efectividad del tratamiento farmacológico ante una falta de respuesta al mismo y una alta posibilidad de refractariedad ante los resultados de expresión de *MDRI*

Disminuir el número de esquemas antiepilépticos usados mediante prueba de ensayo y error, antes de determinar a un paciente como refractario a tratamiento, mediante la ayuda de la expresión de *MDRI* como un factor pronóstico.

Consecuentemente con los puntos anteriores, disminuir los efectos secundarios de los tratamientos farmacológicos:

Ineficaces en monoterapia

Ineficaces con múltiples esquemas en monoterapia

Ineficaces en Politerapia

Ineficaces con múltiples esquemas en Politerapia



Ineficaces en Mono o Politerapia de forma prolongada

Eficaces en Mono o Politerapia con dosis elevadas

Disminuir los efectos secundarios de una epilepsia mal controlada por intentos excesivos de alcanzar control con tratamiento farmacológico

Disminuir los efectos adversos en el desarrollo psicomotor y cognitivo-intelectual por el uso de tratamiento farmacológico prolongado.

Disminuir los costos que implica utilizar múltiples esquemas farmacológicos ineficaces por tiempo prolongado

## Resultados y Análisis. Estadística Descriptiva. Características Demográficas.

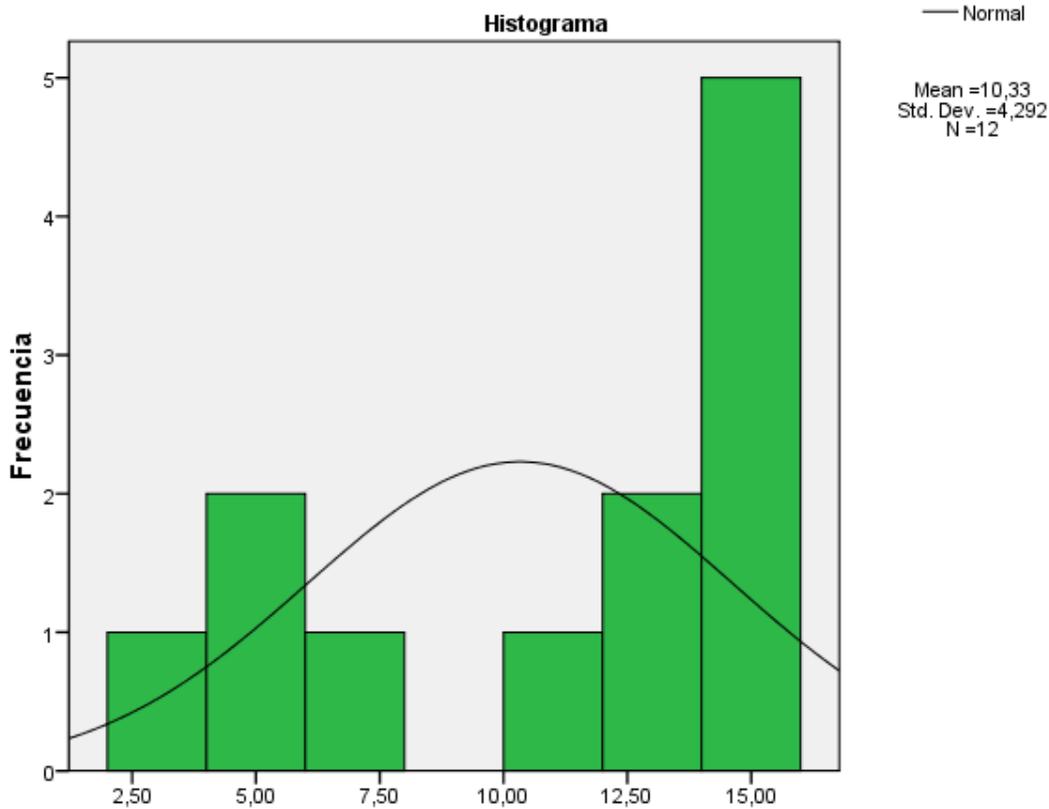
Se obtuvo consentimiento informado de 16 pacientes que cumplieron con los criterios antes mencionados, de los cuales se colectaron 16 muestras (11 sujetos epilépticos y 5 sujetos control), 4 fueron eliminadas por errores en el procesamiento (3 de Sujetos Epilépticos y 1 de un Sujeto del Grupo Control), quedando de esta forma 12 muestras de las cuales 8 provienen del grupo de epilépticos, que al final del seguimiento por Neurología Pediátrica se subdividieron conforme a la respuesta obtenida al tratamiento farmacológico indicado en 4 refractarios y 4 respondedores; integrándose de esta forma 4 muestras por grupo (Refractario, Respondedor y Control). La tabla 1 muestra sus características demográficas.

Tabla 1. Características demográficas de la muestra										
Sujeto	Edad (Años)	Origen	Sexo	Evolución (Meses)	Fármacos	Esquemas Previos	Frecuencia	Crisis	EEG	Imagen
Ref4	14	DF	Fem	6	OXC	0	Semanal	CPC	TD	Atrofia Temporal Mesial
Ref3	11	DF	Masc	12	VM	0	Semanal	TCG	TI	Criptogénica
Ref2	3	Df	Masc	14	VM	0	Diaria	CPC	FT	Criptogénica
Ref1	14	Puebla	Fem	5	VM	1	Mensual	TCG	TD	Criptogénica
Res4	14	DF	Masc	9	VM	1	Única	CPC	TI	Atrofia Temporal Mesial
Res3	5	DF	Fem	13	OXC	0	Diaria	CPS	TD	Atrofia Temporal Mesial
Res2	14	DF	Fem	9	AV	0	Anual	CPC	FC	Criptogénica
Res1	14	DF	Fem	5	AV	1	Única	TCG	TI	Criptogénica
Con4	12	DF	Fem	-	Ninguno	-	-	-	-	-
Con3	5	DF	Masc	-	Ninguno	-	-	-	-	-
Con2	12	DF	Fem	-	Ninguno	-	-	-	-	-
Con1	6	DF	Masc	-	Ninguno	-	-	-	-	-

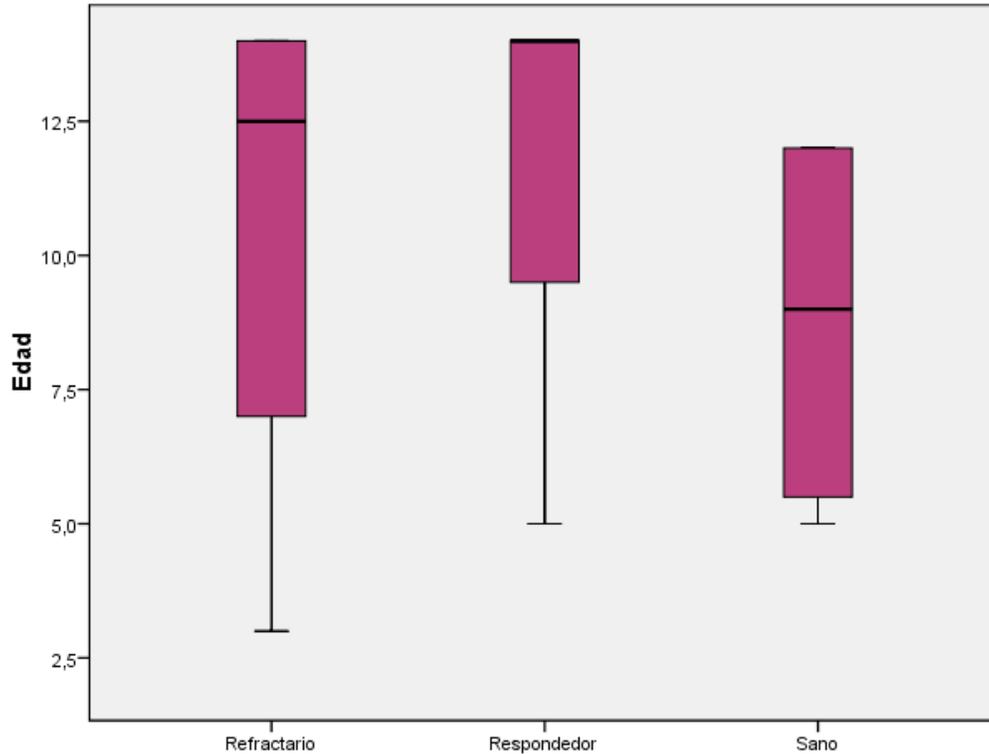
\*. Ref = Refractario, Res = Respondedor, Con = Control, DF = Distrito Federal, Fem = Femenino, Masc = Masculino, OXC = Oxcarbazepina, VM = Valproato de Magnesio, AV = Acido Valproico, CPC = Crisis Parcial Compleja, TCG = Tónica Clónica Generalizada, CPS = Crisis Parcial Simple, TD= Temporal Derecha, TI = Temporal Izquierda , FT = Fronto Temporal, FC = Fronto Central

## Distribución Etaria

La media (M, en años) de la muestra (Gráfica 1) fue de 10.33 con una desviación estándar (SD, en años) de 4.29, con mínima (Mín, en años) de 3 y máxima de 14 (Máx, en años), moda (Mo, en años) de 14, la inclinación (Inc) fue de -0,722, con Kurtosis (Kur) de -1.349; analizado por subgrupos, tenemos que en el grupo refractario fue M: 10.5, SD: 5.19, con Mín: 3, Máx: 14, Mo: 14, Inc: -1,597, y Kur: 2.340; en el grupo respondedor obtuvimos M: 11.75, SD : 4.5, Mín: 5, Máx:14, Mo: 14, Inc: -2 y Kur: 4; y en el grupo control obtuvimos M: 8.75, SD: 3.77, Mín:5, Máx:12, Mo:12 Inc: -0.6 y Kur: -5.6, siendo de entre ellas la distribución de esta última la más cercana a una distribución normal (Gráfica 2).



**Gráfica 1. Distribución de la Edad en el Total de la Muestra**



**Gráfica 2. Promedio de Edad por Grupo al Final del Seguimiento**

#### Distribución por Sexo y Geográfica.

De los 12 sujetos, 7 (58.33%) fueron Mujeres y el resto Hombres, distribuyéndose 2 sujetos de cada sexo en cada grupo exceptuando el grupo respondedor donde hubo 3 mujeres y un varón. Todos los sujetos Fueron Originarios del Distrito Federal (D.F.) y tan solo uno del estado de Puebla, el cual se ubicó en el grupo refractario. Todos los pacientes habitaban en el Área Metropolitana (Incluyendo DF y Estado de México)

#### Diagnóstico, Tratamiento y Tiempo de Evolución al Inicio del Protocolo

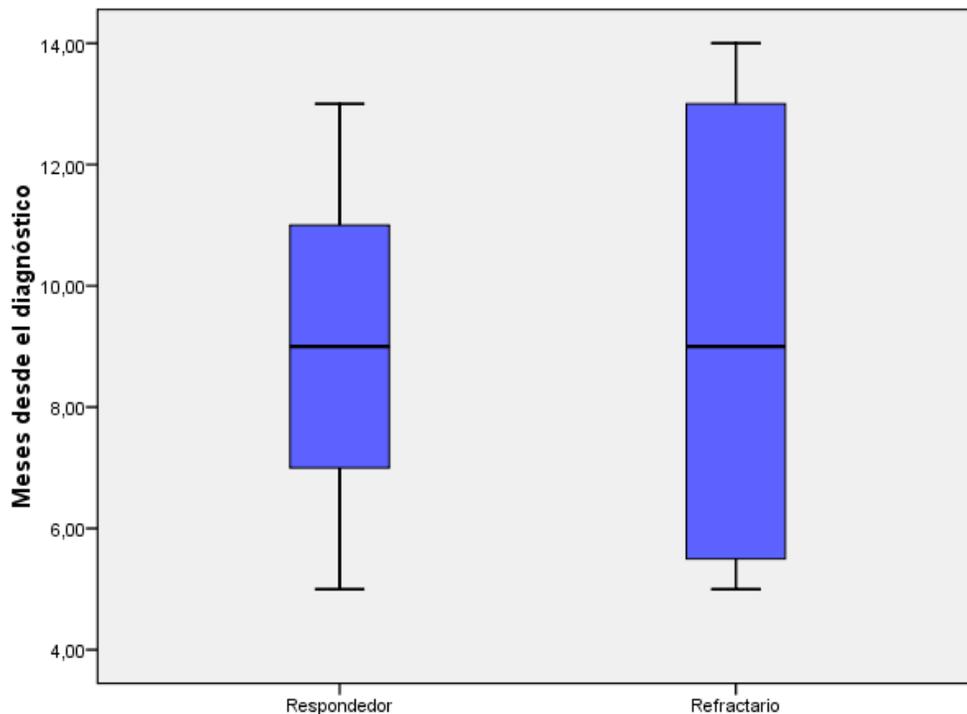
La mayoría de los pacientes acudió al Hospital por primera vez, como era de esperarse habiendo recibido atención medica anteriormente, estableciéndose el diagnóstico de epilepsia e iniciándose tratamiento, acudiendo a la unidad para continuar su control. De los 8 sujetos epilépticos, 3

presentaban Crisis Epilépticas del Lóbulo temporal de la presentación clásica (Aura Sensorial Variable, Sensación Epigástrica Ascendente, Miedo o Angustia, Perdida del Estado de Alerta, Indiferencia al medio, movimientos oroalimentarios primitivos y de búsqueda y/o conductas inapropiadas) uno de los cuales presentaba generalización secundaria a Tónico-Clónica; los 5 sujetos restantes presentaban crisis de inicio generalizado (o al menos así se determinaron por historial clínico), con foco epiléptico de localización temporal (3), y frontotemporal (2), en el electroencefalograma Inter-ictal. Seis de los 8 sujetos recibían Acido Valproico (4 en presentación de Valproato de Magnesio) en dosis terapéuticas, uno de los cuales recibía además carbamacepina, esta última en dosis Subterapéuticas; otro recibía Oxcarbazepina en dosis terapéuticas y finalmente uno más recibía Lamotrigina en dosis terapéutica, por lo que solo 6 de los 8 recibían tratamiento apropiado para el tipo de epilepsia específico (siendo inadecuada la Lamotrigina por no ser medicamento de primera elección – esto, sin considerar el hecho de que probablemente haya sido preferido por tratarse de un sujeto del sexo femenino en edad reproductiva - aunado al paciente con Ácido Valproico y Carbamazepina, por estar en esquema de Politerapia (la cual se ha demostrado que no ofrece ventaja al esquema en monoterapia, además de que esta última estaba en dosis subóptimas). La duración promedio de las crisis fue de 10.18 minutos [IC 95% -6.84-27.21], con una SD: 20.37, Mín: 0.5, Máx: 60, Mediana (Me, en mín) de 2, Mo: 1 y 2, Inc: 2.7 y Kur:7.42; por lo que la distribución no fue normal y los rangos fueron muy amplios con un valor extremo representado por el sujeto con tiempo de 60 minutos, quien cabe destacar que fue uno de los únicos dos sujetos con crisis diarias (perteneciendo al grupo de Respondedores, y el otro paciente con duración de crisis de medio minuto perteneciente al grupo de Refractarios); del resto, en el grupo de Refractarios, uno presentaba crisis con una

frecuencia semanal, otro mensual y otro semestral; y del grupo de Respondedores: dos presentaban crisis única (habiendo iniciado tratamiento el día de debut, sin recurrir hasta el momento del inicio del protocolo) y el último tenía una frecuencia Anual.

El periodo transcurrido desde el diagnóstico de inicio de la enfermedad al momento de la inclusión al protocolo y toma de muestra sanguínea tuvo una M: 8.25 meses [IC95% 5.46-11.03], SD: 3.32, Me: 8.5, Mín: 4, Máx: 13, Inc: 0.019, Kur: -1.619, siguiendo una distribución normal.

Evaluated por grupo (Gráfica 3) tuvo una M: 9 en Respondedores [IC 95% 3.80-14.19], con SD 3.26, Mín: 5, Máx: 13, Inc: 0, Kur: 1.5; y una M: 9.25 en Refractarios [IC 95% 2.20-16.29], SD 4.42, Mín: 5, Máx: 14, Inc: 0.13, Kur:-4.77; Todas las cuales podrían considerarse con Distribución normal o tendiente a la normal (Refractarios).



**Gráfica 3. Meses transcurridos desde el diagnóstico al momento de la toma de la muestra sanguínea**

## Resultados. Estadística Descriptiva e Inferencial. Procesamiento de PCR Punto Final

Las muestras fueron procesadas y separadas hasta mRNA, con la cual se practicó PCR punto final, inicialmente para identificar el gen constitutivo GAPDH+ con la cual obtuvimos la siguiente imagen de fluorescencia de GAPDH+ (Figura 1)

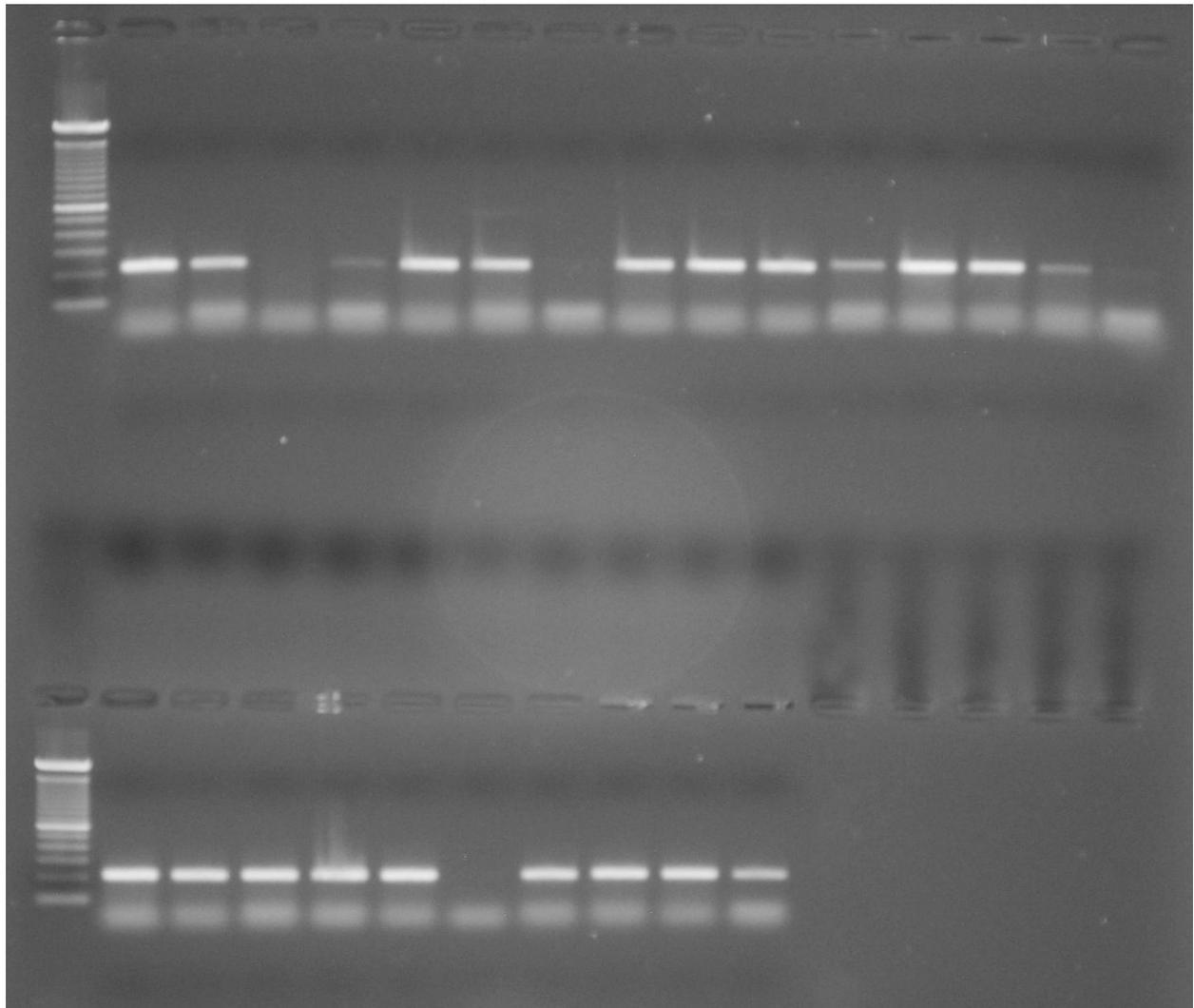


Figura 1. Fluorescencia de PCR Punto Final para Expresión de GAPDH+ con Control de Linfocitos K67 (primera muestra), y Muestras de sujetos del Estudio, ordenados de manera codificada incluyendo controles y muestras posteriormente descartadas por error de procesamiento.

Posteriormente se realizó la misma técnica identificando en esta ocasión *MDR1* (Figura 2).

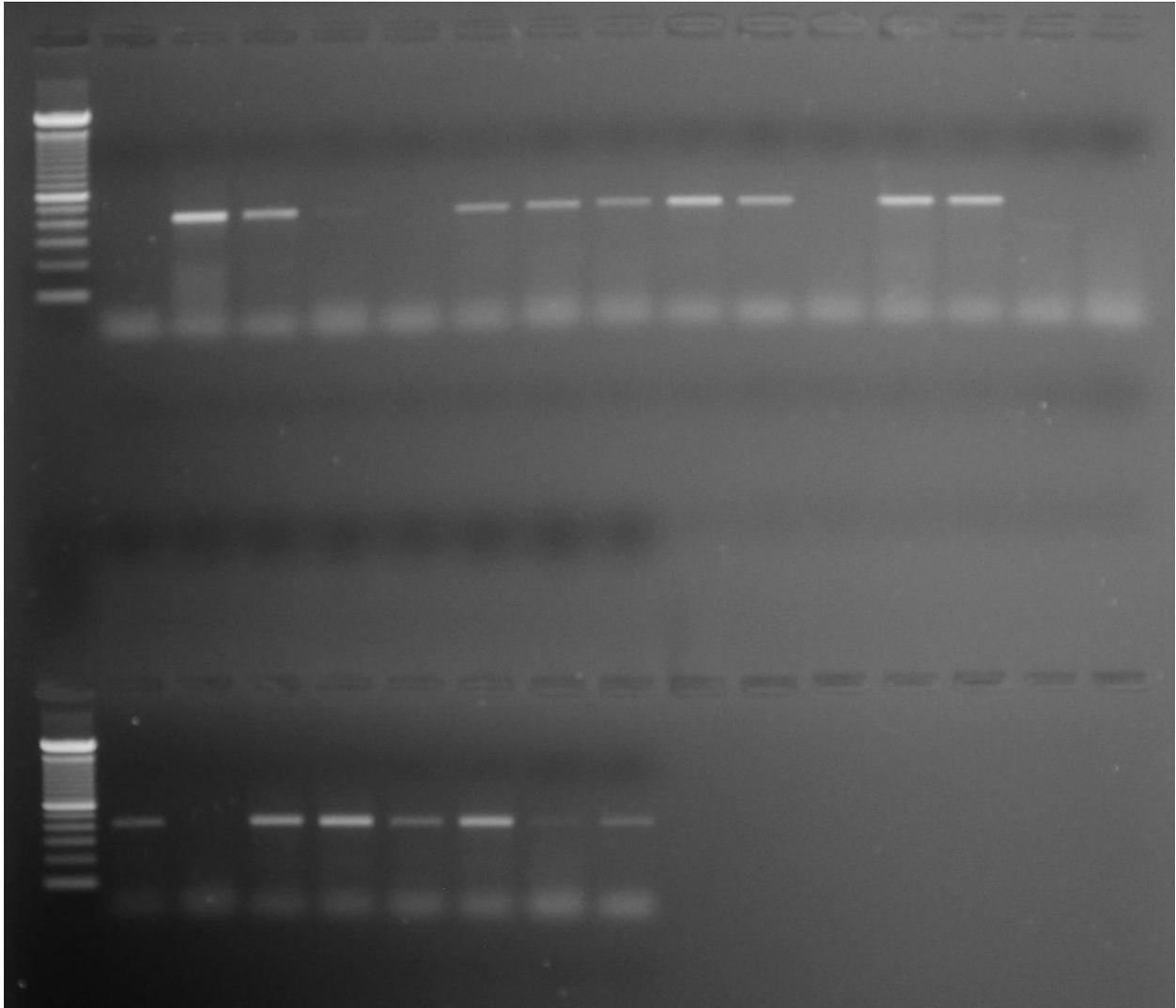
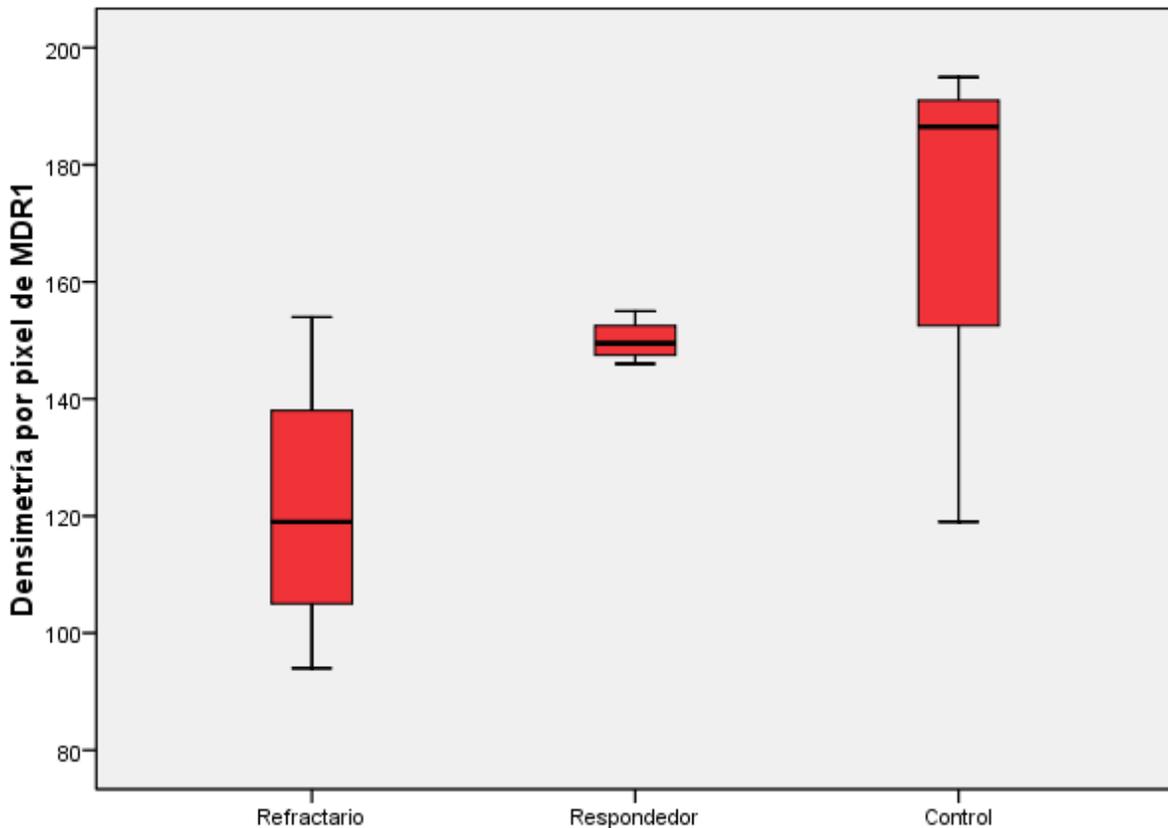


Figura 2. Fluorescencia de expresión de MDR1 por PCR Punto Final con Control de Linfocitos K67 (primera muestra), y Muestras de sujetos del Estudio, ordenados de manera codificada incluyendo controles y muestras posteriormente descartadas por error de procesamiento.

Al obtener estas imágenes de fluorescencia se eliminaron las 5 muestras alteradas por problemas de procesamiento en la separación de células blancas, así como muestras duplicadas utilizadas en el aprendizaje de la técnica, y se procedió a adquisición de semi-cuantificación por Densimetría de Pixel.

## Resultados de Densimetría por Pixel para MDR1 por PCR "Punto final"

Se practicó un análisis preliminar de Densimetría con la imagen de gel de agarosa de MDR1 obteniendo una M: 147.75 [IC 95% 127.91-167.59] (escala arbitraria con máximo de 255 por default en el programa), SD: 31.22, Min: 94, Max: 195, Inc: -0.02 y Kur:-0.72; para los tres grupos en general. Subdividiendo, para el grupo de Refractario la M: 121.50 [IC 95% 82.06-160.94], SD: 24.78, Min: 94, Max: 154, Inc: 0.585 y Kur: 1.413; para el grupo Respondedor una M: 150 [IC 95% 144.05-155.95], SD: 3.74, Min: 146, Max: 155, Inc: 0.764 y Kur: 1.5; y para el grupo Control una M: 171.75 [IC 95% 115.43-228.07], Min: 119, Max: 195, Inc: -1.921 y Kur 3.764 (Gráfica 4).



**Gráfica 4. Expresión Semi-Cuantitativa de MDR1 por Densimetría por Pixel en linfocitos de sangre periférica de Sujetos con Epilepsia y Sujetos Sanos.**

## Resultados. Análisis Inferencial

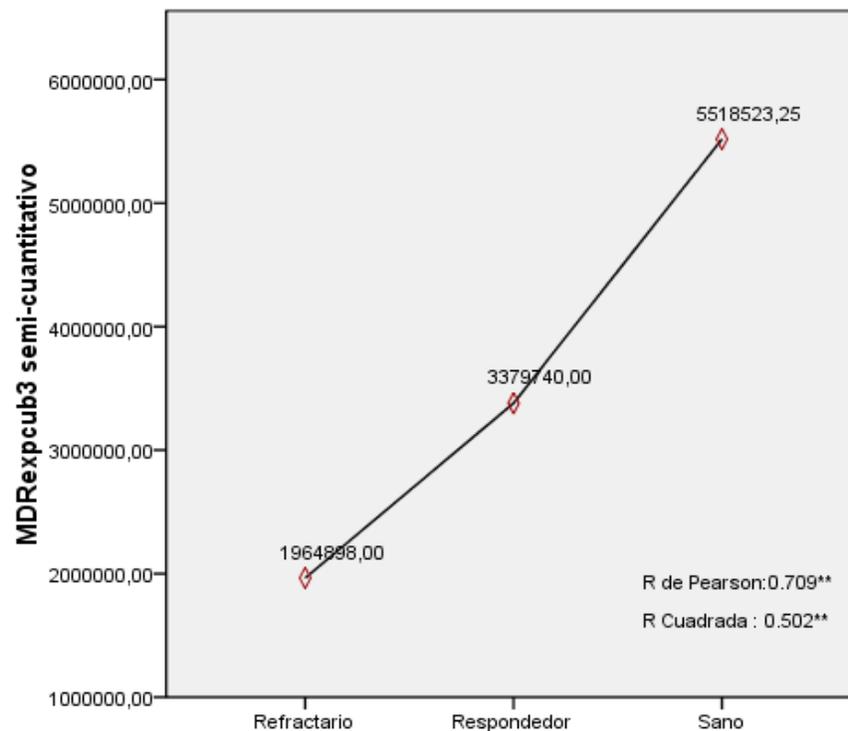
Se realizó una exploración de datos con análisis de Levene que mostró un valor desde 2.965 con una significancia de 0.102 asumiendo igualdad de varianzas sin embargo dado que el valor del test de Levene no fue tan representativo se realizó una transformación Cubica con la que se observó una prueba de Levene de 3.967 y una significancia de 0.058 con lo que se aumentó la fuerza de esta asunción y preservando una  $p > 0.5$  con lo que se asume igualdad de varianzas.

Posteriormente se realizó un ANOVA con la Transformación Cubica del Valor de MDR1 obteniéndose una M: 1964898.00 [IC 95% 55583.6463-3874212.3537] con SD: 1199903.57766 para los sujetos refractarios, una M: 3379740.00 [IC 95% 2973830.2180-3785649.7820], SD: 255092.93360 para el grupo Respondedor, y una M: 5518523.25 [IC 95% de 1392344.8433-9644701.6567], SD de 2.59309E6 para el grupo Control; de esta Forma el ANOVA mostró una F de 9.208 con una significancia estadística de 0.014 con el contraste de termino linear y una F global (al contemplar los 3 análisis comparativos) de 4.67 con significancia estadística con  $p < 0.05$  de 0.041.

El análisis post hoc se realizó con la prueba de LSD y Tukey S-b por tratarse de las pruebas más incluyentes y para grupos de número homogéneo, obteniéndose mediante el análisis LSD una diferencia entre los grupos Control y Refractario con una  $p < 0.01$ , entre el grupo Control y Respondedor con  $p$  de 0.1, y entre el grupo Respondedor y Refractario con una  $p$  de 0.26, en la Tabla 2 se muestran estos resultados y se grafican los promedios en la Grafica 5.

Tabla 2. Post-hoc MDR1 EXPONENTE CUBICO

	(I) Estado Final	(J) Estado Final	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Refractario	Respondedor	-1414842.00	1171106.01	0.48	-4684576.57	1854892.57
		Control	-3553625.25	1171106.01	0.03	-6823359.82	-283890.68
	Respondedor	Refractario	1414842.00	1171106.01	0.48	-1854892.57	4684576.57
		Control	-2138783.25	1171106.01	0.22	-5408517.82	1130951.32
	Control	Refractario	3553625.25	1171106.01	0.03	283890.68	6823359.82
		Respondedor	2138783.25	1171106.01	0.22	-1130951.32	5408517.82
LSD	Refractario	Respondedor	-1414842.00	1171106.01		-4064067.86	1234383.86
		Control	-3553625.25	1171106.01	0.01	-6202851.11	-904399.39
	Respondedor	Refractario	1414842.00	1171106.01	0.26	-1234383.86	4064067.86
		Control	-2138783.25	1171106.01	0.10	-4788009.11	510442.61
	Control	Refractario	3553625.25	1171106.01	0.01	904399.39	6202851.11
		Respondedor	2138783.25	1171106.01	0.10	-510442.61	4788009.11

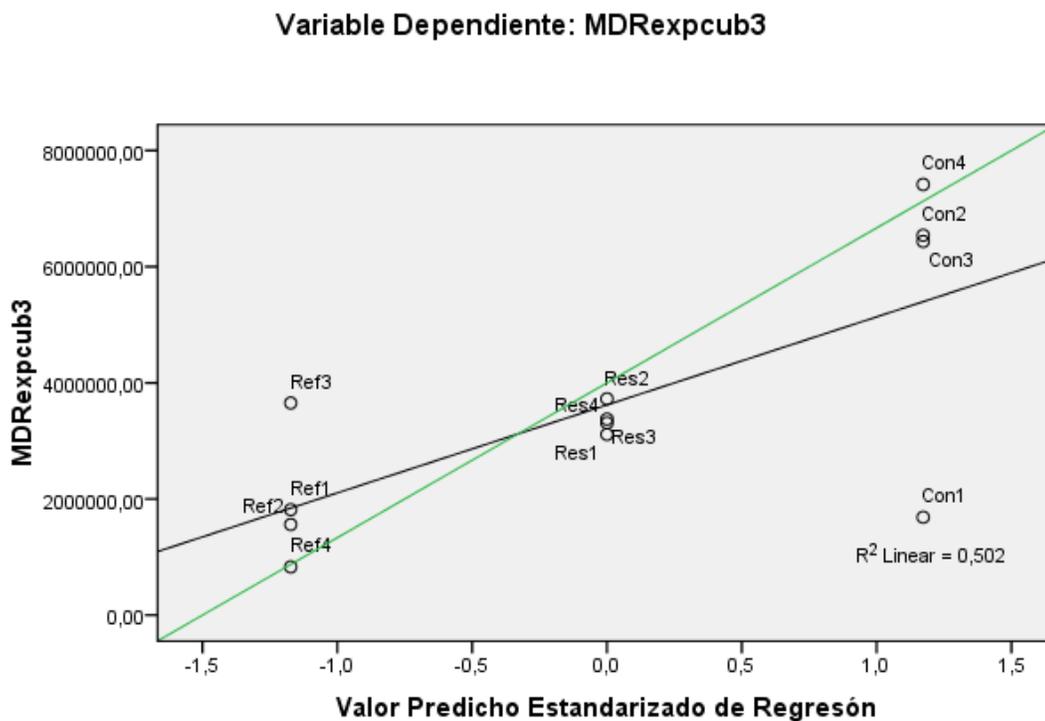


**Gráfica 5. Promedio de expresión semi-cuantitativa por grupo y tendencia de la muestra por medio de Densimetría por Pixel de PCR Punto Final. \*\*p< 0.01**

Se practicó una correlación de Pearson para evaluar la asociación entre el grado de Refratariedad y el nivel de expresión de MDR1 semi-cuantitativo expresado al cubo, siendo la Refratariedad una variable nominal categórica donde 0 es el grupo Refractorio, 1 el grupo Respondedor y 2 el grupo Control, obteniéndose una R de 0.709 con  $p < 0.01$  (Gráfica 5).

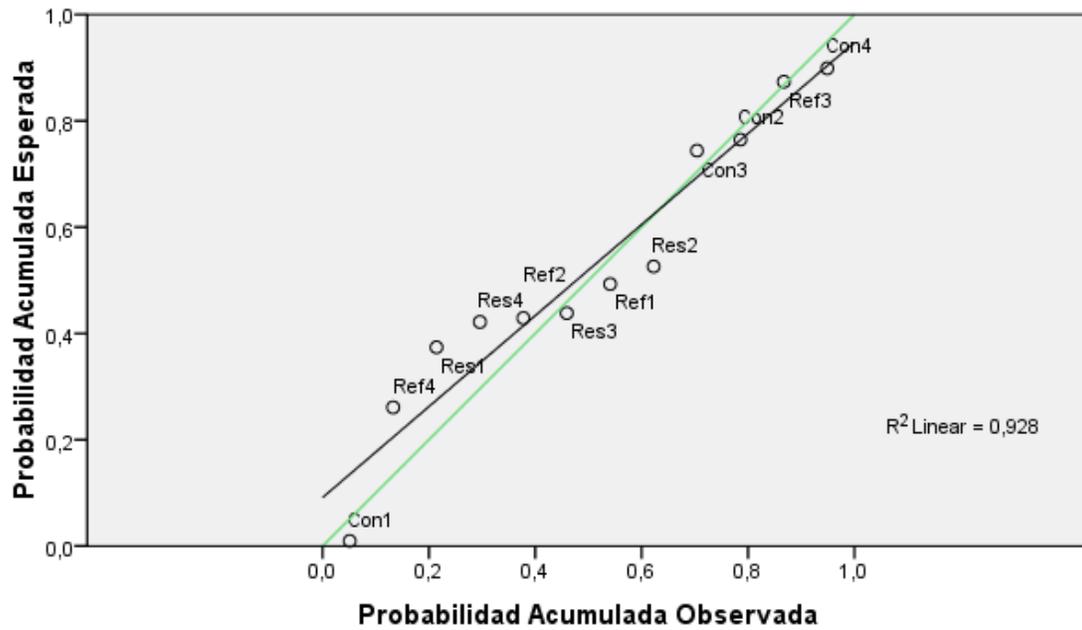
Posteriormente se realizó una regresión arrojando una  $R^2$  de 0.502 con F de 10.08 y significancia estadística con  $p < 0.01$  (Gráfica 6). Los residuales muestran una  $R^2$  de 0.928 dependiente del ajuste entre los diferentes valores con respecto a la tendencia de correlación (Gráfica 7).

**Gráfica 6. Plot de Dispersión de la Regresión**



Gráfica 7. Plot de Probabilidad Normal de los Residuales Estandarizados de Regresión

Variable Dependiente: MDRExpcub3



## Normalización de los Datos

Habiéndose realizado esta exploración inicial se llevó a cabo el mismo proceso con normalización de los datos dependiente del gen Constitutivo de control GAPDH.

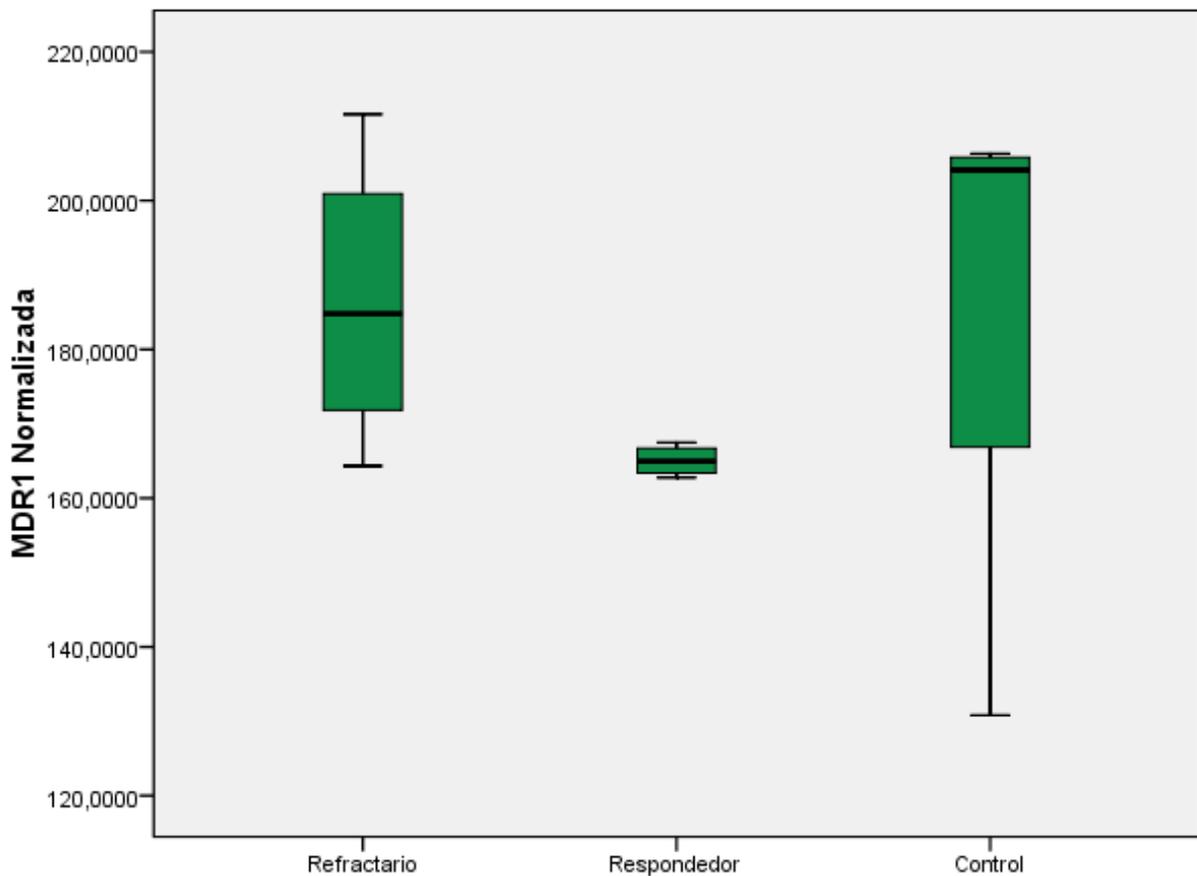
La tabla 3 muestra los valores obtenidos de la expresión de MDR1 y su normalización dependiente del valor de expresión del gen constitutivo GAPDH.

Tabla 3. Niveles de Expresión MDR1 en Linfocitos de Sangre Periférica en Epilépticos y Controles				
Sujeto	Densitometría por Pixel		Datos Normalizados (MDR1/GAPDH)	
	MDR1	GAPDH	PCR*	PCR Tiempo Real**
Ref1	122	147	0.829931973	2.6216174
Ref2	116	180	0.644444444	0.06065971
Ref3	154	219	0.703196347	1.69248144
Ref4	94	126	0.746031746	0.08647733
Res1	146	227	0.643171806	0.08081792
Res2	155	236	0.656779661	0.00090938
Res3	150	235	0.638297872	0.40764607
Res4	149	229	0.650655022	0.099014
Con1	119	232	0.512931034	0.18499589
Con2	187	235	0.795744681	0.93966923
Con3	186	231	0.805194805	0.11020315
Con4	195	241	0.809128631	0.31568453

\* Normalizados con respecto a escala Máxima 255 = 1 (Default de Software de Densimetría)  
 \*\* Normalizados a control de línea celular de linfocitos K562 como = 1, para el Valor Arbitrario  
 Ref = Refractarios, Res = Respondedores, Con = Control, MDR1 = Multiple Drugs Resistance Gen,  
 GAPDH=Glyceraldehyde-3-Phosphate

En la muestra total la expresión de MDR1 normalizada a GAPDH tuvo una M: 179.255000 [IC 95% 163.771955 – 194.738045], SD: 24,3685615, Min:130.8000, Max: 211.63000 y Me; 173.40000, subdividiendo, para el grupo refractario una M: 186.380000 [IC 95%: 154.708287 – 218.051713], SD:19.9040046, Min:164.3300, Max: 211.6300 y Me184.780000; para el grupo

Respondedor M: 165-045000 [IC 95%: 161.740041 – 165.036111], SD: 2.0769930, Min: 162.7700, Max:167.4800 y Me: 164.965000; y para el grupo Control M:186.340000 [IC 95%: 127-378100 – 245.301900]. SD:37-0544509, Mn: 130.8000, Max: 206.3300 y Me: 204.115000.



**Gráfica 8. Niveles de Expresión de MDR1 Normalizados a GAPDH por PCR Punto Final comparados por grupo**



Se practicó ANOVA nuevamente con la normalización de los datos sin obtener diferencia estadísticamente significativa (Tabla 4)

Tabla 4. ANOVA con Normalización deMDR1 a GAPDH por PCR Punto Final

MDR1NormNum

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Combined)	1211,548	2	605,774	1,025	,397
Linear Term Contrast	,003	1	,003	,000	,998
Deviation	1211,545	1	1211,545	2,049	,186
Within Groups	5320,547	9	591,172		
Total	6532,095	11			



Resultados. Estadística Descriptiva e Inferencial. Procesamiento de PCR Tiempo-Real

Habiendo analizado los resultados de PCR Punto Final una vez normalizados se consideró proceder a PCR Tiempo Real para corroborar y dar validez a los hallazgos.

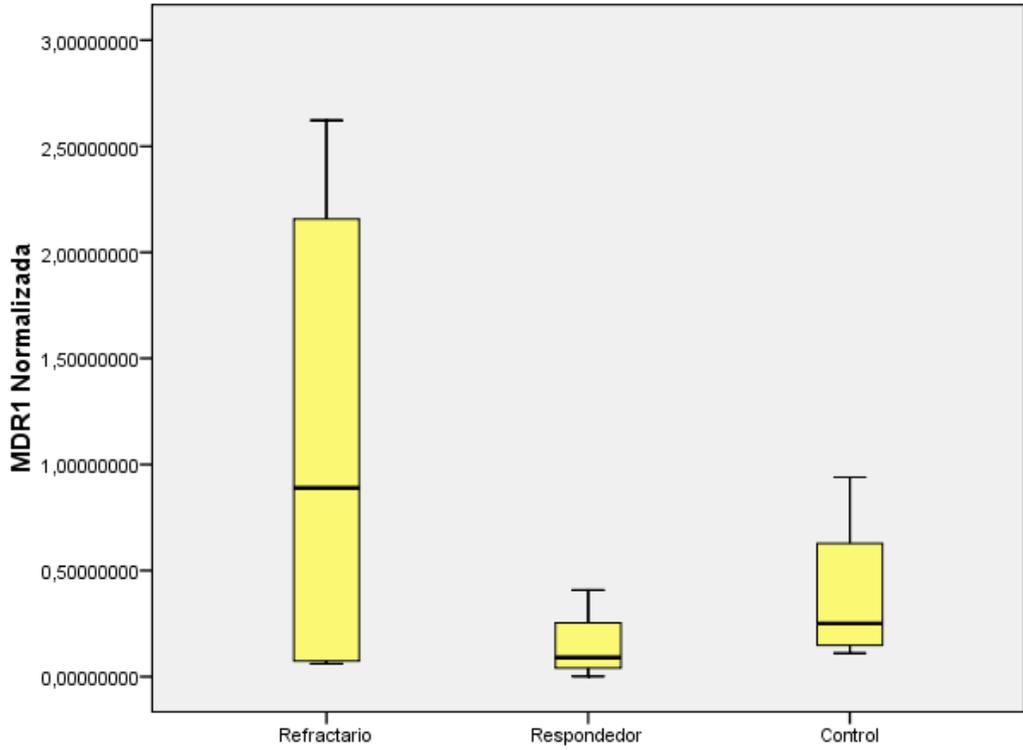
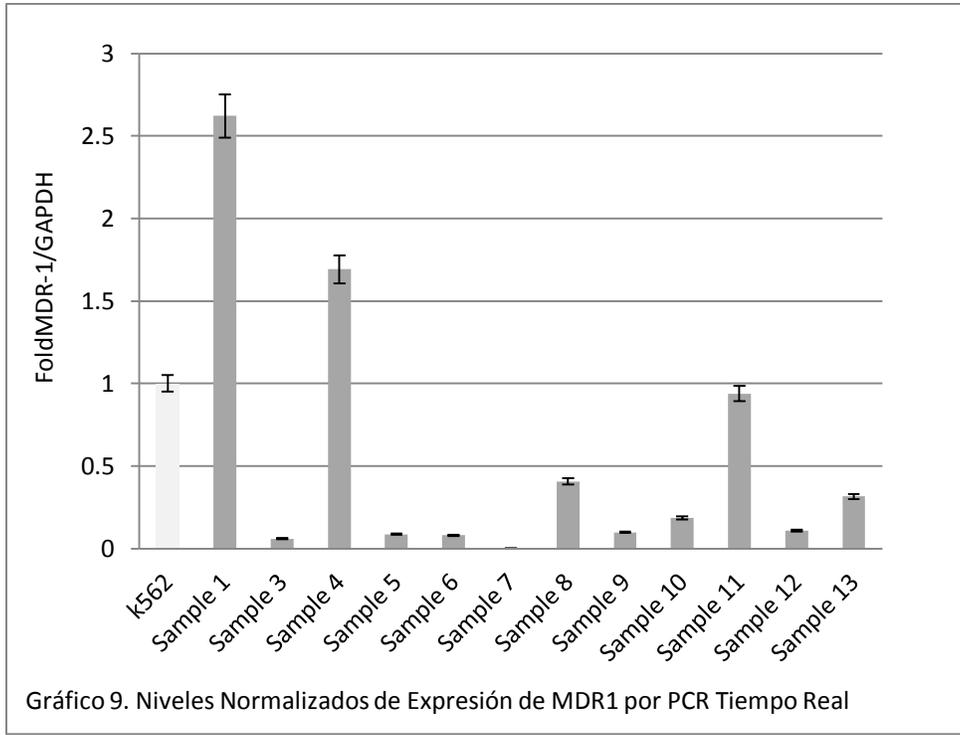
Se realizó la prueba y se obtuvo una M:0.5500146708 [IC 95%: 0.0313607128 - 1.068668628], SD: 0.81630264774, Mín:0.00090938, Máx: 2.62161740 y Me: 0.1475995200; en el grupo Refractorio se obtuvo M: 1.115308970 [IC 95%: -0.8917511878 – 3.12369127], SD: 1.261331670, Mín: 0.06065971, Máx: 2.62161740 y Me: 0.8894793850; en el grupo Respondedor M: 0.1470968425 [IC 95%: 0.1374927688 – 0.4316864538], SD: 0.17884959179, Mín: 0.00090938, Máx:0.40764607 y Me: 0.0899159600; y en el grupo Control M: 0.3876382000 [IC 95%: -0.2133512188 - 0.9886276188], SD: 0.37769021763, Mín: 0.11020315, Máx: 0.93966923 y Me: 0.2503402100, los valores por muestra se aprecian en la Tabla 2.

El ANOVA arrojó resultados estadísticamente no significativos (Tabla 5), por lo que se concluyó el estudio y se procedió al Análisis de Resultados (Gráficas 9 y 10).

**Tabla 5. ANOVA de MDR1 normalizado a GAPDH por PCR Tiempo Real**

PCRTR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,033	2	1,017	1,727	,232
Within Groups	5,297	9	,589		
Total	7,330	11			



Gráfica 10. Niveles de Expresión de MDR1 Normalizados a GAPDH por PCR Tiempo Real por grupo

## DISCUSION

La falta de respuesta al tratamiento médico es un problema fundamental en muchas enfermedades neurológicas – incluyendo la epilepsia – por diferentes mecanismos moleculares todavía no bien esclarecidos, teniéndose dos teorías implicadas, la expresión de transportadores de eflujo (que impiden al fármaco llegar a su objetivo) y la modificación genética y funcional de los ligandos diana de los fármacos (que impide o modifica la acción del fármaco en el objetivo), perteneciente a la primera de ellas, se encuentra el *MDR1* – gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (por sus siglas en inglés) ubicado en el cromosoma 7q21.1 codificante de la p-glicoproteína – cuya sobreexpresión se ha identificado en epilepsia crónica [36], [37], [38]. La p-glicoproteína (p-Gp) es la proteína más importante y prevalente de los transportadores responsables de la resistencia a múltiples fármacos (mecanismo responsable de la refractariedad a fármacos en múltiples enfermedades[39], incluyendo hasta el 90% de las faltas de respuesta a tratamientos anti-tumorales en cáncer metastásico[40], [41], [42]); esta proteína pertenece a la superfamilia del casete de unión a ATP y posea la inusual propiedad de ser poliespecífica a una amplia gama de sitios de unión, característica indispensable para su función biología primaria, decodificación intracelular, por lo que es capaz de reconocer compuestos tan pequeños como 330Da hasta aquellos de 4,000 Da[40]

La expresión de la p-Gp ha sido expuesta en etiologías diversas del espectro de epilepsia, incluyéndose: Epilepsia del Lóbulo Temporal de diversas causas[43], Esclerosis Tuberosa[44], entre otras.

De esta forma, Aronica [45] identifico su particular distribución en dos causas mayores de epilepsia refractaria, Displasia Cortical Focal y Tumores neurogliales, particularmente, aprecio



que la p-Gp se encontraba importantemente sobreexpresada en el endotelio de los vasos sanguíneos y en el tejido glial de las lesiones examinadas, no así en el tejido cerebral sano circundante, lo que conlleva a relacionar fuertemente esta selectividad con la patología y el mecanismo subyacente en la refractariedad. Esta teoría de selectividad se respalda por los estudios de Dombrowski [46] quien identificó sobreexpresión de MDR1, p-Gp cMRP/MRP2, MRP5 (genes de Proteínas Asociadas a Resistencia a Múltiples Fármacos, por sus siglas en inglés) en el endotelio de la barrera hematoencefálica de tejido cerebral de pacientes con Epilepsia del lóbulo temporal comparados con el endotelio del lóbulo temporal de pacientes operados por aneurisma cerebral así como endotelio de cordón umbilical. Inclusive Kwan [47] pudo observar que la expresión de la p-Gp seguía la distribución de las crisis en el componente anatómico en un modelo en ratas propensas a epilepsia.

Además de identificar la expresión de este gen y sus proteínas, se ha demostrado la presencia de esta proteína en múltiples líneas celulares específicas, que van desde el epitelio intestinal[48], [49], [50] medula ósea[51], hepatocitos, células renales tubulares proximales, capilares y endotelio de la barrera hematoencefálica[52], [53], [54], hasta astrocitos reactivos en el tejido encefálico[43], interfiriendo en diferentes puntos en la farmacocinética necesaria (absorción, distribución, metabolismo, excreción) para llevar a cabo su acción terapéutica[55] inclusive modulando la farmacodinamia del mismo, resultando de interés peculiar, su expresión en linfocitos, particularmente del linaje de los asesinos naturales CD56+[56], [57], [58], por su accesibilidad para el estudio.



Con estos precedentes, Siegmeund Wegner [22] identificó una infra expresión MRP1 en tejido cerebral concordante con una infra expresión de MRP1 y MDR1 en linfocitos de sangre periférica comparados con sujetos sanos, siendo esta última aseveración más acentuada en los pacientes refractarios a manejo médico que en aquellos con buena respuesta, independientemente del fármaco utilizado. En este punto, el presente estudio tenía como objetivo apreciar esta infraexpresión del MDR1 en linfocitos de sangre periférica, primariamente con el objeto de confirmar estos hallazgos pues la evidencia es escasa y en segundo término evaluar, si esta diferencia podría observarse desde etapas tempranas de la enfermedad, ya que prácticamente todos los estudios han contemplado pacientes con epilepsia que la han padecido de forma crónica y prácticamente ninguno ha evaluado su comportamiento en etapas tempranas, por lo que se evaluaron ambas hipótesis en un estudio piloto inicial donde observaríamos a grandes rasgos la tendencia a mostrar una infraexpresión en las muestras sanguíneas de pacientes con diagnóstico reciente; esta teoría está fundamentada en los hechos antes referidos, así como en la evidencia creciente de que la expresión a nivel de tejido cerebral de pacientes con epilepsia se ve afectada por la frecuencia de las crisis, la severidad de la misma y los síndromes epilépticos característicos, sin embargo también se ve influenciada por la cronicidad de la misma y por el uso de antiepilépticos, por lo que resulta interesante determinar si los factores inherentes a la epilepsia (tipo, severidad y frecuencia) son suficientes para modular la expresión del MDR1 desde inicios tempranos de la enfermedad como para poder ser de utilidad para identificar tempranamente a los pacientes que serán refractarios, sin embargo los resultados obtenidos en este piloto demuestran una ausencia de diferencia en la expresión de MDR1 por PCR en tiempo real en linfocitos de sangre periférica, por lo que existen al menos 4 posibles explicaciones de

relevancia para este hecho, que serán expuestas en orden de probabilidad: primera, que la muestra no sea capaz de representar el efecto por necesitarse de más sujetos de estudio, segunda, que además del MDR1 los demás genes codificantes de las proteínas de eflujo deben de estar jugando un papel importante en la refractariedad al tratamiento farmacológico, tercera, que la modulación en la expresión de MDR1 depende fuertemente de la cronicidad de la epilepsia y de las respuestas inducidas por los anticomisiales en sí, y cuarta, una espuria asociación entre los niveles de infraexpresión en linfocitos de sangre periférica y la presencia de refractariedad.

Finalmente, se ha evaluado la posibilidad de que diferentes polimorfismos del MDR1 sean partícipes en el proceso de refractariedad[21], siendo particularmente importante los polimorfismos G2677 en el exón 21 y el C3435T en el exón 26; para los cuales existen evidencias diversas a favor y en contra de su relación con refractariedad, como Ozgon [59] quien no logro identificar diferencias en su actividad con el sustrato de carbamazepina, similarmente Kim [60] afirma que en la población Coreana en la que realizo su estudio tampoco identifico una diferencia en la farmacodinamia de estas proteínas codificadas por MDR1 que pudiera explicar la refractariedad a tratamiento médico, por su parte Dericioglu [61] afirma lo propio en población Turca; por su parte Wasterlain [62] y Baars [63] reafirman la ausencia de relación entre refractariedad epiléptica y los polimorfismos, mientras que Bournissen [64] realizo un meta-análisis de 11 estudios de caso control afirmando consecuentemente esta falta de asociación en epilepsia; por otra parte mientras que Oselin [65], quien no identifico diferencia significativa en el efecto



de eflujo de rodamina de las correspondientes proteínas codificantes, Hitzl [56] afirma exactamente lo contrario, al tiempo que Siegmund[66] refiere que no puede excluir la falta de relación con refractariedad; sin embargo Siddiqui [67] pudo identificar una asociación con refractariedad, la cual expone que muy probablemente se deba a un efecto de factor común más que de agente causal, por lo que podemos observar que todas estos estudios muestran resultados diversos e inclusive contrapuestos por lo que a este respecto se precisa de estudios complementarios y más específicos para corroborar o descartar la falta de asociación.



## CONCLUSIONES

No se demostró diferencia significativa entre la expresión de MDR1 en linfocitos de sangre periférica mediante PCR en Tiempo Real de pacientes pediátricos con epilepsia de reciente inicio comparados con su expresión en sujetos sanos pareados por grupo etario.

No se demostró diferencia significativa entre la expresión de MDR1 en linfocitos de sangre periférica mediante PCR en Tiempo Real de pacientes pediátricos con epilepsia refractaria de reciente inicio de aquellos respondedores.

No se demostró la utilidad de la expresión de MDR1 por PCR tiempo Real para diferenciar tempranamente a los pacientes con epilepsia refractaria de aquellos que serán respondedores a tratamiento médico desde el momento de diagnóstico.

La Densimetría por Pixel ofrece una correlación discreta con PCR en tiempo Real para medir la expresión del MDR1 en linfocitos de sangre periférica.

Se requiere evaluar el espectro completo de las Proteínas Asociadas a Resistencia a Múltiples Fármacos (MRP's) conocidas hasta el momento para poder aseverar o descartar la asociación de las proteínas de eflujo en linfocitos de sangre periférica (por ser un tejido accesible y de bajo riesgo para su adquisición) con la presencia de refractariedad.

Se requiere evaluar si los polimorfismos de MDR1 (principalmente C3435T) juegan algún papel en la refractariedad de pacientes pediátricos mexicanos con epilepsia.

Se requiere de estudios con muestra mayor y comparativa entre epilepsia de reciente inicio y epilepsia crónica, tomando en cuenta una evaluación por subgrupos de severidad para evaluar si la expresión de MDR1 se encuentra afectada en todo el espectro de la enfermedad así como en su relación con el tiempo.



## ANEXO1. CARTA DE CONSENTIMIENTO

### **Expresión del gen MDR1 en linfocitos de sangre periférica como factor predictivo de refractariedad en pacientes pediátricos con epilepsia del lóbulo temporal de reciente diagnóstico en el servicio de Pediatría del Hospital General de México**

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha: / /

Investigación con riesgo mínimo

El presente documento tiene como objeto obtener el consentimiento del Padre o Tutor bajo el asentimiento del menor de edad: \_\_\_\_\_ para ser incluido en el protocolo de estudio denominado:

#### **“Expresión del gen MDR1 en linfocitos de sangre periférica como factor predictivo de refractariedad en pacientes pediátricos con epilepsia del lóbulo temporal de reciente diagnóstico en el servicio de Pediatría del Hospital General de México”**

mismo que tiene como objeto determinar la posibilidad de predecir e identificar tempranamente a los pacientes con epilepsia (crisis epilépticas, “convulsivas”) que no responden a tratamiento con medicamentos (refractario) por medio de la medición del gen nombrado “MDR1” en una muestra de sangre habitual. La importancia y justificación de este estudio radica en la alta frecuencia que tiene la epilepsia en la población mundial y nacional, representando un problema de salud pública, siendo hasta el momento imposible predecir que pacientes responderán a tratamiento médico (con medicamentos) y quienes no (refractario), con lo cual se podría evitar a futuro el tratamiento prolongado e ineficaz de su padecimiento y favorecer el uso de las alternativas que se conoce son efectivas en los pacientes refractarios, sopesando de esta forma los riesgos que en si conllevan.

Al aceptar ser incluido en este protocolo de estudio se le garantiza que su atención medica no se verá afectada y que será tratado bajo las mismas condiciones que cualquier otro paciente en la institución.

Al aceptar ser incluido en este protocolo usted autoriza:

Se le tomen muestras de sangre en 3 diferentes tiempos:

Al inicio del seguimiento (pacientes control) y / o diagnóstico de su padecimiento

A la mitad del seguimiento.

Al final de seguimiento (tiempo aproximado 6 meses a 1 año)

Dichas muestras sanguíneas serán tomadas durante la toma de estudios que se realizan habitualmente a los pacientes que acuden a consulta. En el caso de los controles sin epilepsia, dicha muestra se recabara de aquellos pacientes a quienes por motivos de su consulta médica se requiera de algún estudio paraclínico hematológico, proceso durante el cual se tomara la muestra sanguínea que será usada como control.

Dicho proceso se encuentra dentro de la atención habitual de su padecimiento, lo cual, por lo tanto no incurrirá en ninguna molestia adicional de la que tendría de no aceptar incluirse en el presente estudio, mismas que incluyen: toma de muestra de sangre por punción venosa, lo cual puede provocar dolor e inflamación local y conlleva un mínimo riesgo de infección local, todo lo cual se reduce al máximo al llevar acabo medidas de higiene y esterilidad requeridas por la institución y las normas de atención médica.

Los beneficios que usted podrá obtener de incluirse en el presente estudio serán:

Ser atendido por un equipo multidisciplinario de médicos desde el inicio de su atención médica, que incluyen: Médico pediatra, Medico neurocirujano, Médico Residente de pediatría, Médico residente de Neurocirugía, Neuropsicólogo.

En caso de obtenerse apoyo para la obtención de medicamentos, usted obtendría gratuitamente el tratamiento farmacológico por el tiempo completo del seguimiento (Tiempo que dura el protocolo de estudio, tiempo aproximado 6 meses a 1 año) sujeto al número determinado de tratamientos que se logre obtener de la industria farmacéutica. En caso de obtenerse apoyo para los estudios de Resonancia Magnética y Electroencefalograma, usted podría obtener la realización de su estudio a un coste menor del que cualquier paciente tratado con su padecimiento podría obtener en esta institución.

Página 1/2



**Expresión del gen MDR1 en linfocitos de sangre periférica como factor predictivo de refractariedad en pacientes pediátricos con epilepsia del lóbulo temporal de reciente diagnóstico en el servicio de Pediatría del Hospital General de México**

**Paciente (menor de edad):** \_\_\_\_\_

Padre o Tutor: \_\_\_\_\_

Los beneficios para el resto de las personas al completarse el estudio, serán dependientes de que el presente estudio pueda encontrar al gen MDR1 como una herramienta que logre identificar a los pacientes que no responderán a tratamiento con medicamentos, con lo cual todos los pacientes con epilepsia podrían ser atendidos más eficaz y oportunamente.

Durante todo el proceso del estudio se le garantiza recibir respuesta a cada pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de la investigación por parte de una o más personas identificadas por nombre, teléfono y dirección.

La libertad de retirar su consentimiento sin caer en perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento

La seguridad de que se garantiza la confidencialidad de la información

El compromiso de proporcionarle información actualizada durante el estudio

El presente estudio no presenta riesgos para su salud, ni representa un trato diferente de la atención medica habitual por lo que no representa causa de indemnización, así mismo todos los estudios solicitados durante la atención medica de su padecimiento son los mismos que durante el presente estudio se llevaran a cabo por lo que no representan un gasto adicional del esperado para la atención habitual de su padecimiento.

Para cualquier duda, Contactar al Dr. Lino Eduardo Cardiel Marmolejo responsable de la investigación, Dr. Fiacro Jiménez Ponce Tutor de la Tesis de Investigación, Dr. José Alberto Israel Romero Rangel Alumno de Maestría Autor de la Tesis de Investigación (5536606211), o con el Dr. Carlos Ibarra Pérez presidente de la comisión de ética Tel 27892000 Ext 1368

\_\_\_\_\_  
Firma y Nombre del Padre del paciente /Tutor

\_\_\_\_\_  
Firma y Nombre de la Madre del paciente /Tutor

\_\_\_\_\_  
Dirección y teléfono del Padre del paciente / Tutor

\_\_\_\_\_  
Dirección y tel. de la Madre del paciente / Tutor

Dr. Lino Eduardo Cardiel Marmolejo  
Firma del Investigador responsable

Dr. Fiacro Jiménez Ponce  
Firma del Investigador

\_\_\_\_\_  
Unidad de Pediatría HGM O.D.  
Teléfono: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unidad de Neurocirugía Departamento de Neurocirugía  
Funcional y Estereotaxia.

Dr. José Alberto Israel Romero Rangel  
Firma de Investigador (Alumno de Maestría)

\_\_\_\_\_  
Unidad de Neurocirugía Telefono:5536606211



PROTOCOLO: EXPRESION DE MDR1 ...  
HERRAMIENTA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

# Sujeto			
Tipo de sujeto (paciente o control)			
Edad			
Nombre			
N. Familiar			
Expediente			
Origen			
Radicación			
Dirección			
Teléfono			
Fecha de Diagnostico			
Toma de muestras	Fecha	Expresión de MDR1 (si/no)	Nivel de Expresión
1ª Muestra			
2ª Muestra			
3ª Muestra			
Crisis Epilépticas	<b>Ver Calendario de Crisis Anexo para detalles</b>		
Fecha de inicio	Frecuencia	Duración	Generalizadas (si/no)
Esquemas farmacológicos		Dosis	Nivel Sérico
			Control a 3 meses (si/no)
			Control a 6 meses (si/no)
1er esquema	Oxcarbazepina o		
2do esquema	Ácido Valproico		

Resonancia Magnética			
Electroencefalograma			
	1		
	2		
	3		
	Video-EEG		
	Polisomnografía 10-20		
Dx Nosológico			

Paciente refractario (si/no)			
Observaciones			



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. P. Pickett, *The American Heritage Dictionary of the English Language*, 4TH, ILUST., vol. 43, no. 8. 2000, p. 2074.
- [2] R. S. Fisher, W. van Emde Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee, and J. Engel, "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).," *Epilepsia*, vol. 46, no. 4, pp. 470–2, Apr. 2005.
- [3] F. Lefevre and N. Aronson, "Ketogenic Diet for the Treatment of Refractory Epilepsy in Children: A Systematic Review of Efficacy," *PEDIATRICS*, vol. 105, no. 4, pp. e46–e46, Apr. 2000.
- [4] P. Kwan and M. J. Brodie, "Early identification of refractory epilepsy.," *The New England journal of medicine*, vol. 342, no. 5, pp. 314–9, Feb. 2000.
- [5] D. W. Loring and K. J. Meador, "Cognitive side effects of antiepileptic drugs in children," *Neurology*, vol. 62, no. 6, pp. 872–877, Mar. 2004.
- [6] R. T. Daniel, S. G. Thomas, and M. Thomas, "Role of surgery in pediatric epilepsy.," *Indian pediatrics*, vol. 44, no. 4, pp. 263–73, Apr. 2007.
- [7] I. Bragatti, R. Dos Santos, L. Ohlweiler, J. Ranzan, and N. Tellechea, "Indicaciones quirúrgicas de la epilepsia en la niñez," *Medicina*, vol. 67, no. 1, pp. 614–622, 2007.
- [8] N. Senanayake and G. C. Roman, "Epidemiology of epilepsy in developing countries. Reviews / Analyses," *World Health*, vol. 71, no. 2, pp. 247–258, 1993.
- [9] J. Engel, "ILAE Commission Report A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy : Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology," vol. 42, no. 6, pp. 796–803, 2001.
- [10] H. a Volk and W. Löscher, "Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures.," *Brain : a journal of neurology*, vol. 128, no. Pt 6, pp. 1358–68, Jun. 2005.
- [11] Y. Wang-Tilz, C. Tilz, B. Wang, G. P. Tilz, and H. Stefan, "Influence of lamotrigine and topiramate on MDR1 expression in difficult-to-treat temporal lobe epilepsy.," *Epilepsia*, vol. 47, no. 2, pp. 233–9, Feb. 2006.
- [12] S. Chayasirisobhon, "The mechanisms of medically refractory temporal lobe epilepsy.," *Acta neurologica Taiwanica*, vol. 18, no. 3, pp. 155–60, Sep. 2009.
- [13] R. C. Franzon and M. M. Guerreiro, "Temporal lobe epilepsy in childhood: review article," *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, vol. 12, no. 1, pp. 26–31, Mar. 2006.

- [14] E. Cerrahisi and G. Özel, "Pediatric Epilepsy Surgery ( I ): Considerations and Presurgical Strategies," *Turkish Neurosurgery*, vol. 10, pp. 71–79, 2000.
- [15] C. Luna-Tortós, M. Fedrowitz, and W. Löscher, "Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein.," *Neuropharmacology*, vol. 55, no. 8, pp. 1364–75, Dec. 2008.
- [16] S. Pati and A. V Alexopoulos, "Pharmacoresistant epilepsy: from pathogenesis to current and emerging therapies.," *Cleveland Clinic journal of medicine*, vol. 77, no. 7, pp. 457–67, Jul. 2010.
- [17] S. A. Vahab, S. Sen, N. Ravindran, S. Mony, A. Mathew, N. Vijayan, G. Nayak, N. Bhaskaranand, M. Banerjee, and K. Satyamoorthy, "Analysis of genotype and haplotype effects of ABCB1 (MDR1) polymorphisms in the risk of medically refractory epilepsy in an Indian population.," *Drug metabolism and pharmacokinetics*, vol. 24, no. 3, pp. 255–60, Jan. 2009.
- [18] V. Ramachandran and S. D. Shorvon, "Clues to the Genetic Influences of Drug Responsiveness in Epilepsy," *Epilepsia*, vol. 44, no. 9, pp. 33–37, Feb. 2003.
- [19] R. B. Wang, C. L. Kuo, L. L. Lien, and E. J. Lien, "Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors.," *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, vol. 28, no. 3, pp. 203–28, Jun. 2003.
- [20] D. J. D. Joshi, Mohini, "POLYMERASE CHAIN REACTION : METHODS , PRINCIPLES AND," *International Journal of Biomedical Research*, vol. 1, no. 5, pp. 81–97, 2010.
- [21] K. Oselin, I. Nowakowski-Gashaw, P. M. Mrozikiewicz, D. Wolbergs, R. Pähkla, and I. Roots, "Quantitative determination of MDR1 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes: a possible role of genetic polymorphisms in the MDR1 gene.," *European journal of clinical investigation*, vol. 33, no. 3, pp. 261–7, Mar. 2003.
- [22] W. Siegmund and H. K. Kroemer, "Expression and function of ABC multidrug transport proteins in patients with non-responsive focal epilepsy," Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2006.
- [23] N. Marchi, K. L. Hallene, K. M. Kight, L. Cucullo, G. Moddel, W. Bingaman, G. Dini, A. Vezzani, and D. Janigro, "Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain.," *BMC medicine*, vol. 2, p. 37, Oct. 2004.
- [24] Q. LU, L. WU, L. JIN, Q. XU, and Y. SHEN, "Association analysis of a polymorphism of MDR1 gene and refractory temporal lobe epilepsy in a Chinese population," *Neurology Asia*, vol. 12, no. Supplement 1, pp. 94–95, 2007.

- [25] P. Song, S. Li, B. Meibohm, A. O. Gaber, M. R. Honaker, M. Kotb, and C. R. Yates, "Detection of MDR1 single nucleotide polymorphisms C3435T and G2677T using real-time polymerase chain reaction: MDR1 single nucleotide polymorphism genotyping assay.," *AAPS pharmSci*, vol. 4, no. 4, p. E29, Jan. 2002.
- [26] K. Pleban and G. F. Ecker, "Inhibitors of p-glycoprotein--lead identification and optimisation.," *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 5, no. 2, pp. 153–63, Feb. 2005.
- [27] H. Freitag and I. Tuxhorn, "Cognitive function in preschool children after epilepsy surgery: rationale for early intervention.," *Epilepsia*, vol. 46, no. 4, pp. 561–7, Apr. 2005.
- [28] M. A. Mikati, N. Ataya, J. Ferzli, R. Kurdi, D. El-Banna, A. Rahi, A. Shamseddine, D. Sinno, and Y. Comair, "Quality of life after surgery for intractable partial epilepsy in children: a cohort study with controls.," *Epilepsy research*, vol. 90, no. 3, pp. 207–13, Aug. 2010.
- [29] S. Griffin and D. Tranel, "Age of seizure onset, functional reorganization, and neuropsychological outcome in temporal lobectomy.," *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, vol. 29, no. 1, pp. 13–24, Jan. 2007.
- [30] T. Loddenkemper, K. D. Holland, L. D. Stanford, P. Kotagal, W. Bingaman, and E. Wyllie, "Developmental outcome after epilepsy surgery in infancy.," *Pediatrics*, vol. 119, no. 5, pp. 930–5, May 2007.
- [31] E. Wyllie, Y. G. Comair, P. Kotagal, J. Bulacio, W. Bingaman, and P. Ruggieri, "Seizure outcome after epilepsy surgery in children and adolescents.," *Annals of neurology*, vol. 44, no. 5, pp. 740–8, Nov. 1998.
- [32] A. T. Berg, S. N. Smith, D. Frobish, B. Beckerman, S. R. Levy, F. M. Testa, and S. Shinnar, "Longitudinal assessment of adaptive behavior in infants and young children with newly diagnosed epilepsy: influences of etiology, syndrome, and seizure control.," *Pediatrics*, vol. 114, no. 3, pp. 645–50, Sep. 2004.
- [33] a P. Aldenkamp, W. C. Alpherts, P. Sandstedt, G. Blennow, D. Elmqvist, J. Heijbel, H. L. Nilsson, B. Tonnby, L. Wåhlander, and E. Wosse, "Antiepileptic drug-related cognitive complaints in seizure-free children with epilepsy before and after drug discontinuation.," *Epilepsia*, vol. 39, no. 10, pp. 1070–4, Oct. 1998.
- [34] J. H. Cross, P. Jayakar, D. Nordli, O. Delalande, M. Duchowny, H. G. Wieser, R. Guerrini, and G. W. Mathern, "Proposed criteria for referral and evaluation of children for epilepsy surgery: recommendations of the Subcommission for Pediatric Epilepsy Surgery.," *Epilepsia*, vol. 47, no. 6, pp. 952–9, Jun. 2006.

- [35] D. C. Heaney and C. E. Begley, "Economic evaluation of epilepsy treatment: a review of the literature.," *Epilepsia*, vol. 43 Suppl 4, pp. 10–6, Jan. 2002.
- [36] S. Remy, S. Gabriel, B. W. Urban, D. Dietrich, T. N. Lehmann, C. E. Elger, U. Heinemann, and H. Beck, "A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy.," *Annals of neurology*, vol. 53, no. 4, pp. 469–79, Apr. 2003.
- [37] D. F. Callen, E. Baker, R. N. Simmers, R. Seshadri, and I. B. Roninson, "Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1," *Human Genetics*, vol. 77, no. 2, pp. 142–144, Oct. 1987.
- [38] A. Lazarowski, M. Massaro, A. Schteinschnaider, S. Intruvini, G. Sevlever, and A. Rabinowicz, "Neuronal MDR-1 gene expression and persistent low levels of anticonvulsants in a child with refractory epilepsy.," *Therapeutic drug monitoring*, vol. 26, no. 1, pp. 44–6, Feb. 2004.
- [39] E. F. Choo, B. Leake, C. Wandel, H. Imamura, a J. Wood, G. R. Wilkinson, and R. B. Kim, "Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes.," *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, vol. 28, no. 6, pp. 655–60, Jun. 2000.
- [40] S. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, and S. Chittaboina, "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding," *Science*, vol. 323, no. 5922, pp. 1718–1722, 2009.
- [41] U. A. Germann, I. Pastan, and M. M. Gottesman, "P-glycoproteins: mediators of multidrug resistance.," *Seminars in cell biology*, vol. 4, no. 1, pp. 63–76, Feb. 1993.
- [42] S. V Ambudkar, S. Dey, C. a Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, and M. M. Gottesman, "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 39, pp. 361–98, Jan. 1999.
- [43] D. Chengyun, L. Guoming, M. Elia, M. V Catania, and X. Qunyuan, "Expression of multidrug resistance type 1 gene (MDR1) P-glycoprotein in intractable epilepsy with different aetiologies: a double-labelling and electron microscopy study.," *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, vol. 27, no. 4, pp. 245–51, Sep. 2006.
- [44] a Lazarowski, G. Sevlever, a Taratuto, M. Massaro, and a Rabinowicz, "Tuberous sclerosis associated with MDR1 gene expression and drug-resistant epilepsy.," *Pediatric neurology*, vol. 21, no. 4, pp. 731–4, Oct. 1999.

- [45] E. Aronica, J. . Gorter, G. . Jansen, C. W. . van Veelen, P. . van Rijen, S. Leenstra, M. Ramkema, G. . Scheffer, R. . Scheper, and D. Troost, "Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors," *Neuroscience*, vol. 118, no. 2, pp. 417–429, May 2003.
- [46] S. M. Dombrowski, S. Y. Desai, M. Marroni, L. Cucullo, K. Goodrich, W. Bingaman, M. R. Mayberg, L. Bengez, and D. Janigro, "Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy.," *Epilepsia*, vol. 42, no. 12, pp. 1501–6, Dec. 2001.
- [47] P. Kwan, G. J. Sills, E. Butler, T. W. Gant, B. S. Meldrum, and M. J. Brodie, "Regional expression of multidrug resistance genes in genetically epilepsy-prone rat brain after a single audiogenic seizure.," *Epilepsia*, vol. 43, no. 11, pp. 1318–23, Nov. 2002.
- [48] R. Bouër, L. Barthe, C. Philibert, C. Tournaire, J. Woodley, and G. Houin, "The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac.," *Fundamental & clinical pharmacology*, vol. 13, no. 4, pp. 494–500, Jan. 1999.
- [49] G.-T. Ho, F. M. Moodie, and J. Satsangi, "Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease?," *Gut*, vol. 52, no. 5, pp. 759–66, May 2003.
- [50] S. Hoffmeyer, O. Burk, O. von Richter, H. P. Arnold, J. Brockmöller, A. Johné, I. Cascorbi, T. Gerloff, I. Roots, M. Eichelbaum, and U. Brinkmann, "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 7, pp. 3473–8, Mar. 2000.
- [51] T. Licht, I. Pastan, M. M. Gottesman, and F. Herrmann, "The multidrug-resistance gene in gene therapy of cancer and hematopoietic disorders.," *Annals of hematology*, vol. 72, no. 4, pp. 184–93, Apr. 1996.
- [52] I. Ieiri, H. Takane, and K. Otsubo, "The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications.," *Clinical pharmacokinetics*, vol. 43, no. 9, pp. 553–76, Jan. 2004.
- [53] R. B. Kim, "Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers.," *Drug metabolism reviews*, vol. 34, no. 1–2, pp. 47–54, 2002.
- [54] C. Dagenais, C. L. Graff, and G. M. Pollack, "Variable modulation of opioid brain uptake by P-glycoprotein in mice.," *Biochemical pharmacology*, vol. 67, no. 2, pp. 269–76, Jan. 2004.

- [55] R. Linardi and C. Natalini, "Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs," *Ciência Rural*, vol. 36, no. 1, pp. 336–341, 2006.
- [56] M. Hitzl, S. Drescher, H. van der Kuip, E. Schäffeler, J. Fischer, M. Schwab, M. Eichelbaum, and M. F. Fromm, "The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells.," *Pharmacogenetics*, vol. 11, no. 4, pp. 293–8, Jun. 2001.
- [57] H. Kobayashi, Y. Takemura, Y. Kawai, H. Miyachi, M. Kawabata, T. Matsumura, T. Yamashita, S. Mori, K. Furihata, S. Shimodaira, K. Motoyoshi, T. Hotta, S. Sekiguchi, Y. Ando, and K. Watanabe, "Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction assay for quantification of human multidrug resistance 1 (MDR1) gene expression in fresh leukemic cells.," *The Journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 135, no. 2, pp. 199–209, Feb. 2000.
- [58] Y. J. Moon, S. Zhang, and M. E. Morris, "Real-time quantitative polymerase chain reaction for BCRP, MDR1, and MRP1 mRNA levels in lymphocytes and monocytes.," *Acta haematologica*, vol. 118, no. 3, pp. 169–75, Jan. 2007.
- [59] G. O. Ozgon, N. Bebek, G. Gul, and N. Cine, "Association of MDR1 (C3435T) polymorphism and resistance to carbamazepine in epileptic patients from Turkey.," *European neurology*, vol. 59, no. 1–2, pp. 67–70, Jan. 2008.
- [60] D. W. Kim, M. Kim, S. K. Lee, R. Kang, and S.-Y. Lee, "Lack of association between C3435T nucleotide MDR1 genetic polymorphism and multidrug-resistant epilepsy.," *Seizure : the journal of the British Epilepsy Association*, vol. 15, no. 5, pp. 344–7, Jul. 2006.
- [61] N. Dericioglu, M. O. Babaoglu, U. Yasar, I. B. Bal, A. Bozkurt, and S. Saygi, "Multidrug resistance in patients undergoing resective epilepsy surgery is not associated with C3435T polymorphism in the ABCB1 (MDR1) gene.," *Epilepsy research*, vol. 80, no. 1, pp. 42–6, Jul. 2008.
- [62] C. C. Wasterlain, "Lack of association between MDR1 polymorphisms and pharmacoresistance to childhood-onset epilepsy," pp. 1835–1837, 2009.
- [63] C. Baars, W. Löscher, T. Leeb, A. Becker, and H. Potschka, "Polymorphic variants of the multidrug resistance gene Mdr1a and response to antiepileptic drug treatment in the kindling model of epilepsy.," *European journal of pharmacology*, vol. 550, no. 1–3, pp. 54–61, Nov. 2006.
- [64] F. G. Bournissen, M. E. Moretti, D. N. Juurlink, G. Koren, M. Walker, and Y. Finkelstein, "Polymorphism of the MDR1/ABCB1 C3435T drug-transporter and resistance to anticonvulsant drugs: a meta-analysis.," *Epilepsia*, vol. 50, no. 4, pp. 898–903, Apr. 2009.



- [65] K. Oselin, T. Gerloff, P. M. Mrozikiewicz, R. Pähkla, and I. Roots, "MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes.," *Fundamental & clinical pharmacology*, vol. 17, no. 4, pp. 463–9, Aug. 2003.
- [66] I. Mosyagin, U. Runge, H. W. Schroeder, E. Dazert, S. Vogelgesang, W. Siegmund, R. W. Warzok, and I. Cascorbi, "Association of ABCB1 genetic variants 3435C>T and 2677G>T to ABCB1 mRNA and protein expression in brain tissue from refractory epilepsy patients.," *Epilepsia*, vol. 49, no. 9, pp. 1555–61, Sep. 2008.
- [67] A. Siddiqui, R. Kerb, M. E. Weale, U. Brinkmann, A. Smith, D. B. Goldstein, N. W. Wood, and S. M. Sisodiya, "Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1.," *The New England journal of medicine*, vol. 348, no. 15, pp. 1442–8, Apr. 2003.