



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ESTUDIO MOLECULAR DE LOS PRINCIPALES POLIMORFISMOS DE LOS GENES
ABCB1, *CYP2C9* Y *CYP2C19* EN PACIENTES CON EPILEPSIA MIOCLÓNICA
JUVENIL RESPONDEDORES Y NO RESPONDEDORES AL TRATAMIENTO CON
ÁCIDO VALPROICO**

T E S I S

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

P R E S E N T A:

QUETZALLI DENISSE ÁNGELES LÓPEZ

ASESOR:

DR. AURELIO JARA PRADO

COASESORA:

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

Estudio molecular de los principales polimorfismos de los genes ABCB1, CYP2C9 y CYP2C19 en pacientes con Epilepsia Mioclónica Juvenil respondedores y no respondedores al tratamiento con Ácido Valproico.

Que presenta la pasante: **Quetzalli Denisse Ángeles López**

Con número de cuenta: **410003347** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Junio de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

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

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

Dedicatoria

A mi pequeña, bonita y peculiar familia

Y a todos los seres que en su camino
me han brindado cariño y enseñanzas

“Yo soy una parte de todo aquello que he encontrado en mi camino”

Alfred Tennyson

Agradecimientos

A mi tutor Dr Aurelio Jara Prado por todas sus enseñanzas y sobre todo por su apoyo en la realización de éste proyecto.

A mi coasesora Dra Sandra Díaz Barriga Arceo por los conocimientos transmitidos en los salones de clase y el apoyo fuera de ellos.

Al coordinador de BQD, Alejandro Gutierrez, por el inmenso apoyo tanto en la revisión de éste trabajo como en todo el papeleo que conllevó.

Al resto de mi jurado: Mtra. Maritere Dominguez por todo lo enseñado; a Llasbeth Hernández por toda la atención puesta a éste trabajo; y con muy especial cariño a la Profra. Rosalba Bonilla por ser un gran incentivo a lo largo de mi carrera y por prestar tanta atención a éste trabajo incluso en momentos difíciles.

Al departamento de genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía: David, Adri, Lety, Dr Jorge, Dr Jara y Don Gabino por hacer tan ameno mi paso por el laboratorio y especialmente a mis amigos: Sara, Ara, Gaby, Miguel y César por las risas y travesuras en el lab y fuera de él. Y con mucho cariño a Gabriel Lima por ser un excelente profesor y una excelente persona.

A mi papá Isaac por su apoyo siempre incondicional, a mi mamá Ernestina por siempre tener las palabras de apoyo necesarias. A ambos por brindarme tanto cariño y amor y por toda la libertad y confianza que me han otorgado para ser la persona que ahora soy. A mi hermano Axel que durante este proyecto fue mi chef personal y me brindó todo el apoyo necesario para concluirlo (éste trabajo, también es tuyo). A mi hermana Yesi por darme el mejor ejemplo y enseñarme que puedo llegar tan lejos como yo quiera.

A mi amiga de la vida: Pamela, por todo lo vivido.

A mis amigas Rosa y Maleni, con las que soñé éste momento y quienes me han apoyado incondicionalmente en todas mis aventuras, las quiero mucho.

A quiénes iniciaron este largo camino conmigo en la FESC: Gerardo, Marco, Thalia, Alfonso y Diana; también a aquellos que me fui encontrando a cada paso y fueron un gran apoyo: Juan, Jessica, Alberto, Omar, Marco Morales, Janeth, Daniel y Rogelio.

A las tocheras de la 01- 04 por permitirme descubrir lo maravilloso del tocho.

A los amigos que nunca pensé encontrar en la maestría: Lupita, Gus, Leo, Luis y Mary. Y con especial cariño a Lore, quien me brindó el apoyo y afecto necesario para culminar éste escrito.

Y especialmente a Rafael, Andrea y Bety que hasta ahora apoyan mis pasos, los quiero infinitamente.

Finalmente, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme aprender y crecer en sus aulas; me llena de orgullo ser parte de ella y sobre todo, de la UNAM.

“La duda es uno de los nombres de la inteligencia”

Jorge Luis Borges



Trabajo realizado en el Instituto Nacional de
Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”
con el apoyo de **CONACYT FONSEC 18135**

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XI
<hr/>	
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Epilepsia	3
2.1.1 Definición	3
2.1.2 Epidemiología	3
2.1.3 Clasificación	4
2.1.2 Epilepsia mioclónica juvenil	9
2.2 Ácido valproico	14
2.2.1 Farmacodinamia	15
2.2.2 Farmacocinética	16
2.3 Transportadores tipo ABC	19
2.3.1 Exportadores tipo ABC	19
2.4 Gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (<i>MDR1</i>)	20
2.4.1 Antecedentes	20
2.4.2 Genética molecular	21
2.4.3 Glicoproteína P	21
2.4.4 Mecanismo de <i>MDR1</i> y su papel en la resistencia a fármacos	23

2.4.5 Polimorfismos del gen MDR1 en epilepsia resistente a fármacos	25
2.4.6 Haplotipos de los SNPs 1236 C>T, 2677 G>T/A y 3435 C>T	27
2.5 CYP2C9	28
2.5.1 Generalidades	28
2.5.2 Genética molecular	28
2.5.3 Polimorfismos	30
2.6 CYP2C19	32
2.6.1 Generalidades	32
2.6.2 Genética molecular	32
2.6.3 Polimorfismos	34
3. Objetivos	36
3.1 Objetivo general	36
3.2 Objetivos particulares	36
4. Hipótesis	36
5. Metodología	37
5.1 Muestras biológicas	37
5.1.1 Muestras de estudio	37
5.1.2 Muestras Controles	38
5.2 Toma de muestra	39
5.3 Lisis y extracción de DNA	39
5.4 Cuantificación de DNA	40
5.5 Análisis de la integridad del DNA extraído en geles de agarosa	41

5.6 Amplificación de fragmentos de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
5.7 Restricción enzimática	48
5.8 Purificación del fragmento de PCR del polimorfismo G/T2677A del gen <i>ABCB1</i>	52
5.9 Reacción de secuenciación	53
5.10 Purificación de los productos de la reacción de secuenciación	55
5.11 Secuenciación automatizada	55
5.12 Análisis de electroferogramas	55
5.13 Análisis estadístico	55
5.14 Estudio del acoplamiento molecular (docking) de P-gp con el ácido valproico	56
5.14.1 Obtención de ligandos y estructuras	56
5.14.2 Recursos usados para el docking	56
6. Resultados	57
6.1 Análisis de la integridad del DNA cromosómico	57
6.2 Análisis de los fragmentos amplificados por PCR	58
6.3 Análisis del fragmento de PCR purificado del polimorfismo G2677T/A	59
6.4 Genotipificación de los polimorfismos C1236T y C3435T del gen <i>ABCB1</i>	59
6.5 Genotipificación del polimorfismo G2677T/A del gen <i>ABCB1</i>	61
6.6 Genotipificación de los polimorfismos CYP2C9*2 y CYP2C9*3 del gen <i>CYP2C9</i>	63
6.7 Genotipificación de los polimorfismos CYP2C19*2 y CYP2C19*3 del gen <i>CYP2C19</i>	64
6.8 Frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con EMJ y controles	66
6.9 Frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	71

6.10 Frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles	75
6.11 Frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con EMJ no respondedores al tratamiento con AVP y controles	79
6.12 Frecuencias y asociación de haplotipos del gen <i>ABCB1</i> de pacientes con EMJ y controles	83
6.13 Frecuencias y asociación de haplotipos de los genes <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i> de pacientes con EMJ y controles	85
6.14 Frecuencias y asociación de haplotipos del gen <i>ABCB1</i> en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	87
6.15 Frecuencias y asociación de haplotipos del gen <i>ABCB1</i> de pacientes con EMJ y controles	89
6.16 Acoplamiento molecular (docking) de P-gp con la fenitoína y el AVP	91
7. Discusión	95
8. Conclusiones	99
9. Perspectivas	99
10. Referencias	100
1. Anexos	115
Anexo 1	115
Anexo 2	129
Anexo 3	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
Figura 1	EEG de paciente con EMJ que muestra la actividad polipunta-onda	12
Figura 2	Estructura del ácido valproico	15
Figura 3	Farmacodinamia del VPA	17
Figura 4	Farmacocinética del VPA	18
Figura 5	Localización del gen <i>MDR1</i> , 7q21	21
Figura 6	Modelo bidimensional de la P-gp humana	22
Figura 7	Esquema de la función y mecanismo de los transportadores ABC	23
Figura 8	Estructura de la P-gp	24
Figura 9	Localización de los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T en los exones del gen <i>MDR1</i> (<i>ABCB1</i>)	25
Figura 10	Mecanismo por el cual el polimorfismo C3435T altera el plegamiento de la proteína P-gp	27
Figura 11	Localización del gen <i>CYP2C9</i> , 10q24	30
Figura 12	Localización del gen <i>CYP2C19</i> , 10q24.1-q24.3	32
Figura 13	Diagrama general metodológico	37
Figura 14	Gradiente de temperatura del polimorfismo C1236T del gen <i>ABCB1</i>	46
Figura 15	Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa	48
Figura 16	Cámara de electroforesis vertical para geles de acrilamida	50
Figura 17	Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.5% de la integridad del DNA genómico extraído de pacientes con EMJ y controles sanos	57
Figura 18	Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% del fragmento amplificado por PCR para el análisis del polimorfismo G2677T/A del gen <i>ABCB1</i> de pacientes con EMJ y controles sanos	58
Figura 19	Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% del fragmento de PCR purificado para el análisis del polimorfismo G2677T/A del gen <i>ABCB1</i> de pacientes con EMJ y controles sanos	59
Figura 20	Gel de poliacrilamida al 10% donde se observan los genotipos encontrados en pacientes con EMJ y controles para el polimorfismo C1236T del gen <i>ABCB1</i>	60
Figura 21	Gel de poliacrilamida al 10% donde se observan los genotipos encontrados en pacientes con EMJ y controles para el polimorfismo C3435T del gen <i>ABCB1</i>	61
Figura 22	Electroferogramas de los genotipos encontrados en pacientes con EMJ y controles para el polimorfismo G2677T/A del gen <i>ABCB1</i>	62
Figura 23	Electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% de los genotipos encontrados en los pacientes con EMJ y controles sanos para el polimorfismo CYP2C9*2 del gen <i>CYP2C9</i>	63
Figura 24	Electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% de los genotipos encontrados en los pacientes con EMJ y controles sanos para el polimorfismo CYP2C9*3 del gen <i>CYP2C9</i>	64

Figura 25	Electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% de los genotipos encontrados en los pacientes con EMJ y controles sanos para el polimorfismo CYP2C19*2 del gen <i>CYP2C19</i>	65
Figura 26	Gel de acrilamida que muestra los genotipos encontrados en pacientes con EMJ y controles para el polimorfismo CYP2C19*3 del gen <i>CYP2C19</i>	66
Figura 27	Interacción de P-gp con fenitoína	91
Figura 28	Interacciones de residuos de P-gp y fenitoína en dos dimensiones	92
Figura 29	Interacción de P-gp con AVP	93
Figura 30	Interacciones de residuos de P-gp y AVP en dos dimensiones	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
Tabla 1	Clasificación de las crisis epilépticas de acuerdo a la ILAE 2010	5
Tabla 2	Clasificación de los síndromes epilépticos según la edad de inicio de acuerdo a la ILAE 2010	7
Tabla 3	Clasificación de las epilepsias según su etiología de acuerdo a la ILAE 2010	8
Tabla 4	Principales signos de la EMJ de acuerdo a la ILAE	11
Tabla 5	Inductores e inhibidores de CYP2C9	28
Tabla 6	Fármacos sustratos de CYP2C9 y procesos metabólicos mediados por esta enzima	29
Tabla 7	Polimorfismos más frecuentes del gen <i>CYP2C9</i>	30
Tabla 8	Fármacos sustratos de CYP2C19 y procesos metabólicos mediados por esta enzima	33
Tabla 9	Inductores e inhibidores de CYP2C19	34
Tabla 10	Polimorfismos más frecuentes del gen <i>CYP2C19</i>	35
Tabla 11	Secuencia de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los principales polimorfismos de los genes <i>ABCB1</i> , <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i>	43
Tabla 12	Reactivos usados en la PCR del gen <i>ABCB1</i>	44
Tabla 13	Reactivos usados en la PCR de los genes <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i>	44
Tabla 14	Reactivos usados en la PCR de gradiente del polimorfismo C1236T	45
Tabla 15	Condiciones de PCR gen <i>ABCB1</i>	47
Tabla 16	Condiciones de PCR gen <i>CYP2C9</i>	47
Tabla 17	Condiciones de PCR gen <i>CYP2C19</i>	47
Tabla 18	Reactivos y condiciones utilizados para la reacción de digestión de los polimorfismos del gen <i>ABCB1</i>	48
Tabla 19	Reactivos y condiciones utilizados para la reacción de digestión de los polimorfismos del gen <i>CYP2C9</i>	49
Tabla 20	Reactivos y condiciones utilizados para la reacción de digestión de los polimorfismos del gen <i>CYP2C19</i>	49

Tabla 21	Enzimas de restricción y RFLPs generados para cada genotipo de los polimorfismos del gen <i>ABCB1</i>	50
Tabla 22	Enzimas de restricción y RFLPs generados para cada genotipo de los polimorfismos del gen <i>CYP2C9</i>	51
Tabla 23	Enzimas de restricción y RFLPs generados para cada genotipo de los polimorfismos del gen <i>CYP2C19</i>	51
Tabla 24	Reactivos usados en la reacción de secuenciación	54
Tabla 25	Condiciones para la reacción de secuenciación	54
Tabla 26	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>ABCB1</i> (C1236T, G2677T/A y C3435T) en pacientes con EMJ y controles	67
Tabla 27	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>CYP2C9</i> (CYP2C9*2 y CYP2C9*3) en pacientes con EMJ y controles	69
Tabla 28	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>CYP2C19</i> (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) en pacientes con EMJ y controles	70
Tabla 29	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>ABCB1</i> (C1236T, G2677T/A y C3435T) en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	71
Tabla 30	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>CYP2C9</i> (CYP2C9*2 y CYP2C9*3) en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	73
Tabla 31	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>CYP2C19</i> (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	74
Tabla 32	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>ABCB1</i> (C1236T, G2677T/A y C3435T), en pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles	75
Tabla 33	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>CYP2C9</i> (CYP2C9*2 y CYP2C9*3) en pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles	77
Tabla 34	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>CYP2C19</i> (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) en pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles	78
Tabla 35	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>ABCB1</i> (C1236T, G2677T/A y C3435T), en pacientes con EMJ no respondedores al tratamiento con AVP y controles	79
Tabla 36	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>CYP2C9</i> (CYP2C9*2 y CYP2C9*3) en pacientes con EMJ no respondedores al tratamiento con AVP y controles	81
Tabla 37	Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen <i>CYP2C19</i> (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) en pacientes con EMJ no respondedores al tratamiento con AVP y controles	82
Tabla 38	Frecuencias de haplotipos del gen <i>ABCB1</i> en pacientes con EMJ y controles sanos	83

Tabla 39	Asociación de haplotipos del gen <i>ABCB1</i> entre pacientes con EMJ y controles sanos	84
Tabla 40	Frecuencias de haplotipos de los genes <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i> en pacientes con EMJ y controles sanos	85
Tabla 41	Asociación de haplotipos de los genes <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i> entre pacientes con EMJ y controles sanos	86
Tabla 42	Frecuencias de haplotipos del gen <i>ABCB1</i> en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	87
Tabla 43	Asociación de haplotipos del gen <i>ABCB1</i> entre pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	88
Tabla 44	Frecuencias de haplotipos de los genes <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i> en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	89
Tabla 45	Asociación de haplotipos de los genes <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i> entre pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP	90
Tabla 46	Resultados del docking de P-gp y fenitoína	91
Tabla 47	Energías de interacción de los aminoácidos de P-gp y fenitoína	92
Tabla 48	Resultados del docking de P-gp y AVP	93
Tabla 49	Energías de interacción de los aminoácidos de P-gp y AVP	94
Tabla 50	Frecuencias alélicas de los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T en distintas poblaciones	97
Tabla 51	Frecuencias de haplotipos del gen <i>ABCB1</i> en distintas poblaciones	97

ABREVIATURAS

ABAT	Transaminasa del ácido γ -aminobutírico
ABC	Transportadores de membranas dependientes de ATP
ACD	Ácido cítrico-citrato-dextrosa
ADP	Adenosina difosfato
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ALDH5	Succinato semialdehído deshidrogenasa
ATP	Adenosina trifosfato
AVP	Ácido valproico
AVP-CoA	Valproil coenzima A
CoA	Coenzima A
CTCG	Crisis tónico clónicas generalizadas
CYP	Citocromo P450
DdNTPs	Didesoxinucleótidos trifosfatados
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dbSNP	Base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatados
EEG	Electroencefalograma
EHW	Equilibrio Hardy-Weinberg
EMJ	Epilepsia mioclónica juvenil
FAEs	Fármacos antiepilépticos

GABA	Ácido γ -aminobutírico
HDAC1	Histona desacetilasa 1
ILAE	Liga internacional contra la epilepsia
NBDs	Dominios de unión a nucleótidos
MDR1	Gen de resistencia a múltiples fármacos 1
NCBI	Centro nacional para la información biotecnológica
OMS	Organización mundial de la salud
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P-gp	Glicoproteína P
RFLPs	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
RPM	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
SSA	Succinato semialdehído
TBE	Tris-borato-EDTA
Tm	Temperatura de fusión o melting
TMDs	Dominios transmembranales
TTS	Tris-tritón-sacarosa

RESUMEN

El ácido valproico (AVP) es el fármaco de elección para tratar la epilepsia mioclónica juvenil (EMJ), la respuesta al tratamiento es buena, sin embargo, la resistencia al tratamiento ha sido reportada en rangos de 15 a 30% de los pacientes. El AVP se metaboliza vía citocromo P450, principalmente por *CYP2C9* y *CYP2C19*. Se ha propuesto que la presencia de polimorfismos en estos genes puede condicionar la respuesta al tratamiento con AVP. También se ha planteado que la expresión de transportadores de eflujo en la barrera hematoencefálica, (principalmente la glicoproteína P (P-gp), codificada por el gen *ABCB1*) pueden reducir la concentración de AVP en los focos epilépticos contribuyendo a la epilepsia AVP-resistente. Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó como objetivo determinar la asociación de los polimorfismos de los genes *ABCB1*, *CYP2C9* y *CYP2C19* con la respuesta al AVP en pacientes con EMJ, para ello se analizaron 87 pacientes con EMJ en tratamiento con AVP; 27 no respondedores, 60 respondedores y 200 controles. Se realizó la genotipificación de los polimorfismos por PCR-RFLP (C1236T y C3435T del gen *ABCB1*; CYP2C9*2 y CYP2C9*3 del gen *CYP2C9* y CYP2C19*2 y CYP2C19*3 del gen *CYP2C19*) y la secuenciación del G2677T/A del gen *ABCB1*. Las frecuencias de genotipos se analizaron con las pruebas de chi cuadrada y exacta de Fisher, además se realizó un análisis de haplotipos para determinar la asociación con la respuesta al tratamiento. Los resultados obtenidos en este estudio no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los polimorfismos de los genes *ABCB1*, *CYP2C9* y *CYP2C19* entre pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP y los controles. Aunque estos resultados concuerdan con los estudios realizados en otras poblaciones, existen reportes donde la correlación de esta asociación si es positiva, lo cual continúa siendo un debate en la literatura sobre el papel de estos genes en la repuesta al AVP. Consideramos que el aumento del número de pacientes en el estudio podría magnificar lo observado y con esto aumentar la significancia estadística.

1. Introducción

La Epilepsia mioclónica juvenil es una de las epilepsias generalizadas de origen genético más comunes. Abarca alrededor del 6% de todas las epilepsias y del 20 al 30% de las epilepsias generalizadas idiopáticas (Micheli, 2002). En cuanto a su etiología, se ha identificado que existe un fuerte componente genético ligado a los cromosomas 2, 3, 5, 6 y 15 (Shorvon, 2012). Las crisis aparecen en la adolescencia en el 80% de los casos. No hay predominio de sexo. La primera manifestación clínica son las mioclonías que en la mayoría de los pacientes preceden en meses o años las crisis convulsivas tónico-clónicas y ausencias (Micheli, 2002); las mioclonías usualmente incluyen el cuello, espalda, brazos o piernas, siendo las extremidades superiores más frecuentemente afectadas (Shorvon, 2012). La actividad de fondo del EEG (electroencefalograma) es normal y durante la crisis aparecen descargas paroxísticas de punta-onda y polipunta-onda lenta, en general sincrónicas y bilaterales. Aunque en general la respuesta al tratamiento es excelente, la reaparición de las crisis es constante si se suspende la medicación.

A pesar de la gran variedad de fármacos antiepilépticos existentes, la resistencia a fármacos en epilepsia ha sido reportada en hasta un tercio de los pacientes (Sisodiya, 2005). La relación genotipo-fenotipo en epilepsia es bastante compleja pero diferentes estudios han demostrado la implicación de los factores genéticos en el pronóstico y tratamiento en epilepsia (Depondt, 2006). Varios grupos de estudio han demostrado las variaciones genéticas en CYP2C9 y CYP2C19 como determinantes de la afectación en el metabolismo de sus sustratos incluyendo fármacos antiepilépticos (FAEs) comúnmente prescritos (Depondt, 2006; Patsalos et al., 2002).

De igual forma algunos estudios han demostrado que en comparación con el tejido de un cerebro normal, los niveles de expresión de mRNA de la glicoproteína P (P-gp) son mucho más altos en modelos animales con epilepsia y tejidos de pacientes con epilepsia (Tishler et al., 1995; Potschka et al., 2004; Dombrowski et al., 2001), estos hallazgos aunados a que la mayoría de los FAEs son sustratos de P-gp, han permitido asociarlos con la resistencia a fármacos en epilepsia (Kwan & Brodie, 2005; Loscher & Potschka, 2005). A pesar de que

son conocidos más de 50 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *ABCB1*, algunos estudios han reportado que C1236T, G2677T/A y C3435T y sus haplotipos pueden correlacionarse con la resistencia a fármacos en epilepsia (Seo et al., 2006; Hung, 2005); sin embargo otros estudios han cuestionado si existe correlación entre la presencia de polimorfismos del gen *ABCB1* y la resistencia a FAEs (Siddiqui et al., 2003).

2. Marco teórico

2.1 Epilepsia

2.1.1 Definición

La OMS (Organización Mundial de la Salud) define a la epilepsia como una enfermedad crónica que afecta a personas de todos los países y se caracteriza por convulsiones recurrentes. Una convulsión es una disfunción neurológica transitoria secundaria a una descarga eléctrica anormal y excesiva de las neuronas cerebrales; pueden afectar a una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o su totalidad (convulsiones generalizadas). Sus manifestaciones clínicas incluyen trastornos de la consciencia, cambios de las emociones, alteración de las sensaciones, movimientos anormales y trastornos de las funciones viscerales y de la conducta (Bradley, 2006).

La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) estableció que la epilepsia se define por cualquiera de las siguientes condiciones: (1) al menos dos convulsiones no provocadas que ocurren con más de 24 horas de diferencia; (2) una convulsión no provocada y el riesgo de recurrencia de convulsiones no provocadas que pueden producirse durante los próximos 10 años; (3) diagnóstico de algún síndrome epiléptico.

2.1.2 Epidemiología

Mundialmente se estima que al menos 65 millones de personas viven con epilepsia (Ngugi et al., 2010). La incidencia de la epilepsia varía según la población estudiada, en países desarrollados la incidencia anual es cercana a 50 por 100 000 habitantes mientras que la prevalencia es aproximadamente 700 por 100 000 habitantes (Hirtz, 2007).

En Latinoamérica la incidencia de la epilepsia se encuentra en el rango de 77 a 190 por 100 000 habitantes; en México no existen datos epidemiológicos al respecto (Burneo et al., 2005).

2.1.3 Clasificación

La historia de la clasificación de las crisis epilépticas y de las epilepsias se ha basado en observaciones y opiniones de expertos. La primera clasificación fue publicada en 1960 y actualizada oficialmente en 1981 para crisis epilépticas y en 1989 para las epilepsias, ambas clasificaciones fueron realizadas por la Comisión de Clasificación y Terminología de la ILAE; estas clasificaciones se basaron en conceptos que anteceden a las técnicas de neuroimagen, tecnologías modernas y conceptos en biología molecular (Berg et al., 2010).

En la búsqueda de una nueva clasificación en la que sean integrados los conocimientos adquiridos mediante las nuevas tecnologías, en 2010, la ILAE realizó una actualización en la clasificación, la cual se muestra en la tabla 1.

2.1.3.1 Clasificación de las crisis epilépticas

Una crisis epiléptica es un acontecimiento transitorio de signos y/o síntomas debidos a la actividad neuronal anormal excesiva en el cerebro (Fisher et al., 2014). De acuerdo a la clasificación hecha por la ILAE, las crisis epilépticas se dividen a grandes rasgos en dos grupos principales: focal y generalizada, aunque estas categorías pueden no ser adecuadas para describir todas las crisis epilépticas.

Las crisis generalizadas se originan en un punto y rápidamente se propagan por las redes neuronales distribuidas de forma bilateral, éste tipo de redes pueden incluir estructuras corticales y subcorticales, pero no necesariamente incluir toda la corteza. En este tipo de crisis casi siempre hay pérdida de la conciencia desde el principio; a veces son precedidas por crisis focales. Se comprometen todas las funciones cerebrales durante la crisis (función motriz, autonómica, sensorial, endócrina, etc.) (Navarro, 2006).

Las crisis focales se originan con redes neuronales limitadas a un hemisferio, pueden ser discretamente localizadas o más ampliamente distribuidas. Las crisis focales pueden originarse en estructuras subcorticales; éstas representan eventos dinámicos que usualmente implican propagación y las manifestaciones clínicas pueden reflejar descargas en el sitio de inicio ictal y/o sitios de propagación (Engel, 2006).

De acuerdo a la ILAE existen crisis que de acuerdo a sus características no pueden ser clasificadas como focales o generalizadas, por ello las coloca en el grupo de crisis focales/generalizadas.

Tabla 1. Clasificación de las crisis epilépticas de acuerdo a la ILAE 2010

Crisis generalizadas	Crisis focales
<ul style="list-style-type: none"> • Crisis tónico-clónicas • Ausencias: <ul style="list-style-type: none"> Típicas Atípicas Ausencias mioclónicas Mioclónías palpebrales con ausencias • Crisis tónicas • Crisis atónicas • Crisis mioclónicas: <ul style="list-style-type: none"> Mioclónías Mioclónías negativas Mioclónías atónicas Mioclónías tónicas 	<ul style="list-style-type: none"> • De acuerdo a sus características: <ul style="list-style-type: none"> Auras Motoras Autonómicas Discognitivas • De lateralización hemisférica • De acuerdo a su localización lobar: <ul style="list-style-type: none"> Frontal Temporal Parietal Occipital <p>Crisis focales/generalizadas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Espasmos epilépticos

2.1.3.2 Síndromes epilépticos

Un síndrome epiléptico es la asociación de cierto tipo o tipos de crisis epilépticas con ciertas manifestaciones electroencefalográficas ictales o interictales y/u otros componentes como edad de inicio, presencia o ausencia de otros signos de compromiso del sistema nervioso central (SNC), gravedad y curso (Micheli, 2002). La ILAE reconoce que la identificación de un síndrome epiléptico es útil ya que proporciona información sobre cuáles etiologías subyacentes deben ser consideradas y cuáles medicamentos

anticonvulsivos podrían ser más útiles. Varios síndromes epilépticos demuestran el agravamiento con determinados medicamentos anticonvulsivos, que pueden ser evitados mediante el diagnóstico oportuno de un síndrome epiléptico. En la tabla 2 se muestra la clasificación de los síndromes epilépticos realizada por la ILAE en 2010.

2.1.3.3 Epilepsias de acuerdo a su etiología

Debido a que en los últimos años se ha producido una expansión importante en nuestra comprensión de las causas subyacentes de las epilepsias, respaldados por los avances en neuroimagen y pruebas genéticas, las terminologías como “idiopática”, “criptogénica” y “sintomática” ya no son usadas. Por esta razón la ILAE propone una descripción más precisa de las epilepsias de acuerdo a su etiología subyacente (Tabla 3).

El concepto de epilepsia de origen genético, establece que estas epilepsias son el resultado de un conocido defecto genético en la cual las crisis epilépticas son un síntoma de este desorden. Pero a pesar de establecer que este desorden es causado por un defecto genético, no excluye la posibilidad de que factores ambientales contribuyan a la expresión de la enfermedad (Berg et al., 2010).

De igual forma existen condiciones estructurales o metabólicas u otras enfermedades que se ha demostrado, están asociadas con un incremento significativo en el riesgo de desarrollar epilepsia (Berg et al., 2010).

En cuanto al origen inmune de algunas epilepsias, este se ha propuesto debido a la eficacia que han tenido los tratamientos inmunomoduladores y más recientemente, por el hallazgo de marcadores de inflamación incluyendo anticuerpos en individuos que presentan epilepsia. Datos clínicos y experimentales sugieren que la inmunidad adaptativa e innata pueden estar implicadas en la epilepsia (Granata et al., 2011).

Existen epilepsias que son clasificadas como de origen desconocido ya que la naturaleza de la causa subyacente es aún desconocida, pueden deberse a algún defecto genético aún desconocido o ser la consecuencia de otro desorden no conocido (Berg et al., 2010).

Tabla 2. Clasificación de los síndromes epilépticos según la edad de inicio de acuerdo a la ILAE 2010

<p>Periodo neonatal y lactancia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia neonatal familiar benigna • Encefalopatía mioclónica temprana • Síndrome de Ohthatara • Síndrome de West • Síndrome de Dravest 	<ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia mioclónica en la Infancia • Epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias • Encefalopatía mioclónica en enfermedades no progresivas • Crisis febriles plus
<p>Niñez</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome Landau-Kleffner • Epilepsia benigna con puntas centro temporales • Epilepsia atípica de la infancia con puntas centro temporales • Encefalopatía epiléptica con punta-onda continua durante el sueño • Epilepsia nocturna del lóbulo frontal autosómica dominante • Síndrome de Lennox-Gastaut 	<ul style="list-style-type: none"> • Mioclonías palpebrales • Crisis epilépticas con mioclonías atónicas • Epilepsia de ausencia en la niñez • Epilepsia con ausencias mioclónicas • Síndrome de Panayiotopoulos • Epilepsia occipital de aparición tardía en la infancia (tipo Gastaut) • Epilepsia fotosensible del lóbulo occipital
<p>Adolescencia y adultez</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia de ausencia juvenil • Epilepsia mioclónica juvenil • Epilepsia con crisis tónico-clónicas generalizadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia autosómica dominante con fenómenos auditivos • Otras epilepsias del lóbulo temporal familiares
<p>De edad variable</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia familiar focal con focos variable 	<ul style="list-style-type: none"> • Epilepsias reflejas • Epilepsia mioclónica progresiva

Tabla 3. Clasificación de las epilepsias según su etiología de acuerdo a la ILAE 2010

<p>Genético</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anormalidades cromosómicas • Anormalidades genéticas
<p>Estructural</p> <ul style="list-style-type: none"> • Malformaciones en el desarrollo cortical • Displasia focal cortical • Hamartoma hipotalámico • Esclerosis tuberosas • Malformaciones vasculares • Esclerosis hipocampal • Trauma • Tumores • Otra anomalía adquirida en el cerebro
<p>Metabólico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epilepsias metabólicas
<p>Inmune</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Rasmussen • Mediada por anticuerpos
<p>Infeccioso</p>
<p>No conocido</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de epilepsia relacionado con la infección febril

2.1.3.4 Epilepsias no clasificadas

Comprende todas las epilepsias cuya etiología puede ser aún desconocida y que pueden no tener características clínicas y eléctricas que permitan su clasificación por síndromes epilépticos. En este grupo de trastornos con un fenotipo más específico o tiempo de

observación de evolución de los pacientes con epilepsia pueden emerger subgrupos por los cuales un diagnóstico etiológico puede ser encontrado (Kelley, 1992).

2.1.3.4 Imitadores de epilepsia

La ILAE clasifica en este apartado a aquellas condiciones con eventos paroxísticos recurrentes que pueden llegar a imitar y a ser mal diagnosticados como epilepsia.

2.1.2 Epilepsia mioclónica juvenil

2.1.2.1 Antecedentes

Las mioclonías inicialmente fueron descritas como un síntoma asociado con la epilepsia por Pritchard en 1822 (Genton & Gelisse, 2013). Delasiauve también había notado la existencia de sacudidas mioclónicas en pacientes con epilepsia y en su tratado sobre epilepsia en 1854, las llamó "*petit mal moteur*" (Delasiauve, 1854). Hammond en 1867 describió el caso de un joven granjero que presentaba crisis mioclónicas sin pérdida de la conciencia a lo que llamó "*convulsive tremor*" (Hammond, 1867). En Francia en 1899, Leon Rabot describió en su tesis doctoral una serie de casos de mioclonías epilépticas. Rabot reconoció la naturaleza de las mioclonías pero propuso que éstas se originaban en la médula espinal (Rabot, 1899).

Janz y Christian en 1957 publicaron las características clínicas y electroencefalográficas de lo que denominaron "*impulsive petit mal*" definiendo claramente la entidad que hoy se conoce bajo el nombre de epilepsia mioclónica juvenil (EMJ). Encontraron algunos factores desencadenantes de éstas crisis como: falta de sueño, despertar repentino y/o excesiva ingesta de alcohol. Describieron que también existían EEG característicos entre los pacientes con "*impulsive petit mal*", complejos rápidos de polipunta-onda (Janz & Christian, 1957).

Finalmente, en la década de los 80, autores americanos describieron series de diferentes pacientes con epilepsia mioclónica, algunos de ellos en el contexto de una epilepsia farmacorresistente, demostrando que con el tratamiento adecuado quedaban controlados de las crisis. La serie de Asconapé y Penry (Asconapé, 1984) y la de Delgado-

Escueta y Enrile Bacsal (Delgado-Escueta, 1984), ambas publicadas en 1984 en revistas anglosajonas de gran difusión internacional, provocaron el reconocimiento del síndrome que hoy se conoce como EMJ.

2.1.2.2 Definición

De acuerdo a la ILAE, la EMJ es una de las epilepsias generalizadas de origen genético más comunes y se caracteriza por crisis convulsivas mioclónicas y generalizadas en jóvenes y adultos. El EEG muestra una actividad generalizada punta-onda y polipunta-onda. La fotosensibilidad es común.

2.1.2.3 Signos y síntomas

Es la epilepsia mioclónica más frecuente de origen hereditario, en la que hasta un 25% de los pacientes tienen historia familiar de epilepsia de tipo generalizado en la mayoría de los casos. Abarca alrededor del 6% de todas las epilepsias y del 20 al 30% de las epilepsias generalizadas idiopáticas (Micheli, 2002). En cuanto a su etiología, se ha identificado que existe un fuerte componente genético ligado a los cromosomas 2, 3, 5, 6 y 15 (Shorvon, 2012). Las crisis aparecen en la adolescencia en el 80% de los casos. No hay predominio de sexo. La primera manifestación clínica son las mioclonías que en la mayoría de los pacientes preceden en meses o años las crisis convulsivas tónico-clónicas y ausencias (Micheli, 2002), las mioclonías usualmente incluyen el cuello, espalda, brazos o piernas, siendo las extremidades superiores más frecuentemente afectadas (Shorvon, 2012), son bilaterales, por lo general simétricas, únicas o repetitivas, rápidas y de amplitud variable. Las crisis se presentan en mayor medida al despertarse o minutos más tarde, y son precipitados por la privación o interrupción del sueño, la ingestión de alcohol y el estrés emocional; asimismo, en las mujeres la frecuencia aumenta en el periodo perimenstrual. El intelecto y la exploración neurológica son normales casi siempre y no parecen sufrir alteración alguna por las crisis. La actividad de fondo del EEG es normal y durante la crisis aparecen descargas paroxísticas de punta-onda y polipunta-onda lenta (Figura 1), en general sincrónicas y bilaterales. Este síndrome muestra la fotosensibilidad más marcada. Los principales signos de la EMJ se muestran en la tabla 4. Aunque en general la respuesta

al tratamiento es excelente, la reaparición de las crisis es constante si se suspende la medicación, esto puede explicarse por el mantenimiento de la penetrancia del gen hasta la quinta o la sexta décadas de la vida. Ante el riesgo casi seguro de recurrencia, es aconsejable mantener el tratamiento farmacológico toda la vida. Además, este debe incluir medidas generales de higiene de vida para evitar los factores precipitantes de las crisis, como falta de sueño, consumo de alcohol o estimulación luminosa. El fármaco de elección es el ácido valproico (AVP), que controla las crisis en la mayoría de los pacientes. Como alternativa se pueden emplear lamotrigina y topiramato, o benzodiazepinas, clonazepam y clobazam (Micheli, 2002).

Tabla 4. Principales signos de la EMJ de acuerdo a la ILAE

Característica	Datos de referencia
Edad de inicio	8-25
Tipos de crisis que se presentan	Crisis mioclónicas, crisis tónico-clónicas generalizadas, crisis generalizadas, crisis de ausencias; status epiléptico mioclónico puede ocurrir
EEG	El EEG muestra una actividad generalizada polipunta onda
Desarrollo cognitivo	Normal

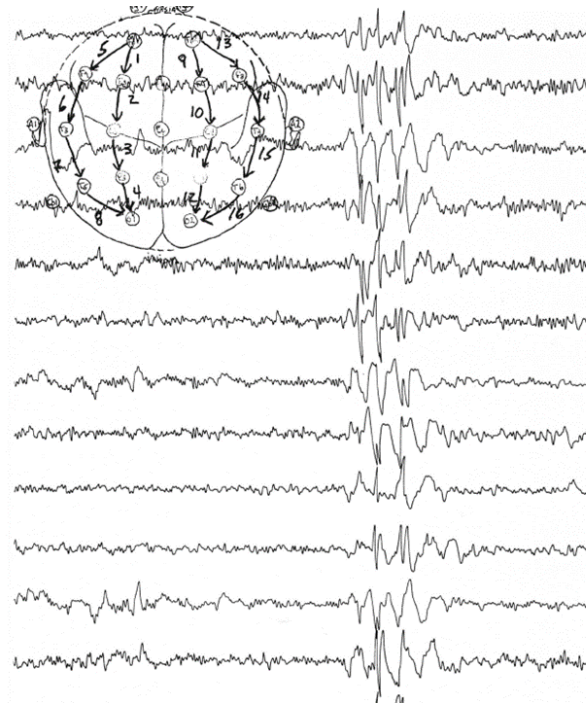


Figura 1. EEG de paciente con EMJ que muestra la actividad polipunta-onda. Tomada de Cossette et al., 2002.

2.1.2.4 Tratamiento

La EMJ se caracteriza por una excelente respuesta al tratamiento si es diagnosticada de manera correcta. El estilo de vida del paciente es una parte integral del tratamiento para la EMJ, recomendaciones para evitar los factores desencadenantes de las crisis son de suma importancia, como la privación del sueño y el exceso de alcohol (Mantoan & Walker, 2011). El AVP es el fármaco de elección para tratar la EMJ y la respuesta a éste tratamiento va de buena a excelente; el AVP controla las crisis de manera efectiva en un 80% de los pacientes con EMJ, pero en algunos casos es posible que a pesar del tratamiento las crisis sigan presentándose (Calleja et al., 2001). Entre los pacientes que presentan reaparición de las crisis, la interrupción del medicamento es generalmente la razón común, incluso después de muchos años de control de las convulsiones. Afortunadamente, la remisión se puede mantener durante varios años con los

medicamentos apropiados (Penry, 1989). El AVP debe ser evitado en mujeres en edad fértil debido a un aumento significativo de los riesgos de malformaciones fetales y retraso del desarrollo neurológico (Mantoan & Walker, 2011). Los fármacos lamotrigina y levetiracetam son alternativas útiles para aquellos pacientes con EMJ que son intolerantes o desarrollan efectos secundarios con AVP, debido a que existen datos limitados para apoyar cualquiera de estos fármacos, la elección de cualquiera de ellos debe tener en cuenta los factores de comorbilidad y prioridades de los pacientes. En casos de falta de respuesta al tratamiento con AVP, la adición de pequeñas dosis de lamotrigina al tratamiento resulta efectivo y en ocasiones puede llegar a usarse en monoterapia (Buchanan, 1996). El clonazepam también resulta efectivo en el control de EMJ y se puede utilizar en combinación con lamotrigina. El topiramato también ha mostrado ser efectivo pero debido a que presenta mala tolerancia, es recomendado únicamente como complemento al tratamiento (Specchio et al., 2006). La zonisamida debe seguir siendo un complemento de segunda línea en el tratamiento de EMJ, debido a la falta de datos de apoyo. El fenobarbital es el fármaco más rentable y se puede utilizar para controlar las convulsiones de EMJ cuando los fármacos antiepilépticos son limitados o demasiado costoso. La carbamazepina, oxcarbazepina y fenitoína puede exacerbar las ausencias y mioclonías y por lo tanto están contraindicados, aunque pueden mejorar el control de las convulsiones tónico-clónicas cuando éstas son refractarios a otros medicamentos. La gabapentina, pregabalina, tiagabina y vigabatrina están contraindicados y pueden empeorar las convulsiones (se ha reportado que tiagabina y vigabatrina inducen status epilepticus de ausencia). Las alternativas quirúrgicas en casos refractarios raramente se contemplan, pero pueden incluir estimulación del nervio vago y callosotomía. La estimulación cerebral profunda es una técnica experimental que puede resultar útil en el manejo de los casos refractarios de EMJ (Mantoan & Walker, 2011).

2.1.2.5 Criterios de farmacoresistencia

La resistencia a fármacos en EMJ ha sido reportada en rangos de 15 a 30% de pacientes bajo tratamiento con FAEs (Gelisse et al., 2001). Los predictores de farmacoresistencia en

EMJ incluyen: 1) la presencia de 3 tipos de crisis: mioclonías, crisis de ausencias y crisis tónico-clónicas generalizadas; 2) la existencia de problemas psiquiátricos y 3) síntomas focales y/o EEG con descargas focales (Fernando-Dongas et al., 2000). Por otra parte, la resistencia a fármacos puede depender de factores genéticos y adquiridos que afectan la farmacocinética y farmacodinamia de los FAEs. Los factores genéticos pueden reducir la concentración sérica del fármaco ya sea mediante la reducción de la absorción o mediante el aumento de la eliminación y/o la disponibilidad de FAEs en el foco epiléptico en el SNC. Además, los factores genéticos pueden ser responsables de los cambios en los blancos de los fármacos reduciendo así la respuesta a fármacos (Loscher & Potschka, 2005; Loscher et al., 2009). Por esta razón, actualmente se realizan estudios farmacogenéticos ya que una comprensión genética y molecular clara de la resistencia a los FAEs en pacientes con EMJ, tiene el potencial para guiar al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el contexto de la medicina genómica y personalizada (Walley, 2009).

2.2 Ácido valproico

El AVP es un ácido graso ramificado de cadena corta derivado del ácido valérico (Figura 2) (naturalmente producido por la valeriana, *Valeriana officinalis*), este fue sintetizado por primera vez en 1882 por Burton (Chateauvieux et al., 2010). Durante casi un siglo el AVP fue usado como un solvente para compuestos orgánicos “fisiológicamente inerte” y fue hasta 1963 durante un estudio enfocado en moléculas con potencial actividad anticonvulsiva en la cual el AVP fue usado como un vehículo y fue demostrada su actividad farmacológica, impidiendo convulsiones inducidas por pentilentetrazol en roedores (Lebreton, 1984).

Además de su uso clínico como anticonvulsivo y estabilizador del estado de ánimo (McElroy, 1989), el AVP presenta efectos clínicos benéficos en depresión (Calabrese, 1982), crisis de ausencias (Coppola et al., 2004), crisis tónico-clónicas, crisis parciales complejas (Dean, 1988), EMJ, crisis asociadas al síndrome de Lennox-Gastaut, migraña y esquizofrenia.

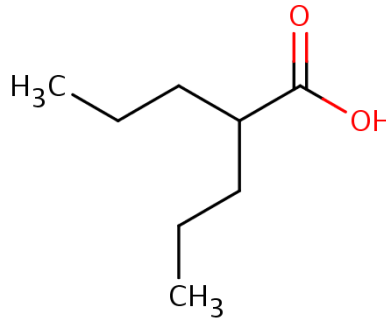


Figura 2. Estructura del ácido valproico. Tomada de Canadian Institutes of Health Research, Alberta Innovates-Health Solutions, 2013.

2.2.1 Farmacodinamia

El AVP presenta sus efectos farmacodinámicos en diferentes vías (Figura 3). En el cerebro humano, el AVP altera la actividad del neurotransmisor gamma amino-butírico (GABA). Debido a que el deterioro de la actividad inhibidora GABAérgica puede conducir a convulsiones, esta vía es un objetivo para los FAEs. GABA se forma a partir de alfa-cetoglutarato a través del ciclo de Krebs y es metabolizado a succinato semialdehído (SSA) por GABA transaminasa (ABAT) y luego a succinato por la succinato semialdehído deshidrogenasa (ALDH5A1). Mediante varios estudios se ha demostrado que el AVP inhibe a ABAT y ALDH5A1 que están involucrados en la vía de degradación de GABA (Johannessen & Johannessen, 2003), además de que también incrementa la síntesis de GABA (Mesdjian, 2013). Por otra parte el AVP atenúa la excitación mediada por N-metil-D-aspartato y bloquea los canales Na^+ , Ca^{+2} y K^+ dependientes de voltaje (incluyendo los codificados, CACNA1D, CACNA1N y CACNA1F y la familia de genes SCN) (Chateauvieux et al., 2010). Recientemente se demostró que el AVP es un inhibidor de la histona deacetilasa 1 (HDAC1) así como de otras HDACs (Phiel et al., 2001), lo cual potencializa el incremento de la expresión de genes involucrados en apoptosis y la acción antitumoral (Minucci et al., 2001).

2.2.2 Farmacocinética

El AVP se absorbe con rapidez y por completo después de su administración oral. Se observa una concentración plasmática máxima en el plazo de 1 a 4 horas, aunque se puede retrasar varias horas si el fármaco se da en comprimidos con capa entérica o se ingiere con alimentos (Brunton, 2012).

Este fármaco tiene un alto grado de unión a proteínas (87-95%) y por lo tanto una baja depuración (6-20 mL/hr/kg) (Leppik, 2009). El AVP se metaboliza por tres vías en el humano (Figura 2): glucuronidación (50%), beta oxidación en la mitocondria (40%) y citocromo P450 (CYP) mediante oxidación (10%) (Ito et al., 1990; Argikar & Rimmel, 2009; Tan et al., 2010).

El AVP-glucurónido es el mayor metabolito de AVP que se excreta en la orina (aproximadamente 30-50%). La glucuronidación del AVP se lleva a cabo por las enzimas: UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7 Y UGT2B15 (Argikar & Rimmel, 2009).

El AVP es un ácido graso que puede ser metabolizado vía endógena en la mitocondria. Se ha observado que algunos de los metabolitos generados mediante esta vía son hepatotóxicos. El AVP cruza la membrana de la mitocondria con ayuda de la carnitina. Dentro de la mitocondria, el primer paso de la oxidación es la formación de valproil-CoA (AVP-CoA) catalizado por la enzima acil-CoA de cadena media (codificada por los genes ACSM1-5) (Luís et al., 2011). AVP-CoA es entonces convertido en 2-propil-valproil-CoA (2-ene-AVP-CoA) mediante la enzima acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta/ramificada (ACADSB) (Ito et al., 1990). El 2-ene-AVP-CoA es además convertido a 3-hidroxil-valproil-AVP (3-OH-AVP-CoA) por una enoil-CoA hidratasa (ECSH1), luego 3-OH-AVP-CoA es metabolizada a 3-keto-valproil-CoA (3-oxo-AVP-CoA) a través de la acción de 2-metil-3hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (HSD17B10). Aún no es concluyente si la beta oxidación del AVP se completa en la mitocondria (Figura 4). Hasta ahora se sabe que la bioactivación del AVP en la mitocondria implica la entrada de 4-ene-AVP, la formación de 4-ene-AVP-CoA éster con la ayuda de ACADSB y subsecuentemente la beta oxidación para

formar 2,4-diene-AVP-CoA éster. Éste metabolito citotóxico (2,4-diene-AVP-S-CoA) es conjugado con glutatión para formar conjugados tiol (Kassahun et al., 1994).

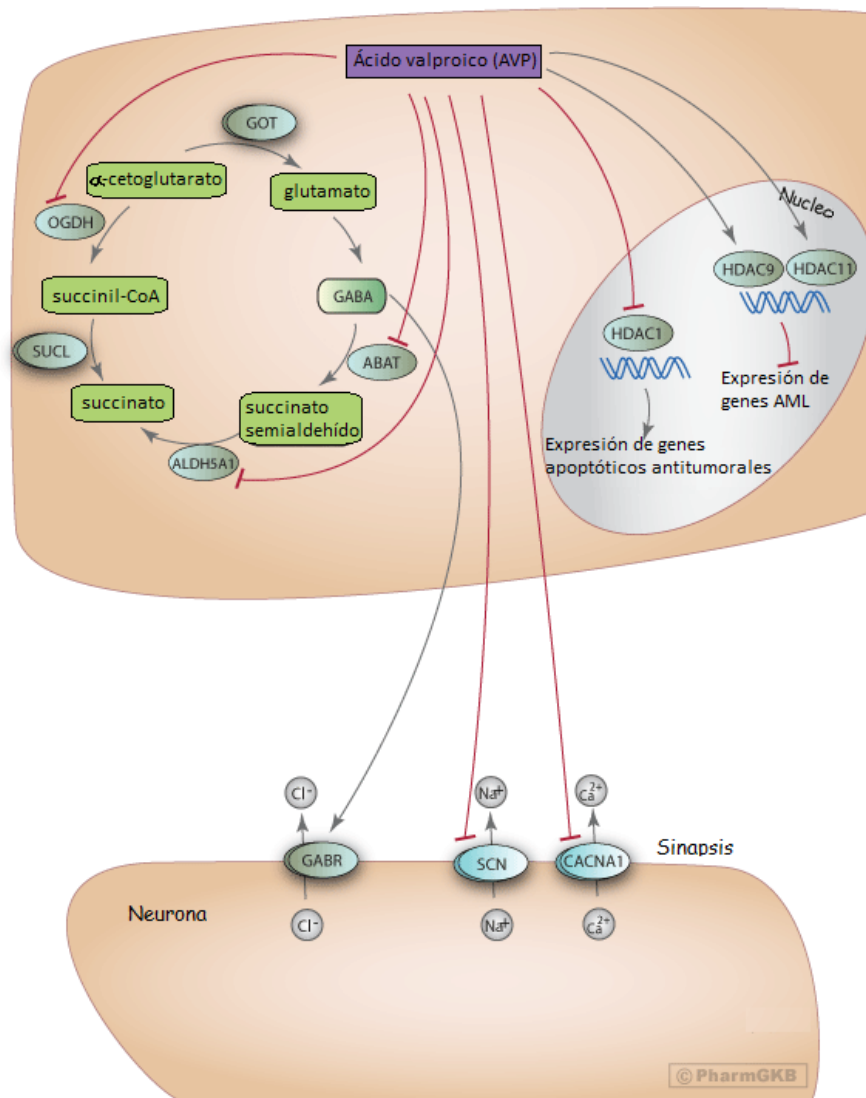


Figura 3. Farmacodinamia del VPA. Modificada de Godhe-Puranik et al., 2013.

CYP2C9 y CYP2A6 son las enzimas predominantes en la oxidación de AVP mediada por CYP. El papel de CYP2B6 aún no se tiene bien definido (Kiang et al., 2006). El metabolito 4-ene-AVP por la vía de CYP, es generado por CYP2C9, CYP2A6 y CYP2B6, CYP2A6 también contribuye parcialmente a la formación de 3-OH-AVP (Sadeque et al., 1997). De igual forma se ha observado que pacientes portadores de la variante CYP2C19*2 bajo terapia con inhibidor de la metiltransferasa 5-azacitidina (5-AZA) y AVP, requieren dosis más altas

de AVP para lograr la concentración terapéutica necesaria en plasma (Voso et al., 2009), lo cual indica que CYP2C19 también está implicado en el metabolismo del AVP. También se ha planteado la hipótesis de que la expresión de transportadores de eflujo en la barrera hematoencefálica pueden reducir la concentración del AVP en los focos epilépticos contribuyendo a la epilepsia AVP-resistente (Kwan, 2009).

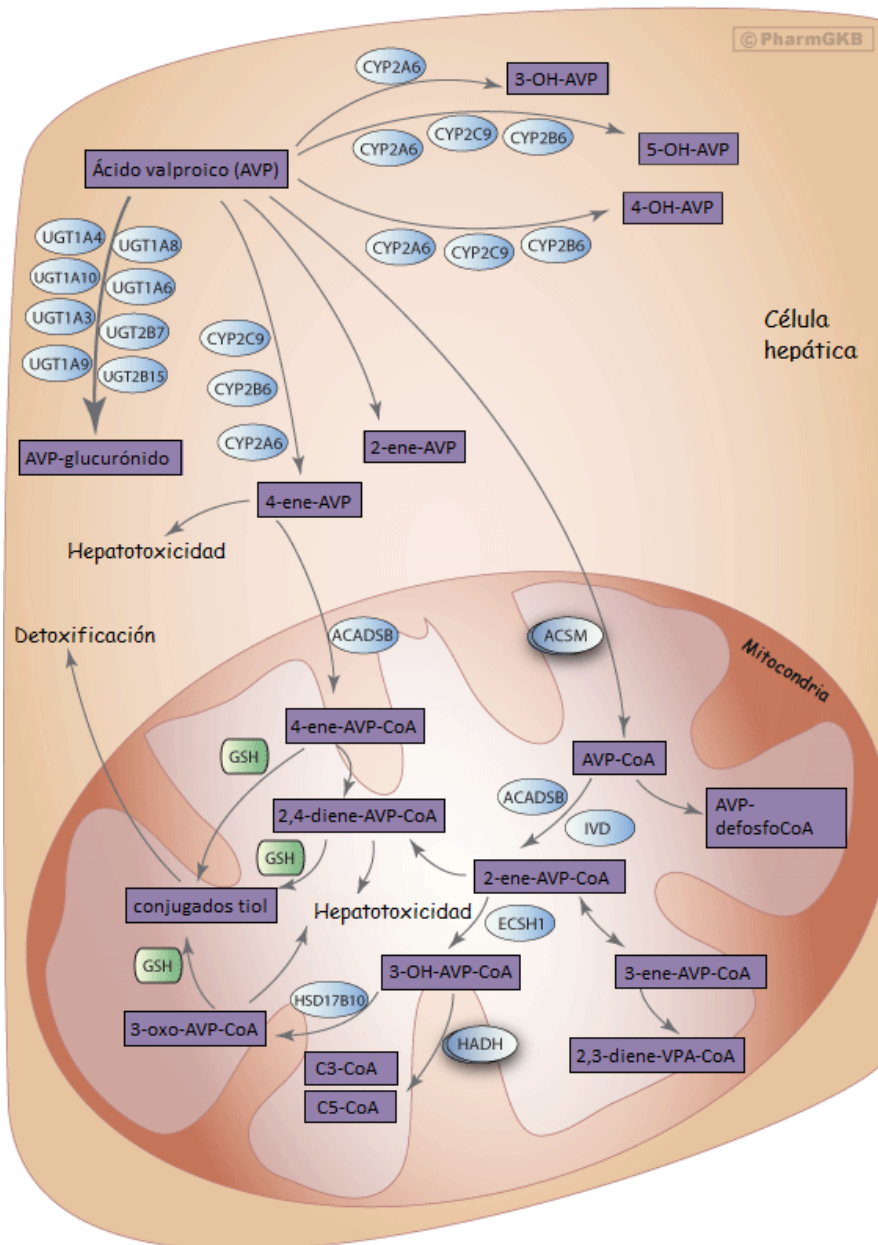


Figura 4. Farmacocinética del VPA. Modificada de Godhe-Puranik et al., 2013.

2.3 Transportadores tipo ABC

Los transportadores ABC son una gran familia de proteínas de membrana con diversas funciones (Rockwell & Thorner, 2003). Estas proteínas convierten la energía obtenida de la hidrólisis de ATP en movimiento de sustratos a través de la membrana lipídica hacia el citoplasma (importación) o fuera del citoplasma (exportación). En ambos casos la hidrólisis de ATP es catalizada por un par de dominios de unión a nucleótido (NBDs), mientras que la traslocación del sustrato es facilitada por un par de dominios transmembranales (TMDs). Los importadores sólo han sido identificados en organismos procariontes mientras que los transportadores ABC de tipo exportadores están expresados ubicuamente en todos los seres vivos (Higgins, 1992).

En lo que respecta al dominio NBD, éste se encuentra conservado en esta familia de proteínas. Este dominio contiene dos subdominios, uno parecido a la proteína RecA y otro que se ha llamado el “subdominio hélice”. Existen varias secuencias motivo en los NBDs, y todas ellas poseen funciones específicas (Jones & George, 2004). Las más importantes son las P-loops, localizadas en el dominio parecido a RecA y el motivo LSGGQ localizado en el subdominio hélice. En todos los transportadores los dominios NBD que poseen estos motivos son expuestos en la interface en un arreglo cabeza-tallo. Este arreglo genera dos sitios de unión a ATP y sitios de hidrólisis entre los P-loops de un NBD y el motivo LSGGQ del otro. En la ausencia de un nucleótido, existe una separación en la interface del dominio y el agua es capaz de acceder a los sitios de unión a nucleótido. Cuando se une el ATP, la interface se cierra y el nucleótido es atrapado por los NBDs. Se cree que durante un ciclo de transporte, se consumen dos moléculas de ATP (Chen et al., 2003).

2.3.1 Exportadores tipo ABC

Este tipo de transportadores son encontrados en el genoma de todos los organismos que han sido secuenciados hasta el momento. Muchos organismos presentan múltiples transportadores con funciones fisiológicas diversas; como ejemplo, el genoma humano codifica para 49 distintos transportadores del tipo ABC aproximadamente, sin embargo, los sustratos de algunos de estos transportadores aún son desconocidos. Muchos

transportadores del tipo ABC han sido involucrados en la extrusión multi-fármacos de sustancias tóxicas, las cuales confieren a las células cancerígenas resistencia a fármacos usados en la quimioterapia. A pesar de que los transportadores del tipo ABC pueden reconocer diversos sustratos, éstos comparten un núcleo con arquitectura común que consiste en 12 hélices transmembranales, las cuales se encuentran bien extendidas y unidas a la membrana plasmática en el lado citósólico

2.4 Gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (*MDR1*)

2.4.1 Antecedentes

El *MDR1* (P-gp, *ABCB1*) fue el primer transportador identificado en las membranas caniculares de los hepatocitos y se ha convertido en el gen más estudiado en el campo de la resistencia a fármacos (Chen et al., 1986). La P-gp fue purificada en 1979 (Riordan & Ling, 1979) y fue hasta 1982 que se demostró su papel en la resistencia a medicamentos en estudios con líneas celulares resistentes y no resistentes a fármacos en las que se veía la variación en la expresión de P-gp (Debenham et al., 1982). El gen que codifica para esta glicoproteína (*MDR1*), fue clonado en 1985 (Endicott, 1989).

Es un miembro de la superfamilia de transportadores ligados a ATP (ABC), cuyas características fueron mencionadas anteriormente. Además del *MDR1*, otros 47 transportadores de la familia ABC han sido identificados en el genoma humano. Estos transportadores son clasificados en 7 grupos (A-G) de acuerdo a la similitud de sus secuencias (Allikmets et al., 1996). Los transportadores ABC muestran diversos patrones de expresión. *MDR1* humano es normalmente encontrado en tejidos específicos. Se encuentra en las células normales de las glándulas suprarrenales, riñón, hígado, colon, yeyuno, páncreas, en las células endoteliales de los capilares de la barrera hematoencefálica y testículos (Thiebaut et al., 1987; Tatsuta et al., 1992; Willingham, 1989). *MDR1* es también encontrado en la placenta y en el endometrio de las mujeres embarazadas. Los patrones de expresión sugieren que su papel fisiológico más importante es proteger los órganos vitales y el feto de los xenobióticos (Lankas et al., 1998).

2.4.2 Genética molecular

El gen *MDR1* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, en la región 21 (Figura 5) (Boticario, 2009), su cDNA es de aproximadamente 4.5 kb, cuenta con 28 exones que varían en tamaño de 49 hasta 587 pb (Chen et al., 1990).

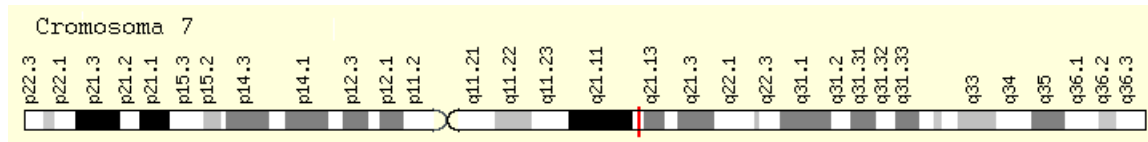


Figura 5. Localización del gen *MDR1*, 7q21. Modificada de Science, 2014.

2.4.3 Glicoproteína P

El gen *MDR1* codifica un polipéptido con 1280 aminoácidos que tiene un peso aproximado de 170 kDa. Esta proteína se expresa como una sola cadena polipeptídica que contiene dos porciones homólogas de longitud similar, cada una de las porciones contiene 6 dominios TMDs hidrofóbicos y un dominio de unión a ATP (Figura 6). Las dos mitades están separadas por una región flexible enlazadora y los dos dominios de unión a ATP son estructuralmente similares. Varios motivos han sido identificados en cada uno de los dominios de unión a ATP (Sauna et al., 2001). Los 12 dominios TMDs se encuentran en la membrana plasmática con 6 loops extracelulares (Boticario, 2009). *MDR1* tiene una regulación post-traduccional y contiene 3 sitios de N-glicosilación (N91, N94 Y N99) en el primer loop extracelular (Gribar et al., 2000). Los dominios de unión a ATP actúan como ATPasas que hidrolizan el ATP a ADP y son sumamente importantes para la función de la proteína, ya que la inhibición de estos sitios conlleva a la inhibición de la proteína (Senior et al., 1995).

Aunque el papel fisiológico de la P-gp aún no es bien conocido, puede considerarse que su misión incluye la secreción de toxinas naturales o metabólicas en la bilis o en el lumen intestinal y también la protección de sitios, tales como el SNC, el útero durante el embarazo o los testículos. Así que, la P-gp surge para transportar una gran variedad de

productos tóxicos y esa característica le capacita para transportar fármacos con estructuras reconocibles (Boticario, 2009).

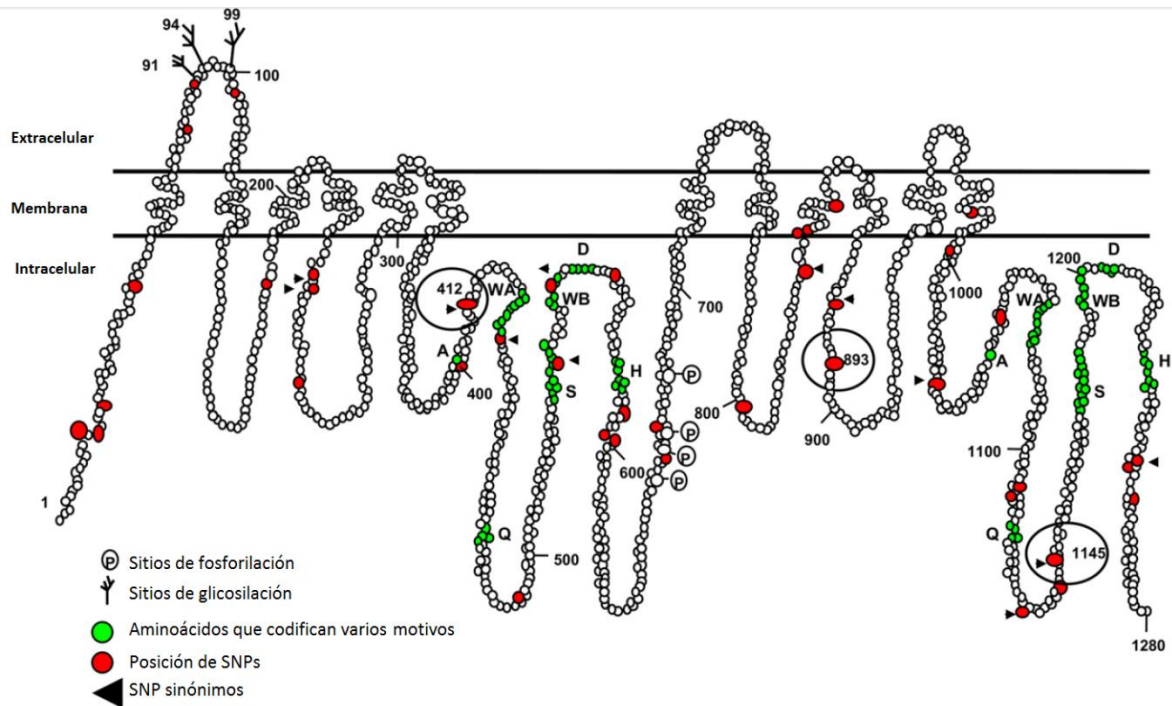


Figura 6. Modelo bidimensional de la P-gp humana. Los círculos pequeños representan los 1280 aminoácidos. Los círculos en color rojo representan los aminoácidos afectados por SNPs. Los residuos de aminoácidos afectados por SNPs se encuentran marcados con un triángulo. Los sitios de glicosilación también son mostrados. Modificada de Fung & Gottesman, 2009.

2.4.4 Mecanismo de *MDR1* y su papel en la resistencia a fármacos

El mecanismo general de los exportadores tipo ABCB1 está ejemplificado en la Figura 7, el cual implica un cambio de conformación en la proteína debido a la unión de un sustrato y gracias a la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP.

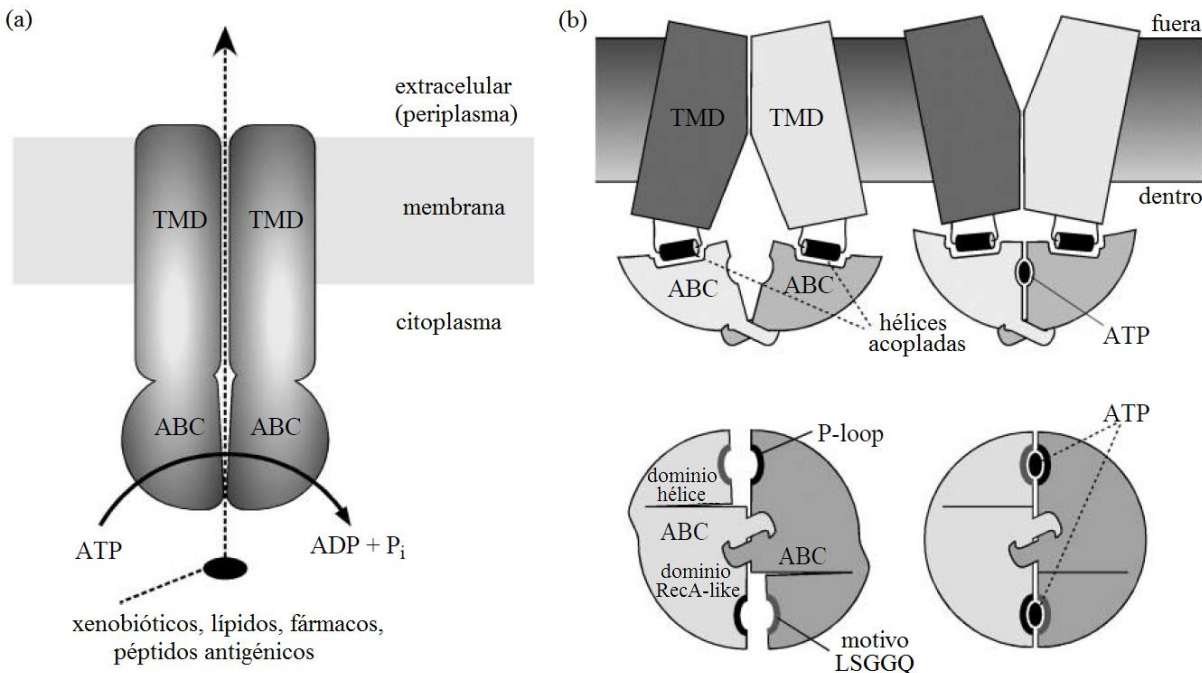


Figura 7. Esquema de la función y mecanismo de los transportadores ABC. (a) Los exportadores ABC típicamente tienen sus TMDs fusionados con sus NBDs (ABCs). (b) La unión de ATP a sus sitios de acople provoca el movimiento molecular de los TMDs lo que a su vez ocasiona la eliminación de la separación entre los NBDs y la exportación de sus sustratos. Modificada de Locher, 2009.

Actualmente el modelo aceptado para explicar el transporte de xenobióticos por *MDR1* es la “bomba de eflujo hidrófoba” en la cual el fármaco es expulsado al espacio extracelular pasando a través de un poro hidrofóbico formado por los dominios transmembranales de la P-gp. Para que éste eflujo pueda suceder se requiere un cambio conformacional de la P-gp dependiente de energía, por lo cual se da la hidrólisis de ATP a ADP (Higgins & Gottesman, 1992). La característica más significativa de la función de *MDR1* es su amplia

especificidad de sustratos. Los sustratos de *MRD1* tienen diversas estructuras químicas y una amplia gama de funciones biológicas: fármacos anticancerígenos, proteasas anti-VIH, antihistamínicos, bloqueadores de canales de calcio, antibióticos, etc. (Marzolini et al., 2004).

Debido a que el mecanismo responsable de la respuesta a fármacos en epilepsia aún no es bien conocido se han formulado diversas hipótesis, una de las cuales atribuye la falta de respuesta a fármacos a la sobre expresión de P-gp en la barrera hematoencefálica, debido a que actúa como una bomba de eflujo para la mayoría de los FAEs (Luna-Tortós et al., 2008). Esta hipótesis ha sido apoyada por diversos estudios que indican que existe un incremento en la expresión de P-gp en los focos epilépticos comparada con áreas vecinas del tejido cerebral en pacientes resistentes a los fármacos (Tishler et al., 1995).

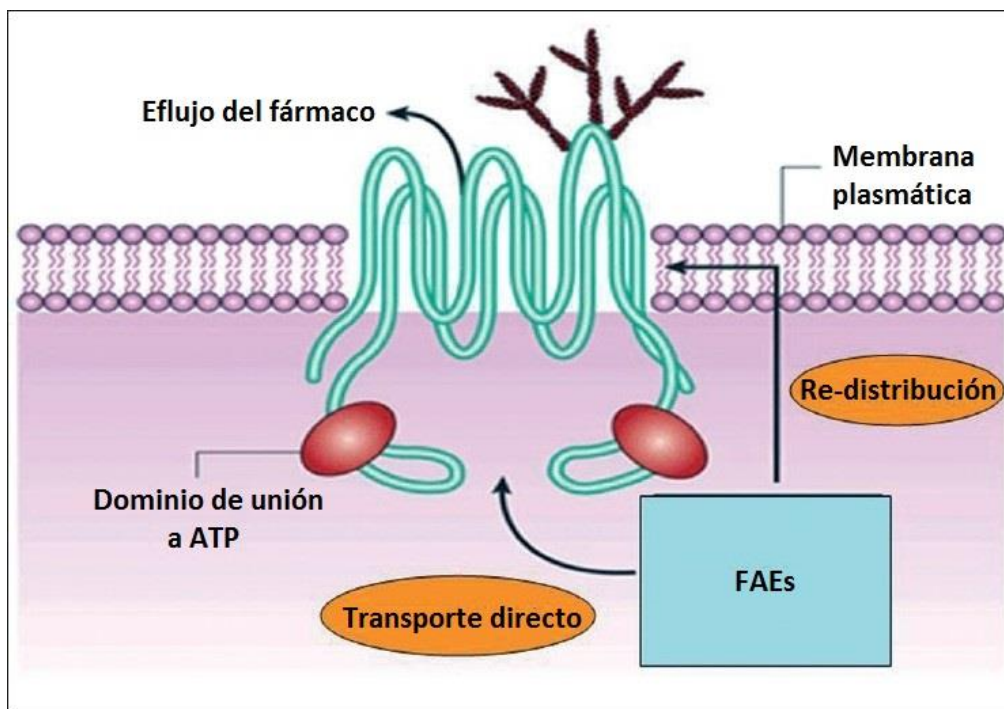


Figura 8. Estructura de la P-gp. El mecanismo exacto de eflujo de los fármacos aún no es bien conocido, pero podría implicar el transporte directo al citoplasma o la redistribución del fármaco a través de la membrana plasmática. Modificada de Das, Balan, et al., 2016.

2.4.5 Polimorfismos del gen MDR1 en epilepsia resistente a fármacos

De acuerdo a la base de datos de SNPs del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), hay más de 50 SNPs en la región codificante del gen *MDR1* humano. Pero son tres los polimorfismos comúnmente más estudiados en relación a la variación en la respuesta a FAEs en este gen: C1236T (rs1128503), G2677T/A (rs2032582) y C3435T (rs1045642) (Figura 9). Algunos estudios muestran asociaciones positivas de SNPs (Siddiqui et al., 2003; Patrick Kwan et al., 2007) y otros reportan asociaciones por haplotipos (Zimprich et al., 2004; Hung, 2007).

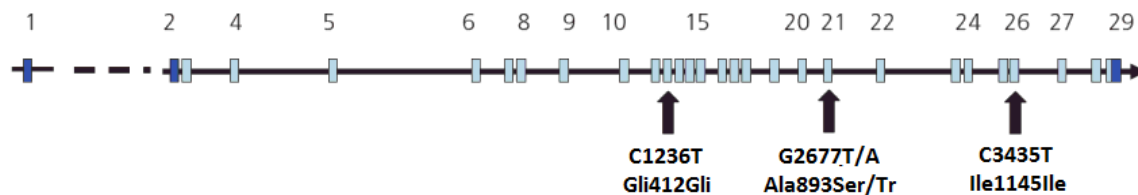


Figura 9. Localización de los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T en los exones del gen MDR1 (*ABCB1*). Modificada de Dhavendra, 2009.

2.4.5.1 C1236T (rs1128503)

El polimorfismo C1236T está localizado en el exón 12 del gen *ABCB1*, se trata de una transición de citosina por una timina (C>T) en el residuo 412 que origina un cambio sinónimo del codón GGC al codón GGT, codificando ambos para glicina (Speicher, 2010). La frecuencia de los alelos C y T varía de acuerdo a la etnia. De acuerdo a la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido (dbSNP), el alelo ancestral C se presenta en una frecuencia de entre 30% y 93% dependiendo de la población, siendo el alelo C menos frecuente en asiáticos y el alelo T menos frecuente en africanos (Altman, 2012). A pesar de que se han realizado varios estudios buscando asociaciones fenotípicas con este polimorfismo sinónimo, aún no se ha establecido claramente la influencia de los genotipos CC y TT en el funcionamiento de la P-gp (Leschziner et al., 2007).

2.4.5.2 G2677T/A (rs2032582)

Es un SNP trialélico, ya que es posible encontrar el cambio de los nucleótidos T o A por G (T/A>G), está localizado en el exón 21 del gen *ABCB1* y resulta en un cambio no sinónimo del codón GCT al codón TCT o ACT, originando un cambio en el aminoácido 893 de alanina a serina ó treonina, respectivamente (Ambudkar et al., 1999). Los alelos más frecuentes en este polimorfismo son el T (893S) y G (893A). La frecuencia del alelo T varía entre 2% hasta 65% en la población mundial. La frecuencia del genotipo GG es mayor al 81% en población africana, comparada con el 10% a 32% en indios americanos, mexicanos, italianos, asiáticos y caucásicos. De acuerdo a dbSNP el alelo A es muy poco común y su frecuencia va de 0% a 17% en diferentes poblaciones étnicas (Cascorbi et al., 2001).

2.4.5.3 C3435T (rs1045642)

Este polimorfismo se localiza en medio del exón 26, el cual cambia una citosina por una timina en la posición 1145 ATC por ATT, y que en cada caso codifica para isoleucina (Speicher, 2010). C3435T fue el primer polimorfismo funcional reportado. Se han observado diferencias interétnicas en las frecuencias de estos polimorfismos. Por ejemplo, el alelo 3435C es más frecuente en población africana que en población asiática y caucásica. El genotipo CC en el polimorfismo C3435T ha sido más comúnmente asociado con altos niveles de mRNA y proteína y el incremento del eflujo de fármacos en tejidos normales y tumorales, aunque existen algunas discrepancias, especialmente en población japonesa. El mecanismo por el cual el polimorfismo sinónimo C3435T afecta la función de la proteína aún no es bien definido pero recientemente se ha explicado por la alteración del plegamiento de la proteína debido a la desaceleración de la velocidad de traducción como se muestra en la Figura 8 (Ahcène, 2009).

2.4.6 Haplotipos de los SNPs 1236 C>T, 2677 G>T/A y 3435 C>T

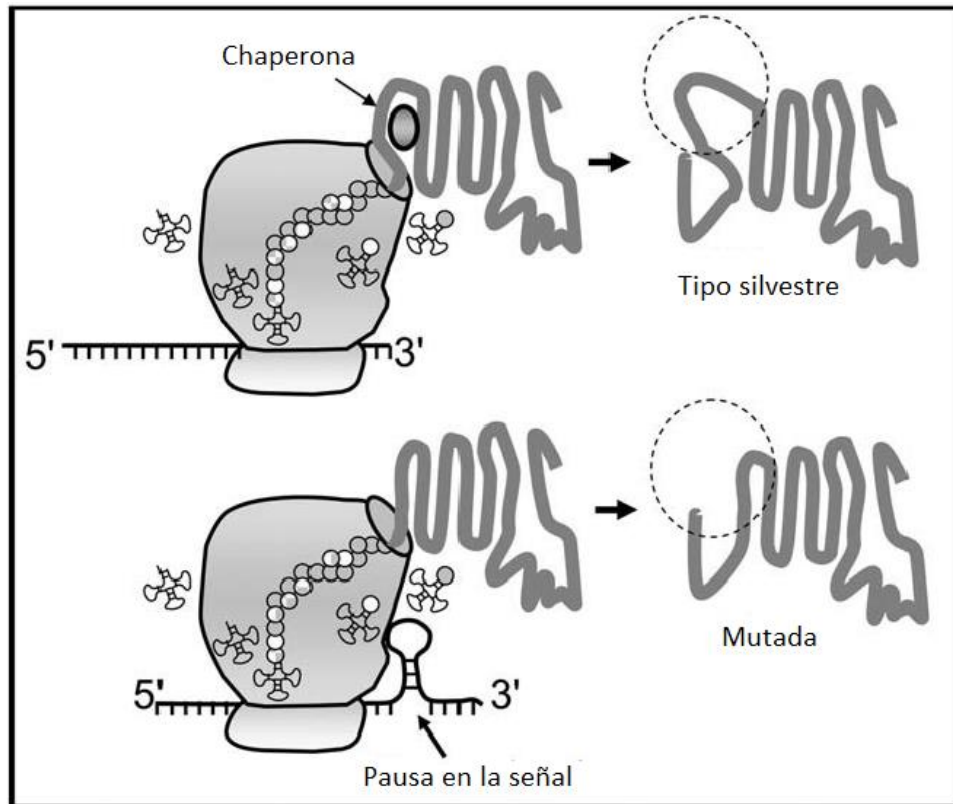


Figura 10. Mecanismo por el cual el polimorfismo C3435T altera el plegamiento de la proteína P-gp. Una mutación sinónima puede crear una pausa en la traducción retrasando al ribosoma. Un retraso significativo podría interrumpir el momento de la interacción chaperona-proteína y producir una proteína con un ligero cambio en su conformación. Modificada de Fung & Gottesman, 2009.

El haplotipo frecuentemente estudiado en el gen *ABCB1* consiste en la combinación de los polimorfismos 3435 C>T, 2677 G>T/A y 1236 C>T. La población de origen africano presenta predominantemente el haplotipo silvestre CGC y no el haplotipo TTT. En personas caucásicas la frecuencia de los haplotipos CGC y TTT son aproximadamente las mismas. Mientras que el haplotipo TTT es predominante en asiáticos e hindús; estos datos muestran que la frecuencia de los haplotipos varían de acuerdo a los grupos étnicos (Kroetz, 2003).

En relación a la respuesta a fármacos anticonvulsivos, se ha observado que los pacientes que presentan farmacoresistencia poseen comúnmente los haplotipos CGC, TGC y TTT, mientras que los pacientes que si responden a estos fármacos presentan comúnmente los haplotipos TTC, GTC, CGT, TGT y CGT (Hung, 2005).

2.5 CYP2C9

2.5.1 Generalidades

CYP2C9 es responsable del metabolismo de aproximadamente 16% de los fármacos de uso clínico metabolizados por vías oxidativas (Williams et al., 2004). CYP2C9 es una de las más abundantes enzimas CYP en el hígado adulto humano (aproximadamente 20% del contenido total de CYP hepático) (Goldstein, 1994). La proteína inmunorreactiva CYP2C9 ha sido detectada no sólo en hígados adultos, también en hígados de fetos de 8-24 semanas de gestación (Boullata, 2010). Este CYP metaboliza un gran número de fármacos de uso clínico incluyendo antibióticos, anticancerígenos, antidiabéticos, antiepilépticos, antihipertensivos, cannabinoides, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), anticoagulantes y antihiperlipidémicos (Tabla 6). Algunos inductores e inhibidores de CYP2C9 se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. *Inductores e inhibidores de CYP2C9. Tomada de Boullata, 2010.*

Inductores	Inhibidores
Rifampicina	Amiodarona
	Avasimibe
	Fluconazol
	Miconazol

2.5.2 Genética molecular

El gen *CYP2C9* está localizado en el brazo largo del cromosoma 10 en la región 24 (10q24)(Figura 11) (Zanger, 2008). Este gen está formado por nueve exones que codifican para una proteína de 490 aminoácidos (Goldstein, 1994).

Tabla 6. Fármacos sustratos de CYP2C9 y procesos metabólicos mediados por esta enzima. Tomada de Hirota et al., 2013.

CYP2C9	Tipo de fármaco	Fármaco	Proceso metabólico
Metabolitos activos	Antialérgicos	Seratrodist	5-metilhidroxilación
	Antibióticos	Sulfametoxazol	N-hidroxilación
	Anticancerígenos	Ciclofosfamida	4-hidroxilación
		Ifosfamida	4-hidroxilación
		Tamoxifen	4-hidroxilación
	Antidepresivos	Amitriptilina	N-demetilación
		Fluoxetina	N-demetilación
	Antidiabéticos	Glicazida	Metil hidroxilación
Antihipertensivos	Losartán	5-carboxilación	
Cannabinoides	Δ^9 -tetrahydrocannabinol	11-hidroxilación	
Diuréticos	Ácido tienílico	5-hidroxilación	
Metabolitos inactivos	Antialérgicos	Zafirlukast	Hidroxilación
	Antibióticos	Dapsona	N-hidroxilación
		Terbinafina	N-demetilación
	Antidepresivos	Sertralina	N-demetilación
	Antidiabéticos	Glibenclamida	4- y 3-hidroxilación
	Antiepilépticos	Fenitoína	4'-hidroxilación
Ácido valproico		Ácido 2-profilpent-4-enoico, 4- y 5-hidroxilación	
Antihipertensivos	Irbesartan	Hidroxilación	

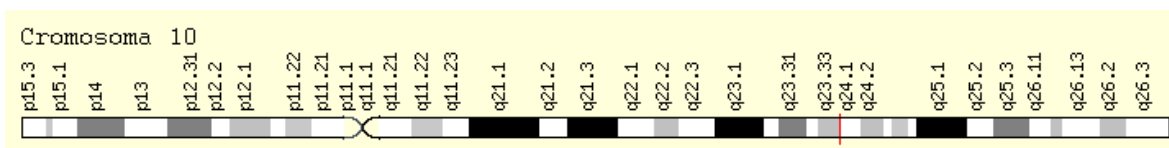


Figura 11. Localización del gen *CYP2C9*, 10q24. Modificada de Science, 2014.

2.5.3 Polimorfismos

Hasta ahora, 42 alelos han sido identificados en el gen *CYP2C9* humano. El alelo más común considerado como el alelo silvestre es denotado *CYP2C9**1. De los polimorfismos en el gen *CYP2C9*, al menos 8 alelos no funcionales se han encontrado en diferentes grupos étnicos (DeLozier et al., 2005).

Estos polimorfismos codifican enzimas con actividad disminuida o con una proteína trunca inactiva (Tabla 7). Entre las variantes funcionales, *CYP2C9**2 (rs1799853) y *CYP2C9**3 (rs1057910) han sido extensamente estudiadas.

Tabla 7. Polimorfismos más frecuentes del gen *CYP2C9*. Tomada de Blaisdell et al., 2004.

Polimorfismo	Población	SNP	Localización	Actividad enzimática
<i>CYP2C9</i>*1	Población general	Tipo silvestre	10q24.1	Normal
<i>CYP2C9</i>*2	12.8% Ascendencia Europea 1.3% Afro-Americanos	R144C (3608C>T)	Exón 3	Disminuida
<i>CYP2C9</i>*3	6.3% Ascendencia Europea 1.9% Afro-Americanos 2-4% Asiáticos	I359L (42614A>C)	Exón 7	Disminuida
<i>CYP2C9</i>*5	0.9-1.8% Afro-Americanos	D360E (42619C>G)	Exón 7	Disminuida
<i>CYP2C9</i>*6	0.1-0.75% Afro-Americanos	10601delA (818delA)	Exón 5	Nula
<i>CYP2C9</i>*11	1.5% Afro-Americanos	R335W (1003C>T)	Exón 7	Disminuida

Nota: C= cisteína, D= aspartato, E= glutamato, I= isoleucina, L= leucina, R= arginina, W= triptófano; (letras en paréntesis) A= adenina, C= citosina, G= guanina, T= timina.

2.5.3.1 CYP2C9*2 (rs1799853)

El alelo *CYP2C9*2* codifica para una proteína moderadamente defectuosa (Lee, 2002). Este alelo es más frecuente en la población de Europa, Medio Oriente y Centro/Sur de Asia y se encuentra en menor frecuencia en regiones geográficas como África, Asia Oriental, Oceanía y América (Ross et al., 2010).

*CYP2C9*2* está localizado en el exón 3 (Barh, 2013), se trata del cambio de una citosina por una timina en la posición 430 (C430T), causando una sustitución no sinónima por el cambio de aminoácido cisteína por arginina en la posición 144 (R144C). Se ha sugerido que esta sustitución afecta la interacción entre la enzima P450 y P450 reductasa (Crespi, 1997), lo cual puede explicar el metabolismo lento de algunos sustratos de *CYP2C9*.

2.5.3.2 CYP2C9*3 (rs1057910)

El alelo *CYP2C9*3* presenta una baja afinidad con su sustrato y tiene un aclaramiento intrínseco notablemente inferior para numerosos fármacos *in vitro* e *in vivo* (Lee, 2002). El alelo *CYP2C9*3* tiene una distribución geográfica más amplia comparada con el alelo *CYP2C9*2*, pero las frecuencias más altas son encontradas en poblaciones en Europa y Centro/Sur de Asia (Ross et al., 2010).

Este polimorfismo está localizado en el exón 7 (Barh, 2013), y es un cambio de adenina por citosina en la posición 1075 (A1075C), lo cual genera un cambio de aminoácido isoleucina por leucina en la posición 359 (I359L), esta una de las variantes más extensamente estudiadas. El residuo 359 está localizado en el sitio activo de *CYP2C9*, donde participa en el reconocimiento de sustratos (Gotoh, 1992). Estudios *in vitro* muestran que se afecta la actividad catalítica de varios sustratos de *CYP2C9* en relación con el alelo silvestre (Takanashi, 2000).

2.6 CYP2C19

2.6.1 Generalidades

CYP2C19 tiene un papel crítico en la biotransformación oxidativa de varios grupos importantes de fármacos, incluyendo fármacos anticancerígenos, antidepresivos, antihipertensivos y antiplaquetarios (Tabla 8) (Hirota et al., 2013). CYP2C19 es predominantemente expresado en hígado y en menor medida en el intestino delgado (Klose, 1999). CYP2C19 representa aproximadamente el 3 % del contenido hepático total de CYP. La expresión constitutiva de CYP2C19 es ampliamente mediada por los factores nucleares hepáticos 4 alfa (HNF4alfa, HNF4A) y 3 gamma (HNF3gamma, FOXA3) (Kamiyama et al., 2007; Bort, 2004). Algunos inductores e inhibidores de CYP2C19 se muestran en la Tabla 9.

2.6.2 Genética molecular

El gen *CYP2C19* está localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q24.1-q24.3) (Figura 12) y tiene 9 exones que codifican para una proteína de 490 aminoácidos (Hirota et al., 2013).

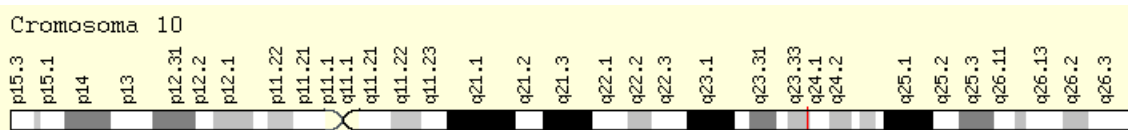


Figura 12. Localización del gen *CYP2C19*, 10q24.1-q24.3. Modificada de Science, 2014.

Tabla 8. Fármacos sustratos de CYP2C19 y procesos metabólicos mediados por esta enzima. Tomada de Hirota et al., 2013.

CYP2C19	Tipo de fármaco	Fármaco	Proceso metabólico
Metabolitos activos	Analgésicos	Carisoprodol	N-desmetilación
	Antibióticos	Claritromicin	14-hidroxilación
	Anticancerígenos	Ciclofosfamida	4-hidroxilación
		Tamoxifen	4-hidroxilación
	Antiepilépticos	Mefenitoína	4'-hidroxilación
	Antidepresivos	Amitriptilina	N-desmetilación
		Fluoxetina	N-desmetilación
	Antihipertensivos	Carvedilol	4-hidroxilación
	Antimaláricos	Proguanil	Oxidación
	Antiplaquetarios	Clopidogrel	2-oxidación
Antiviral	Nelfinavir	Hidroxilación de un grupo <i>t</i> -butil	
Psicotrópicos	Diazepam	N-desmetilación	
Metabolitos inactivos	Anticancerígenos	Indisulam	4-hidroxilación
	Anticoagulantes	Warfarina	7-hidroxilación
	Antiepilépticos	Fenitoína	5-hidroxilación
	Antidepresivos	Sertralina	N-desmetilación
	Psicotrópicos	Metilfenidato	O-desmetilación
	Antibióticos	Voriconazol	N-oxidación

Tabla 9. Inductores e inhibidores de CYP2C19. Tomada de Boullata, 2010.

Inductores	Inhibidores
Artemisinina	Cimetidina
Rifampicina	Fluoxetina
	Fluvoxamina
	Isoniazida
	Ketoconazol
	Moclobemida
	Omeprazol
	Anticonceptivos orales
	Ticlopidina

2.6.3 Polimorfismos

Hasta ahora 34 alelos del gen *CYP2C19* humano han sido identificados y caracterizados, algunos se encuentran en la Tabla 9. Las variantes alélicas *CYP2C19*2* y *CYP2C19*3* son las más estudiadas.

2.6.3.1 *CYP2C19*2* (rs4244285)

*CYP2C19*2* se localiza en el exón 5 y produce un cambio de guanina por adenina en la posición 681 (G681A) que lleva a un defecto en el splicing (Hirota et al., 2013). Esta es la variante más común; la creación de este sitio de splicing altera el marco de lectura del mRNA que comienza en el aminoácido 215 y produciendo un codón de terminación prematuro (De Morais et al., 1994). Este alelo tiene una frecuencia de 30% en población china, aproximadamente 15% en caucásicos y 17% en afroamericanos.

Tabla 10. Polimorfismos más frecuentes del gen *CYP2C19*. Tomada de Kaneko et al., 1997; Sim et al., 2006.

Alelo	Población	SNP	Localización	Actividad enzimática
<i>CYP2C19*1</i>	Población general	Tipo silvestre	10q24.1-3	Normal
<i>CYP2C19*2</i>	2-5% Caucásicos 18-23% Japoneses	Delección 40 pb (681G>A)	Exón 5	Disminuida
<i>CYP2C19*3</i>	13% Islas de Vanuatu	W212X (636G>A)	Exón 4	Disminuida
<i>CYP2C19*4</i>	0.6-3% Caucásicos	M1V (Mutación en codón de inicio A>G)	Codón de inicio	Disminuida
<i>CYP2C19*5</i>	Baja en chinos y japoneses	R433W (1297C>T)	Exón 9	Disminuida
<i>CYP2C19*17</i>	18% Etiopes y suecos 1.3% Japoneses 0.64% Chinos	C806T (3402C>T)	Región 5'	Aumentada

Nota: M= metionina, R= arginina, V= valina, W= triptófano, X= codón de paro; (en paréntesis) A= adenina, T= timina, C= citosina, G= guanina.

2.6.3.2 *CYP2C19*3* (rs4986893)

Este polimorfismo se localiza en el exón 4, es un cambio de una guanina por una adenina en la posición 636 (G636A) y produce un codón de paro prematuro (Hirota et al., 2013). Esta variante afecta aproximadamente al 5% de la población china y es casi inexistente en caucásicos (Xie, 2001).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la asociación de los principales polimorfismos de los genes *ABCB1*, *CYP2C9* y *CYP2C19* mediante las técnicas PCR, RFLPs y secuenciación automatizada, en la respuesta al tratamiento con Ácido Valproico en pacientes con Epilepsia Mioclónica Juvenil, para mejorar la respuesta al tratamiento.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos C1236T, G2677T/A, C3435T, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2 y CYP2C19*3 en 200 controles sanos y 87 pacientes con EMJ.
- Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas de cada polimorfismo en controles sanos con las reportadas en otros estudios y en otras poblaciones.
- Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas de cada polimorfismo entre controles y pacientes con EMJ así como entre pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP.

4. Hipótesis

La presencia de variantes polimórficas en los genes *ABCB1*, *CYP2C9* y *CYP2C19* podrían condicionar la respuesta de los pacientes con Epilepsia Mioclónica Juvenil al tratamiento con Ácido Valproico.

5. Metodología

A continuación, se presenta el diagrama general metodológico, posteriormente serán detallados cada uno de los pasos.

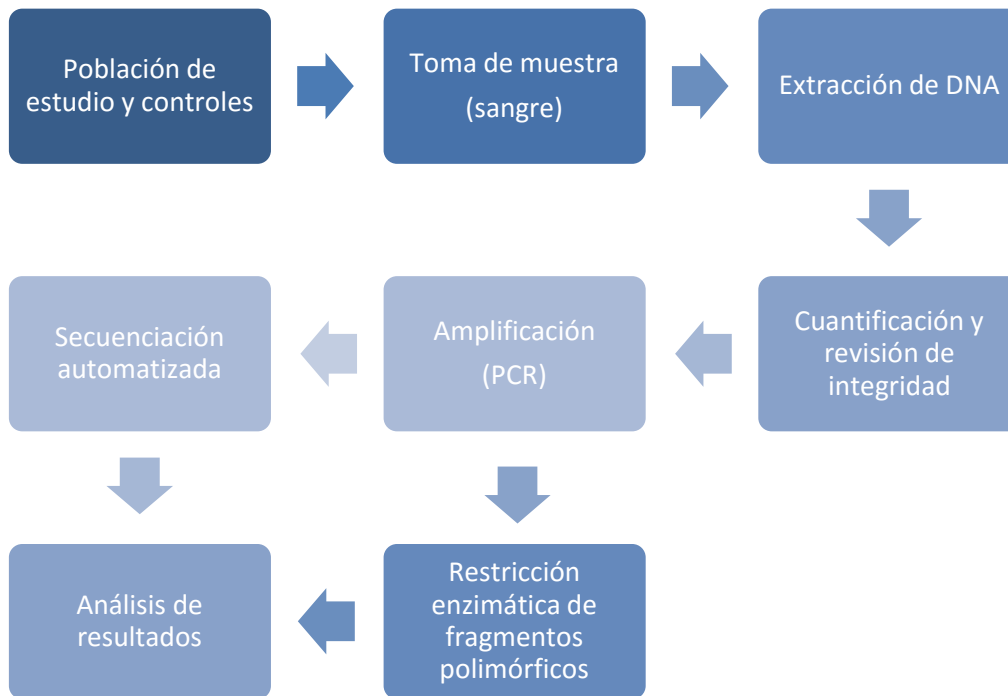


Figura 13. Diagrama general metodológico.

5.1 Muestras biológicas

5.1.1 Muestras de estudio

Se realizó el análisis de 87 pacientes con EMJ bajo tratamiento con AVP; de los cuales 60 fueron respondedores y 27 no respondedores. Todos ellos firmaron carta de consentimiento informado (Anexo 1). La distribución por género fue de 12 hombres y 15 mujeres, con una edad de inicio de la enfermedad promedio de 14 años y un intervalo de 6 a 18 años en pacientes no respondedores. En pacientes respondedores la distribución por género fue de 30 hombres y 30 mujeres, con una edad de inicio de la enfermedad promedio de 14 años y un intervalo de 6 a 27 años.

- Criterios de inclusión:
 - *Pacientes con diagnóstico único de EMJ.
 - *Pacientes en monoterapia con AVP con al menos un año de seguimiento.
- Criterios de exclusión:
 - *Pacientes en politerapia.
 - *Pacientes que presentaran diagnóstico de otra enfermedad neurodegenerativa además de EMJ.

Definición de respondedor: Pacientes bajo terapia con AVP que en al menos un año no presentaron CTCG (crisis tónico-clónicas generalizadas).

Definición de no respondedor: Pacientes bajo terapia con AVP que presentaron crisis generalizadas y CTCG en un lapso menor a un año.

5.1.2 Muestras Controles

- Criterios de inclusión:
 - *Individuos sanos sin antecedentes de enfermedades neurodegenerativas ni demencias de rápida evolución.
 - *Individuos mexicanos con al menos 3 abuelos mexicanos, pudiendo tener uno de origen español.
- Criterios de exclusión:
 - *Individuos no mexicanos o con más de un abuelo que no sea mexicano.
 - *Individuos con antecedentes de enfermedades neurodegenerativas o demencias de rápida evolución.
 - *Individuos que no aceptaron participar en el estudio.

5.2 Toma de muestra

En condiciones de asepsia, se obtuvieron aproximadamente 20 mL de sangre periférica de los pacientes y controles por punción venosa en tubos Vacutainer que tienen como anticoagulante ACD (ácido cítrico-citrato-dextrosa). Donde el citrato actúa como anticoagulante quelando los iones Ca^{2+} ; la proporción de ácido cítrico y citrato de sodio permite la conservación de la sangre entera y la dextrosa proporciona un sustrato para la glucólisis durante el almacenamiento que extiende la vida de las células presentes en la sangre.

5.3 Lisis y extracción de DNA

La lisis de las células nucleadas y la extracción de DNA de leucocitos se realizaron por la técnica de Cuevas Covarrubias modificada de Buffone y Darlington, mediante el siguiente procedimiento:

- Transferir 3 mL de sangre a un tubo cónico y agregar 3 veces el volumen igual de TTS (Tris-Tritón-Sacarosa).
- Centrifugar a 4000 rpm durante 6 min y decantar.
- Agregar al botón 1 mL de TTS.
- Resuspender el botón y pasar a un tubo de 1.5 mL. Homogeneizar.
- Centrifugar a 14000 rpm por 6 minutos a 4°C. Decantar y añadir 1 mL de TTS, resuspender.
- Repetir de 2 a 3 veces el paso anterior.
- Al botón limpio, agregar NaCl. Agitar y colocar SDS al 10%.
- Agregar NaCl saturado. Agitar durante 10 min nuevamente.
- Centrifugar y decantar el sobrenadante a un tubo *ependorf*.
- Agregar cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), mezclar y centrifugar.
- Tomar la fase superior y pasarla a un tubo *ependorf*.
- Agregar etanol absoluto frío para precipitar el DNA.
- Centrifugar a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C y decantar sin perder el botón.
- Agregar etanol frío al 70%, resuspender el botón y centrifugar. Decantar.

- Repetir el paso anterior.
- Secar el botón de DNA y resuspender en un máximo de 200 μL de agua estéril.

Por medio de este método la lisis de glóbulos rojos se consigue mediante el uso del TTS, la lisis de las células blancas se obtiene mediante el uso de detergentes, mientras que las proteínas y demás contaminantes del DNA se eliminan mediante el uso de sales. La precipitación del DNA es realizada con alcoholes debido a su insolubilidad en ellos.

5.4 Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se realizó mediante espectrofotometría en el equipo *Genova Nano*. En este equipo la determinación de la concentración de DNA se basa en la capacidad de las sustancias de absorber luz a una longitud de onda determinada, en proporción directa a la cantidad de materia presente. Para realizar la determinación en el equipo se seleccionó el programa de cuantificación de DNA de doble cadena a 260 y 280 nm, posteriormente se calibró el equipo de acuerdo a las especificaciones del fabricante utilizando agua destilada antes de realizar las mediciones. La cantidad de DNA presente en una muestra se determinó depositando 2 μL de muestra en el lector, previamente homogenizada mediante agitación a 40°C y 850 rpm en el equipo *Thermomixer*. El espectrofotómetro realiza dos lecturas, una a 260 nm y otra a 280 nm. Por cada muestra se realizaron tres mediciones para obtener un promedio de la concentración y pureza.

La lectura a 260 nm nos indicó la cantidad de DNA presente en la muestra y la pureza se determinó por la relación de las absorbancias medidas a las longitudes de onda 260/280 nm, ya que las proteínas absorben a 280 nm, es así como valores entre 1.8 y 2.0 nos indicaron alta pureza en nuestras muestras.

Después de realizada la cuantificación de DNA se realizaron diluciones de las muestras a una concentración de 100 ng/ μL y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

5.5 Análisis de la integridad del DNA extraído en geles de agarosa

Una vez obtenida la concentración de DNA en las muestras extraídas, es indispensable conocer la integridad del DNA obtenido, para lo cual se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.5%, en el cual las moléculas de DNA migran de manera inversamente proporcional a sus tamaños moleculares. Dado que el DNA está cargado negativamente debido a los grupos fosfatos de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo hacia el polo positivo. Esta electroforesis se realiza colocando 3 μL de muestra más 2 μL de buffer de carga, el cual contiene: azul de bromofenol que es un colorante de seguimiento habitual y tiñe a la muestra de azul brillante, esto facilita observar su progreso a través del gel ya que este viaja a la misma velocidad que una cadena de DNA de 300 pb; el xilencianol es también un colorante de seguimiento que viaja a la misma velocidad de una cadena de 4 kpb; y glicerol, que por ser de alta densidad facilita la agregación de las muestras en los pozos de agarosa. La electroforesis se favoreció con el buffer de corrida (TBE 0.5X) y se realizó a 100 V durante aproximadamente 1 hr. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV para su análisis.

La determinación de la concentración de DNA y su integridad, resulta indispensable, ya que así se determinará la forma en la que posteriormente se manejará la muestra y las consideraciones que con ella se tendrán al realizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.6 Amplificación de fragmentos de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica que permite amplificar rápidamente muestras pequeñas de DNA para poder analizarlas. Para llevar a cabo una PCR se comienza con una solución que incluye el DNA que será amplificado, la enzima DNA polimerasa, los cuatro dNTPs, los oligonucleótidos (cebadores), iones magnesio y otras sales necesarias para que se produzca la reacción. Una PCR típica incluye tres pasos:

1. Desnaturalización. La solución inicial que contiene el DNA a amplificar se calienta entre 90 y 100°C para romper los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas de nucleótidos y producir así los moldes monocatenarios necesarios.
2. Alineación. La solución de DNA baja de temperatura entre 45 y 65°C que es la temperatura a la cual los oligonucleótidos se unen a las cadenas desnaturalizadas.
3. Elongación o extensión. Este paso se lleva a cabo a la temperatura óptima para la actividad de la polimerasa; la polimerasa elonga la cadena utilizando como molde la muestra inicial. La polimerasa comúnmente utilizada es la Taq polimerasa que tiene su pico máximo de actividad a 72 °C. El tiempo de extensión depende del tamaño de fragmento a amplificar y de la velocidad de la polimerasa para añadir nucleótidos a la cadena. La velocidad de la Taq polimerasa es de entre 500 a 1000 pb por minuto.

Los tres pasos anteriores se repiten en ese mismo orden y cada repetición es llamada ciclo. Este ciclo se repite de 20 a 30 veces en la misma mezcla de reacción para poder obtener una cantidad suficiente de DNA amplificado que será útil para su análisis.

Por medio de esta técnica fueron amplificados los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T del gen *ABCB1*, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2 y CYP2C19*3 en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP y en muestras de controles. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR para cada polimorfismo se muestran en la Tabla 10.

Tabla 11. Secuencia de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los principales polimorfismos de los genes *ABCB1*, *CYP2C9* y *CYP2C19*

Oligos	Secuencia	Tamaño	Tamaño producto de PCR	Ref.
<i>ABCB1</i> C1236T F C1236T R	5'-TATCCTGTCTCTGTGAATTGC-3' 5'-CCTGACTCACCACACCAATG-3'	20 pb 20 pb	370 pb	(Cascorbi et al., 2001)
<i>ABCB1</i> G2677T/A F G2677T/A R	5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG-3' 5'-GTTTGACTCACCTTCCCAG-3'	20 pb 19 pb	221 pb	(Cascorbi et al., 2001)
<i>ABCB1</i> C3435T F C3435T R	5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG-3' 5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'	20 pb 20 pb	197 pb	(Cascorbi et al., 2001)
<i>CYP2C9</i> 2C9*2F 2C9*2R	5'-TACAAATACAATGAAAATATCATG-3' 5'-CTAACAACCAGACTCATAATG-3'	24 pb 21 pb	690 pb	(Sullivan et al., 1996)
<i>CYP2C9</i> 2C9*3 F2 2C9*3 R	5'-AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGGTAC-3' 5'-GATACTATGAATTTGGGACTTC-3'	30 pb 22 pb	165 pb	(Sullivan et al., 1996)
<i>CYP2C19</i> 2C19*2 F 2C19*2 R	5'-ATTACAACCAGAGCTTGGC-3' 5'-TATCACTTTCCATAAAAGCA-3'	19 pb 20 pb	167 pb	(De Morais et al., 1994)
<i>CYP2C19</i> 2C19*3 F 2C19*3 R	5'-ACTTTCATCCTGGGCTGTGC-3' 5'-ACTTCAGGGCTTGGTCAATA-3'	20 pb 20 pb	233 pb	(Ohkubo et al., 2006)

Nota: F= forward, R= reverse. Los oligonucleótidos usados para el análisis de los polimorfismos del gen *ABCB1*

Las Tablas 12 y 13 muestran los reactivos usados para la mezcla de reacción de cada PCR, así como la concentración y volumen necesarios.

Tabla 12. Reactivos usados en la PCR del gen ABCB1

Reactivo	Concentración	C3435T	C1236T	G2677T/A
DNA	100-200 ng/ μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Oligo Forward	10 μ M	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Oligo Reverse	10 μ M	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Master Mix	2X	7.5 μ L	7.5 μ L	7.5 μ L
H ₂ O		3.5 μ L	3.5 μ L	3.5 μ L
Volumen total		15 μ L	15 μ L	15 μ L

Tabla 13. Reactivos usados en la PCR de los genes CYP2C9 y CYP2C19

Reactivo	Concentración	CYP2C9*2	CYP2C9*3	CYP2C19*2	CYP2C19*3
DNA	100-200 ng/ μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Oligo Forward	10 μ M	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Oligo Reverse	10 μ M	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Master Mix	2X	7.5 μ L	7.5 μ L	7.5 μ L	7.5 μ L
H₂O		3.5 μ L	3.5 μ L	3 μ L	3.5 μ L
MgCl₂	2.5 mM	-	-	0.5 μ L	-
Volumen total		15 μ L	15 μ L	15 μ L	15 μ L

Las condiciones a las cuales se realizó la amplificación de los fragmentos de interés fueron previamente estandarizadas. La temperatura óptima de alineamiento de cada par de oligonucleótidos para cada polimorfismo fue determinada mediante una PCR de gradiente de temperatura.

Al realizar una PCR de gradiente de temperatura, es necesario preparar 12 reacciones ajustadas a un volumen de 5µL, manteniendo la proporción de reactivos descritos en la Tabla 11, utilizándose una misma muestra de DNA control para cada una de las 12 reacciones. Antes de realizar la mezcla de reacción es necesario determinar la T_m teórica de cada oligonucleótido de acuerdo a la ecuación: $T_m = 2AT + 4GC$, además de realizar el cálculo en el software en línea de *Applied Biosystems*. Una vez realizado el cálculo anterior, fue seleccionado el programa de gradiente de temperatura en el termociclador *Axygen Maxygene* seleccionando un rango de temperaturas en el cual se incluyeran las temperaturas teóricas calculadas, ya que en cada uno de los 12 pozos del termociclador, este establece una temperatura diferente.

Para ejemplificar este proceso se muestra el gradiente del polimorfismo C1236T del gen *ABCB1*, en la Tabla 14 se muestran las condiciones de la mezcla de reacción.

Tabla 14. Reactivos usados en la PCR de gradiente del polimorfismo C1236T

Reactivo	Concentración	Volumen
Master mix	2X	2.5 µL
Oligo Forward	10 µM	0.25 µL
Oligo Reverse	10 µM	0.25 µL
H ₂ O		1.75 µL
DNA	100-200 ng/µL	0.25 µL
Volumen total		5 µL

T_m teórica oligo Forward gen *ABCB1*, polimorfismo C1236T:

5'-TATCCTGTCTCTGTGAATTG-3'

- $T_m = 2(12) + 4(8) = 56^\circ C$

T_m teórica oligo Reverse gen *ABCB1*, polimorfismo C1236T:

5'-CCTGACTCACCACACCAATG-3'

- $T_m = 2(9) + 4(11) = 62^\circ C$

La T_m teórica calculada en el software en línea de *Applied Biosystems* fue:

Oligo Forward= 49.26°C

Oligo Reverse= 58.35°C

Por ello el gradiente de temperatura se estableció entre 55°C - 65°C, y se verificó en un gel de agarosa al 2% como se observa en la Figura 14.

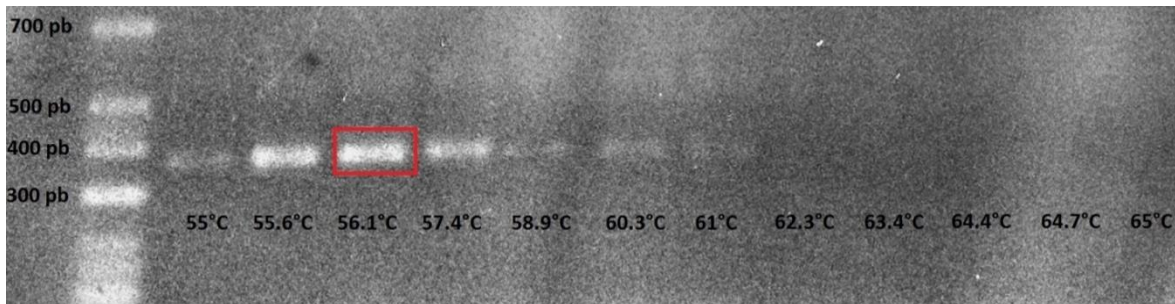


Figura 14. Gradiente de temperatura del polimorfismo C1236T del gen ABCB1. En el costado izquierdo de la figura puede observarse el marcador de peso molecular utilizado, debido a que el producto de PCR del polimorfismo C1236T del gen ABCB1 es de 370 pb, se seleccionó la temperatura a la cual se observó una banda muy bien definida cercana al marcador de 400 pb.

Una vez encontrada la T_m óptima de cada par de oligos para cada polimorfismo, fueron establecidas las condiciones de la PCR como se muestran en las Tablas 15-17.

Tabla 15. Condiciones de PCR gen ABCB1

	Fase	C3435T		C1236T		G2677T/A	
	Desnaturalización T° y T	95°C	1 min	95°C	2 min	95°C	2 min
40 ciclos	Desnaturalización T° y T	95°C	20 s	94°C	30 s	94°C	30 s
	Alineación T° y T	55°C	30 s	56.1°C	30 s	58.4°C	30 s
	Elongación T° y T	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	30 s
	Elongación final T° y T	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

Tabla 16. Condiciones de PCR gen CYP2C9

	Fase	CYP2C9*2		CYP2C9*3	
	Desnaturalización T° y T	95°C	5 min	95°C	5 min
35 ciclos	Desnaturalización T° y T	95°C	30 s	95°C	30 s
	Alineación T° y T	50.6°C	1 min	56°C	30 s
	Elongación T° y T	72°C	30 s	72°C	30 s
	Elongación final T° y T	72°C	7 min	72°C	7 min

Tabla 17. Condiciones de PCR gen CYP2C19

	Fase	CYP2C19*2		CYP2C19*3	
	Desnaturalización T° y T	94°C	10 min	94°C	10 min
35 ciclos	Desnaturalización T° y T	94°C	30 s	94°C	30 s
	Alineación T° y T	58.9°C	30 s	56°C	30 s
	Elongación T° y T	72°C	30 s	72°C	30 s
	Elongación final T° y T	72°C	5 min	72°C	5 min

Los productos de PCR de todos los polimorfismos a excepción del G/A2677T, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para verificar que los productos de PCR fueran los esperados se utilizó un marcador de peso molecular para poder identificar el peso de cada banda.

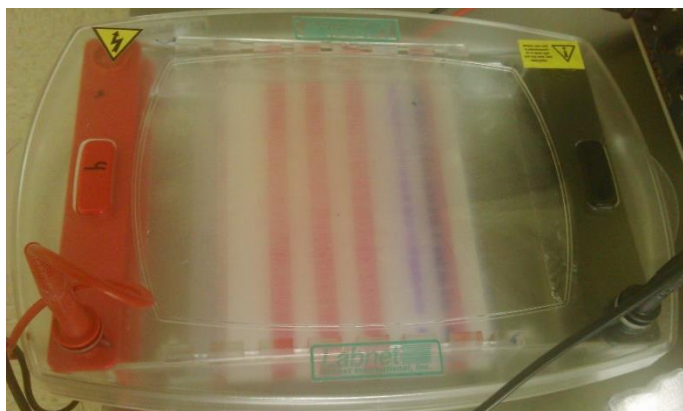


Figura 15. Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa.

5.7 Restricción enzimática

Las muestras amplificadas para los polimorfismos C1236T y C3435T del gen *ABCB1*; CYP2C9*2 y CYP2C9*3 del gen *CYP2C9* y CYP2C19*2 y CYP2C19*3 del gen *CYP2C19*, se sometieron a digestión con enzimas de restricción para conocer el genotipo de cada muestra a las condiciones que se observan en las Tablas 18-20.

Tabla 18. Reactivos y condiciones utilizados para la reacción de digestión de los polimorfismos del gen *ABCB1*

Reactivos	C3435T	C1236T
Producto de PCR	9 μ L	9 μ L
Enzima	2U <i>Mbol</i> 0.2 μ L	2U <i>HaeIII</i> 0.2 μ L
Buffer	1 μ L	1 μ L
H ₂ O	9.8 μ L	9.8 μ L
Volumen final	20 μ L	20 μ L
T y T° digestión	3 hrs/37°C	3 hrs/37°C

Tabla 19. Reactivos y condiciones utilizados para la reacción de digestión de los polimorfismos del gen *CYP2C9*

Reactivos	CYP2C9*2	CYP2C9*3
Producto de PCR	4 µL	9 µL
Enzima	2.5U <i>AvaII</i> 0.25 µL	2U <i>KpnI</i> 0.2 µL
Buffer	0.75 µL	1.5 µL
H ₂ O	2 µL	4.3 µL
Volumen final	7 µL	15 µL
T y T° digestión	16 hrs/37°C	3 hrs/37°C

Tabla 20. Reactivos y condiciones utilizados para la reacción de digestión de los polimorfismos del gen *CYP2C19*

Reactivos	CYP2C19*2	CYP2C19*3
Producto de PCR	9 µL	9 µL
Enzima	<i>SmaI</i> 0.2 µL	<i>BamHI</i> 0.2 µL
Buffer	1.5 µL	1.5 µL
H ₂ O	4.3 µL	4.3 µL
Volumen final	15 µL	15 µL
T y T° digestión	16 hrs/30°C	1.3 hrs/30°C

Una vez realizada la digestión, el producto de ésta (7, 15 o 20µL) se agregó más 5µL de buffer de carga en geles de acrilamida al 10%, al igual que un marcador de peso molecular conocido, de ésta forma se identificó el tamaño de las bandas que se generaban para cada polimorfismo, lo cual permitió la genotipificación de las muestras en estudio, las cámaras de electroforesis usadas para el corrimiento de estas muestras son similares a la que se muestra en la Figura 16. En las Tablas 21-23 se observan los fragmentos de restricción generados para cada polimorfismo que permitieron establecer el genotipo de cada muestra.

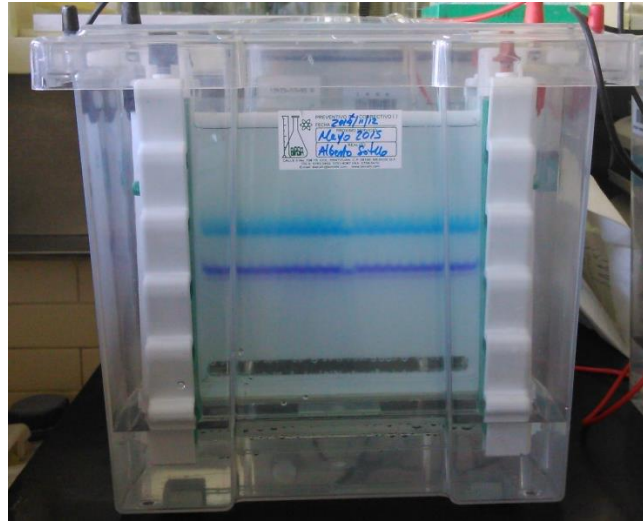


Figura 16. Cámara de electroforesis vertical para geles de acrilamida

Tabla 21. Enzimas de restricción y RFLPs generados para cada genotipo de los polimorfismos del gen *ABCB1*

Genotipos	C1236T	C3435T
Enzima de restricción	<i>HaeIII</i>	<i>MboI</i>
Secuencia de reconocimiento	5'-GG↓CC-3' 3'-CC↑GG-5'	5'-↓GATC-3' 3'-CTAG↑-3'
Producto de PCR	370 pb	197 pb
Homocigoto silvestre (wt/wt)	272+63+35 pb	158+39 pb
Heterocigoto (wt/m)	272+98+63+35 pb	197+158+39 pb
Homocigoto anormal (m/m)	272+98 pb	197 pb

Nota: wt: wild type; m: mutant.

Tabla 22. Enzimas de restricción y RFLPs generados para cada genotipo de los polimorfismos del gen *CYP2C9*

Genotipos	CYP2C9*2	CYP2C9*3
Enzima de restricción	<i>Avall</i>	<i>KpnI</i>
Secuencia de reconocimiento	5'-G↓GWCC-3' 3'-CCWG↑G-5'	5'-GGTAC↓C-3' 3'-C↑CATGG-5'
Producto de PCR	690 pb	165 pb
Homocigoto silvestre (wt/wt)	521+169 pb	165 pb
Heterocigoto (wt/m)	690+521+169 pb	165+135+30 pb
Homocigoto anormal (m/m)	690 pb	135+30 pb

Nota: wt: wild type; m: mutant.

Tabla 23. Enzimas de restricción y RFLPs generados para cada genotipo de los polimorfismos del gen *CYP2C19*

Genotipos	CYP2C19*2	CYP2C19*3
Enzima de restricción	<i>SmaI</i>	<i>BamHI</i>
Secuencia de reconocimiento	5'-CCC↓GGG-3'	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-5'
Producto de PCR	167 pb	233 pb
Homocigoto silvestre (wt/wt)	117+50 pb	135+98 pb
Heterocigoto (wt/m)	167+117+50 pb	233+135+98 pb
Homocigoto anormal (m/m)	167 pb	233 pb

Nota: wt: wild type; m: mutant.

5.8 Purificación del fragmento de PCR del polimorfismo G/T2677A del gen *ABCB1*

Debido a que este polimorfismo es trialélico se decidió determinar el genotipo de las muestras de estudio mediante secuenciación, para lo cual fue necesario realizar el corrimiento de las muestras en geles de agarosa al 1.5% agregando todo el producto de PCR (15µL) más 5µL de buffer de carga a 115 V, esto con la finalidad de revisar si las muestras amplificaron y poder cortar las bandas del amplificado para posteriormente purificar el DNA en ellas. El DNA contenido en las bandas de gel de agarosa se purificó usando el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* siguiendo el procedimiento que se muestra a continuación:

- Pesar las bandas de agarosa en tubos *ependorf* de 1.5 mL y agregar su equivalente en peso en µL del reactivo *Membrane binding solution* (por ejemplo: peso de la banda= 0.067 g, se agregan 67 µL de reactivo).
- Centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos.
- Colocar en baño seco los tubos para fundir la banda de agarosa a 55-60°C y mezclar perfectamente con ayuda del vórtex cuando la banda se haya fundido completamente.
- Depositar el contenido del tubo de 1.5 mL en la columna armada que se incluye en el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*; incubar por 1 minuto.
- Centrifugar a 13500 rpm por 4 minutos a 21°C.
- Decantar el contenido del tubo colector.
- Agregar 200 µL del reactivo *Membrane washing solution* y centrifugar a 13500 rpm por 4 minutos y decantar el contenido del tubo colector.
- Repetir el lavado con 150 µL de *Membrane washing solution* y centrifugar nuevamente a 13500 rpm por 4 minutos.
- Secar al vacío la columna armada por 7 minutos.
- Transferir la columna a un tubo *ependorf* nuevo de 1.5 mL y agregar 40 µL de *Nuclease-free water*, incubar 1 minuto y centrifugar a 13500 rpm por dos minutos.

El reactivo *Membrane binding solution* (isotiocianato de guanidina) es un agente caotrópico que se encarga de degradar proteínas e inhibir DNAsas que puedan dañar la integridad del DNA que se desea purificar, al mismo tiempo que permite que el DNA se una a la membrana contenida en la columna. Las centrifugaciones posteriores ayudan a remover el exceso de la solución y posteriormente, el lavado con el reactivo *Membrane washing solution* ayuda a remover oligonucleótidos, sales y dNTPs no incorporados dejando intacto el DNA absorbido en la membrana de la columna.

Después de purificar los productos de PCR contenidos en las bandas de agarosa, es necesario realizar otra electroforesis con 3 μL de purificado más 2 μL de buffer de carga en gel de agarosa al 1% para verificar que se ha recuperado DNA y poder proceder con la reacción de secuenciación.

5.9 Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó usando el kit comercial *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* de *Applied Biosystems* que está basado en una reacción de Sanger. Por medio de la reacción de secuenciación se determina el orden de los nucleótidos en una secuencia determinada de DNA y se basa en la incorporación de una mezcla de 2',3' didesoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados con un fluoróforo y dNTPs en una reacción de PCR. Durante esta reacción se replica sólo una de las cadenas de DNA molde y la incorporación de los ddNTPs resulta en cadenas de distintos tamaños al detenerse la elongación de la cadena por la falta del grupo -OH en la posición 3' de los ddNTPs. Cada ddNTP está marcado con un fluoróforo distinto, por lo que cada fragmento que termine con un ddNTP diferente emitirá fluorescencia a una longitud de onda distinta. Los reactivos usados para la reacción de secuenciación se encuentran en la Tabla 24.

Tabla 24. Reactivos usados en la reacción de secuenciación

Reactivo	Concentración	Volumen
Producto de PCR		1-3.5 μL
Oligo (Forward)	10 μM	1 μL
Buffer de secuenciación	5 X	3.5 μL
H ₂ O		11.5-13.5 μL
Big Dye		1 μL
Volumen total		20 μL

Los fragmentos obtenidos en esta reacción de secuenciación son sometidos a una electroforesis capilar que separará cada uno de estos fragmentos por su tamaño y la longitud de onda que emita el fluoróforo de los ddNTPs incorporados al final de cada fragmento será detectado e interpretado por el equipo de secuenciación dando como resultado un electroferograma con picos de distintos colores que representan a cada una de las bases que se encuentren en la secuencia de DNA. Las condiciones de la reacción de secuenciación se encuentran en la Tabla 25.

Tabla 25. Condiciones para la reacción de secuenciación

	Fase	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	96°C	30 s
40 ciclos	Desnaturalización	95°C	10 s
	Alineación	50°C	10 s
	Elongación	60°C	4 min
	Elongación final	72°C	1 min

5.10 Purificación de los productos de la reacción de secuenciación

Después de realizada la reacción de secuenciación se purificó la secuencia, lo cual se logró mediante el uso de columnas con *Sephadex*[®] que, al ser hidratado, forma una sílica, la cual retiene los reactivos sobrantes de la reacción y otras moléculas que pueden interferir en la lectura del secuenciador; luego de filtrar la secuencia en la columna, esta se llevó a sequedad por centrifugación al vacío y se resuspendió en formamida.

5.11 Secuenciación automatizada

Las muestras resuspendidas en formamida fueron cargadas en placas de 96 pozos y desnaturalizadas a 94°C por 5 minutos, posteriormente se dejaron enfriar hasta llegar a temperatura ambiente.

Las muestras fueron analizadas en el secuenciador automático *ABI Prism 3130 Sequencer* de *Applied Biosystems*.

5.12 Análisis de electroferogramas

Los electroferogramas obtenidos se analizaron empleando el software *Sequencing Analysis v.5.3* en búsqueda de variantes en el alelo G en la posición 2677 del gen *ABCB1*.

5.13 Análisis estadístico

Se calcularon frecuencias de genotipos y alelos en pacientes con EMJ y controles sanos. Se calculó el OR (odds ratio) y riesgo entre pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP mediante las pruebas de χ^2 y prueba exacta de Fisher con un intervalo de confianza calculado al 95% con el programa *IBM SPSS Statistics* versión 20. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Se realizó un análisis de haplotipos de los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T del gen *ABCB1* así como de los polimorfismos CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2 y CYP2C19*3 de los genes *CYP2C9* y *CYP2C19* mediante el software en línea *SNPstats* (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) para determinar la asociación con la respuesta al tratamiento con AVP.

5.14 Estudio del acoplamiento molecular (docking) de P-gp con el ácido valproico

Se realizó un análisis *in silico* sobre la interacción de la proteína P-gp y el AVP (docking) y éste se comparó con la interacción que P-gp presenta por uno de sus sustratos anteriormente caracterizado (fenitoína) y que además también es un fármaco usado en el tratamiento de EMJ.

5.14.1 Obtención de ligandos y estructuras

La estructura de los ligandos usados (AVP y fenitoína), se obtuvo en formato PDB de la base de datos DRUGBANK. El número de acceso para la estructura del AVP es DB00313 y para la fenitoína es DB00252.

Por otra parte, la estructura de la proteína de interés (P-gp) fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank (PDB) en formato PDB; el número de acceso para esta proteína es 3ZDQ.

5.14.2 Recursos usados para el docking

El docking se realizó en un software en línea con una licencia académica provisional. El software en línea está disponible en: <http://www.dockingserver.com/>. El análisis de los resultados obtenidos fueron analizados en el servidor ya mencionado.

6. Resultados

Se analizaron las muestras de 87 pacientes con EMJ bajo tratamiento con AVP; de los cuales 60 (69%) eran respondedores y 27 (31%) no respondedores. La distribución por género fue de 12 hombres y 15 mujeres, con una edad de inicio de la enfermedad promedio de 14 años y un intervalo de 6 a 18 años en pacientes no respondedores. En pacientes respondedores la distribución por género fue de 30 hombres y 30 mujeres, con una edad de inicio de la enfermedad promedio de 14 años y un intervalo de 6 a 27 años. Así mismo se estudiaron 200 controles sanos mestizo mexicanos, sin antecedentes de crisis convulsivas o enfermedades neurodegenerativas. La distribución por género fue de 71 hombres y 129 mujeres, con una edad promedio de 34 años y un intervalo de 17 a 67 años. Pacientes con EMJ y controles sanos firmaron carta de consentimiento informado.

6.1 Análisis de la integridad del DNA cromosómico

La integridad del DNA extraído de las muestras de pacientes con EMJ y controles sanos se analizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.5% en TBE al 0.5X las cuales fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. En la Figura 17 se observa la integridad de 6 muestras de DNA genómico extraído.

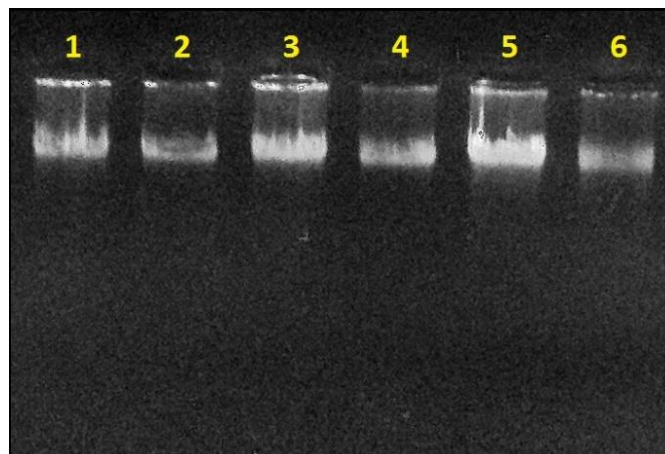


Figura 17. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.5% de la integridad del DNA genómico extraído de pacientes con EMJ y controles sanos. Puede observarse en las muestras 1 a 6 una banda bien definida que corresponde al DNA genómico.

6.2 Análisis de los fragmentos amplificados por PCR

Los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T del gen *ABCB1*; CYP2C9*2 y CYP2C9*3 del gen *CYP2C9*; y CYP2C19*2 y CYP2C19*3 del gen *CYP2C19* fueron amplificados por PCR en pacientes con EMJ y en muestras de controles. Los fragmentos amplificados a excepción del polimorfismo G2677T/A del gen *ABCB1*, fueron verificados en geles de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5X colocando 3µL de muestra, mientras que para el polimorfismo G2677T/A se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% colocando toda la muestra (Figura 18).

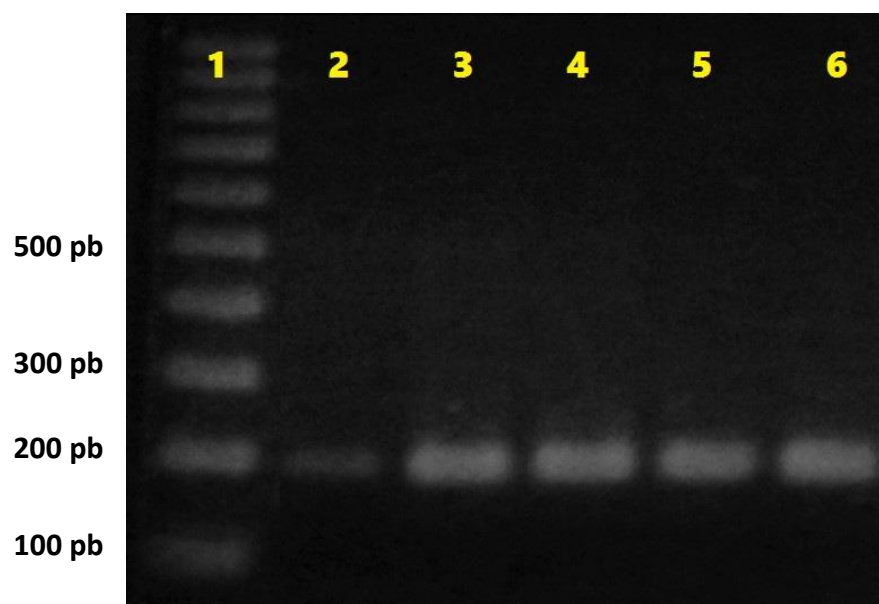


Figura 18. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% del fragmento amplificado por PCR para el análisis del polimorfismo G2677T/A del gen *ABCB1* de pacientes con EMJ y controles sanos. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular y en los carriles 2,3,4,5,6 las muestras amplificadas con un peso de 221 pb.

6.3 Análisis del fragmento de PCR purificado del polimorfismo G2677T/A

Los fragmentos de PCR purificados mediante el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* fueron analizados en geles de agarosa al 1% (Figura 19).

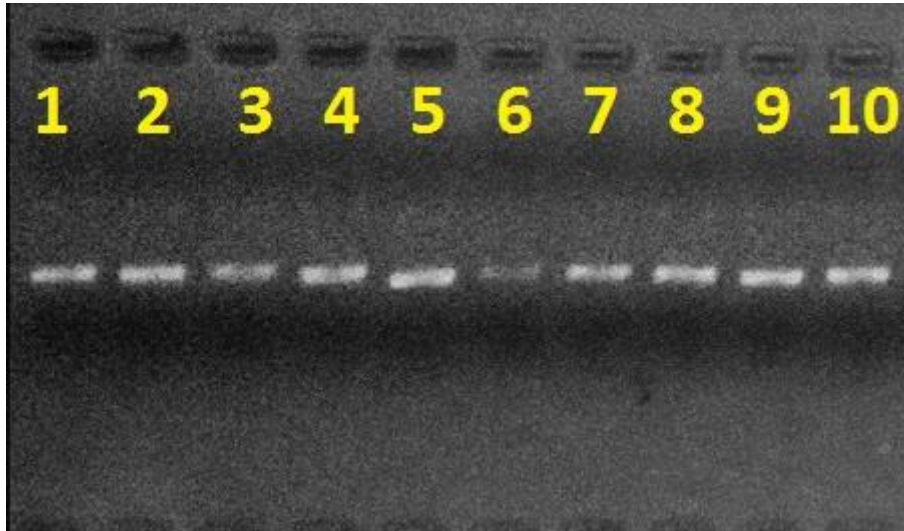


Figura 19. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% del fragmento de PCR purificado para el análisis del polimorfismo G2677T/A del gen *ABCB1* de pacientes con EMJ y controles sanos. En las muestras 1 a 10, se observa una banda bien definida que corresponde al fragmento de PCR purificado del polimorfismo G2677T/A.

6.4 Genotipificación de los polimorfismos C1236T y C3435T del gen *ABCB1*

En las Figuras 20 y 21 se observan los geles de acrilamida al 10% en los que se realizó la electroforesis de las muestras digeridas con la enzima de restricción *HaeIII* y *MboI* para la identificación de los polimorfismos C1236T y C3435T respectivamente del gen *ABCB1*. En el caso del polimorfismo C1236T la enzima *HaeIII* en el alelo normal reconoce dos sitios de corte y por ello se observan 3 bandas para el genotipo CC, mientras que en presencia del alelo mutado (T), la enzima sólo reconoce un sitio de corte generando dos fragmentos como se observa en la Figura 20.

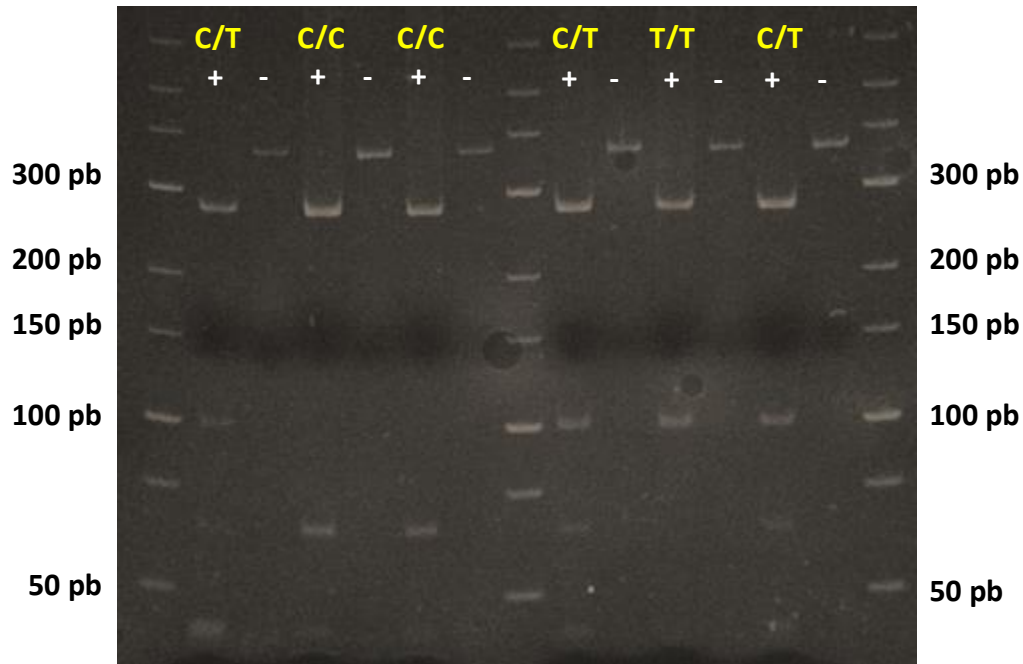


Figura 20. Gel de poliacrilamida al 10% donde se observan los genotipos encontrados en pacientes con EMJ y controles para el polimorfismo C1236T del gen ABCB1. Las muestras marcadas con el signo (+) se sometieron a digestión con la enzima HaeIII, las muestras con el signo (-) son los productos de PCR que no se sometieron a digestión.

En lo que respecta al polimorfismo C3435T, en presencia del alelo normal la enzima *MboI* reconoce el sitio de restricción cortando el fragmento amplificado, de esta manera se generan dos bandas, una de 158 pb y otra de 39 pb, en el gel de acrilamida al 10% se puede observar una banda cercana al marcador de 150 pb y otra en la parte inferior del gel, las cuales corresponden a las ya mencionadas para el genotipo C/C; para el alelo mutado se pierde el sitio de restricción por lo cual la enzima no corta y se observa una banda de 197 pb. Para los genotipos heterocigotos se observan 3 bandas de 197, 159 y 39 pb (Figura 21).

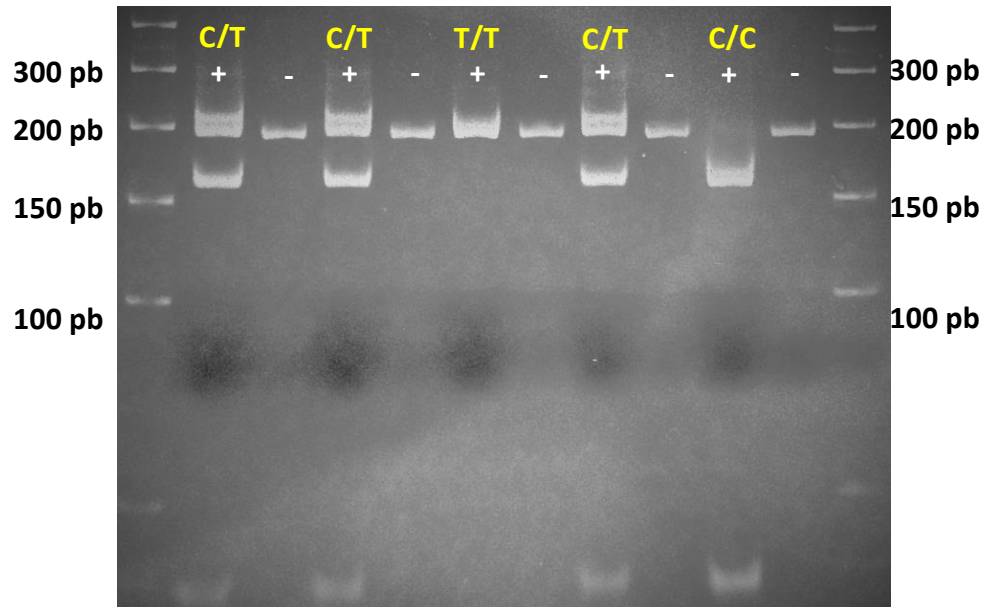


Figura 21. Gel de poliacrilamida al 10% donde se observan los genotipos encontrados en pacientes con EMJ y controles para el polimorfismo C3435T del gen *ABCB1*. Las muestras marcadas con el signo (+) se sometieron a digestión con la enzima *MboI*, las muestras con el signo (-) son los productos de PCR que no se sometieron a digestión.

6.5 Genotipificación del polimorfismo G2677T/A del gen *ABCB1*

Para determinar los genotipos de este polimorfismo se realizó la lectura de los electroferogramas en el software *Sequencing Analysis v.5.3* en el que se observa la secuencia del fragmento de interés y cada base es representada por un pico de diferente color. En la Figura 22 pueden observarse los 5 genotipos encontrados.

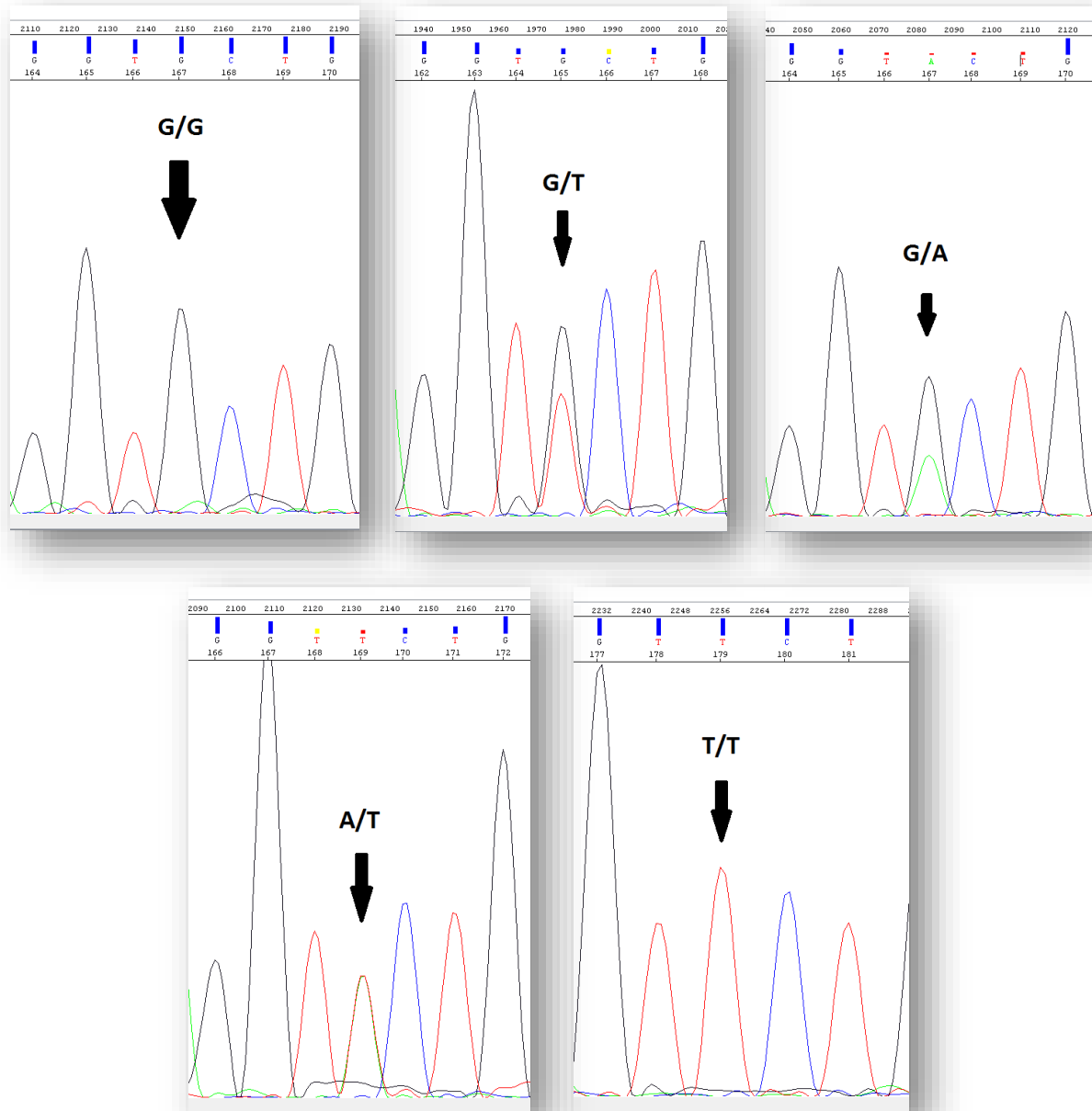


Figura 22. Electroferogramas de los genotipos encontrados en pacientes con EMJ y controles para el polimorfismo G2677T/A del gen ABCB1. Debido a que este polimorfismo es trialélico, es posible encontrar 6 genotipos, sin embargo, en este estudio sólo se encontraron 5 de los 6 genotipos existentes.

6.6 Genotipificación de los polimorfismos CYP2C9*2 y CYP2C9*3 del gen CYP2C9

Para el polimorfismo CYP2C9*2, la enzima *Avall* reconoce el sitio de corte en presencia del alelo normal (C) y se generan dos bandas, mientras que cuando se encuentra el alelo mutado (T) se elimina el sitio de corte de la enzima y sólo se observa una banda (Figura 23).

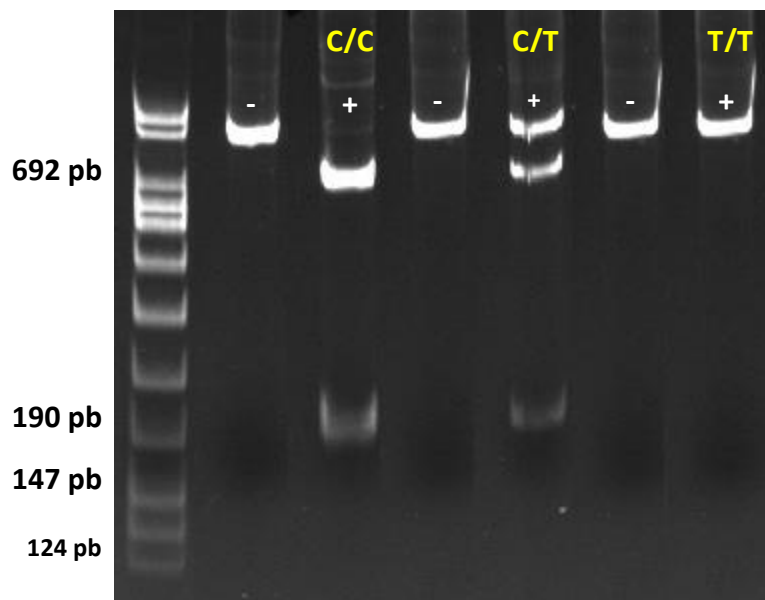


Figura 23. Electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% de los genotipos encontrados en los pacientes con EMJ y controles sanos para el polimorfismo CYP2C9*2 del gen CYP2C9. Las muestras marcadas con el signo (+) se sometieron a digestión con la enzima *Avall*, las muestras con el signo (-) son los productos de PCR que no se sometieron a digestión.

En el caso del polimorfismo CYP2C9*3, el oligonucleótido Forward usado para la amplificación del fragmento de interés genera el cambio de un nucleótido (mutación puntual) para que en presencia del alelo mutado (C) la enzima *KpnI* reconozca la secuencia y realice el corte, generando dos fragmentos, mientras que en presencia del alelo normal (A) el sitio de corte desaparece y se observa sólo un fragmento (Figura 24).

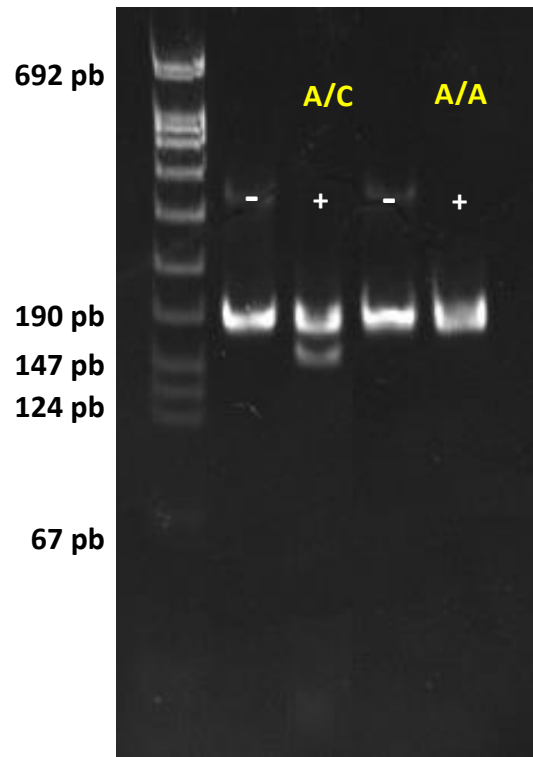


Figura 24. Electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% de los genotipos encontrados en los pacientes con EMJ y controles sanos para el polimorfismo CYP2C9*3 del gen CYP2C9. Las muestras marcadas con el signo (+) se sometieron a digestión con la enzima KpnI, las muestras con el signo (-) son los productos de PCR que no se sometieron a digestión. Para este polimorfismo no fue encontrado el genotipo C/C.

6.7 Genotipificación de los polimorfismos CYP2C19*2 y CYP2C19*3 del gen CYP2C19

Para conocer el genotipo de estos polimorfismos en las muestras estudiadas, se usaron las enzimas de restricción *SmaI* (para el polimorfismo CYP2C19*2) y *BamHI* (para el polimorfismo CYP2C19*3). Ambas enzimas reconocían el sitio de corte en presencia del alelo normal (G) y de esta forma se observaban dos bandas en el gel de acrilamida,

mientras que en presencia del alelo mutado (A) el sitio de corte se perdía y sólo se observaba una banda (Figuras 25 y 26).

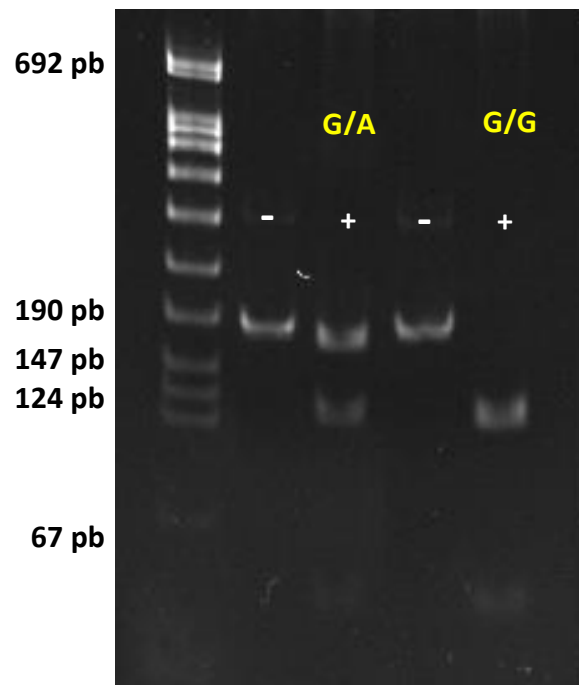


Figura 25. Electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% de los genotipos encontrados en los pacientes con EMJ y controles sanos para el polimorfismo CYP2C19*2 del gen CYP2C19. Las muestras marcadas con el signo (+) se sometieron a digestión con la enzima *Sma*I, las muestras con el signo (-) son los productos de PCR que no se sometieron a digestión.

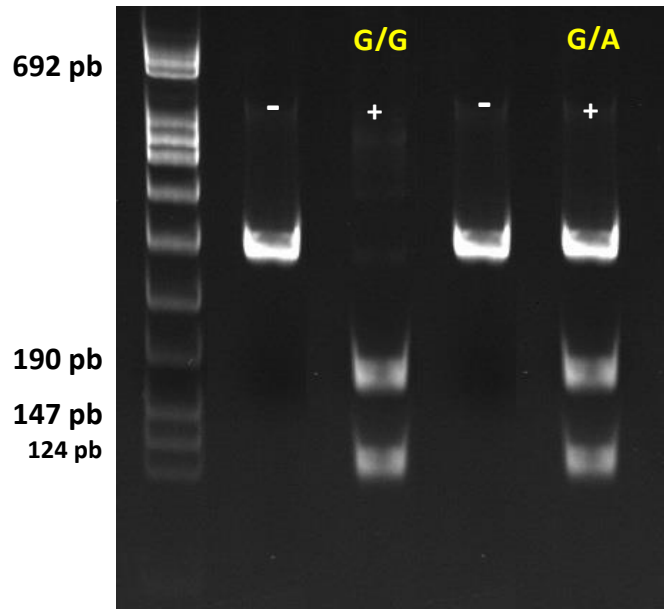


Figura 26. Gel de acrilamida que muestra los genotipos encontrados en pacientes con EMJ y controles para el polimorfismo CYP2C19*3 del gen CYP2C19. Las muestras marcadas con el signo (+) se sometieron a digestión con la enzima BamHI, las muestras con el signo (-) son los productos de PCR que no se sometieron a digestión.

6.8 Frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con EMJ y controles

En la Tabla 26 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de los tres polimorfismos estudiados del gen *ABCB1* en pacientes con EMJ y controles sanos. Las frecuencias genotípicas en controles sanos no mostraron desviaciones significativas para el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en los polimorfismos C1236T y C3435T con valores de p de 0.3 y 0.12 respectivamente. En pacientes con EMJ, de igual forma, el valor de p fue de 0.83 para el EHW del polimorfismo C3435T, sin embargo, en el polimorfismo C1236T se encontró un valor de p menor a 0.0001 para el EHW.

Tabla 26. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen ABCB1 (C1236T, G2677T/A y C3435T) en pacientes con EMJ y controles

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes con EMJ n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
C1236T			TT vs CC+CT		
CC	30 (34.5)	36 (18)	0.523	1.019	0.606-1.712
CT	24 (27.6)	89 (44.5)	CC vs CT + TT		
TT	33 (37.9)	75 (37.5)	0.002	2.398	1.355-4.242
C	84 (48)	161 (40)	C vs T		
T	90 (52)	239 (60)	0.045	1.386	0.968-1.982
G2677T/A			TT vs GG + GT + GA + AT + AA		
GG	64 (73.6)	41 (20.5)	0.038	0.475	0.233-0.97
GT	7 (8)	86 (43)	GG vs GT + GA + TT + AT + AA		
TT	11 (12.6)	46 (23)	1X10E-7	10.59	5.883-19.05
GA	4 (4.6)	13 (6.5)	GG vs GT + TT		
AT	1 (1.1)	11 (5.5)	1X10E-7	11.45	6.1-21.48
AA	-	-	GG vs AG + AA		
G	139 (80)	181 (46)	0.004	5.073	1.548-16.63
T	30 (17)	189 (48)	GG vs AT		
A	5 (3)	24 (6)	5.39X10E-4	17.17	2.136-138
			G vs T + A		
			1X10E-7	4.674	3.07-7.115
			T vs G + A		
			1X10E-7	0.226	0.145-0.350
			G vs T		
			1X10E-7	4.838	3.103-7.543
			G vs A		

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes con EMJ n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
			4.04X10E-3	3.686	1.372-9.905
				T vs G	
			1X10E-7	0.206	0.132-0.322
				T vs A	
			0.389	0.761	0.269-2.15
				A vs G	
			4.04X10E-3	0.271	0.101-0.729
				A vs T	
			0.389	1.313	0.465-3.704
C3435T			TT vs CT + CC		
CC	25 (28.7)	39 (19.5)	0.224	0.748	0.403-1.392
CT	45 (51.7)	112 (56)	CC vs CT + TT		
TT	17 (19.5)	49 (24.5)	0.059	1.665	0.930-2.977
C	95 (55)	190 (48)	C vs T		
T	79 (45)	210 (52)	0.070	1.329	0.929-1.9

Nota: continuación de la Tabla 26.

En la tabla 27 se observan las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos CYP2C9*2 y CYP2C9*3 del gen *CYP2C9* en pacientes con EMJ y controles sanos. Las frecuencias genotípicas de los dos SNPs se encontraron en EHW para ambos grupos, con valores de p de 0.1 y 0.6 para el alelo CYP2C9*2 en pacientes y controles respectivamente. Mientras que para el polimorfismo CYP2C9*3 los valores de p fueron de 1 en casos y controles.

Tabla 27. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen *CYP2C9* (*CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*) en pacientes con EMJ y controles

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes con EMJ n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
CYP2C9*2			TT vs CT+CC		
CC	68 (78.2)	172 (86)	0.027	3.410	2.846-4.086
CT	15 (17.2)	28 (14)	CC vs CT + TT		
TT	3 (3.4)	-	0.100	0.615	0.319-1.184
C	151 (88)	372 (93)	T vs C		
T	21 (12)	28 (7)	0.032	1.848	1.018-3.355
CYP2C9*3			AA vs AC		
AA	81 (93.1)	184 (92)	0.478	1.174	0.443-3.109
AC	6 (6.9)	16 (8)	AC vs AA		
CC	-	-	0.478	0.851	0.321-2.256
A	168 (97)	384 (96)	C vs A		
C	6 (3)	16 (4)	0.479	0.857	0.329-2.229

En la tabla 28 se observan las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *CYP2C19*2* y *CYP2C19*3* del gen *CYP2C19* en pacientes con EMJ y controles sanos. Para el polimorfismo *CYP2C19*2* se obtuvieron valores de p de 0.2 y 1 para el EHW en pacientes y controles, respectivamente. Mientras que para el polimorfismo *CYP2C19*3* se obtuvo un valor estadísticamente significativo para el EHW en el grupo de pacientes, con un valor de p de 0.018, mientras que en controles el valor de p fue de 1.

Tabla 28. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen CYP2C19 (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) en pacientes con EMJ y controles

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes con EMJ n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
CYP2C19*2			GG vs GA		
GG	61 (70.1)	175 (87.5)	5.25X10E-4	0.335	0.18-0.624
GA	26 (29.9)	25 (12.5)	GA vs GG		
AA	-	-	5.25X10E-4	2.984	1.603-5.555
G	148 (85)	375 (94)	A vs G		
A	26 (15)	25 (6)	9.77X10E-4	2.635	1.474-4.711
CYP2C19*3			GG vs GA		
GG	52 (59.8)	199 (99.5)	1X10E-7	0.007	9.99X10E-4- 5.57X10E-2
GA	35 (40.2)	1 (0.5)	GA vs GG		
AA	-	-	1X10E-7	133.9	17.93-1001
G	139 (80)	399 (100)	A vs G		
A	35 (20)	1 (0)	1X10E-7	100.5	13.64, 740.1

6.9 Frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

Tabla 29. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen ABCB1 (C1236T, G2677T/A y C3435T) en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes no respondedores n(%)	Pacientes respondedores n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
C1236T			TT vs CT + CC		
CC	8 (29.6)	22 (36.7)	0.364	0.750	0.289-1.944
CT	10 (37)	14 (23.3)	CC vs CT + TT		
TT	9 (33.3)	24 (40)	0.349	0.727	0.273-1.935
C	31 (57)	53 (44)	C vs T		
T	23 (43)	67 (56)	0.073	1.704	0.890-3.259
G2677T/A			TT vs GA + GG + GT + TA		
GG	21 (77.8)	43 (71.7)	0.491	0.453	0.091-2.257
GT	1 (3.7)	6 (10)	GG vs TT + GA + GT + TA		
TT	2 (7.4)	9 (15)	0.374	1.384	0.476-4.022
GA	2 (7.4)	2 (3.3)	GG vs GT + TT		
TA	1 (3.7)	-	0.149	2.442	0.636-9.371
AA	-	-	GG vs AG + AA		
G	44 (81)	95 (79)	0.416	0.488	0.064-3.711
T	8 (15)	22 (18)	G vs T + A		
A	2 (4)	3 (2)	0.447	1.158	0.512-2.618
			T vs G + A		
			0.369	0.774	0.320-1.871
			G vs T		

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes no respondedores n(%)	Pacientes respondedores n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
			0.381	1.274	0.525-3.085
				G vs A	
			0.513	0.694	0.112-4.307
				T vs G	
			0.381	0.785	0.324-1.902
				T vs A	
			0.446	0.545	0.076-3.886
				A vs G	
			0.513	1.439	0.232-8.923
				A vs T	
			0.446	1.833	0.257-13.06
C3435T				TT vs CT + CC	
CC	7 (25.9)	18 (30)	0.149	0.410	0.107-1.57
CT	17 (63)	28 (46.7)		CC vs CT + TT	
TT	3 (11.1)	14 (23.3)	0.453	0.816	0.293-2.271
C	30 (56)	65 (54)		C vs T	
T	24 (44)	55 (46)	0.498	1.058	0.554-2.017

Nota: continuación de la Tabla 29.

Tabla 30. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen CYP2C9 (CYP2C9*2 y CYP2C9*3) en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes no respondedores n(%)	Pacientes respondedores n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
CYP2C9*2			TT vs CT + CC		
CC	22 (81.5)	46 (76.7)	0.549	1.482	1.276-1.721
CT	5 (18.5)	10 (16.7)	CC vs CT + TT		
TT	-	3 (5)	0.474	1.243	0.393-3.926
C	50 (93)	101 (86)	T vs C		
T	4 (7)	17 (14)	0.146	0.475	0.151-1.487
CYP2C9*3			AA vs AC		
AA	26 (96.3)	55 (91.7)	0.391	2.364	0.262-21.27
AC	1 (3.7)	5 (8.3)	AC vs AA		
CC	-	-	0.391	0.423	0.047-3.807
A	52 (96)	116 (97)	C vs A		
C	2 (4)	4 (3)	0.605	1.115	0.198-6.282

Tabla 31. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen CYP2C19 (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes no respondedores n(%)	Pacientes respondedores n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
CYP2C19*2				GG vs GA	
GG	17 (63)	44 (73.3)	0.232	0.618	0.234-1.628
GA	10 (37)	16 (26.7)		GA vs GG	
AA	-	-	0.232	1.618	0.614-4.26
G	46 (85)	102 (85)		A vs G	
A	8 (15)	18 (15)	0.586	0.985	0.399-2.43
CYP2C19*3				GG vs GA	
GG	17 (63)	35 (58.3)	0.434	1.214	0.476-3.092
GA	10 (37)	25 (41.7)		GA vs GG	
AA	-	-	0.434	0.823	0.323-2.097
G	45 (83)	94 (78)		A vs G	
A	9 (17)	26 (22)	0.292	0.723	0.313, 1.67

6.10 Frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles

Tabla 32. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen ABCB1 (C1236T, G2677T/A y C3435T), en pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles

SNP (genotipo /alelo)	Pacientes respondedores n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
C1236T			CC vs TT + CT		
CC	22 (36.7)	36 (18)	0.172	0.726	0.408-1.293
CT	14 (23.3)	89 (44.5)	TT vs CC + CT		
TT	24 (40)	75 (37.5)	0.419	1.111	0.615-2.005
C	53 (44)	161 (40)	C vs T		
T	67 (56)	239 (60)	0.254	1.174	0.777-1.773
G2677T/A			TT vs GA + GG + GT + TA		
GG	43 (71.7)	41 (20.5)	0.113	0.579	0.265-1.266
GT	6 (10)	86 (43)	GG vs TT + GA + GT + TA		
TT	9 (15)	46 (23)	1X10E-7	9.624	4.982-18.59
GA	2 (3.3)	13 (6.5)	GG vs GT + TT		
AT	-	11 (5.5)	1X10E-7	9.229	4.656-18.29
AA	-	-	GG vs AG + AA		
G	95 (79)	181 (46)	0.005	6.817	1.449-32.08
T	22 (18)	189 (48)	G vs T + A		
A	3 (2)	24 (6)	1X10E-7	4.472	2.759-7.249
			G vs T + A		
			1X10E-7	0.243	0.147-0.402
			G vs T		
			1X10E-7	4.509	2.717-7.483

SNP (genotipo /alelo)	Pacientes respondedores n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
			G vs A		
			0.008	4.199	1.233-14.3
				T vs G	
			1X10E-7	0.221	0.133-0.368
				T vs A	
			0.561	0.931	0.259-3.345
				A vs G	
			0.006	0.2382	0.069-0.811
				A vs T	
			0.456	1.074	0.298-3.858
C3435T			CC vs CT + TT		
CC	18 (30)	39 (19.5)	0.063	1.769	0.920-3.401
CT	28 (46.7)	112 (56)	TT vs CT + TT		
TT	14 (23.3)	49 (24.5)	0.501	0.937	0.475-1.85
C	65 (54)	190 (48)	C vs T		
T	55 (46)	210 (52)	0.119	1.306	0.867-1.967

Nota: continuación de la Tabla 32.

Tabla 33. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen CYP2C9 (CYP2C9*2 y CYP2C9*3) en pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles

SNP (genotipo /alelo)	Pacientes respondedores n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
CYP2C9*2			CC vs TT + CT		
CC	46 (76.7)	172 (86)	0.048	0.495	0.238-1.03
CT	10 (16.7)	28 (14)	T vs C		
TT	3 (5)	-	0.012	2.236	1.177-4.247
C	101 (86)	372 (93)			
T	17 (14)	28 (7)			
CYP2C9*3			AA vs AC		
AA	55 (91.7)	184 (92)	0.557	0.956	0.335- 2.729
AC	5 (8.3)	16 (8)	AC vs AA		
CC	-	-	0.557	1.045	0.366-2.983
A	116 (97)	384 (96)	C vs A		
C	4 (3)	16 (4)	0.493	0.827	0.271-2.524

Tabla 34. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen CYP2C19 (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) en pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles

SNP (genotipo/ alelo)	Pacientes respondedores n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
CYP2C19*2			GG vs GA		
GG	44 (73.3)	175 (87.5)	0.009	0.392	0.193-0.798
GA	16 (26.7)	25 (12.5)	GA vs GG		
AA	-	-	0.009	2.545	1.252-5.173
G	102 (85)	375 (94)	A vs G		
A	18 (15)	25 (6)	0.003	2.647	1.39-5.041
CYP2C19*3			GG vs GA		
GG	35 (58.3)	199 (99.5)	1X10E-7	0.007	9.2XE-4-0.0536
GA	25 (41.7)	1 (0.5)	GA vs GG		
AA	-	-	1X10E-7	142.1	18.66-108
G	94 (78)	399 (100)	A vs G		
A	26 (22)	1 (0)	1X10E-7	110.4	14.79, 823.5

6.11 Frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con EMJ no respondedores al tratamiento con AVP y controles

Tabla 35. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen ABCB1 (C1236T, G2677T/A y C3435T), en pacientes con EMJ no respondedores al tratamiento con AVP y controles

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes no respondedores n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
C1236T			CC vs CT + TT		
CC	8 (29.6)	36 (18)	0.121	1.918	0.778-4.724
CT	10 (37)	89 (44.5)	TT vs CT + CC		
TT	9 (33.3)	75 (37.5)	0.423	0.833	0.356-1.949
C	31 (57)	161 (40)	C vs T		
T	23 (43)	239 (60)	0.012	2.001	1.126-3.556
G2677T/A			TT vs GA + GG + GT + TA		
GG	21 (77.8)	41 (20.5)	0.041	0.262	0.059-1.151
GT	1 (3.7)	86 (43)	GG vs TT + GA + GT + TA		
TT	2 (7.4)	46 (23)	1X10E-7	13.32	5.047-35.14
GA	2 (7.4)	13 (6.5)	GG vs GT + TT		
AT	1 (3.7)	11 (5.5)	1X10E-7	22.54	6.397-79.4
AA	-	-	GG vs AG + AA		
G	44 (81)	181 (46)	0.060	3.329	0.686-16.14
T	8 (15)	189 (48)		GG vs AT	
A	2 (4)	24 (6)	0.069	5.634	0.680-46.63
			G vs T + A		
			4.76X10E-7	5.178	2.534-10.58

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes no respondedores n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
			T vs G + A		
			1.40X10E-6	0.188	0.086-0.41
				G vs T	
			4.95X10E-7	5.743	2.632-12.53
				G vs A	
			0.107	2.917	0.664-12.81
				T vs G	
			4.95X10E-7	0.174	0.079-0.38
				T vs A	
			0.328	0.507	0.101-2.532
				A vs G	
			0.069	0.342	0.078-1.505
				A vs T	
			0.328	1.969	0.394-9.815
C3435T			CC vs CT + TT		
CC	7 (25.9)	39 (19.5)	0.290	1.445	0.570-3.659
CT	17 (63)	112 (56)	TT vs CT + CC		
TT	3 (11.1)	49 (24.5)	0.089	0.385	0.111-1.335
C	30 (56)	190 (48)	C vs T		
T	24 (44)	210 (52)	0.166	1.382	0.780-2.447

Nota: continuación de la Tabla 35.

Tabla 36. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen CYP2C9 (CYP2C9*2 y CYP2C9*3) en pacientes con EMJ no respondedores al tratamiento con AVP y controles

SNP (genotipo/alelo)	Pacientes no respondedores n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
CYP2C9*2			CC vs CT		
CC	22 (81.5)	172 (86)	0.351	0.716	0.250-2.047
CT	5 (18.5)	28 (14)	CT vs CC		
TT	-	-	0.351	1.396	0.488-3.989
C	50 (93)	372 (93)	T vs C		
T	4 (7)	28 (7)	0.543	1.063	0.357-3.156
CYP2C9*3			AA vs AC		
AA	26 (96.3)	184 (92)	0.372	2.261	0.287-17.76
AC	1 (3.7)	16 (8)	AC vs AA		
CC	-	-	0.372	0.442	0.056-3.475
A	52 (96)	384 (96)	C vs A		
C	2 (4)	16 (4)	0.636	0.923	0.206-4.129

Tabla 37. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs del gen CYP2C19 (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) en pacientes con EMJ no respondedores al tratamiento con AVP y controles

SNP (genotipo/ alelo)	Pacientes no respondedores n(%)	Grupo control n(%)	Valor de p	OR	IC 95%
CYP2C19*2			GG vs GA		
GG	17 (63)	175 (87.5)	0.002	0.242	0.100-0.589
GA	10 (37)	25 (12.5)	GA vs GG		
AA	-	-	0.002	4.118	1.697-9.991
G	46 (85)	375 (94)	A vs G		
A	8 (15)	25 (6)	0.039	2.449	1.047-5.729
CYP2C19*3			GG vs GA		
GG	17 (63)	199 (99.5)	1X10E-7	0.008	0.001-0.070
GA	10 (37)	1 (0.5)	GA vs GG		
AA	-	-	1X10E-7	117.1	14.13-969.7
G	45 (83)	399 (100)	A vs G		
A	9 (17)	1 (0)	1X10E-7	79.8	9.883-644.4

6.12 Frecuencias y asociación de haplotipos del gen *ABCB1* de pacientes con EMJ y controles

Tabla 38. Frecuencias de haplotipos del gen *ABCB1* en pacientes con EMJ y controles sanos

SNP			Frecuencia de haplotipos	
C1236T	G2677T/A	C3435T	Pacientes con EMJ	Grupo control
T	T	T	0.0915	0.393
C	G	C	0.240	0.261
T	G	C	0.250	0.099
C	G	T	0.175	0.071
T	G	T	0.132	0.025
T	T	C	0.023	0.074
C	A	C	0.009	0.021
C	A	T	NA	0.034
C	T	T	0.035	0
C	T	C	0.022	0.013
T	A	C	0	0.004
T	A	T	0.019	NA

Tabla 39. Asociación de haplotipos del gen ABCB1 entre pacientes con EMJ y controles sanos

SNP			Frecuencia de haplotipos		OR (IC 95%)	Valor de p
C1236T	G2677T/A	C3435T	Pacientes con EMJ	Grupo control		
T	T	T	0.091	0.393	1	-
C	G	C	0.240	0.261	0.26 (0.13 - 0.52)	1X10E-04
T	G	C	0.250	0.099	0.12 (0.06 - 0.28)	1X10E-04
C	G	T	0.175	0.071	0.15 (0.07 - 0.31)	1X10E-04
T	G	T	0.132	0.071	0.07 (0.02 - 0.21)	1X10E-04
T	T	C	0.023	0.074	0.91 (0.21 - 3.87)	0.89
T	A	C	0	0.004	-	-
T	A	T	0.019	NA	-	-

6.13 Frecuencias y asociación de haplotipos de los genes *CYP2C9* y *CYP2C19* de pacientes con EMJ y controles

Tabla 40. Frecuencias de haplotipos de los genes *CYP2C9* y *CYP2C19* en pacientes con EMJ y controles sanos

SNP				Frecuencia de haplotipos	
CYP2C9*2	CYP2C9*3	CYP2C19*2	CYP2C19*3	Pacientes con EMJ	Grupo control
C	A	G	G	0.621	0.833
T	A	G	G	0.082	0.066
C	A	A	G	0.071	0.054
C	C	G	G	0.019	0.034
C	A	G	A	0.075	0.002
C	A	A	A	0.074	NA
T	A	G	A	0.036	NA
C	C	G	A	0.014	NA
T	A	A	G	0.003	0.003
C	C	A	G	NA	0.005
T	A	A	A	0	NA
T	C	G	G	NA	0

Tabla 41. Asociación de haplotipos de los genes CYP2C9 y CYP2C19 entre pacientes con EMJ y controles sanos

SNP				Frecuencia de haplotipos		OR (IC 95%)	Valor de p
CYP2C9 *2	CYP2C9 *3	CYP2C19 *2	CYP2C19 *3	Pacientes con EMJ	Grupo control		
C	A	G	G	0.621	0.833	1	---
T	A	G	G	0.082	0.066	0.66 (0.31 - 1.42)	0.29
C	A	A	G	0.071	0.054	0.56 (0.24 - 1.28)	0.17
C	C	G	G	0.019	0.034	1.33 (0.37 - 4.69)	0.66
C	A	G	A	0.075	0.002	0.02 (0.00 - 0.15)	2.00E-04
C	A	A	A	0.074	NA	0.00 (-Inf - Inf)	1
T	A	G	A	0.036	NA		

6.14 Frecuencias y asociación de haplotipos del gen *ABCB1* en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

Tabla 42. Frecuencias de haplotipos del gen *ABCB1* en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

SNP			Frecuencia de haplotipos	
C1236T	G2677T/A	C3435T	No respondedores	Respondedores
T	G	C	0.145	0.270
C	G	C	0.332	0.210
C	G	T	0.130	0.187
T	G	T	0.206	0.123
T	T	T	0.037	0.115
C	T	T	0.070	0.023
T	T	C	NA	0.041
C	T	C	0.040	0.003
T	A	T	0	0.008
C	A	C	NA	0.016
T	A	C	0.037	0

Tabla 43. Asociación de haplotipos del gen ABCB1 entre pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

SNP			Frecuencia de haplotipos		OR (IC 95%)	Valor de p
C1236T	G2677T/A	C3435T	No respondedores	Respondedores		
T	G	C	0.145	0.270	1	-
C	G	C	0.332	0.210	0.95 (0.08 - 11.91)	0.97
C	G	T	0.130	0.187	2.73 (0.31 - 23.76)	0.37
T	G	T	0.206	0.123	1.91 (0.07 - 51.56)	0.7
T	T	T	0.037	0.115	4.13 (0.42 - 40.05)	0.23
C	T	T	0.070	0.023		
C	A	C	NA	0.016		
T	A	C	0.037	0		

6.15 Frecuencias y asociación de haplotipos del gen *ABCB1* de pacientes con EMJ y controles

Tabla 44. Frecuencias de haplotipos de los genes *CYP2C9* y *CYP2C19* en pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

SNP				Frecuencia de haplotipos	
CYP2C9*2	CYP2C9*3	CYP2C19*2	CYP2C19*3	No respondedores	Respondedores
C	A	G	G	0.683	0.605
T	A	G	G	0.044	0.090
C	A	G	A	0.086	0.067
C	A	A	A	0.050	0.081
C	A	A	G	0.067	0.068
T	A	G	A	NA	0.053
C	C	G	G	0.021	0.018
C	C	G	A	0.015	0.014
T	A	A	G	0.016	0
T	A	A	A	0.013	NA

Tabla 45. Asociación de haplotipos de los genes CYP2C9 y CYP2C19 entre pacientes con EMJ respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP

SNP				Frecuencia de haplotipos		OR (IC 95%)	Valor de p
CYP2C9 *2	CYP2C9 *3	CYP2C19 *2	CYP2C19 *3	No respondedores	Respondedores		
C	A	G	G	0.683	0.605	1	-
T	A	G	G	0.044	0.090	2.02 (0.40 - 10.16)	0.39
C	A	A	A	0.086	0.067	1.08 (0.15 - 7.65)	0.94
C	A	G	A	0.050	0.081	0.54 (0.05 - 5.88)	0.61
C	A	A	G	0.067	0.068	1.33 (0.17 - 10.28)	0.79
T	A	G	A	NA	0.053	Inf (-Inf - Inf)	1
T	A	A	G	0.016	0		
T	A	A	A	0.013	NA		

6.16 Acoplamiento molecular (docking) de P-gp con la fenitoína y el AVP

La estructura de la fenitoína se muestra en el anexo 2, los resultados del docking con P-gp son mostrados en la tabla 46, además en la Figura 27 se observa gráficamente la interacción del fármaco con la proteína. Como puede observarse en los resultados mencionados anteriormente, la fenitoína presenta una energía libre de unión negativa, lo cual facilita su unión con P-gp, además con la energía de inhibición mostrada podemos saber que existe una gran afinidad del fármaco por la proteína a pesar de no tener gran selectividad hacia él.

Tabla 46. Resultados del docking de P-gp y fenitoína

Rank	Est. Free Energy of Binding	Est. Inhibition Constant, Ki	vdW + Hbond + desolv Energy	Electrostatic Energy	Total Intermolec. Energy	Frequency	Interact. Surface
1.	-6.28 kcal/mol	24.78 uM	-6.30 kcal/mol	+0.01 kcal/mol	-6.28 kcal/mol	100%	474.307

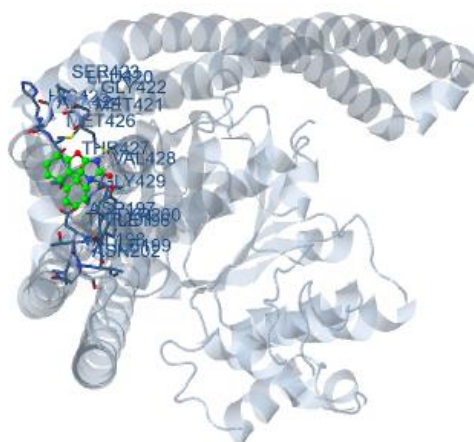
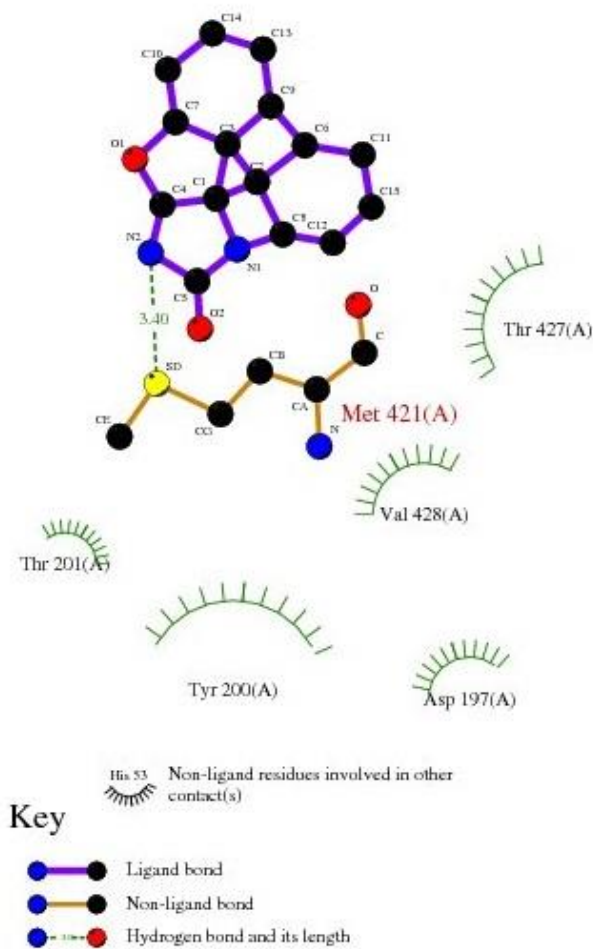


Figura 27. Interacción de P-gp con fenitoína. La estructura de la fenitoína se muestra en verde, los aminoácidos con los que interacciona se muestran en azul y la proteína se muestra en gris.

En la Figura 27 y tabla 47 se muestran las interacciones específicas fenitoína con P-gp y es notable que estas interacciones son favorecidas por la energía liberada al interactuar aminoácidos específicos con el fármaco.



docking

Figura 28. Interacciones de residuos de P-gp y fenitoína en dos dimensiones

Tabla 47. Energías de interacción de los aminoácidos de P-gp y fenitoína

Decomposed Interaction Energies in kcal/mol			
hydrogen bonds	polar	hydrophobic	other
MET421 (-0.7142)	TYR200 (-1.8773)	VAL428 (-0.8028)	THR427 (-1.2025)
			ASP197 (-0.5319)
			THR201 (-0.2538)

Para el caso del AVP, su estructura se muestra en el anexo 2 y los resultados del docking con P-gp son mostrados en la tabla 48, además en la Figura 29 se observa gráficamente la interacción del fármaco con la proteína. En los resultados mostrados en las figuras y tablas mencionados anteriormente, se observa que el AVP presenta una energía libre de unión negativa, lo cual facilita su unión con P-gp, y su constante de inhibición pequeña indica poca afinidad del fármaco hacia P-gp.

Tabla 48. Resultados del docking de P-gp y AVP

Rank	Est. Free Energy of Binding	Est. Inhibition Constant, Ki	vdW + Hbond + desolv Energy	Electrostatic Energy	Total Intermolec. Energy	Frequency	Interact. Surface
1.	-3.41 kcal/mol	3.15 mM	-4.28 kcal/mol	-0.02 kcal/mol	-4.31 kcal/mol	100%	419.457

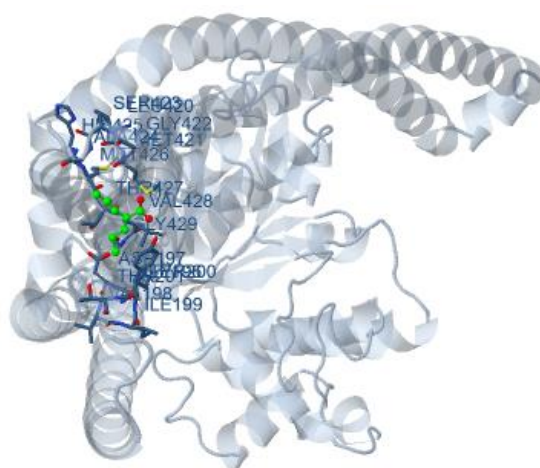


Figura 29. Interacción de P-gp con AVP. La estructura del AVP se muestra en verde, los aminoácidos con los que interacciona se muestran en azul y la proteína se muestra en gris.

En la Figura 30 y tabla 49 se muestran las interacciones específicas de P-gp con la AVP y puede notarse que no existe interacción entre el fármaco y aminoácidos específicos con P-gp.

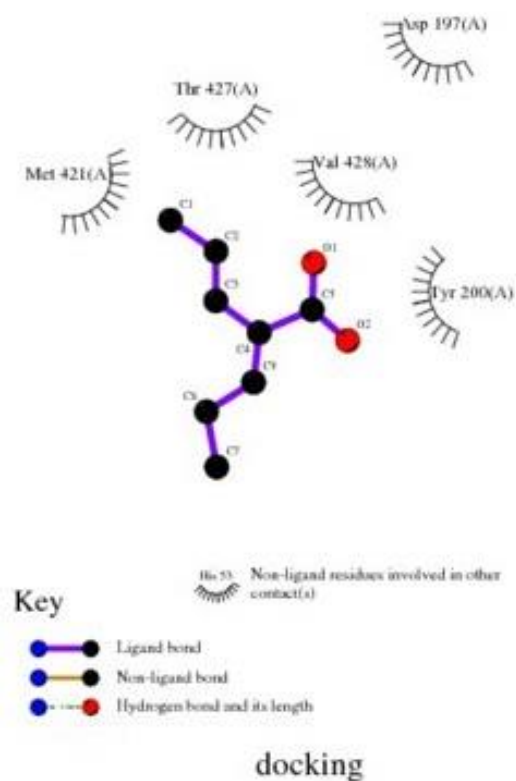


Figura 30. Interacciones de residuos de P-gp y AVP en dos dimensiones

Tabla 49. Energías de interacción de los aminoácidos de P-gp y AVP

Decomposed Interaction Energies in kcal/mol		
polar	hydrophobic	other
TYR200 (0)	MET421 (0)	ASP197 (0)
	VAL428 (0)	THR427 (0)

7. Discusión

La epilepsia mioclónica juvenil, es una forma común de epilepsia generalizada idiopática que típicamente ocurre en la adolescencia y que afecta a millones de personas en el mundo (Calleja et al., 2001), el fármaco de primera elección para el tratamiento de éste tipo de epilepsia es el AVP (Calleja et al., 2001; Buchanan, 1996). Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los pacientes con EMJ responden favorablemente al tratamiento con AVP, alrededor del 30% de los pacientes no logra el control de la enfermedad bajo el tratamiento con el fármaco ya mencionado (Sisodiya, 2005). Por lo anterior, éste estudio se enfocó en el análisis de polimorfismos en enzimas relacionadas con el metabolismo del AVP y en el transportador de ABCB1 en pacientes que no presentaron respuesta al fármaco y aquellas que presentaban una buena respuesta.

Los resultados presentados en éste estudio muestran que no se encontró relación entre la presencia de los principales polimorfismos del transportador de multi-fármacos ABCB1 (C1236T, G2677T/A y C3435T) y de los polimorfismos de los CYP's CYP2C9 y CYP2C19 entre pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con AVP en un grupo de pacientes mestizo mexicanos.

Respecto a los resultados obtenidos de los CYP's y su falta de relación con la resistencia a AVP, se plantea que esto se debe a que AVP se metaboliza vía citocromo P450 en un porcentaje aproximado del 10% por lo cual se considera que es una ruta menor mientras que la principal vía por la cual se metaboliza éste fármaco es la glucuronidación y la beta oxidación en la mitocondria (50 y 40%, respectivamente) (Godhe-Puranik et al., 2013), por lo cual se plantea que la presencia de polimorfismos en UGT's podría presentar mayor relación con la resistencia a FAEs como AVP. Sin embargo, las frecuencias encontradas para los diferentes polimorfismos de CYP2C9 corresponden con los reportados anteriormente (Castelán-Martínez et al., 2013). Además, a pesar de que en la tabla 27 se muestra una diferencia estadísticamente significativa (valor de $p < 0.05$) en la frecuencia del alelo T para el polimorfismo CYP2C9*2 entre pacientes con EMJ y controles, ésta no puede relacionarse con la presencia de la enfermedad. Lo mismo ocurre con la frecuencia

de los genotipos GA y GG de los polimorfismos CYP2C19*2 y *3 (tabla 28), en los que se muestra una diferencia estadísticamente significativa al comparar pacientes con EMJ y controles pero que, como se dijo anteriormente no puede ser relacionada con la presencia de la enfermedad. Así mismo ocurre para el polimorfismo CYP2C19*2 al comparar pacientes con EMJ respondedores al tratamiento con AVP y controles. En cuanto al análisis de haplotipos hecho para los CYP's antes mencionados, los resultados obtenidos tampoco muestran relación con la respuesta AVP (tablas 40 y 41), lo cual concuerda con un estudio realizado en una población de malayos (Haerian et al., 2011).

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis llevado a cabo del transportador ABCB1, en éste estudio no se encontró asociación entre los principales polimorfismos y haplotipos del transportador con la respuesta al AVP, estos resultados son similares a los encontrados en una población de malayos (Haerian et al., 2011), sin embargo, no son consistentes con los reportados por Siddiqui et al. en 2003 en caucásicos; ésta variación puede relacionarse con la diferencia en las poblaciones que se han estudiado, ya que como puede observarse en la tabla 50 y 51, la frecuencia alélica de los polimorfismos y haplotipos de ABCB1 varía de acuerdo a la población en estudio y las frecuencias obtenidas en este estudio en controles sanos, presentan mayor similitud a las frecuencias reportadas en población asiática. Además, a pesar de haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia del alelo G en el polimorfismo G2677T/A en pacientes con EMJ respecto a los controles (y en pacientes respondedores al AVP respecto a controles) (tabla 35), ésta no puede relacionarse con la presencia de la enfermedad. También se plantea que la razón por la cual no se encontró relación entre los polimorfismos del transportador y la falta de respuesta al AVP es debido a que ABCB1 podría no ser el principal transportador de AVP en la barrera hematoencefálica, no es posible asegurar lo anterior ya que el mecanismo de transporte de AVP aún no ha sido bien caracterizado (Gibbs et al., 2004).

Tabla 50. Frecuencias alélicas de los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T en distintas poblaciones. Frecuencias tomadas de la base de datos *e!Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

Población	rs1128503		rs2032582			rs1045642	
	C	T	G	T	A	C	T
Africanos	0.864	0.136	0.980	0.020	0.001	0.850	0.150
Europeos	0.584	0.416	0.573	0.410	0.018	0.482	0.518
Asiáticos del Este	0.373	0.627	0.468	0.398	0.134	0.602	0.398
Asiáticos del Sur	0.413	0.587	0.358	0.592	0.050	0.425	0.575
Americanos	0.597	0.403	0.572	0.369	0.059	0.572	0.428
Controles en este estudio	0.400	0.600	0.460	0.480	0.060	0.480	0.520
Pacientes con EMJ en este estudio	0.480	0.520	0.800	0.170	0.030	0.550	0.450

Tabla 51. Frecuencias de haplotipos del gen ABCB1 en distintas poblaciones

Población	Haplotipo		
	CGC (%)	TTT (%)	Otros (%)
Afro-Americanos (Tang et al., 2004)	71.96	6.49	21.55
Asiáticos (Xu, 2008)	16.80	35.70	47.50
Koreanos (Choi et al., 2007)	20.70	41.40	37.90
Indús (Tang et al., 2004)	23.45	56.09	20.46
Malayos (Tang et al., 2004)	22.70	32.92	44.38
Caucásicos (Potočník et al., 2008)	45.00	37.00	18.00
Controles sanos en este estudio	26.11	39.31	34.58
Pacientes con EMJ en este estudio	24.03	9.15	66.82

Como se mencionó anteriormente, AVP no ha sido caracterizado totalmente como un sustrato de P-gp y su mecanismo de transporte en barrera hematoencefálica aún no es bien conocido, se realizó el docking para conocer el acoplamiento molecular que existe entre P-gp y AVP *in silico* y compararlo con el acoplamiento que la proteína presenta con un sustrato ya conocido (fenitoína). El ensayo anterior logró corroborar la afinidad que presenta la fenitoína por P-gp, ya que como muestran los resultados del docking en la tabla 46, la energía libre de unión favorece la interacción entre determinados aminoácidos de P-gp con el fármaco (mostrados en la tabla 47) y que son mostrados en la Figura 27, donde inclusive se aprecia la interacción por puentes de hidrógeno entre un aminoácido de P-gp y la fenitoína. En lo que respecta al AVP, con los resultados mostrados en la Tabla 48, puede inferirse que si tiene interacción con P-gp pero que no presenta gran afinidad hacia ella, además en la Figura 29, se observa que no existe energía que facilite la interacción del fármaco con aminoácidos específicos de P-gp que faciliten una unión entre ellos como se presenta en la fenitoína. Es por ello que a pesar de existir una interacción entre el AVP y P-gp, ésta no es tan fuerte y por tanto no es posible asegurar que P-gp sea el único transportador de AVP en barrera hematoencefálica y por lo tanto la variación en su expresión no es la única responsable de la respuesta que los pacientes presentan hacia el tratamiento.

8. Conclusiones

No se encontró asociación entre los principales polimorfismos y haplotipos de los genes *ABCB1*, *CYP2C9* y *CYP2C19* y la respuesta al tratamiento con Ácido Valproico en pacientes con Epilepsia Mioclónica Juvenil.

Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos C1236T, G2677T/A, C3435T, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2 y CYP2C19*3 en 200 controles sanos y 87 pacientes con EMJ, observándose una similitud en las frecuencias alélicas de los polimorfismos del transportados ABCB1 de población asiática y las reportadas en éste estudio.

9. Perspectivas

Se sugiere aumentar la muestra de estudio para obtener resultados más confiables. Además, se propone hacer la búsqueda en polimorfismos presentes en UGT's por ser éstos los principales metabolizadores del AVP, de igual forma en otros transportadores que pudieran estar implicados con el movimiento del AVP en la barrera hematoencefálica.

10. Referencias

- Ahcène, B. (2009). *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. Ney Jersey: Wiley.
- Allikmets, R., Gerrard, B., Hutchinson, A., & Dean, M. (1996). Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Human Molecular Genetics*, 5(10), 1649–1655.
<http://doi.org/DOI 10.1093/hmg/5.10.1649>
- Altman, R. (2012). A very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoportien). *Pharmacogenet Genomics*, 21(3), 152–161.
<http://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283385a1c.Very>
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1999). BIOCHEMICAL, CELLULAR, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF THE MULTIDRUG TRANSPORTER¹. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 361–398. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361>
- Argikar, U. A., & Rimmel, R. P. (2009). Effect of aging on glucuronidation of valproic acid in human liver microsomes and the role of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4, UGT1A8, and UGT1A10. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(1), 229–236.
<http://doi.org/10.1124/dmd.108.022426>
- Asconapé, J. (1984). Some Clinical and EEG Aspects of Benign Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Official Journal of the International League against Epilepsy*, 25, 108–114.
- Barh, D. (2013). *OMICS: Applications in Biomedical, Agricultural, and Environmental Sciences*. Boca Raton: CRC Press.
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., Van Emde Boas, W., ... Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676–685. <http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x>

- Blaisdell, J., Jorge-Nebert, L. F., Coulter, S., Ferguson, S. S., Lee, S.-J., Chanas, B., ... Goldstein, J. a. (2004). Discovery of new potentially defective alleles of human CYP2C9. *Pharmacogenetics*, *14*(8), 527–537.
<http://doi.org/10.1097/01.fpc.0000114759.08559.51>
- Bort, R. (2004). Role of hepatocyte nuclear factor 3 gamma in the expression of human CYP2C genes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *426*, 63–72.
- Boticario, C. (2009). *Innovaciones en cáncer*. Madrid: Editorial UNED.
- Boullata, J. (2010). *Drug-Nutrient Interactions*. New York: Human Press.
- Bradley, W. (2006). *Neurología Clínica*. Madrid: Editorial Elsevier.
- Brunton, L. (2012). *Goodman & Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica* (12th ed.). México: McGraw Hill.
- Buchanan, N. (1996). The use of lamotrigine in juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure*, *5*(2), 149–151. [http://doi.org/10.1016/S1059-1311\(96\)80110-5](http://doi.org/10.1016/S1059-1311(96)80110-5)
- Burneo, J. G., Tellez-Zenteno, J., & Wiebe, S. (2005). Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Research*. <http://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2005.07.002>
- Calabrese, J. (1982). Phenomenology of rapid cycling maniac depression and its treatment with valproate. *Journal of Clinical Psychiatry*, 30–34.
- Calleja, S., Salas-Puig, J., Ribacoba, R., & Lahoz, C. H. (2001). Evolution of juvenile myoclonic epilepsy treated from the outset with sodium valproate. *Seizure*, *10*(6), 424–427. <http://doi.org/10.1053/seiz.2000.0530>
- Canadian Institutes of Health Research, Alberta Innovates-Health Solutions, T. M. I. C. (TMIC). (2013). DRUGBANK. Retrieved October 3, 2014, from <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00313#targets>
- Cascorbi, I., Gerloff, T., John, A., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Schwab, M., ... Roots, I. (2001).

- Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 169–174. <http://doi.org/10.1067/mcp.2001.114164>
- Castelán-Martínez, O. D., Hoyo-Vadillo, C., Sandoval-García, E., Sandoval-Ramírez, L., González-Ibarra, M., Solano-Solano, G., ... Valladares-Salgado, A. (2013). Allele frequency distribution of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms in six Mexican populations. *Gene*, 523(2), 167–172. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.128>
- Chateauvieux, S., Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2010). Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 479364. <http://doi.org/10.1155/2010/479364>
- Chen, C. J., Clark, D., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M., & Roninson, I. B. (1990). Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(1), 506–514.
- Chen, C. jie, Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., & Roninson, I. B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47(3), 381–389. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90595-7](http://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90595-7)
- Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A. L., & Quioco, F. A. (2003). A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Molecular Cell*, 12(3), 651–661. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.004>
- Choi, J. H., Lee, Y. J., Jang, S. B., Lee, J. E., Kim, K. H., & Park, K. (2007). Influence of the CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Korean subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 64(2), 185–191. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02874.x>
- Coppola, G., Auricchio, G., Federico, R., Carotenuto, M., & Pascotto, A. (2004). Lamotrigine versus valproic acid as first-line monotherapy in newly diagnosed typical absence

- seizures: An open-label, randomized, parallel-group study. *Epilepsia*, 45(9), 1049–1053. <http://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.40903.x>
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., ... Rouleau, G. A. (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*, 31(2), 184–189. <http://doi.org/10.1038/ng885>
- Crespi, C. (1997). The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics*, 7(3), 203–210.
- Das, A., Balan, S., Banerjee, M., & Radhakrishnan, K. (2016). Drug resistance in epilepsy and the ABCB1 gene : The clinical perspective Full Text Introduction An overview of antiepileptic drug resistance The role of P - glycoprotein in antiepileptic drug resistance Drug resistance in epilepsy and the ABCB1 gene : Th, (4), 1–5.
- De Morais, S. M. F., Wilkinson, G. R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U. A., & Goldstein, J. A. (1994). The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *Journal of Biological Chemistry*, 269(22), 15419–15422.
- Dean, J. (1988). Valproate monotherapy in 30 patients with partial seizures. *Epilepsia*, 29(2), 140–144.
- Debenham, P. G., Kartner, N., Siminovitch, L., Riordan, J. R., & Ling, V. (1982). DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Molecular and Cellular Biology*, 2(8), 881–9. <http://doi.org/10.1128/MCB.2.8.881>
- Delasiauve, L. (1854). *Traité de l' épilepsie : histoire , traitement , médecine légale / par M . le Dr Delasiauve ,...* París: V. Masson.
- Delgado-Escueta, A. . (1984). Juvenile myoclonic epilepsy of Janz. *Neurology*, 34, 285–294.
- DeLozier, T. C., Lee, S., Coulter, S. J., Goh, B. C., & Goldstein, J. A. (2005). Functional

- characterization of novel allelic variants of CYP2C9 recently discovered in southeast Asians. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(3), 1085–1090. <http://doi.org/10.1124/jpet.105.091181>.markedly
- Depondt, C. (2006). The potential of pharmacogenetics in the treatment of epilepsy. *European Journal of Paediatric Neurology*, 10(2), 57–65. <http://doi.org/10.1016/j.ejpn.2005.11.009>
- Dhavendra, K. (2009). *Principles and Practice of Clinical Cardiovascular Genetics*. New York: OXFORD.
- Dombrowski, S. M., Desai, S. Y., Marroni, M., Cucullo, L., Goodrich, K., Bingaman, W., ... Janigro, D. (2001). Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*, 42(12), 1501–1506. <http://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.12301.x>
- Endicott, J. (1989). The Biochemistry Of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 137–171. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.58.1.137>
- Engel, J. (2006). Report of the ILAE classification core group. In *Epilepsia* (Vol. 47, pp. 1558–1568). <http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00215.x>
- Fernando-Dongas, M. C., Radtke, R. A., VanLandingham, K. E., & Husain, A. M. (2000). Characteristics of valproic acid resistant juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure*, 9(6), 385–388. <http://doi.org/10.1053/seiz.2000.0432>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <http://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fung, K. L., & Gottesman, M. M. (2009). A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 860–871. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.02.014>

- Gelisse, P., Genton, P., Thomas, P., Rey, M., Samuelian, J. C., Dravet, C., ... Timone, C. H. U. (2001). Clinical factors of drug resistance in juvenile myoclonic epilepsy, 240–243.
- Genton, P., & Gelisse, P. (2013). The history of juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy & Behavior : E&B*, *28 Suppl 1*, S2–7. <http://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.01.002>
- Gibbs, J. P., Adeyeye, M. C., Yang, Z., & Shen, D. D. (2004). Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells: Role of active efflux transport. *Epilepsy Research*, *58*(1), 53–66. <http://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2003.12.008>
- Godhe-Puranik, Y., Thorn, C. F., Lambra, J. K., & Leeder, J. S. (2013). Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics*, *23*(4), 236–241. <http://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2.Valproic>
- Goldstein, J. (1994). Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*, *4*(6), 285–299.
- Gotoh, O. (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(1), 83–90.
- Granata, T., Cross, H., Theodore, W., & Avanzini, G. (2011). Immune-mediated epilepsies. *Epilepsia*, *52*(SUPPL. 3), 5–11. <http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03029.x>
- Gribar, J. J., Ramachandra, M., Hrycyna, C. A., Dey, S., & Ambudkar, S. V. (2000). Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *The Journal of Membrane Biology*, *173*(3), 203–14. <http://doi.org/JMEMB144> [pii]
- Haerian, B. S., Lim, K. S., Tan, H. J., Mohamed, E. H. M., Tan, C. T., Raymond, A. A., ... Mohamed, Z. (2011). Association between ABCB1 polymorphism and response to sodium valproate treatment in Malaysian epilepsy patients. *Epileptic Disorders*, *13*(1), 65–75. <http://doi.org/10.1684/epd.2011.0419>
- Hammond, W. (1867). Convulsive tremor. *Am J Santy*, 185.

- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 8, 67–113. <http://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>
- Higgins, C. F., & Gottesman, M. M. (1992). Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in Biochemical Sciences*, 17(1), 18–21. [http://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90419-A](http://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90419-A)
- Hirota, T., Eguchi, S., & Ieiri, I. (2013). Impact of Genetic Polymorphisms in CYP2C9 and CYP2C19 on the Pharmacokinetics of Clinically Used Drugs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(1), 28–37. <http://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-12-RV-085>
- Hirtz, D. (2007). How common are the “ common ” neurologic disorders ? <http://doi.org/10.1212/01.wnl.0000252807.38124.a3>
- Hung, C. (2005). Complex haplotypic effects of the ABCB1 gene on epilepsy treatment response. *Pharmacogenomics*, 6(4), 411–417.
- Hung, C. (2007). Association of polymorphisms in NR1H2 and ABCB1 genes with epilepsy treatment responses. *Pharmacogenomics*, 8(9), 1151–1158.
- Ito, M., Ikeda, Y., Arnez, J. G., Finocchiaro, G., & Tanaka, K. (1990). The enzymatic basis for the metabolism and inhibitory effects of valproic acid: dehydrogenation of valproyl-CoA by 2-methyl-branched-chain acyl-CoA dehydrogenase. *BBA - General Subjects*, 1034(2), 213–218. [http://doi.org/10.1016/0304-4165\(90\)90079-C](http://doi.org/10.1016/0304-4165(90)90079-C)
- Janz, D; Christian, W. (1957). Impulsive Petit-Mal. *Dtsch Z Nervenheilkd*, 176, 346–386.
- Johannessen, C. U., & Johannessen, S. I. (2003). Valproate : Past , Present , and Future Mechanisms of Action, 9(2), 199–216.
- Jones, P. M., & George, A. M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: Perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(6), 682–699. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-3336-9>
- Kamiyama, Y., Matsubara, T., Yoshinari, K., Nagata, K., Kamimura, H., & Yamazoe, Y. (2007). Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-

- metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 22(4), 287–98.
<http://doi.org/10.2133/dmpk.22.287>
- Kassahun, K., Hu, P., Grillo, M. P., Davis, M. R., Jin, L., & Baillie, T. A. (1994). Metabolic activation of unsaturated derivatives of valproic acid. Identification of novel glutathione adducts formed through coenzyme A-dependent and -independent processes. *Chemico-Biological Interactions*, 90(3), 253–275.
[http://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)90014-0](http://doi.org/10.1016/0009-2797(94)90014-0)
- Kelley, W. (1992). *Medicina interna*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Kiang, T. K. L., Ho, P. C., Anari, M. R., Tong, V., Abbott, F. S., & Chang, T. K. H. (2006). Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9*1/*1 genotype. *Toxicological Sciences*, 94(2), 261–271. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfl096>
- Klose, T. (1999). Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 13(6), 289–295.
- Kroetz, D. (2003). Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*, 13(8), 481–494.
- Kwan, P. (2009). Gene-wide tagging study of association between ABCB1 polymorphisms and multidrug resistance in epilepsy in Han Chinese. *Pharmacogenomics*, 10(5), 723–732.
- Kwan, P., Baum, L., Wong, V., Ng, P. W., Lui, C. H., Sin, N. C., ... Wong, L. K. S. (2007). Association between ABCB1 C3435T polymorphism and drug-resistant epilepsy in Han Chinese. *Epilepsy and Behavior*, 11(1), 112–117.
<http://doi.org/10.1016/j.yebeh.2007.04.013>
- Kwan, P., & Brodie, M. J. (2005). Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 46(2), 224–235.

<http://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.31904.x>

- Lankas, G. R., Wise, L. D., Cartwright, M. E., Pippert, T., & Umbenhauer, D. R. (1998). Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproductive Toxicology*, *12*(4), 457–463.
[http://doi.org/10.1016/S0890-6238\(98\)00027-6](http://doi.org/10.1016/S0890-6238(98)00027-6)
- Lebreton, S. (1984). Pharmacodynamic properties of 2,2-dipropylacetic Acid. III. *Therapie*, *19*, 457–467.
- Lee, C. (2002). Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics*, *12*(3), 251–263.
- Leppik, I. E. (2009). Epilepsy in the Elderly. *Epilepsia*, *47*(s1), 65–70.
<http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00664.x>
- Leschziner, G. D., Andrew, T., Pirmohamed, M., & Johnson, M. R. (2007). ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics*, *7*(3), 154–179.
<http://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500413>
- Locher, K. P. (2009). Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *364*(1514), 239–245.
<http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0125>
- Loscher, W., & Potschka, H. (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(8), 591–602.
<http://doi.org/10.1038/nrn1728>
- Loscher, W., Klotz, U., Zimprich, F., & Schmidt, D. (2009). The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia*.
<http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01716.x>
- Luís, P. B. M., Ruiten, J. P., Ofman, R., Ijlst, L., Moedas, M., Diogo, L., ... Silva, M. F. B. (2011). Valproic acid utilizes the isoleucine breakdown pathway for its complete β -

- oxidation. *Biochemical Pharmacology*, 82(11), 1740–1746.
<http://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.103>
- Luna-Tortós, C., Fedrowitz, M., & Löscher, W. (2008). Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology*, 55(8), 1364–1375.
<http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.08.032>
- Mantoan, L., & Walker, M. (2011). Treatment options in juvenile myoclonic epilepsy. *Current Treatment Options in Neurology*, 13(4), 355–370.
<http://doi.org/10.1007/s11940-011-0131-z>
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T., & Kim, R. B. (2004). Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <http://doi.org/10.1016/j.clpt.2003.09.012>
- McElroy, S. (1989). Valproate in psychiatric disorders: literature review and clinical guidelines. *Journal of Clinical Psychiatry*, 50, 23–29.
- Mesdjian, E. (2013). Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Micheli, F. (2002). *Tratado de Neurología Clínica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Minucci, S., Zhu, P., Kra, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., ... Heinzel, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*, 20(24), 6969–6978.
- Navarro, C. (2006). *Neurocirugía para médicos generales*. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
- Ngugi, A. K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J. W., & Newton, C. R. (2010). Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. *Epilepsia*, 51(5), 883–890. <http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x>

- Ohkubo, Y., Ueta, A., Ando, N., Ito, T., Yamaguchi, S., Mizuno, K., ... Togari, H. (2006). Novel mutations in the cytochrome P450 2C19 gene: A pitfall of the PCR-RFLP method for identifying a common mutation. *Journal of Human Genetics*, *51*(2), 118–123.
<http://doi.org/10.1007/s10038-005-0332-y>
- Patsalos, P. N., Fröscher, W., Pisani, F., & Van Rijn, C. M. (2002). The importance of drug interactions in epilepsy therapy. *Epilepsia*, *43*(4), 365–385.
<http://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.13001.x>
- Penry, J. D. (1989). Juvenile Myoclonic Epilepsy: Long-Term Response to Therapy. *Epilepsia*, *30*, 19–23.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., & Klein, P. S. (2001). Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(39), 36734–36741. <http://doi.org/10.1074/jbc.M101287200>
- Potočnik, U., Glavač, D., & Dean, M. (2008). Common germline MDR1/ABCB1 functional polymorphisms and haplotypes modify susceptibility to colorectal cancers with high microsatellite instability. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *183*(1), 28–34.
<http://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.01.023>
- Potschka, H., Volk, H., & Löscher, W. (2004). Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats. *Neuroreport*, *15*(10), 1657–61.
<http://doi.org/00001756-200407190-00025> [pii]
- Rabot, L. (1899). *De la myoclonie épileptique*. Paris.
- Riordan, R., & Ling, V. (1979). Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine J R Riordan and V Ling • When this article is cited Purification of P-Glycoprotein from Plasma Membrane Vesicles Chinese Hamster Ova. *Journal of Biological Chemistry*, *254*(24), 12701–12705.

- Rockwell, N. C., & Thorner, J. (2003). C Is for CFTR, M Is for Mdr, S is for Ste6—The Alphabet of ABC Proteins. *Cell*, *114*, 13–16. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00518-X](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00518-X)
- Ross, K. A., Bigham, A. W., Edwards, M., Gozdzik, A., Suarez-Kurtz, G., & Parra, E. J. (2010). Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements. *Journal of Human Genetics*, *55*(9), 582–589. <http://doi.org/10.1038/jhg.2010.73>
- Sadeque, A. J., Fisher, M. B., Korzekwa, K. R., Gonzalez, F. J., & Rettie, A. E. (1997). Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *283*(2), 698–703. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9353388&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers3://publication/uuid/37D9BB2C-025E-46C4-99B1-C7551EAE33EE>
- Sauna, Z. E., Smith, M. M., Miller, M., & Ambudkar, S. V. (2001). Evidence for the Vectorial Nature of Drug (Substrate)-stimulated ATP Hydrolysis by Human P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(36), 33301–33304. <http://doi.org/10.1074/jbc.C100369200>
- Science, W. I. of. (2014). GeneCards. Retrieved May 7, 2014, from <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB1&search=799ca3cf7d8fcbae1b6dd841da90fb41>
- Senior, A. E., Al-Shawi, M. K., & Urbatsch, I. L. (1995). The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Letters*, *377*(3), 285–289. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01345-8](http://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01345-8)
- Seo, T., Ishitsu, T., Ueda, N., Nakada, N., Yurube, K., Ueda, K., & Nakagawa, K. (2006). ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients. *Pharmacogenomics*, *7*(4), 551–561. <http://doi.org/10.2217/14622416.7.4.551>

- Shorvon, S. (2012). *Oxford Textbook of Epilepsy and Epileptic Seizures*. United Kingdom: Oxford University Press.
- Siddiqui, A., Kerb, R., Weale, M. E., Brinkmann, U., Smith, A., Goldstein, D. B., ... Sisodiya, S. M. (2003). Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *The New England Journal of Medicine*, *348*(15), 1442–8. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa021986>
- Sim, S. C., Risinger, C., Dahl, M. L., Aklillu, E., Christensen, M., Bertilsson, L., & Ingelman-Sundberg, M. (2006). A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *79*(1), 103–113. <http://doi.org/10.1016/j.clpt.2005.10.002>
- Sisodiya, S. M. (2005). Genetics of drug resistance. *Epilepsia*, *46*(SUPPL. 10), 33–38. <http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00356.x>
- Specchio, L. M., Gambardella, A., Giallonardo, A. T., Michelucci, R., Specchio, N., Boero, G., & La Neve, A. (2006). Open label, long-term, pragmatic study on levetiracetam in the treatment of juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Research*, *71*(1), 32–39. <http://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.05.013>
- Speicher, M. (2010). *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches* (4th ed.). New York: Springer.
- Takanashi, K. (2000). CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics*, *10*(2), 95–104.
- Tan, L., Yu, J. T., Sun, Y. P., Ou, J. R., Song, J. H., & Yu, Y. (2010). The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *112*(4), 320–323. <http://doi.org/10.1016/j.clineuro.2010.01.002>
- Tang, K., Wong, L. P., Lee, E. J. D., Chong, S. S., & Lee, C. G. L. (2004). Genomic evidence for

- recent positive selection at the human MDR1 gene locus. *Human Molecular Genetics*, 13(8), 783–97. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddh099>
- Tatsuta, T., Naito, M., Oh-hara, T., Sugawara, I., & Tsuruo, T. (1992). Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *Journal of Biological Chemistry*, 267(28), 20383–20391.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., & Willingham, M. C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7735–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7735>
- Tishler, D. M., Weinberg, K. I., Hinton, D. R., Barbaro, N., Annett, G. M., & Raffel, C. (1995). MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 36(1), 1–6. <http://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1995.tb01657.x>
- Voso, M. T., Santini, V., Finelli, C., Musto, P., Pogliani, E., Angelucci, E., ... Leone, G. (2009). Valproic acid at therapeutic plasma levels may increase 5-azacytidine efficacy in higher risk myelodysplastic syndromes. *Clinical Cancer Research*, 15(15), 5002–5007. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0494>
- Walley, N. (2009). Epilepsy Predisposition and Pharmacogenetics. In *Genomic and Personalized Medicine* (p. 1249). Elsevier.
- Williams, J. A., Hyland, R., Jones, B. C., Smith, D. A., Hurst, S., Goosen, T. C., ... Ball, S. E. (2004). Minireview, 32(11), 1201–1208. <http://doi.org/10.1124/dmd.104.000794>
- Willingham, M. C. (1989). Immunohistochemical Localization in Normal Tissues of Different Epitopes in the Multidrug Transport Protein P170 : Evidence for Localization in Brain Capillaries and Crossreactivity of One Antibody with a Muscle Protein.
- Xie, H.-G. (2001). Molecular Basis of the Neurodegenerative Disorders. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(14), 815–850.
- Xu, P. (2008). Impact of MDR1 haplotypes derived from C1236T, G2677T/A and C3435T on

the pharmacokinetics of single-dose oral digoxin in healthy Chinese volunteers. *Pharmacology*, 82(3), 221–227.

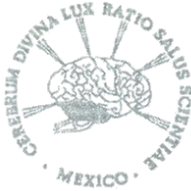
Zanger, U. (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6), 1093–1108.

Zimprich, F., Sunder-Plassmann, R., Stogmann, E., Gleiss, A., Dal-Bianco, A., Zimprich, A., ... Mannhalter, C. (2004). Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 63(6), 1087–1089. <http://doi.org/10.1212/01.WNL.0000141021.42763.F6>


1. Anexos

Anexo 1

a) Consentimiento informado para pacientes con EMJ



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA. LOS ANGELES, E. U.



Hoja de Consentimiento para adultos y de Asentimiento para jóvenes

**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN INVESTIGACIÓN
DE GENÉTICA DE LAS EPILEPSIAS
Miembros afectados**

En las siguientes declaraciones la palabra "usted" se refiere a usted, a su hijo(a), o a alguien de quien Ud. es responsable.

A usted se le ha invitado a participar en un estudio de investigación dirigido por el Dr. Antonio Delgado-Escueta, del Departamento de Neurología, por la Dra. Julia Bailey del Departamento de Psiquiatría de la Universidad de California en Los Ángeles y por la Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela del departamento de neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Cd. de México. Este es un estudio multi-céntrico financiado por donaciones privadas, varias fundaciones, la Administración de Veteranos, los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos y el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Cd. de México. Ud. ha sido invitado(a) a participar en esta investigación debido a que Ud. tiene algún tipo de epilepsia como la Epilepsia Mioclónica Juvenil, Epilepsia de Ausencias de la Niñez, epilepsia gran mal, Síndrome de Angelman, epilepsia fotogénica con mioclonías palpebrales o epilepsia parcial. Su participación activa podría requerir entre 2 y 8 horas en un período de 1 a 30 días. En los próximos 5 a 10 años de este estudio, esperamos incluir a 200 personas con Epilepsia Mioclónica Juvenil y sus familiares si hay antecedente familiar de epilepsia. En cada una de estas familias reclutaremos tantos familiares como sea posible en base a las necesidades del proyecto y a su disponibilidad para participar. Además se incluirán alrededor de 800 personas con Epilepsia Mioclónica Juvenil y sus padres que no tengan antecedente familiar de epilepsia. También incluiremos a 100 individuos con Epilepsia de Ausencias de la Niñez y sus familias y 50 individuos con otras formas de genética de las epilepsias y sus familias. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Ud. debe leer detenidamente la información siguiente y hacer cualquier pregunta de lo que no entienda, antes de decidir si va a participar o no.

•ACLARACIÓN

Su médico puede ser también uno de los investigadores de este protocolo y como tal, está interesado tanto en su bienestar como en la realización adecuada de este estudio. Antes de decidir entrar a este estudio o en cualquier momento durante su participación, ud. puede solicitar una segunda opinión acerca de su atención médica a otro médico que no esté asociado con este proyecto. Ud. no está obligado(a) a participar en ningún proyecto de investigación ofrecido por su médico tratante.

•PROPÓSITO DEL ESTUDIO

El propósito de este estudio es investigar cómo algunos síndromes epilépticos, enfermedades relacionadas con epilepsia o cómo algunas ondas cerebrales pueden ser hereditarias. Esto se está estudiando debido a que todavía no hay un entendimiento de la causa de muchos tipos de crisis epilépticas y aún no hay cura para ninguna. Entendiendo las bases genéticas de algunos tipos de epilepsia esperamos que se puedan desarrollar tratamientos específicos según los genes causantes.

•PROCEDIMIENTOS

Si Ud. participa voluntariamente en este estudio, le pediremos que realice las siguientes actividades. No hay un orden particular para las mismas.

Entrevista, evaluación y revisión de expedientes

Un médico hará una evaluación neurológica de las funciones de su cerebro y la hará preguntas sobre su historia médica y sus crisis epilépticas. A usted (o a sus padres si ud. es menor de 18 años) se le entrevistará durante 30 a 90 minutos para hacer un árbol genealógico y revisar la historia familiar de crisis epilépticas. Si ud. es un menor, el Dr. Escueta y la Dra. Ma. Elisa Alonso harán una evaluación neurológica y le preguntará sobre su historia médica o las crisis epilépticas. Si es necesario, el Dr. Escueta y la Dra. Alonso solicitarán la revisión de sus expedientes médicos previos. Los expedientes previos pueden incluir encefalogramas o EEG's (registro de las ondas cerebrales) y resultados de evaluaciones médicas y neurológicas previas. La información obtenida de esta entrevista y de los archivos médicos previos será guardada en oficinas aseguradas, en áreas accesibles sólo para el personal del proyecto.

Muestra de Sangre

Si Ud. es adulto, se le tomará una muestra de hasta 10 cucharaditas. Si Ud. es un menor de edad se le extraerán aproximadamente de 2 a 4 cucharaditas. Este procedimiento durará entre 10 y 15 minutos. Generalmente sólo se necesita una muestra, pero dependiendo de la cantidad de sangre o ADN que se necesite, puede ser que se le solicite otra muestra. La muestra de sangre será tomada por personal capacitado, o en la clínica o laboratorio que sea conveniente para usted. En este último caso, los investigadores verificarán que el laboratorio cuente con las instrucciones y el material necesarios. Los investigadores contactarán a su laboratorio local directamente y se asegurarán de que no le cobren a usted sino al proyecto por tomar la muestra de sangre.

La sangre es tomada para buscar proteínas y otros componentes presentes en la sangre. Esto sirve para buscar el material genético contenido en las células blancas de la sangre y para determinar la causa genética de la epilepsia que se está estudiando. Esta sangre es tomada sólo para los propósitos de este proyecto de investigación y no será usada para decidir tratamientos. Las muestras de sangre serán estudiadas únicamente por el Dr. Escueta y sus colaboradores. Su muestra será almacenada solo durante la duración del estudio. Cuando la investigación de genética de epilepsias se haya completado, la muestra será desechada.

Estudio de las ondas cerebrales o EEG

A usted se le hará un electroencefalograma o EEG que grabará las ondas de su cerebro. A menos que su condición clínica cambie, ud. necesitará hacerse el EEG solo una vez durante el estudio. El EEG es un procedimiento que dura de 1 a 3 horas y se realizará en el laboratorio de EEG del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía o en un laboratorio especializado cercano a su domicilio. El lugar se selecciona en base a la conveniencia del sujeto y la disponibilidad de un EEG cerca de su domicilio si ud. lo prefiere y si es posible. El EEG será realizado por técnicos especializados para asegurar la calidad del estudio y reducir cualquier incomodidad. Durante el registro del EEG pequeños discos de metal; llamados electrodos; son puestos sobre su cabeza con una pasta. Los impulsos eléctricos cerebrales son transmitidos por los cables hasta el aparato de EEG y son registrados por una pluma sobre una hoja de papel gráfico en movimiento o son grabados digitalmente y se ven en una pantalla de computadora y se graban en un disco. Un EEG es un examen de rutina en la práctica clínica para diagnosticar síndromes epilépticos. Si usted se ha hecho uno recientemente, se le pedirá que obtenga una copia del registro para ser revisado por los investigadores. Si usted no se ha hecho un EEG recientemente y ud. tiene crisis epilépticas, el EEG se haría como parte de la rutina médica.

CONSENTIMIENTO PARA AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:



Contacto con familiares

Podría ser útil estudiar a otros miembros de su familia. Sus familiares no serán contactados sin su permiso. Le daremos hojas de información para que usted les informe acerca de este estudio y sobre cómo pueden contactar nuestras oficinas si desean participar.

Resultados del estudio

Usted no recibirá el resultado del estudio genético de su muestra.

•RIESGOS POTENCIALES E INCOMODIDADES

El estudio puede involucrar riesgos impredecibles como los siguientes:

Entrevista, evaluación y revisión de expedientes

Si ud. es un adulto con epilepsia o padre de un menor con epilepsia, se le puede hacer algunas preguntas personales que le pueden causar ansiedad o estrés. Algunos ejemplos de estas preguntas son: a la madre del paciente ¿Cuántos hijos nacieron vivos (incluidos los que hayan muerto jóvenes)? ¿Algunos de estos niños tienen un padre diferente? ¿Los padres son parientes? ¿Hay algún niño criado en otro lugar o dado en adopción? Usted tiene el derecho de negarse a contestar cualquier pregunta que no desee responder.

Muestra de Sangre. Los riesgos asociados con la toma de sangre son dolor, hinchazón, enrojecimiento y posible infección en el sitio donde se toma la sangre (vea también la sección de riesgos que se describe en "Información Genética en su muestra", página 5).

Estudios de EEG. Los riesgos asociados con el procedimiento del EEG incluyen ocasionalmente reacciones alérgicas a la pasta usada para fijar los electrodos y la mínima posibilidad de provocar una crisis en algunos pacientes cuando son expuestos a la luz intermitente.

•BENEFICIOS PREVISTOS PARA LOS SUJETOS

No se espera que usted obtenga beneficios por participar en este estudio y no se espera que su condición mejore por participar en esta investigación.

•BENEFICIOS PREVISTOS PARA LA SOCIEDAD

Los beneficios para la sociedad que surjan de esta investigación incluyen: 1) Mejor diagnóstico de varios síndromes epilépticos, lo cual llevará a mejorar la selección de antiepilépticos y un mejor control de las crisis, 2) Más información para asesoría familiar sobre la genética y herencia de las epilepsias.

•ALTERNATIVAS PARA PARTICIPAR

Una alternativa es no participar.

•PAGO POR PARTICIPACIÓN

No hay pago por su participación en este estudio.

•INFORMACIÓN SOBRE SU MUESTRA

Al final de este documento, se le preguntará si desea recibir información general acerca de lo que se encontró en este proyecto (o las conclusiones del estudio). Usted también puede elegir no recibir ninguna información general acerca del estudio. La investigación es un largo y complicado proceso. Obtener información general de un proyecto puede tomar años.

CONSENTIMIENTO PARA AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:





•OBLIGACIONES FINANCIERAS

No hay obligaciones financieras asociadas con su participación en este estudio.

•CUIDADO DE EMERGENCIA Y COMPENSACIÓN POR DAÑO

Si usted resulta con algún daño como resultado directo de procedimientos de investigación no realizados para su beneficio, usted recibirá tratamiento sin costo. Los investigadores no proporcionarán ninguna otra clase de compensación por daño.

•PRIVACÍA Y CONFIDENCIALIDAD

Las únicas personas que sabrán que usted es un participante de este estudio son los miembros del equipo investigador y si es necesario, sus médicos o enfermeras. Ninguna información acerca de usted, proporcionada por ud. durante la investigación, será revelada a otros sin su permiso escrito, excepto:

-si es necesario para proteger sus derechos o bienestar (por ej., si ud. sufre un daño y necesita cuidado de emergencia.

Los representantes autorizados de una agencia financiadora como los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de América pueden solicitar la revisión de los registros de los sujetos participantes. Como resultado, ellos podrían ver su nombre, pero ellos están obligados a no revelar su identidad a otros debido a reglas de confidencialidad.

El presente proyecto de investigación esta cubierto por un Certificado de Confidencialidad emitido por el Departamento de Salud y Servicios Humanos (Department of Health and Human Services, DHHS) de los Estados Unidos de América. Este Certificado protegerá a los investigadores de verse forzados a dar a conocer cualquier dato de la investigación en el cual usted pueda ser identificado, aún si se trata de una orden judicial. Sin embargo, los investigadores pueden mostrar estos datos si se tratara de una auditoria del DHHS o de un programa de evaluación del proyecto.

Esta protección, sin embargo, no es absoluta. Un Certificado de Confidencialidad no previene que un miembro de su familia de a conocer por su propia iniciativa información acerca de usted o de su participación en esta investigación. Usted también debe saber que si un representante de una aseguradora o un empleador se entera de su participación y usted le autoriza para recibir información de la investigación, entonces el investigador podría no utilizar el Certificado de Confidencialidad para retener esa información. Esto significa que usted y su familia también deben proteger activamente su propia privacidad.

Ud. no visitará el Hospital de Veteranos (VA). Sin embargo, algunas partes del estudio se realizarán en las instalaciones del VA Greater Los Angeles Healthcare System (VAGLAHS) –Centro Médico y Servicio de Investigación en West Los Angeles: 1) manejo de datos en una base computarizada y almacenada bajo llave, 2) análisis de las muestras de ADN/sangre.

Su árbol genealógico es identificado por un número de familia para referencia de los investigadores, por ejemplo, LA40. Este número identifica la ciudad o país de procedencia. A cada individuo participante se le asigna un código que indica a que generación pertenece, su número individual dentro del árbol genealógico, fecha de nacimiento, sexo e iniciales. Por ejemplo, LA40-III-25-101890-F-WC es el miembro número 25 de la tercera generación de la familia numero 40 de Los Ángeles, su fecha de nacimiento es 18 de octubre de 1990 y sus iniciales son W. C. Los datos, documentos y tubos que contengan muestras tendrán estos códigos. Los nombres

CONSENTIMIENTO PARA AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:

se colocan en un árbol genealógico maestro para verificar la posición de un individuo dentro del árbol familiar y ayuda a interpretar los resultados de los marcadores del DNA (genotipos) que se están estudiando.

Los registros médicos y las muestras de sangre serán guardados en las oficinas y laboratorios del proyecto y serán conocidos solo por los miembros del equipo investigador. Cuando el árbol genealógico es publicado, se le asigna otro número y no se proporcionan nombres ni datos que puedan identificar al paciente o a la familia. Las muestras de sangre son guardadas en un refrigerador con llave en un laboratorio cerrado y los expedientes se guardan en archiveros en una oficina adonde sólo el personal del proyecto tienen acceso.

Solamente el Dr. Delgado-Escueta y los investigadores de su equipo de investigación genética estudiarán sus muestras de sangre y sus datos. Su muestra se guardará mientras dure el estudio genético. Cuando la investigación se complete, la muestra será desechada.

• **INFORMACIÓN GENÉTICA DE SU MUESTRA: POSIBLES LÍMITES PARA LA CONFIDENCIALIDAD INDIVIDUAL**

Cada tejido o muestra humana contiene información genética. Estudios recientes han encontrado variaciones genéticas entre individuos sanos y enfermos. Estas variaciones pueden permitir la identificación de estos individuos. Debido a esta posible limitación, serán tomadas precauciones para mantener su confidencialidad ahora y en el futuro.

Hemos aprendido de investigaciones pasadas que no siempre es posible predecir los hallazgos y el futuro de las investigaciones y de las nuevas tecnologías. Usted debe estar consciente de que pueden surgir problemas con los nuevos desarrollos científicos. Estos posibles problemas pueden incluir: estigma social o discriminación basada en información genética por aseguradoras o empleadores. Algunas veces la información genética obtenida indica un parentesco diferente. Esta información no se proporcionará al participante. Dentro de los límites impuestos por la tecnología y las leyes se realizarán todos los esfuerzos para mantener la privacidad de su información genética.

• **PARTICIPACIÓN Y ABANDONO**

Su participación en esta investigación es **VOLUNTARIA**. Si decide no participar, esto no afectará su relación con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía o su derecho a la atención de su salud u otros servicios para los cuales usted esté registrado o tenga derecho. Si usted decide participar, también es libre de abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto perjudique su atención en la institución.

• **EXCLUSIÓN DEL ESTUDIO POR DECISIÓN DEL INVESTIGADOR**

Los investigadores podrían decidir excluirle a usted del estudio si surgieran circunstancias que lo justifiquen. Usted podría ser excluido aunque usted deseara seguir participando. Los investigadores tomarán la decisión y le harán saber si no es posible que continúe. Esta decisión será hecha, si bien, para proteger su salud y seguridad o porque es parte del plan de la investigación que la gente que desarrolla ciertas condiciones no debe continuar en el estudio.

• **NUEVOS HALLAZGOS**

Durante el curso de este estudio, será informado de cualquier hallazgo significativo (bueno o malo) así como cambios en los riesgos o los beneficios como resultado de su participación en la investigación o nuevas alternativas de participación, esto puede ocasionar que usted cambie de opinión sobre su decisión de continuar.

CONSENTIMIENTO PARA AFECTADOS

Fecha de preparación: **Noviembre, 2013.**

No. del IRB :

Fecha de expiración:



en el estudio. Si se le proporciona información nueva, se le preguntará si desea o no desea continuar con el estudio.

•IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Si el estudio le ocasiona algún daño o si experimenta alguna reacción adversa, por favor contacte inmediatamente a uno de los investigadores de la lista siguiente. El Dr. Dr. Delgado-Escueta puede ser localizado por el servicio de beeper de la UCLA al (310) 825-6301 x05183. Si usted tiene preguntas acerca del estudio, siéntase libre de contactar a la Dra. Ma. Elisa Alonso y/o a la M. en C. Adriana Ochoa en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía ubicado en Insurgentes Sur 3877 Col. La Fama, Tlalpan C. P. 14269, teléfono (55) 56 06 38 22 Ext. 2022 o 2018, correo electrónico elisaav@servidor.unam.mx, ochoa2205@yahoo.com.mx o al Dr. Delgado-Escueta o con la Dra. Julia Bailey al teléfono de su oficina (310) 268-3129 o por correo electrónico a escueta@ucla.edu, Antonio.Escueta@med.va.gov y jbailey@mednet.ucla.edu, o a la siguiente dirección: Epilepsy Center, Suite 3405, Bldg 500, VA Medical Center, 11301 Wilshire Blvd, Los Angeles, CA 90073.

•DERECHOS DE LOS SUJETOS DE INVESTIGACIÓN

Usted puede retirar su consentimiento en cualquier momento y suspender su participación sin sanción alguna. Usted no renuncia a ningún derecho por su participación en esta investigación. Si tiene alguna pregunta acerca de sus derechos como sujeto de investigación, puede contactar la oficina para la Protección de Sujetos de Investigación, 11000 Kinross Ave, Suite 102, UCLA, Box 951694, Los Angeles, CA 90095-1694, (310) 825-8714.

FIRMA DEL SUJETO O REPRESENTANTE LEGAL

He leído (o alguien me ha leído) la información arriba proporcionada. Me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas han sido contestadas y las he comprendido. Me han dado una copia de este consentimiento, así como una copia de la "Declaración de Derechos de los Sujetos de Investigación".

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA

Nombre completo del sujeto: _____

Firma del Sujeto o su Representante Legal: _____ Fecha: ___/___/___

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____



INFORMACIÓN ACERCA DE MI MUESTRA

Por favor indique después de revisar las opciones abajo descritas, qué tipo de información desea recibir. Es su responsabilidad hacerle saber al investigador si su dirección y/o número de teléfono cambia. En la sección de "Identificación de los Investigadores" están incluidas direcciones y teléfonos para solicitar cualquier tipo de información.

CONSENTIMIENTO PARA AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:

- ____ Deseo información general acerca de lo que se encontró en el estudio.
- ____ No deseo ninguna información acerca de los resultados del estudio.

FIRMA DEL INVESTIGADOR

He explicado al sujeto de investigación o a su representante legal y he resuelto todas sus dudas. Creo que entendió la información descrita en este documento y acepta participar libremente.

Nombre del Investigador: _____

Firma del Investigador: _____

Fecha: ____/____/____

(Debe ser la misma que la del participante)



CONSENTIMIENTO PARA AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:

b) Consentimiento informado para controles



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA. LOS ANGELES, E. U.

Hoja de Consentimiento para adultos y de Asentimiento para jóvenes

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN INVESTIGACIÓN DE GENÉTICA DE LAS EPILEPSIAS

Miembros no afectados



En las siguientes declaraciones la palabra "usted" se refiere a usted, a su hijo(a), o a alguien de quien Ud. es responsable.

A usted se le ha invitado a participar en un estudio de investigación dirigido por el Dr. Antonio Delgado-Escueta, del Departamento de Neurología y por la Dra. Julia Bailey del Departamento de Psiquiatría de la Universidad de California en Los Angeles y la Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MVS". Este es un estudio multi-céntrico financiado por donaciones privadas, varias fundaciones, la Administración de Veteranos, los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos y el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Cd. de México. Aunque usted no tiene epilepsia, ha sido invitado(a) a participar en esta investigación debido a que un familiar suyo tiene algún tipo de epilepsia como la Epilepsia Mioclónica Juvenil, Epilepsia de Ausencias de la Niñez, epilepsia gran mal, Síndrome de Angelman, epilepsia fotogénica con mioclonías palpebrales o epilepsia parcial. Su participación activa podría requerir entre 2 y 8 horas en un período de 1 a 30 días. En los próximos 5 a 10 años de este estudio, esperamos incluir a 200 personas con Epilepsia Mioclónica Juvenil y sus familiares si hay antecedente familiar de epilepsia. En cada una de estas familias reclutaremos tantos familiares como sea posible en base a las necesidades del proyecto y a su disponibilidad para participar. Además se incluirán alrededor de 800 personas con Epilepsia Mioclónica Juvenil y sus padres sin antecedente familiar de epilepsia. También incluiremos a 100 individuos con Epilepsia de Ausencias de la Niñez y sus familias y 50 individuos con otras formas de epilepsia hereditaria y sus familias. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Debe leer detenidamente la siguiente información y preguntar lo que no entienda, antes de decidir si va a participar o no.

•ACLARACIÓN

El médico de su familiar puede ser también uno de los investigadores de este protocolo y como tal, está interesado tanto en el bienestar de su paciente como en la realización adecuada de este estudio. Antes de decidir entrar a este estudio o en cualquier momento durante su participación, puede solicitar una segunda opinión acerca de la atención médica de su familiar a otro médico que no esté asociado con este proyecto. Ud. no está obligado(a) a participar en ningún proyecto de investigación ofrecido por el médico de su familiar.

•PROPÓSITOS DEL ESTUDIO

El propósito de este estudio es investigar cómo algunos síndromes epilépticos, enfermedades relacionadas con epilepsia o como algunas ondas cerebrales pueden ser hereditarias. Esto se está estudiando debido a que todavía no hay un entendimiento de la causa de muchos tipos de crisis epilépticas y aún no hay cura para ninguna. Entendiendo las bases genéticas de algunos tipos de epilepsia esperamos que se puedan desarrollar tratamientos específicos según los genes causantes.

•PROCEDIMIENTOS

Si Ud. participa voluntariamente en este estudio, le pediremos que realice las siguientes actividades. No hay un orden específico para las mismas.

Entrevista, evaluación y revisión de expedientes

A usted (o a sus padres si ud es menor de 18 años) se le entrevistará durante 30 a 90 minutos para hacer un árbol genealógico y revisar cualquier síntoma previo o pasado de probables crisis epilépticas y su historia médica. Si es necesario, el Dr. Escueta y la Dra. Ma. Elisa Alonso solicitarán la revisión de sus expedientes médicos previos. Los expedientes previos pueden incluir encefalogramas o EEGs (registro de las ondas cerebrales) y resultados de evaluaciones médicas y neurológicas previas. La información obtenida de esta entrevista y de los archivos médicos previos será guardada en oficinas aseguradas, en áreas accesibles sólo para el personal del proyecto.

Muestra de Sangre

Si ud. es adulto, se le tomará una muestra de hasta 10 cucharaditas. Si es menor de edad se le extraerán aproximadamente de 2 a 4 cucharaditas. Este procedimiento durará entre 10 y 15 minutos. Generalmente sólo se necesita una muestra, pero dependiendo de la cantidad de sangre o ADN que se necesite, puede ser que se le solicite otra muestra. La muestra de sangre será tomada por personal capacitado, o en la clínica o laboratorio que sea conveniente para usted. En este último caso, los investigadores verificarán que el laboratorio cuente con las instrucciones y el material necesarios.

La sangre es tomada para buscar proteínas y otros componentes presentes en la sangre. Esto sirve para buscar el material genético contenido en las células blancas de la sangre y para determinar la causa genética de la epilepsia que se está estudiando. Esta sangre es tomada sólo para los propósitos de este proyecto de investigación y no será usada para decidir tratamientos. Las muestras de sangre serán estudiadas únicamente por el Dr. Escueta y sus colaboradores. Su muestra será almacenada solo durante la duración del estudio. Cuando la investigación de genética de epilepsias se haya completado, la muestra será desechada.

Estudio de las ondas cerebrales o EEG

Si su familiar tiene algún tipo de epilepsia como la Epilepsia Mioclónica Juvenil, Epilepsia de Ausencias de la Niñez, epilepsia gran mal, Síndrome de Angelman, epilepsia fotogénica con mioclonías palpebrales o algún síndrome parecido, a usted se le haría un EEG, el cual es un procedimiento que dura 1 hora y se realizará en el laboratorio de EEG del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía o en un laboratorio especializado cercano a su domicilio. A usted se le hará EEG solo una vez durante el estudio. Como usted no tiene epilepsia, su EEG será hecho solo para propósitos de investigación. Durante el registro del EEG pequeños discos de metal; llamados electrodos; son puestos sobre su cabeza con una pasta. Los impulsos eléctricos cerebrales son transmitidos por los cables hasta el aparato de EEG y son registrados por una pluma sobre una hoja de papel gráfico en movimiento o son grabados digitalmente y se ven en una pantalla de computadora y se graban en un disco.

Contacto con familiares

Podría ser útil estudiar a otros miembros de su familia. Sus familiares no serán contactados sin su permiso. Le daremos hojas de información para que usted le avise a sus familiares acerca de este estudio y sobre cómo pueden contactar nuestras oficinas si desean participar.

CONSENTIMIENTO PARA NO AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:



•RIESGOS POTENCIALES E INCOMODIDADES

El estudio puede involucrar riesgos impredecibles como los siguientes:

Entrevista, evaluación y revisión de expedientes

Si Ud. es adulto, se le podría hacer algunas preguntas personales que le pueden causar ansiedad o estrés. Algunos ejemplos de estas preguntas son: ¿Cuántos hijos vivos tiene? ¿Algún niño en su familia tiene un padre diferente? ¿Los padres son parientes? ¿Hay algún niño criado en otro lugar o dado en adopción? Usted tiene el derecho de negarse a contestar cualquier pregunta que no desee responder.

Muestra de Sangre. Los riesgos asociados con la toma de sangre son dolor, hinchazón, enrojecimiento y posible infección en el sitio donde se toma la sangre (vea también la sección de riesgos que se describe en "Información Genética en su muestra", página 5).

Estudios de EEG. Los riesgos asociados con el procedimiento del EEG incluyen ocasionalmente reacciones alérgicas a la pasta usada para fijar los electrodos y la mínima posibilidad de provocar una crisis en algunas personas fotosensibles.

•BENEFICIOS PREVISTOS PARA LOS SUJETOS

No se espera que usted obtenga beneficios por participar en este estudio.

•BENEFICIOS PREVISTOS PARA LA SOCIEDAD

Los beneficios para la sociedad que surjan de esta investigación incluyen: 1) Mejor diagnóstico de varios síndromes epilépticos, lo cual llevará a mejorar la selección de antiepilépticos y un mejor control de las crisis, 2) Más información para consejería familiar sobre la genética y herencia de las epilepsias.

•ALTERNATIVAS PARA PARTICIPAR

Una alternativa es no participar.

•PAGO POR PARTICIPACIÓN

No hay pago por su participación en este estudio.

•INFORMACIÓN SOBRE SU MUESTRA

Al final de este documento, se le preguntará si desea recibir información general acerca de lo que se encontró en este proyecto (o las conclusiones del estudio). También puede elegir no recibir ninguna información general acerca del estudio. La investigación es un largo y complicado proceso. Obtener información general de un proyecto puede tomar años.

•OBLIGACIONES FINANCIERAS

Los procedimientos realizados para este estudio, tales como evaluaciones, historia, EEG de miembros no afectados y toma de muestras de sangre, serán realizados sin costo para usted o su aseguradora. Ni usted ni su aseguradora recibirán cobros por su participación en esta investigación.

•CUIDADO DE EMERGENCIA Y COMPENSACIÓN POR DAÑO

Si usted resulta con algún daño como resultado directo de procedimientos de investigación no realizados para su beneficio, usted recibirá tratamiento sin costo. Los investigadores no proporcionarán ninguna otra clase de compensación por daño.

CONSENTIMIENTO PARA NO AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:



•PRIVACÍA Y CONFIDENCIALIDAD

Las únicas personas que sabrán que usted es un participante de este estudio son los miembros del equipo investigador y si es necesario, sus médicos o enfermeras. Ninguna información acerca de usted, proporcionada por ud. durante la investigación, será revelada a otros sin su permiso escrito, excepto:

-si es necesario para proteger sus derechos o bienestar (por ej., si ud. sufre un daño y necesita cuidado de emergencia.

Cuando los resultados de investigación sean publicados o discutidos en conferencias, no se incluirá información que revele su identidad. Si se usaran fotografías, videos o grabaciones de audio fueran utilizadas para propósitos educativos, su identidad será protegida o enmascarada.

Los representantes autorizados de una agencia financiadora como los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de América pueden solicitar la revisión de los registros de los sujetos participantes. Como resultado, ellos podrían ver su nombre, pero ellos están obligados a no revelar su identidad a otros debido a reglas de confidencialidad.

El presente proyecto de investigación esta cubierto por un Certificado de Confidencialidad emitido por el Departamento de Salud y Servicios Humanos (Department of Health and Human Services, DHHS) de los Estados Unidos de América. Este Certificado protegerá a los investigadores de verse forzados a dar a conocer cualquier dato de la investigación en el cual usted pueda ser identificado, aún si se trata de una orden judicial. Sin embargo, los investigadores pueden mostrar estos datos si se tratara de una auditoria del DHHS o de un programa de evaluación del proyecto.

Esta protección, sin embargo, no es absoluta. Un Certificado de Confidencialidad no previene que un miembro de su familia de a conocer por su propia iniciativa información acerca de usted o de su participación en esta investigación. Usted también debe saber que si un representante de una aseguradora o un empleador se entera de su participación y usted le autoriza para recibir información de la investigación, entonces el investigador podría no utilizar el Certificado de Confidencialidad para retener esa información. Esto significa que usted y su familia también deben proteger activamente su propia privacidad.

Ud. no visitará el Hospital de Veteranos (VA). Sin embargo, algunas partes del estudio se realizarán en las instalaciones del VA Greater Los Angeles Healthcare System (VAGLAHS) –Centro Médico y Servicio de Investigación en West Los Angeles: 1) manejo de datos en una base computarizada y almacenada bajo llave, 2) análisis de las muestras de ADN/sangre.

Su árbol genealógico es identificado por un número de familia para referencia de los investigadores, por ejemplo, LA40. Este número identifica la ciudad o país de procedencia. A cada individuo participante se le asignará un código que indica a que generación pertenece, su numero individual dentro del árbol genealógico, fecha de nacimiento, sexo e iniciales. Por ejemplo, LA40-III-25-101890-F-WC es el miembro número 25 de la tercera generación de la familia numero 40 de Los Angeles, su fecha de nacimiento es 18 de octubre de 1990 y sus iniciales son W. C. Los datos, documentos y tubos que contengan muestras tendrán estos códigos. Los nombres se colocan en un árbol genealógico maestro para verificar la posición de un individuo dentro del árbol familiar lo cual ayuda a interpretar los resultados de los marcadores del DNA (genotipos) que se están estudiando.

CONSENTIMIENTO PARA NO AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:



Los registros médicos y las muestras de sangre serán guardados en las oficinas y laboratorios del proyecto y serán conocidos solo por los miembros del equipo investigador. Cuando el árbol genealógico es publicado, se le asigna otro número y no se proporcionan nombres ni datos que puedan identificar al paciente o a la familia. Las muestras de sangre son guardadas en un refrigerador con llave en un laboratorio cerrado y los expedientes se guardan en archiveros en una oficina adonde sólo el personal del proyecto tienen acceso.

Solamente el Dr. Delgado-Escueta y los investigadores de su equipo de investigación genética estudiarán sus muestras de sangre y sus datos. Su muestra se guardará mientras dure el estudio genético. Cuando la investigación se complete, la muestra será desechada.

•INFORMACIÓN GENÉTICA DE SU MUESTRA: POSIBLES LÍMITES PARA LA CONFIDENCIALIDAD INDIVIDUAL

Cada tejido o muestra humana contiene información genética. Estudios recientes han encontrado variaciones genéticas entre individuos sanos y enfermos. Estas variaciones pueden permitir la identificación de estos individuos. Debido a esta posible limitación, serán tomadas precauciones para mantener su confidencialidad ahora y en el futuro.

Hemos aprendido de investigaciones pasadas que no siempre es posible predecir los hallazgos y el futuro de las investigaciones y de las nuevas tecnologías. Usted debe estar consciente de que pueden surgir problemas con los nuevos desarrollos científicos. Estos posibles problemas pueden incluir: estigma social o discriminación basada en información genética por aseguradoras o empleadores. Algunas veces la información genética obtenida indica un parentesco diferente. Esta información no se proporcionará al participante. Dentro de los límites impuestos por la tecnología y las leyes se realizarán todos los esfuerzos para mantener la privacidad de su información genética.

•PARTICIPACIÓN Y ABANDONO

Su participación en esta investigación es **VOLUNTARIA**. Si decide no participar, esto no afectará su relación con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía o su derecho a la atención de su salud u otros servicios para los cuales usted esté registrado o tenga derecho. Si usted decide participar, usted también es libre de abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto perjudique su atención futura en la institución.

•EXCLUSIÓN DEL ESTUDIO POR DECISIÓN DEL INVESTIGADOR

Los investigadores podrían decidir excluirle a usted del estudio si surgieran circunstancias que lo justifiquen. Usted podría ser excluido aunque usted deseara seguir participando. Los investigadores tomarán la decisión y le harán saber si no es posible que continúe. Esta decisión será hecha, si bien, para proteger su salud y seguridad o porque es parte del plan de la investigación que la gente que desarrolla ciertas condiciones no debe continuar en el estudio.

•NUEVOS HALLAZGOS

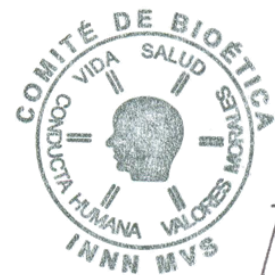
Durante el curso de este estudio, será informado de cualquier hallazgo significativo (bueno o malo) así como cambios en los riesgos o los beneficios como resultado de su participación en la investigación o nuevas alternativas de participación, esto puede ocasionar que usted cambie de opinión sobre su decisión de continuar en el estudio. Si se le proporciona información nueva, se le preguntará si desea o no desea continuar con el estudio.

CONSENTIMIENTO PARA NO AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:



• **IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES**

Si el estudio le ocasiona algún daño o si experimenta alguna reacción adversa, por favor contacte inmediatamente a uno de los investigadores de la lista siguiente. El Dr. Dr. Delgado-Escueta puede ser localizado por el servicio de beeper de la UCLA al (310) 825-6301 x05183. Si usted tiene preguntas acerca del estudio, siéntase libre de contactar a la Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela y/o a la M. en C. Adriana Ochoa en Insurgentes Sur 3877 Col. La Fama, Tlalpan D. F. o al teléfono (55) 56 06 38 22 Ext. 2022 o 2018, correo electrónico: elisaav@servidor.unam.mx, ochoa2205@yahoo.com.mx; o al Dr. Delgado-Escueta o con la Dra. Julia Bailey al teléfono de su oficina (310) 268-3129 o por correo electrónico a escueta@ucla.edu, Antonio.Escueta@med.va.gov y jbailey@mednet.ucla.edu, o a la siguiente dirección: Epilepsy Center, Suite 3405, Bldg 500, VA Medical Center, 11301 Wilshire Blvd, Los Angeles, CA 90073.

• **DERECHOS DE LOS SUJETOS DE INVESTIGACIÓN**

Usted puede retirar su consentimiento en cualquier momento y suspender su participación sin sanción alguna. Usted no renuncia a ningún derecho por su participación en esta investigación. Si tiene alguna pregunta acerca de sus derechos como sujeto de investigación, puede contactar la oficina para la Protección de Sujetos de Investigación, 11000 Kinross Ave, Suite 102, UCLA, Box 951694, Los Angeles, CA 90095-1694, (310) 825-8714.

FIRMA DEL SUJETO O REPRESENTANTE LEGAL

He leído (o alguien me ha leído) la información arriba proporcionada. Me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas han sido contestadas y las he comprendido. Me han dado una copia de este consentimiento, así como una copia de la "Declaración de Derechos de los Sujetos de Investigación".

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA

Nombre completo del sujeto: _____

Firma del Sujeto o su Representante Legal: _____ Fecha: ___/___/___

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____



INFORMACIÓN ACERCA DE MI MUESTRA

Por favor indique después de revisar las opciones abajo descritas, qué tipo de información desea recibir. Es su responsabilidad hacerle saber al investigador si su dirección y/o número de teléfono cambia. En la sección de "Identificación de los Investigadores" están incluidas direcciones y teléfonos para solicitar cualquier tipo de información.

- _____ Deseo información general acerca de lo que se encontró en el estudio.
- _____ No deseo ninguna información acerca de los resultados del estudio.

CONSENTIMIENTO PARA NO AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:

FIRMA DEL INVESTIGADOR

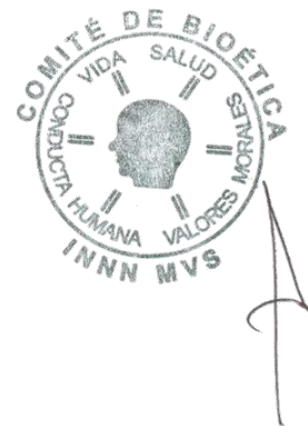
He explicado al sujeto de investigación o a su representante legal y he resuelto todas sus dudas. Creo que entendió la información descrita en este documento y acepta participar libremente.

Nombre del Investigador: _____

Firma del Investigador: _____

(Debe ser la misma que la del participante)

Fecha: ____/____/____



CONSENTIMIENTO PARA NO AFECTADOS

Fecha de preparación: Noviembre, 2013.

No. del IRB :

Fecha de expiración:

Anexo 2

a) Reactivos

- Tris
- Tritón
- Sacarosa
- NaCl 5μL y saturado
- SDS 10%
- Etanol al 70%
- Etanol absoluto
- Cloroformo/ alcohol isoamílico (49:1)
- Agua estéril
- Agarosa
- Buffer de carga (azul de bromofenol, xileno cianol, glicerol).
- TBE
- Master mix 2X
- Agua libre de nucleasas
- Enzimas de restricción Mbol, HaeIII, Avall, KpnI, SmaI, BamHI
- Buffer para enzimas de restricción
- Kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Membrane binding solution y Membrane washing solution)*.
- Kit comercial *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, Buffer de secuenciación 5X)*

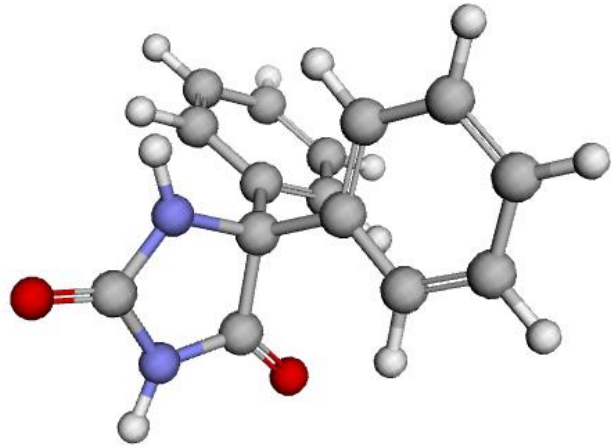
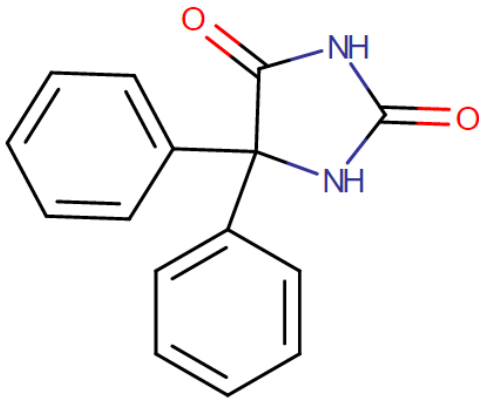
b) Equipo y material

- Tubos Vacutainer con anticoagulante ACD.
- Adaptador para tubos Vacutainer.
- Agujas para toma de muestra.
- Tubos Falcon 12 mL.
- Tubos *ependorf* 1.5 mL, 0.2 mL y

- Centrifugas (tubos *falcon* y *eppendorf*)
- Micropipetas 10, 20, 100, 200 y 1000 μL
- Puntas para micropipetas
- Pipetas de transferencia
- Agitador
- Espectrómetro *Genova Nano*
- *Thermomixer*
- Termociclador *Axygen Maxygene*.
- Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa
- Cámara de lectroforesis vertical para geles de acrilamida
- Kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (columnas para purificación de DNA de bandas de agarosa).

Anexo 3

a) Estructura de la fenitoína en 2D y 3D.



b) Estructura del AVP en 2D y 3D.

