



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA (INNN)**

**“MANUEL VELASCO SUAREZ”**

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE:**

**Evaluación de productos relacionados con la salud**

**PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL**

**Genotipificación del polimorfismo CYP3A5\*3 en pacientes mexicanos con  
esclerosis múltiple.**

**ALUMNA**

**ANA CRISTINA ZURITA ZACARÍAS**

**2173025451**

**ASESORES**

**DR. JORGE LUIS GUERRERO CAMACHO**

**DR. FRANCISCO MIRANDA HERNÁNDEZ**

**PERIODO DE 21 DE MARZO DE 2022 A 21 DE MARZO DE 2023**

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>Esclerosis múltiple</b>	<b>4</b>
Definición y aspectos generales	4
Clasificación	4
Epidemiología	5
Etiología	6
Factores ambientales	6
Genética	7
Obesidad/dieta	7
Sexo	7
Enfermedades autoinmunes	7
Migración	8
Inmunopatogénesis	8
Signos y síntomas	11
Diagnóstico	12
• Historia clínica	12
• Resonancia magnética (RM)	13
• Análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR)	13
• Potenciales evocados	14
• Criterios de McDonald	14
• Diagnóstico diferencial	14
Tratamiento	15
• Terapias modificadoras de la enfermedad (DMT)	15
• Tratamiento sintomático	16
• Tratamiento agudo	17
• Tratamiento de neuroprotección y remielinización	17
• Evaluación del tratamiento	17
<b>Corticoesteroides</b>	<b>19</b>
Mecanismo de acción	20
Mecanismo genómico	20
Mecanismo no genómico	21
Reacciones adversas	22
Farmacocinética	23
<b>Metabolismo de fármacos</b>	<b>23</b>
Enzimas del citocromo P450	24
Generalidades	24
Nomenclatura y clasificación	24
Importancia	24
Subfamilia CYP3A	25
Gen CYP3A5	26
Polimorfismo CYP3A5*3 (rs7767446)	28
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>29</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>30</b>
<b>Selección de muestras</b>	<b>30</b>
Criterios de inclusión para pacientes	30
Criterios de exclusión para pacientes	30
Criterios de eliminación para pacientes	30
Criterios de inclusión para población sana	30
<b>Obtención de muestra sanguínea y extracción de DNA</b>	<b>30</b>

<b>Cuantificación de DNA</b>	<b>31</b>
<b>Evaluación de la integridad del DNA</b>	<b>31</b>
<b>Genotipificación</b>	<b>31</b>
Amplificación de DNA por PCR	31
Digestión de DNA con enzimas de restricción	32
Electroforesis con geles de acrilamida	33
<b>Análisis estadístico</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>Características de muestras de DNA obtenidas</b>	<b>34</b>
<b>Características de la población</b>	<b>35</b>
<b>Reacción de PCR de punto final</b>	<b>35</b>
<b>Genotipos encontrados del polimorfismo CYP3A5 mediante RFLP</b>	<b>36</b>
<b>Frecuencias alélicas y genotípicas calculadas de CYP3A5 tanto en población sana como en pacientes con EM</b>	<b>37</b>
<b>Asociación de polimorfismo con esclerosis múltiple en población estudiada</b>	<b>37</b>
<b>Comparación de frecuencia alélica de CYP3A5 entre la población sana mestizo mexicana estudiada y la reportada en distintas poblaciones</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>43</b>
Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica	43
<b>ANEXO 2</b>	<b>44</b>
Preparación de soluciones y reactivos utilizados en electroforesis con geles de agarosa.	44
A. Preparación del gel de agarosa al 0.8%	44
B. Preparación de buffer TBE 10X	44
C. Preparación de buffer TBE 1X	44
D. Preparación de colorante de carga tipo III	44
E. Preparación de GelRed® 100x a partir de solución Stock.	45
F. Preparación de GelRed® 5x	45
<b>ANEXO 3</b>	<b>46</b>
Manual de usuario: <i>SspI</i> , 10U/μL, 500 U	46
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>48</b>

# Genotipificación del polimorfismo CYP3A5\*3 en pacientes mexicanos con esclerosis múltiple.

## INTRODUCCIÓN

### Esclerosis múltiple

#### Definición y aspectos generales

De acuerdo con la Asociación Médica Estadounidense (AMA) y el Comité Mexicano para el Tratamiento e investigación en Esclerosis Múltiple (MEXCTRIMS), la esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central (SNC) donde el daño ocurre debido a la inflamación de la mielina, la cual es la proteína que rodea y protege los nervios en el cerebro y médula espinal. Así, cuando la mielina es dañada (desmielinización), ocasiona que los impulsos nerviosos que ocurren entre el cerebro y la médula espinal se distorsionen o interrumpan, causando los síntomas neurológicos y la discapacidad. (Marcus, R., 2022; MEXCTRIMS, 2022)

#### Clasificación

Desde 1996, el Comité Asesor Internacional sobre Ensayos Clínicos en Esclerosis Múltiple se ha encargado de determinar la clasificación Lublin-Reingold que se basa en el curso clínico del paciente (Kuhlmann, T., *et al.* 2022). Los fenotipos existentes se enumeran a continuación (Figura 1):

1. EM recurrente-remitente (EMRR): representa el 85-90% de los casos de EM y se caracteriza por brotes que generalmente evolucionan durante días o semanas seguidos de una remisión parcial, completa o nula (Hauser, SL. y Cree, BAC., 2020; MEXCTRIMS, 2022).
2. EM progresiva secundaria (EMSP): después de un periodo de 15 a 20 años, entre el 30-50% de las personas con EMRR la presenta y consiste en un empeoramiento de signos y síntomas ocasionando una incapacidad progresiva (MEXCTRIMS, 2022; Hauser, SL. y Cree, BAC., 2020)
3. EM progresiva primaria (EMPP): alrededor del 10-20% de los pacientes experimentan una progresión desde el inicio, es decir, no experimentan ataques o brotes, sino una disminución constante de la función desde el inicio (Hauser, SL. y Cree, BAC., 2020; MEXCTRIMS, 2022).

En 2013 se hizo una revisión a la clasificación de Lublin-Reingold (Lublin, F.D., *et al.* 2014) en donde surgieron nuevos cursos de la enfermedad como:

4. Síndrome Clínicamente Aislado (SCA): se caracteriza por un primer episodio de síntomas neurológicos causados por desmielinización del SNC sugestivos de EM pero que aún no reúne otros requisitos como un segundo evento de disfunción neurológica para considerarse EM. Puede presentarse como una neuritis óptica, mielitis transversa, entre otros (Lublin, F.D., *et al.* 2014; MEXCTRIMS, 2022; EME, 2019).
5. Síndrome Radiológicamente Aislado (SRA): consiste en que imágenes de resonancia magnética sugieren desmielinización, pero existe una ausencia de

signos o síntomas clínicos. Es por esto por lo que no se considera un subtipo como tal de EM, pero ayuda a sospechar de presencia de la enfermedad por lo que los pacientes deben llevar un seguimiento en búsqueda de mayor evidencia (Lublin, F.D., *et al.* 2014).

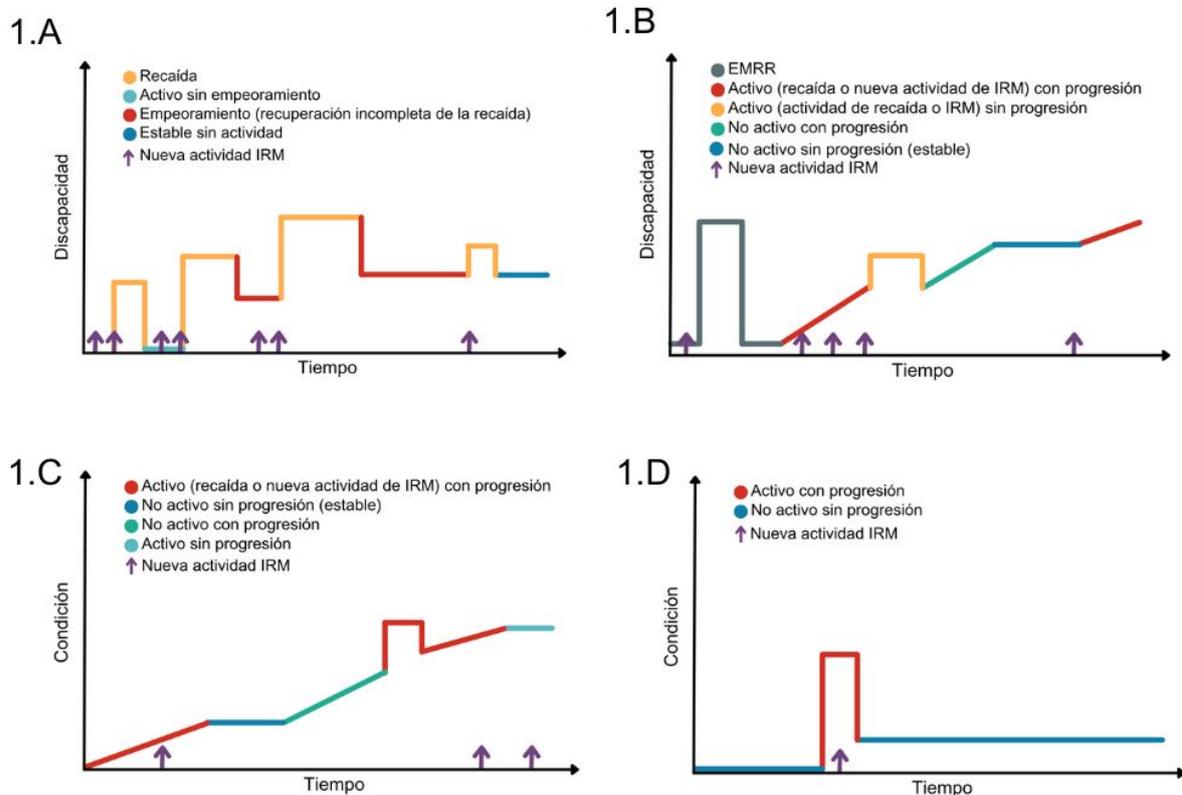


Figura 1. Clasificación de esclerosis múltiple de acuerdo con Lublin-Reingold. A. Esclerosis múltiple recurrente-remite (EMRR); B. Esclerosis múltiple progresiva secundaria (EMSP); C. Esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP) y D. Síndrome Clínicamente Aislado (SCA). (Modificado de Lublin, F.D., *et al.* 2014).

En el caso de la población mexicana, el fenotipo más frecuente es EMRR con un 87.6% en comparación con EMSP (9.11%) & EMPP (1.18%), así como el Síndrome Clínicamente Aislado (1.43%) (Bertado-Cortés, B., *et al.* 2020).

## Epidemiología

La EM es un problema mundial afectando a más de 2.8 millones de personas, no obstante, la prevalencia es mayor en las poblaciones de América del Norte y Europa Occidental (108-140 casos por 100,000 habitantes) y más baja en poblaciones de Asia Oriental (<30 casos por 100,000 habitantes) (Figura 2.A) (Leray, E., *et al.* 2016; Hauser, SL. y Cree, BAC., 2020). En el caso de México, la EM se consideraba casi inexistente ya que alrededor de los años 70s la prevalencia era de 1.6/100,000 habitantes, no obstante, en la actualidad se estiman de 12 a 30 casos por 100 mil habitantes dependiendo la zona geográfica del país y el hospital que lo reporte (Figura 2.B) (Alter, M. y Olivares, L., 1970; MEXCTRIMS, 2022; Aguilar-Juárez, J.A., *et al.* 2019).

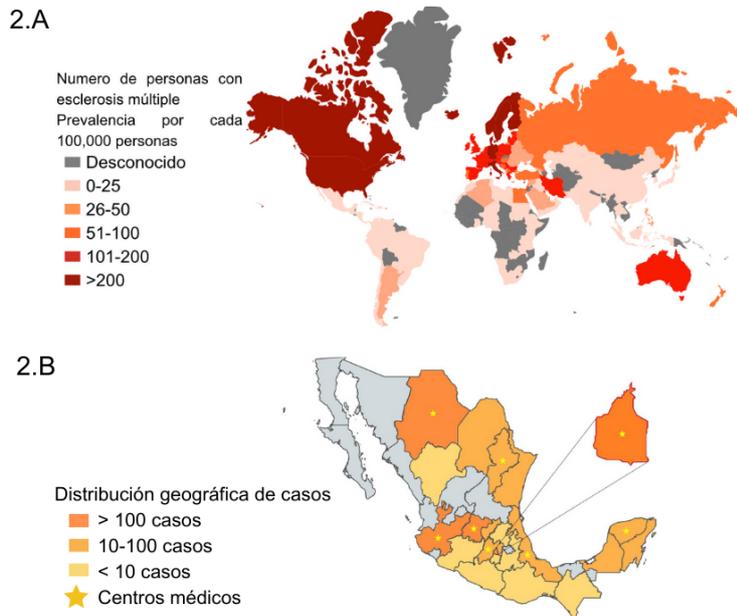


Figura 2. Epidemiología de la esclerosis múltiple. A. Prevalencia de esclerosis múltiple en el mundo. B. Prevalencia de esclerosis múltiple en México. Modificado de Atlas of MS, 2022 y Bertado-Cortés., *et al.* 2020

Por otro lado, la edad de inicio de esta enfermedad suele ser entre los 20 y 40 años. Asimismo, en el estudio REMEMBer realizado por Bertado-Cortés, B. y colaboradores (2020), se obtuvo que la edad media a la cual comienzan las manifestaciones clínicas en la población mexicana es de 31 años y la duración de la enfermedad es de 9 a 17 años. De igual manera, se ha identificado una relación mujer-hombre de 2:1 en pacientes mexicanos y entre 1.5:1 y 2.5:1 en diversas poblaciones; sin embargo, en hombres, la progresión es más rápida y grave con el paso del tiempo (Yamout, B. I., y Alroughani, R. 2018; Bertado-Cortés, B., *et al.* 2020).

## Etiología

A pesar de que la EM se considera una enfermedad autoinmune, la causa que impulsa la desmielinización sigue desconocida, sin embargo, la genética, el medio ambiente y otros factores están relacionados y se describen a continuación (Sun, M., *et al.* 2021):

### Factores ambientales

Se ha determinado que el tabaquismo juega un papel en el desarrollo de EM ya que los fumadores tienen 1.5 veces más probabilidades de desarrollar la enfermedad que personas no expuestas; además, el riesgo aumenta con la duración e intensidad de este hábito y es mayor en los hombres que en las mujeres (Yamout, B. I., y Alroughani, R. 2018; Thompson, A.J., *et al.* 2018). De igual manera, la exposición a agentes infecciosos que involucran el sistema inmunitario como el virus de Epstein-Barr (EBV) aumenta hasta aproximadamente 30% el riesgo de padecer EM y presentar la infección sintomática, es decir, la mononucleosis infecciosa duplica el riesgo (Dobson, R. y Giovannoni, G. 2019). También se ha investigado la asociación de la deficiencia de vitamina D con el riesgo de EM y estudios han demostrado que la incidencia y prevalencia de ésta es mayor en áreas con menor radiación ultravioleta (UV) y baja exposición al sol en el otoño/invierno como sucede en Islandia (218/100,000

habitantes) o Noruega (248/100,000 habitantes) que se encuentran en latitudes altas (Nourbakhsh, B., y Mowry, E. M. 2019; Atlas of MS, 2022).

### Genética

La EM no se hereda directamente de padres a hijos, sin embargo, se considera poligénica ya que estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han identificado aproximadamente 200 variantes de susceptibilidad a EM, pero cada una de manera individual tiene un efecto pequeño y juntas explican del 20 al 30% de la heredabilidad de la EM. Muchos de estos genes tienen funciones conocidas en el sistema inmunitario innato y/o adaptativo, como es el caso de genes del receptor de interleucina 7 (IL-7) (CD127) y el receptor de IL-2 (CD25). Sin embargo, el gen *HLA-DRB1* de la región del antígeno leucocitario humano (HLA) localizado en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) ubicado en el cromosoma 6, representa el mayor riesgo asociado a EM puesto que los portadores heterocigotos del alelo *HLA-DRB1\*1501* tienen tres veces más probabilidades de desarrollar EM que los no portadores y los portadores homocigotos tienen un riesgo de seis veces más, asimismo, ser portador de *HLA-A\*02* se asocia con una probabilidad menor de desarrollar EM (Cree BAC y Hauser SL. 2019; Nourbakhsh, B., y Mowry, E. M. 2019). De igual manera, existe una mayor heredabilidad dentro de las familias ya que el riesgo de EM entre familiares de primer grado es mayor que en la población general, no obstante, el riesgo absoluto es de 2-5% (Yamout, B. I., y Alroughani, R. 2018).

### Obesidad/dieta

Las personas que tuvieron obesidad en la adolescencia y edad adulta temprana presentan un riesgo de EM y el riesgo es mayor en las personas que siguen presentando obesidad (Nourbakhsh, B., y Mowry, E. M. 2019). De igual manera, la obesidad puede interactuar con la variante de riesgo del antígeno HLA puesto que en un estudio de Hedström, A.K. y colaboradores (2014), la obesidad fue un factor de riesgo más fuerte en portadores de *HLA-B\*1501*. También, se ha encontrado una interacción entre la infección por EBV y la obesidad, ya que aumenta 14 veces la probabilidad de tener EM si presentan ambos factores (Hedström, A.K., *et al.* 2015). Por otro lado, la dieta influye en las probabilidades de presentar EM dado que una dieta rica en pescados grasos (Ej.: salmón y sardina) se asocia a una menor probabilidad de EM, principalmente, en personas con poca exposición al sol debido a que son una fuente de vitamina D (Bäärnhielm, M., *et al.* 2014).

### Sexo

Las mujeres tienen una mayor tendencia a desarrollar EM que los hombres. Esto puede estar relacionado con las hormonas ya que éstas pueden influir en la actividad del sistema inmunitario, además, las mujeres son más susceptibles a enfermedades autoinmunes e ir a revisiones médicas por lo que son diagnosticadas con mayor frecuencia (Yamout, B. I., y Alroughani, R. 2018).

### Enfermedades autoinmunes

Las personas que presentan ciertas enfermedades autoinmunes tienen un mayor riesgo de desarrollar EM. Algunas de éstas son la diabetes tipo 1 que se ha asociado con un riesgo de tres veces más de presentar EM o las enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn que confiere 1.5 veces más de riesgo (Almeida, C., *et*

al. 2022 y Kosmidou, M., *et al.* 2017). En el caso de la psoriasis o los trastornos de la tiroides, éstos son más comunes en pacientes con EM que en la población general (Bertado-Cortés, B., *et al.* 2020).

## Migración

Los estudios de migración respaldan que la EM es una consecuencia secundaria a una exposición ambiental ya que los adultos inmigrantes de países de baja prevalencia como la India Occidental a Europa, mantienen un bajo riesgo de desarrollarla. Sin embargo, los descendientes de éstos adquieren el riesgo de su nuevo lugar de residencia (Dobson, R. y Giovannoni, G. 2019).

## Inmunopatogénesis

La EM se caracteriza por la destrucción de la mielina mediada por el sistema inmune como consecuencia de una tolerancia inmunológica defectuosa que desencadena eventos patológicos (Lemus, H., *et al.* 2018; Nourbakhsh, B. y Mowry, EM., 2019). El modelo más utilizado para conocer la inmunopatogénesis de la EM es la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la cual se induce en animales mediante la inmunización periférica con componentes de proteína de mielina o tejido de la médula espinal o células T específicas de antígeno de mielina (Schaeffer, J., *et al.* 2015). De este modo, la EM se caracteriza por la inflamación, la desmielinización, la neurodegeneración y la gliosis (Hauser, SL y Cree, BAC. 2020). Estos eventos dan como resultado la formación de placas desmielinizadas tanto en la sustancia blanca como en la gris (Nourbakhsh, B. y Mowry, EM. 2019).

El primer paso para el ataque inmunológico (Figura 3), es la activación periférica de células autorreactivas. Si bien, éstas se eliminan durante el desarrollo a través del mecanismo de tolerancia central en el timo (células T) o la médula ósea (células B), algunas escapan de éste y son liberadas a la circulación en donde el mecanismo de tolerancia periférica las detiene, sin embargo, este mecanismo puede fallar debido a un desperfecto en la función de las células T reguladoras (Treg) o la resistencia de las células autorreactivas debido a la sobreexpresión de  $\beta$ -arrestina (Ward, M. y Goldman, MD. 2022). Aún no está completamente definido por qué se activan estas células autorreactivas, no obstante, existen diversas hipótesis al respecto. La primera sugiere que la activación se debe a un fenómeno conocido como mimetismo molecular, el cual ocurre cuando los péptidos de los autoantígenos y de los agentes infecciosos comparten secuencias o tienen similitudes estructurales ocasionando que las células T y B autorreactivas reaccionen con los antígenos del SNC como es el caso de la proteína básica de mielina (MBP), el constituyente principal de la vaina de mielina de los oligodendrocitos que comparte con el virus de herpes simple (VHS) la unión a los receptores de linfocitos T (TCR). Una segunda hipótesis menciona un antígeno ambiental como un virus ya que las infecciones virales provocan la activación de células presentadoras de antígenos (APC) que, a su vez, activan los linfocitos autorreactivos. La tercera hipótesis es que el sistema inmunológico reconoce a la mielina como extraña, siendo la MBP, la proteína proteolipídica (PLP), la glicoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG) y la glicoproteína asociada a mielina (MAG), los autoantígenos más estudiados (Yamout, BI y Alroughani, R. 2018; Schaeffer, J., *et al.* 2015; Wu, GF y Cruz, AH. 2021). Sin embargo, la ausencia de un antígeno viral o bacteriano consistente en los pacientes sugiere que la hipótesis de la presencia de un autoantígeno es la más acertada (Lemus, H., *et al.* 2018).

Tras la activación, las células autorreactivas atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) mediante diversos mecanismos como es la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas o metaloproteinasas de matriz (MMP). En el caso de la expresión de moléculas de adhesión, las células reactivas expresan integrinas en su superficie para unirse a las células endoteliales capilares de la BHE, las cuales reorganizan su membrana en dominios que poseen la molécula de adhesión celular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) permitiendo así, el paso de las células a través del endotelio de la BHE. Por otra parte, la producción de quimiocinas como la interleucina (IL) 17, IL-22, interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por parte de células endoteliales, alteran la BHE mediante la inhibición de la expresión de las proteínas de unión y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que perjudican la permeabilidad del endotelio. También los linfocitos pueden expresar MMP que alteran la lámina basal subendotelial (Yamout, BI y Alroughani, R. 2018; Schaeffer, J., *et al.* 2015; Filippi, M., *et al.* 2018).

Una vez que las células autorreactivas activadas periféricamente hayan ingresado al SNC se reactivan mediante la unión a los receptores tipo Toll de las células APC como lo son las células dendríticas (CD), los macrófagos y algunas células B y así, producir citocinas y quimiocinas específicas para reclutar más células inflamatorias como células T, monocitos, células B y macrófagos, ya que estos reconocen los componentes de la mielina y por ende, son los responsables del daño a ésta y la pérdida de células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) que ayudan a restaurar la conducción axonal al envolver las áreas desmielinizadas con mielina recién generada (Yamout, BI y Alroughani, R. 2018).

Esta reacción inflamatoria incluye la activación de células T CD4+ conocidas también como células T colaboradoras (Th), se pueden diferenciar en tres fenotipos cuando se unen a ellas diferentes interleucinas (IL-12, IL-4, IL-23, IL-6 e IL-21); las células Th1 que producen citoquinas proinflamatorias como el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que activan a los macrófagos, las células Th2 que secretan citocinas antiinflamatorias como la IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, las cuales reducen la inflamación e inducen la proliferación de células B para la producción de anticuerpos y las células Th17 que producen citoquinas que promueven la inflamación como IL-17, IL-21, IL-22 e IL-26 (Ghasemi, N., *et al.* 2017; Lewis, PA y Spillane, JE. 2019). También, las células T CD8+ o citotóxicas están presentes y producen proteínas como la perforina y la granzima que dañan a los axones, destruyen las células gliales y desencadenan la muerte de los oligodendrocitos afectando la reparación de la mielina (Ghasemi, N., *et al.* 2017; Nourbakhsh, B. y Mowry, EM. 2019). Por otro lado, los linfocitos B tienen efectos tanto positivos como negativos ya que secretan IL-10 que es una citocina antiinflamatoria pero también secretan el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y el TNF- $\alpha$  que promueven la inflamación y anticuerpos que contribuyen a la destrucción de la mielina mediante diversos mecanismos como la opsonización mediada por el complemento para facilitar la fagocitosis por los macrófagos o la estimulación de la citotoxicidad al unirse a células natural killer (NK) (Ghasemi, N., *et al.* 2017; Schaeffer, J., *et al.* 2015).

La microglía también juega un papel importante en la formación de lesiones tanto agudas como crónicas de la EM puesto que, ayuda a la ruptura de la BHE al liberar citoquinas proinflamatorias y libera glutamato que provoca excitotoxicidad, es decir, permite que niveles altos de iones de calcio ( $Ca^{++}$ ) entren a la célula y active enzimas que dañan el citoesqueleto del axón. También libera ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que provocan lesiones a la mielina, así como, factores solubles como el citocromo oxidasa que altera la actividad mitocondrial de las neuronas, dando como resultado, la alteración en el intercambio de iones a través de la membrana celular axonal y la falla de energía. Sin embargo, la microglía también facilita la remielinización y reparación neuronal puesto que produce factores solubles que promueven la proliferación y diferenciación de OPC e induce el desarrollo de células T-reg para suprimir las respuestas inflamatorias (Ward, M. y Goldman, MD. 2022; Wu, GF y Cruz, AH. 2021; Shah, A., *et al.* 2022)

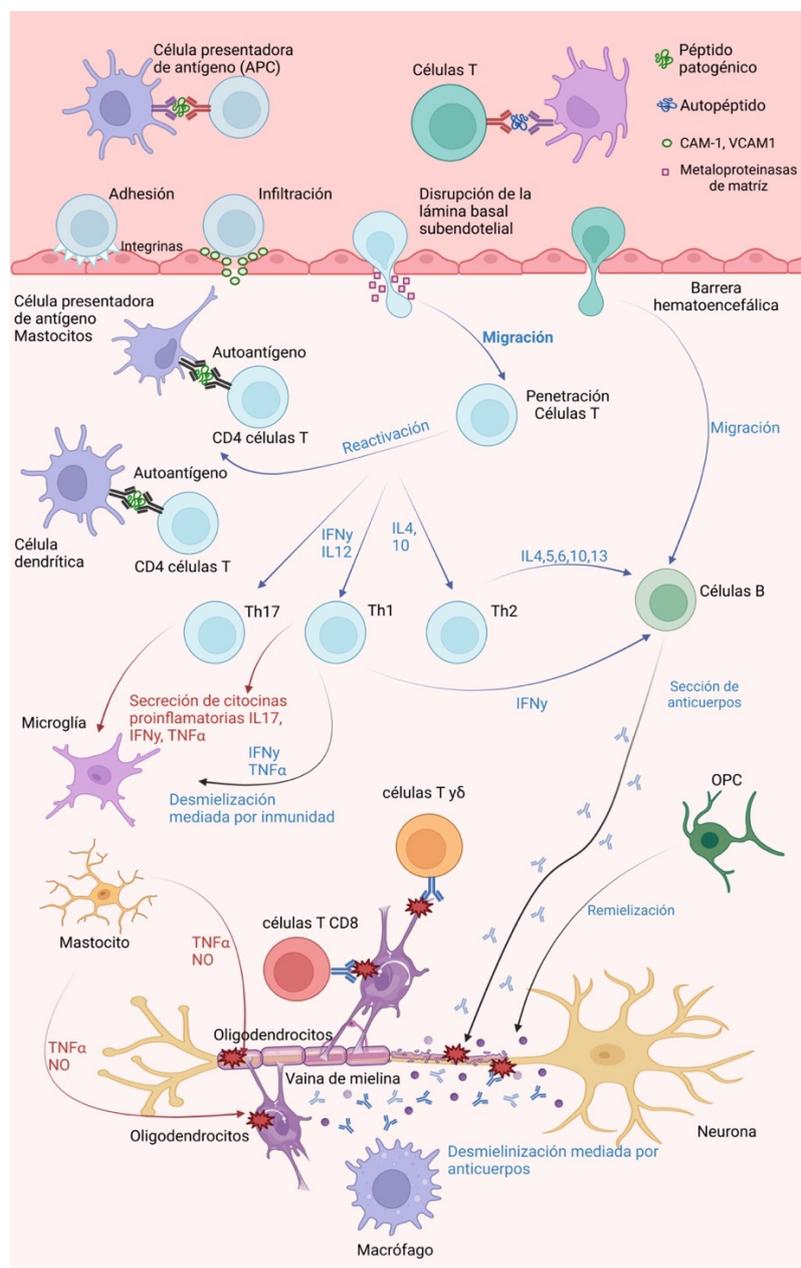


Figura 3. Inmunopatogénesis de esclerosis múltiple. Modificado de Schaeffer., *et al.* 2015 y creado con Biorender.

Cabe mencionar que, si bien existe una remielinización espontánea en las primeras etapas de la enfermedad, con el tiempo, ésta ya no logra compensar la progresión de la desmielinización provocada por la inflamación lo que ocasiona un daño neurológico permanente e irreversible, es decir, neurodegeneración. Esto puede deberse a que existe un reclutamiento inadecuado o insuficiente de OPC además de que la remielinización y desmielinización repetida puede provocar una pérdida de función y agotamiento de estas células. También los axones desmielinizados pueden presentar alteraciones como, por ejemplo, pueden expresar moléculas inhibitoras de la superficie celular como la molécula de adhesión de células neuronales polisialilada (PSA-NCAM) o pueden tener una fragmentación del neurofilamento (Lewis, PA y Spillane, JE. 2019; Schaeffer, J., *et al.* 2015). Finalmente, cuando la membrana axonal queda descubierta debido al daño estructural, se generan cambios en el potencial de acción y los canales de sodio se redistribuyen dando como resultado una conducción de impulsos nerviosos lenta o nula (Shah, A., *et al.* 2022).

## Signos y síntomas

Las manifestaciones de la EM pueden variar ampliamente dependiendo de la zona y la extensión del daño del SNC, así mismo, pueden iniciar tanto de forma brusca o ir evolucionando progresivamente y varían mucho entre pacientes y dentro de un mismo paciente (Ghasemi, N., *et al.* 2017). No obstante, la primera manifestación clínica son los brotes conocidos también como exacerbaciones. Un brote se define como un episodio de déficit neurológico con una duración de más de 24 horas, en ausencia de fiebre o infección (Aguilar-Juárez, PA., *et al.* 2019). Estos episodios empeoran en días o semanas, pero se remiten parcial o completamente (Lewis, PA. y Spillane, JE. 2019). Cuando el deterioro neurológico resulta de un aumento en la temperatura, fiebre o infección, se considera como una “pseudo exacerbación” (Hauser, S. L., y Cree, B.A.C. 2020)

El primer episodio neurológico en el 34-75% de los pacientes es la neuritis óptica (NO) que se caracteriza por una pérdida visual parcial o total en un ojo acompañada de una deficiencia de la visión del color (discromatopsia) y dolor durante el movimiento del ojo (Filippi, M., *et al.* 2018). De igual manera, los síntomas sensoriales como la parestesia (hormigueo en la piel), hipoestesia (disminución de la intensidad de las sensaciones) o el signo de Lhermitte que se describe como una descarga eléctrica que recorre la columna vertebral y las extremidades debido a la flexión del cuello, están presentes entre el 29-86% de los pacientes con EM y hasta un 43% como primera manifestación clínica (Aguilar-Juárez, PA., *et al.* 2019; Filippi, M., *et al.* 2018; Hauser, S. L., y Cree, B.A.C. 2020).

También, entre los síntomas más comunes se encuentra la debilidad muscular, la cual inicia frecuentemente en una de las extremidades inferiores, pero también puede presentarse de manera facial y si se acompaña de espasticidad, la marcha del paciente se ve alterada (Martínez-Altarriba, M.C., *et al.* 2015; Aguilar-Juárez, PA., *et al.* 2019). Así mismo, hasta un 95% de los pacientes con EM experimentan fatiga, la cual es la causa principal de incapacidad laboral ya que puede persistir incluso después de que el brote se haya remitido. En el caso del deterioro cognitivo, entre el 40-70% de los pacientes lo presentan y son más frecuentes en EMPP. Entre estos síntomas se incluye el deterioro de la velocidad y eficiencia de procesamiento de la información y la memoria episódica (Filippi, M., *et al.* 2018).

De manera general, los síntomas clínicos y los signos pueden implicar diversas vías como las vías motoras, sensoriales, visuales y cerebrales como se muestra en la figura 4 y muchos síntomas pueden estar interrelacionados, por ejemplo, la falta de sueño y la depresión empeora la fatiga diurna (Macaron, G., y Ontaneda, D. 2019). Schaeffer, J. *et al.* (2015) mencionan que, si el inicio de los síntomas es antes de los 20 años, la mayoría se relaciona con sensibilidad óptica mientras que en edades más tardías son predominantes los déficits motores.

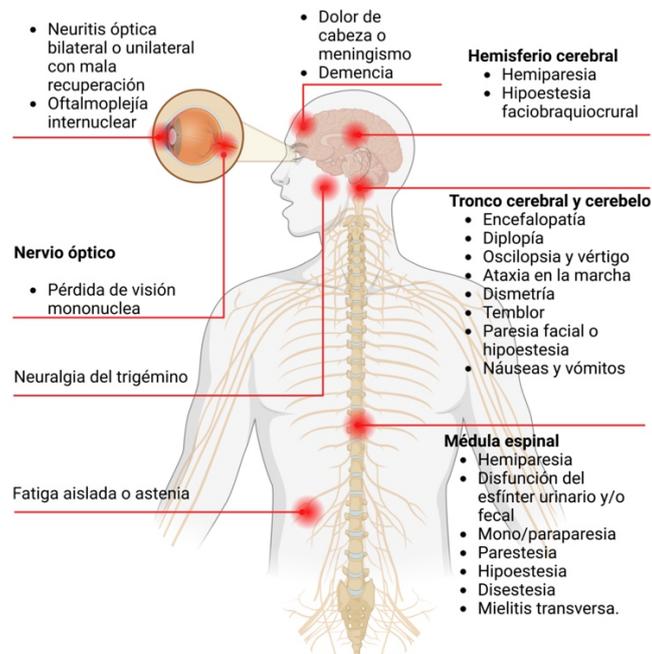


Figura 4. Síntomas de EM. Elaboración propia basada en Brownlee, W.J., *et al.* 2017 y Oh, J., *et al.* 2018. Creado con Biorender.

## Diagnóstico

El diagnóstico de EM puede ser difícil debido a la falta de una prueba específica y a la variedad de los síntomas entre pacientes (Wilder, P., *et al.* 2020). Por otro lado, tampoco se puede diagnosticar EM solo con estudios de imagen y/o laboratorio y sin presentación clínica. Esto debido a que otras enfermedades pueden imitar tanto en aspectos clínicos como estudios de laboratorio a la EM (Tabla 1) (Rahmanzadeh, R., *et al.* 2018). Es por esto, que el diagnóstico se basa en la presentación clínica respaldada por una historia clínica detallada, exámenes neurológicos, pruebas de imagen, análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) y estudios de potencial evocados (Cavanagh, J.J, y Levy, M. 2021).

- Historia clínica

El primer paso para la evaluación de un paciente por EM se basa en la aparición de dos o más brotes clínicamente distintos y compatibles con la enfermedad (Solomon, A.J. 2019 y Filippi, M., *et al.* 2018). Asimismo, es importante que el historial clínico sea lo más completo posible, para ello debe preguntarse al paciente sobre la aparición de los primeros síntomas, sus hábitos alimenticios, si cuenta con otras enfermedades como diabetes o tiroides, si existe un historial de medicamentos tomados o un abuso de sustancias y datos que permitan su identificación como es la edad, fecha de nacimiento, lugar de nacimiento y residencia actual (Ghasemi, N., *et al.* 2017)

- Resonancia magnética (RM)

Las pruebas de imagen se basan en la resonancia magnética (RM) que puede mostrar lesiones tanto en la materia blanca como gris. Estas lesiones pueden presentarse en cuatro áreas del SNC: periventricular, cortical, infratentorial y médula espinal (Wilder, P., *et al.* 2020).

Las lesiones hiperintensas en secuencia T2 son los hallazgos típicos en pacientes con EM, sin embargo, en imágenes T1 las lesiones pueden ser hipointensas conocidas también como agujeros negros (Imagen 1). Esta hipointensidad se asocia a un daño tisular más grave y sugiere desmielinización y pérdida axonal (Filippi, M., *et al.* 2018). Por otro lado, en secuencias FLAIR (*fluid-attenuation inversion recovery*), las lesiones pueden tener una forma ovoide o redondeada y por lo general se encuentran dentro del cuerpo caloso y áreas de sustancia blanca como periventricular y subcortical. De igual manera, de acuerdo con Micheli, F. y Pardal, F. (2019) se pueden observar los “dedos de Dawson”, los cuales son lesiones en forma lineal en aspecto de flama y que están perpendiculares a los ventrículos (Imagen 1).

Cabe mencionar que una RM anormal está presente en un 95-99% de los casos de EM ya establecida y en más del 80% de pacientes con SCA (Brownlee, W.J., *et al.* 2017). Aunque es una prueba sensible, llega a ser inespecífica ya que otras enfermedades inflamatorias del SNC muestran lesiones similares (Wilder, P., *et al.* 2020).

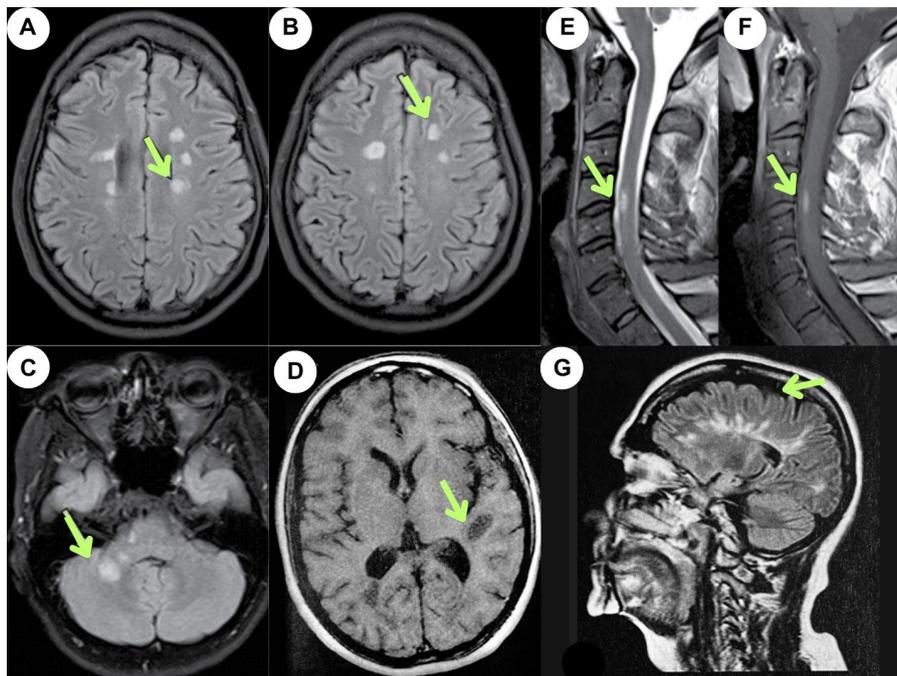


Imagen 1. Lesiones típicas de esclerosis múltiple. RM cerebral axial que muestra lesiones periventriculares (A), lesiones yuxtacorticales (B) y lesiones infratentoriales (C). Vista axial de secuencia T1 que muestra “agujeros negros” (D). Vista sagital en T2 que muestra lesión hiperintensa en médula espinal (E, F). Vista sagital de secuencia FLAIR que muestra “dedos de Dawson” (G). (Modificado de Brownlee, W.J., *et al.* 2017 y Micheli, F. y Pardal, F. 2019).

- Análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR)

En el caso del análisis del LCR se realiza una punción lumbar para obtener la muestra y es utilizada para buscar marcadores inflamatorios que están presentes en hasta el

88% de los pacientes con EM y/o bandas oligoclonales (BOC) (Filippi, M., *et al.* 2018). Cabe mencionar que se requiere una muestra de sangre paralela a la toma del LCR para demostrar que las BOC son de origen intratecal (Lewis, PA. y Spillane, JE. 2019). Los resultados más comunes son el recuento de glóbulos blancos ( $<25$  células/cm<sup>3</sup>), un índice de inmunoglobulina gamma (IgG) elevado y BOC que están presentes en el LCR, pero no en el suero (Brownlee, W.J., *et al.* 2017; Travers, B.S., *et al.* 2022). Las BOC se evalúan de manera cualitativa mediante electroforesis en gel de agarosa e inmunofijación y se observan en el 89% de los pacientes con EM (Solomon, A.J. 2019). La formación de BOC es debida a una proliferación de IgG contra un antígeno específico, lo cual corrobora la patogenia de la enfermedad (Shah, A., *et al.* 2022). Por el contrario, es poco común observar una concentración de proteínas por encima de 100 mg/dL, pleocitosis de 50 células/mm<sup>3</sup>, la presencia de neutrófilos o eosinófilos y bandas combinadas, es decir, que se observan tanto en el SNC como en el suero. Estos resultados pueden indicar otro diagnóstico como afecciones infecciosas e inflamatorias (Wilder, P., *et al.* 2020; Lewis, PA. y Spillane, JE. 2019).

- Potenciales evocados

Por otro lado, las pruebas de potenciales evocados miden la actividad eléctrica de las células nerviosas en respuesta a estímulos visuales, auditivos o táctiles y ayudan a detectar problemas en la conducción nerviosa y lesiones clínicamente silenciosas que no se logran apreciar en estudios de imagen (Garg, N., y Smith, T.W. 2015). En caso de observarse una latencia prolongada y una forma de onda bien conservada durante la prueba, sugiere desmielinización (Brownlee, W.J., *et al.* 2017).

- Criterios de McDonald

Es importante mencionar que se han propuesto varios criterios de diagnóstico para diagnosticar de manera precisa y rápida la EM, siendo los criterios de McDonald los más utilizados y propuestos por primera vez en 2001, no obstante, se han revisado en 2005, 2010 y más recientemente en 2017. Estos criterios se basan en demostrar que se han producido daños en el SNC diseminados en el tiempo (DIT) y el espacio (DIS) ocupando datos clínicos y/o pruebas de imagen o de laboratorio (Thompson, A.J., *et al.* 2018). En el caso de DIT, se refiere a que tiene que probarse que los daños se han producido en momentos diferentes y a DIS, que deben encontrarse evidencias de que hay lesiones en dos partes diferentes del SNC como mínimo (Sociedad Nacional de Esclerosis Múltiple, 2023). Hay que destacar que estos criterios han sido validados en cohortes de pacientes de Europa, Estados Unidos de América y Canadá menores de 50 años con EM, por lo que, no se recomienda su aplicación para el diagnóstico de EM en pacientes con otras presentaciones clínicas, que pertenezcan a otras poblaciones y que sean menores de 11 años (Solomon, A.J. 2019).

- Diagnóstico diferencial

Debido a la presentación variada y no específica de la EM, es posible que se realice un diagnóstico erróneo. No obstante, en la Tabla 1 se presentan diagnósticos diferenciales a considerar ya que, si bien se pueden confundir con EM, muestran hallazgos clínicos, de laboratorio o radiográficos atípicos de esta enfermedad (Travers, B.S., *et al.* 2022). Por ejemplo, la neuromielitis óptica puede ser un síntoma típico de EM, pero si viene acompañada con pleocitosis elevada en el LCR, puede indicar un trastorno infeccioso o inflamatorio distinto a EM (Solomon, A.J. 2019),

Tabla 1. Diagnósticos diferenciales en la esclerosis múltiple.

<b>Enfermedades desmielinizantes</b>	<b>Malignidades</b>
Encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM)	Linfoma primario del SNC
Neuromielitis óptica (NMO)	Síndromes paraneoplásicos
Encefalomiелitis de la glucoproteína de oligodendrocito asociada a mielina (MOG)	Glioma difuso de línea media
Mielitis transversa	Siringomielia
<b>Enfermedades sistémicas autoinmunes</b>	<b>Enfermedades vasculares</b>
Lupus eritematoso sistémico (LES)	Infarto cerebral isquémico
Síndromes antifosfolípidos	Malformación arteriovenosa dural espinal
Síndrome de Sjögren	Vasculitis primaria del SNC
Sarcoidosis	Leucoarainosis
<b>Infecciones crónicas</b>	<b>Enfermedades hereditarias</b>
Enfermedad de Lyme ( <i>Borrelia burgdorferi</i> )	Adrenoleucodistrofia
Sífilis ( <i>Treponema pallidum</i> )	Enfermedades mitocondriales
Brucelosis ( <i>Brucella melitensis</i> )	Enfermedad de Wilson
Herpes virus tipo 6	Enfermedad de Alexander
Hepatitis C	Gangliosidosis Gm2
Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	Xantomatosis cerebrotendinosa
Meningitis	Neuropatía óptica de Leber
Encefalitis	Enfermedad de Fabry
<b>Trastornos metabólicos</b>	
Deficiencia de vitamina B1	Deficiencia de cobre

Obtenido de Micheli, F. y Pardal, F., 2019; Travers, B.S., *et al.* 2022 y Filippi, M., *et al.* 2018

## Tratamiento

El tratamiento de la EM depende del fenotipo y la gravedad de la enfermedad, así como de otros factores individuales como la edad del paciente, la presencia de otras enfermedades y la respuesta del paciente al tratamiento. Aunque no existe una cura para la EM, hay diversos tratamientos disponibles que pueden retrasar la progresión de la enfermedad, reducir la frecuencia y la gravedad de los brotes y mejorar la calidad de vida de las personas con EM. Entre estos tratamientos se incluyen:

- Terapias modificadoras de la enfermedad (DMT)

El objetivo principal de los DMTs es cambiar el curso de la enfermedad al reducir la frecuencia de recaídas, la acumulación de síntomas y el número de lesiones mediante la supresión o modulación de la función inmunitaria (Hauser, S.L. y Cree, BAC, 2020). La mayoría de estos medicamentos ha demostrado una buena eficacia en pacientes con EMRR y SCA, pero no en pacientes con EM progresiva, además, si bien previenen un mayor deterioro del sistema nervioso, no revierten el daño ocurrido previamente (Garg, N. y Smith, T.W., 2015; Shah, A., *et al.* 2022). Durante más de una década, el interferón-beta (IFN) y el acetato de glatirámico (AG) fueron las únicas opciones de DMTs disponibles, sin embargo, en los últimos años se han aprobado varios agentes por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) que presentan diferentes mecanismos de acción y características como se muestra en la tabla 2 (Rahmanzadeh, R., *et al.* 2018).

Tabla 2. Fármacos modificadores de esclerosis múltiple.

Fármaco	Modo de acción	Año de aprobación por la FDA
<b>Ozanimod (Zeposia)</b>	Reducción reversible pero rápida de los linfocitos circulantes.	2020
<b>Ponesimod (Ponvory)</b>	Reduce la cantidad de linfocitos periféricos circulantes.	2021
<b>IFN-β-1a (Rebif)</b>	Reduce la entrada de células T a través de la BHE y establece un equilibrio entre Th1 y Th2. Además, reduce la inflamación al controlar la secreción de citocinas proinflamatorias.	2003
<b>Peginterferón beta-1a</b>	Reduce la penetración de células T a través de la BHE, al reducir las moléculas de adhesión en su superficie y evita su acumulación en el SNC.	2014
<b>Ofatumumab</b>	Anticuerpo monoclonal CD20 que ataca y destruye las células B.	2020

Obtenido de Shah, A., *et al.* 2022

- Tratamiento sintomático

Se centra en mejorar la calidad de vida de los pacientes al aliviar los síntomas más frecuentes de la enfermedad como es la fatiga, espasticidad o dolor mediante el tratamiento farmacológico específico para cada uno de ellos o bien, a través de terapias de apoyo como la fisioterapia, terapia del habla, yoga, estiramientos, modificación de la dieta, entre otros (Garg, N., y Smith, T.W. 2015). En la Tabla 3 se muestra con mayor detalle el tratamiento farmacológico de los síntomas más comunes de EM.

Tabla 3. Tratamiento farmacológico de síntomas de esclerosis múltiple.

Síntoma	Fármaco	Síntoma	Fármaco
Espasticidad	Baclofeno, tizanidina, benzodiazepinas, gabapentina. En espasticidad focal de extremidades se emplea toxina botulínica.	Dolor neuropático crónico	1ra línea: Gabapentina y pregabalina, antidepresivos tricíclicos. 2da línea: tramadol o codeína 3ra línea: cannabinoides como la marihuana
Disestesia/dolor	Cannabinoides y pregabalina	Síntomas del tracto urinario inferior	Antimuscarínicos orales, sondas permanentes y autocateterismos
Capacidad de caminar	Dalfampidina	Fatiga	Alfacalcidol, amantadina, modafinilo, armodafinilo y estimulantes del SNC (anfetaminas y metilfenidato)
Depresión	Desipramina y paroxetina	Problemas de sensibilidad	Neuralgia agua: carbamazepina, oxcarbacepina, lamotrigina.

Obtenido de Shah, A., *et al.* 2022; Micheli, F. y Pardal, F., 2019 y Filippi, M., *et al.* 2018.

- Tratamiento agudo

Se basa en primera instancia en el uso de corticosteroides que, al presentar efectos antiinflamatorios, aceleran la recuperación del paciente tras una recaída o brote. Los corticosteroides más usados son la metilprednisolona y la prednisona (Garg, N., y Smith, T.W. 2015). En cuanto a su administración, se recomienda una dosis intravenosa (IV) de metilprednisolona de 500 a 1000 mg/día durante tres a cinco días de acuerdo con la severidad del brote y a menudo es seguido de un ciclo oral de prednisona que comienza con una dosis de 60 a 80 mg/día y que se va reduciendo durante dos semanas (Aguilar-Juárez, P.A., *et al.* 2019; Yamout, B., *et al.* 2020). Otras consideraciones son la dexametasona o prednisona oral en dosis altas equivalentes a la metilprednisolona IV (Hauser, S. L., y Cree, B.A.C. 2020)

En dado caso que los pacientes no respondan correctamente y/o toleren los corticosteroides se recurre a terapias de segunda línea como la plasmaféresis que elimina los anticuerpos y otras proteínas que pueden estar contribuyendo a la inflamación mediante el recambio de plasma y se realizan de cinco a siete ciclos (40-60 mL/kg por ciclo) durante 14 días (Shah, A., *et al.* 2022; Hauser, S. L., y Cree, B.A.C. 2020).

Otra opción en pacientes resistentes a esteroides es la Ig IV con una dosis de 2 g/kg durante 3 a 5 días (Rahmanzadeh, R., *et al.* 2018 y Yamout, B., *et al.* 2020). Finalmente, la hormona adrenocorticotropina (ACTH), es una opción para personas con acceso intravenoso deficiente o que no toleran corticosteroides orales y se administra vía intramuscular en 80 a 120 unidades durante dos o tres semanas, no obstante, si bien está aprobada por la FDA rara vez se utiliza debido al alto costo (Hauser, S. L., y Cree, B.A.C. 2020)

- Tratamiento de neuroprotección y remielinización

Otro enfoque es la búsqueda de agentes remielinizantes que puedan reparar el daño producido y agentes neuroprotectores que prevengan la pérdida axonal. Si bien, se han obtenido diversas moléculas prometedoras en estudios preclínicos, al realizar ensayos clínicos han sido negativos o mostrado beneficios mínimos (Macaron, G., y Ontaneda, D. 2019).

- Evaluación del tratamiento

La interpretación de la eficacia del tratamiento es clave para la progresión clínica del paciente, siendo la escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) el instrumento más empleado y presenta una puntuación que va de 0 a 10, siendo 0 la ausencia de alteraciones y 10, la muerte producida por la enfermedad (Figura 5) (Macaron, G., y Ontaneda, D. 2019; Rojas., *et al.* 2019). Esta escala se basa en la combinación de exámenes neurológicos, de la capacidad de deambular y de llevar adelante actividades de la vida diaria.

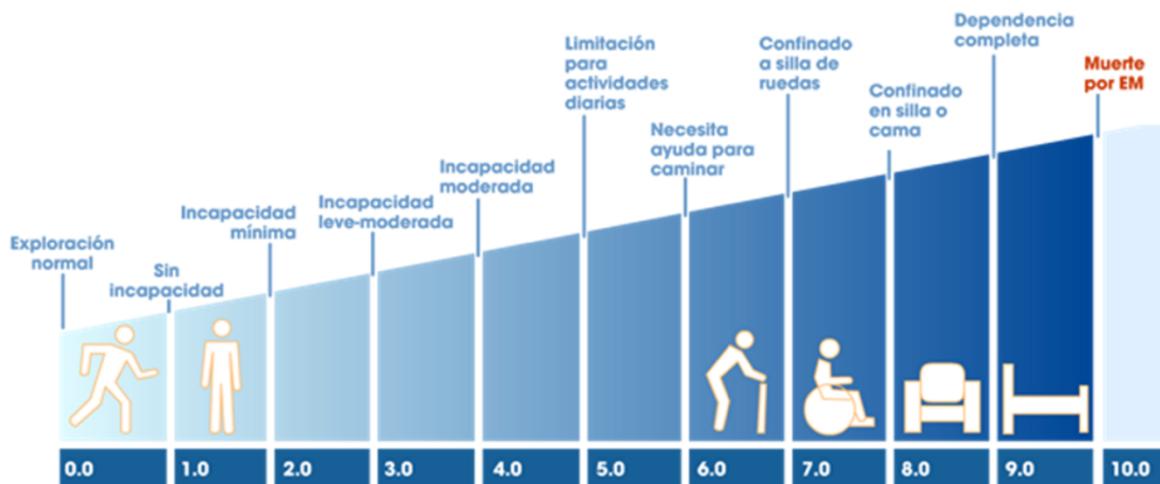


Figura 5. Escala ampliada del estado de discapacidad. Obtenido de Fundación Esclerosis múltiple, 2019.

Si bien, esta escala nos ayuda a evaluar la discapacidad física y su progresión, presenta ciertas limitaciones como son que muestra variabilidad intra e interevaluador, especialmente en puntajes bajos, disminuyendo su confiabilidad. También presenta poca sensibilidad para detectar cambios, principalmente en pacientes con puntajes superiores a 6.0 y está limitada en la evaluación de funciones cognitivas y la motricidad, en especial de las extremidades superiores (Rojas, J., *et al.* 2019).

Así, para superar estas deficiencias de la EDSS, se desarrolló el compuesto funcional de esclerosis múltiple (MSFC) que cubre tres dominios: la motricidad de miembros superiores, la deambulación y la función cognitiva mediante las pruebas mostradas en la Tabla 4. Una vez aplicadas las pruebas, se calcula un promedio (Z-core) de las pruebas para obtener la evaluación de los pacientes. Las ventajas de esta herramienta es que se limita la variabilidad inter e intra evaluador y presenta mayor sensibilidad, no obstante, la principal debilidad es cómo se interpreta el Z-score.

Tabla 4. Descripción de las pruebas utilizadas en el MSFC.

Dominio	Prueba	Descripción
Motricidad de miembros superiores	Prueba de 9 agujeros (9HPT)	El paciente debe incorporar clavijas en un tablero con 9 agujeros lo más rápido que pueda con su mano dominante. Se repite una vez más para cada mano.
Deambulación	Prueba de 7.5 metros	El paciente debe caminar 7.5 metros tan rápido como sea posible. Si los pacientes usan asistencia para deambular la utilizan al momento de la prueba. Se realiza por duplicado.
Función cognitiva	Prueba de suma de una serie auditiva (PASAT)	Evalúa la velocidad y flexibilidad del procesamiento de la información auditiva y la capacidad de cálculo. Al paciente se le presentan dígitos individuales cada 3 segundos que debe agregar al dígito anterior.

Obtenido de Macaron, G., y Ontaneda, D. 2019 y Rojas, J., *et al.* 2019.

Otra limitación que presentaba el MSFC era la ausencia de una medida de evaluación de la función visual, no obstante, se propuso la prueba de agudeza de bajo contraste. En esta prueba el paciente identifica el tamaño mínimo en el que pueden percibir las letras de un grado de contraste en particular mediante el uso de siete tarjetas de Sloan (Macaron, G., y Ontaneda, D. 2019). Cada una de estas tarjetas consta de filas de letras grises en fondo blanco que van disminuyendo en tamaño de arriba a abajo y de contraste que va del 100% al 0.6% (Imagen 2) (Balcer, L.J. y Frohman, E.M. 2010).

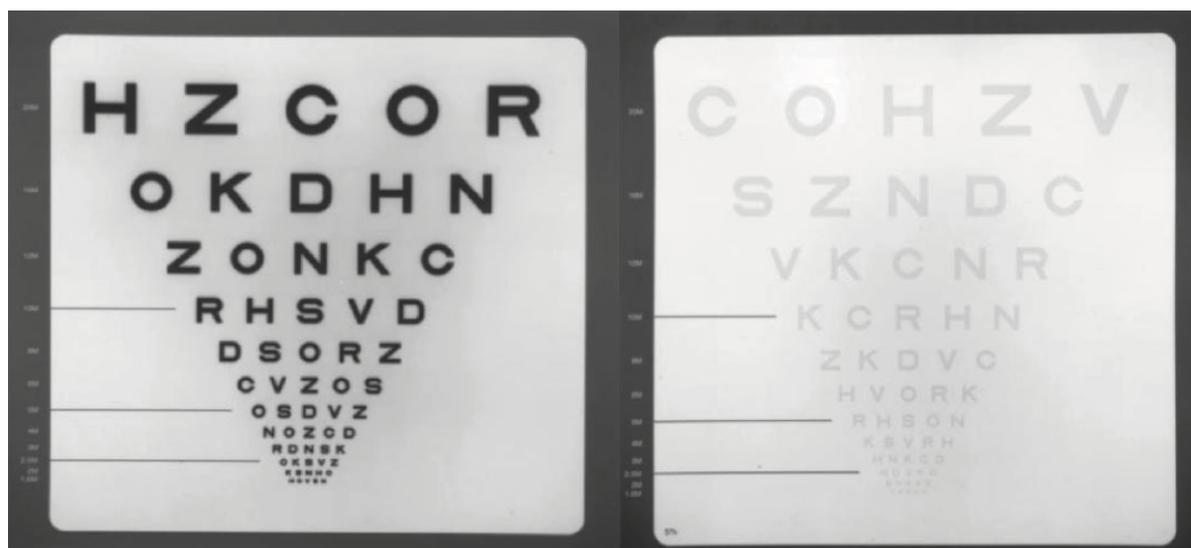


Imagen 2. Tarjeta de Sloan con contraste al 100% (izquierda) y al 5% (derecha). Obtenido de Balcer, L.J. & Frohman, E.M. 2010.

## Corticoesteroides

Los corticosteroides (CC) endógenos como el cortisol, fueron descubiertos en 1935 y son secretados por las glándulas suprarrenales, pero fue hasta 1950 que los CC análogos sintéticos fueron aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) (Kapugi, M., y Cunningham, K. 2019). Actualmente, son utilizados para tratar una variedad de indicaciones como la esclerosis múltiple, siendo la prednisona y la metilprednisolona (MP) a altas dosis, los corticosteroides más conocidos para el manejo de las recaídas agudas (Smets, I., *et al.* 2017). Su forma de dosificación puede realizarse de manera oral, intramuscular (IM), tópica, intravenosa (IV) o por inhalación (Kapugi, M., y Cunningham, K. 2019).

Los corticosteroides se clasifican en dos grandes grupos que son los mineralocorticoides y los glucocorticoides, siendo estos últimos, los encargados de los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios y son estructuralmente similares a la hormona endógena cortisol, no obstante, presentan modificaciones para mejorar su efecto antiinflamatorio, algunos de estos son la prednisolona, la fluticasona, la budesonida y al dexametasona (Alan, I. S., y Alan, B. 2018) (Figura 5).

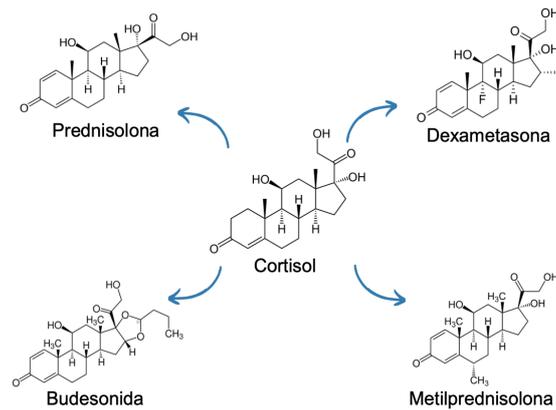


Figura 5. Estructura de glucocorticosteroides más conocidos, basados en modificaciones de la estructura natural del cortisol.

En cambio, los mineralocorticoides como la aldosterona, regulan los electrolitos y el equilibrio de sal y agua al afectar el transporte de iones en las células epiteliales de los túbulos renales (Kapugi, M., y Cunningham, K. 2019 y Hodgens, A. y Sharman, T. 2022). Los corticosteroides sintéticos presentan diferentes grados de estas propiedades como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de los principales corticosteroides.

Corticosteroide	Actividad glucocorticoide relativa	Actividad mineralocorticoide relativa	Duración de la acción (horas)	Vida media plasmática (min)
Acción corta				
Cortisol	1	1	8-12	90
Cortisona	0.8	0.8	8-12	80-118
Acción intermedia				
Prednisona	4	0.8	12-36	60
Prednisolona	4	0.8	12-36	115-200
Metilprednisolona	5	0.5	12-36	180
Acción prolongada				
Dexametasona	30	0	36-72	200
Betametasona	25	0	>48	300

Obtenido de Adcock, I. M., y Mumby, S. 2017 y Nicolaidis, N.C., *et al.* 2018.

### Mecanismo de acción

Los efectos de los glucocorticoides se producen a través tanto de mecanismos genómicos, los cuales tienen una latencia y persistencia de horas a meses, como mediante mecanismos no genómicos que presentan efectos inmediatos (segundos o minutos) (Muhammad, Y., *et al.* 2022)

### Mecanismo genómico

Este mecanismo está mediado a través del receptor citosólico de glucocorticoides (cGCR) que se encuentra dentro del citoplasma. Entonces, los glucocorticoides al ser sustancias pequeñas y lipofílicas se difunden fácilmente a través de la membrana celular y se unen al cGCR mediante la eliminación de proteínas de choque térmico que están unidas al receptor. Esto resulta en la formación de un complejo que se desplazará al núcleo. Una vez ahí, este complejo cGCR/CC afecta la transcripción génica y causa una transrepresión, es decir, inhibe la expresión de citocinas

proinflamatorias como INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , moléculas de adhesión celular y enzimas involucradas en la respuesta inflamatoria. De igual manera, ocurre una transactivación de factores de transcripción que induce la expresión génica de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ , (Figura 6) (Smets, I., *et al.* 2017; Hodgens, A. y Sharman, T. 2022; Muhammad, Y., *et al.* 2022).

### Mecanismo no genómico

Por otro lado, el mecanismo no genómico ocurre más rápidamente y está mediado por interacciones entre la hormona y el receptor glucocorticoide intracelular o el receptor de glucocorticoide unido a la membrana. Cabe mencionar que en este mecanismo están presentes dos efectos que son relevantes para la inmunopatogénesis de la EM. El primero es que segundos o minutos de la activación del receptor, se activa una cascada de señalización que produce la disminución de células inmunitarias activadas mediante apoptosis y una inhibición de la activación de más células T. Asimismo, se inhibe la fosfolipasa A2 que es crítica para producir citocinas inflamatorias. En segundo lugar, hay una reducción de la capacidad de adhesión y migración de células mononucleares de la sangre periférica hacia el SNC debido a una baja expresión de moléculas de adhesión en la superficie tanto de células endoteliales como de células T (Figura 6) (Smets, I., *et al.* 2017; Hodgens, A. y Sharman, T. 2022; Barnes P. J. 2017). Conviene mencionar que los corticosteroides a altas concentraciones como sucede en el tratamiento de EM, también inhiben la producción de células B y células T (Hodgens, A. y Sharman, T. 2022).

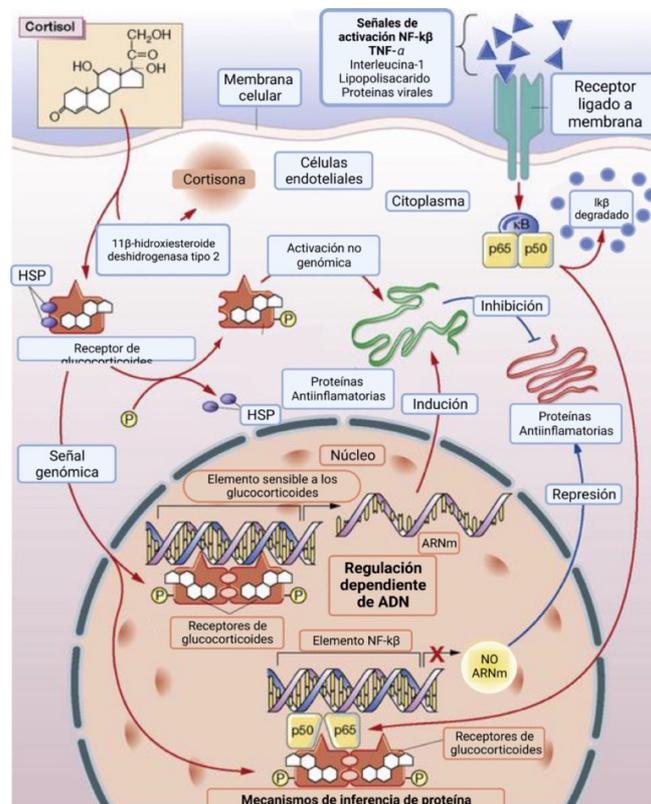


Figura 6. Mecanismos genómicos y no genómicos de los glucocorticoides mediados por el receptor de glucocorticoides en la inhibición de la inflamación. Donde: HSP, proteína de choque térmico; ARNm, ARN mensajero; NF, factor nuclear; P, fosfato; TNF, factor de necrosis tumoral. Las flechas rojas indican activación, la flecha azul represión y la X roja, falta de producto (Modificado de Rhen, T., y Cidlowski, J. A. 2005).

## Reacciones adversas

Aunque presentan muchos usos terapéuticos, su utilidad se ve limitada ya que los pacientes pueden presentar reacciones adversas (RAM) a éstos. El tipo de RAM experimentados y la gravedad varía de un paciente a otro y están relacionadas a las dosis administradas y la duración de uso ya que son más comunes en dosis más altas y un uso crónico (Kapugi, M., y Cunningham, K. 2019; Hodgens, A. y Sharman, T. 2022). Las RAM más comunes son hiperglucemia, hipertensión, osteoporosis, glaucoma, insomnio, cambios de humor, aumento del apetito, acné, sabor metálico y el aumento de la susceptibilidad a las infecciones (Alan, I. S., y Alan, B. 2018). En la Tabla 6, se clasifican las RAM más comunes asociadas con la administración de metilprednisolona a pacientes con esclerosis múltiple.

Tabla 6. Reacciones adversas asociadas a metilprednisolona en pacientes con esclerosis múltiple clasificadas de acuerdo con los diferentes sistemas afectados.

Sistema	Síntomas	Referencias
Dermatológico	Adelgazamiento de la piel Ictericia Prurito Urticaria Angioedema Enrojecimiento facial Dificultad para la cicatrización de heridas	Zoubek et al., 2019; Rotondo et al., 2018; Jongen et al., 2016.
Oftalmológico	Neuritis óptica Visión borrosa Formación de cataratas Aumento de presión intraocular	Sahraian et al., 2012; Miqdad et al., 2022 & Ocejo & Correa, 2021.
Cardiovasculares	Hipertensión Arritmias Taquicardia Retención de líquidos Hiperlipidemia Bradycardia sinusal Opresión en el pecho	Nociti et al, 2018; Rotondo et al., 2018; Ashtari et al., 2021; Miqdad et al., 2022.
Digestivo/gastrointestinal	Gastritis Úlceras pépticas Hemorragias Dolor abdominal Cambio en el apetito Pancreatitis	Zoubek et al., 2019; Rotondo et al., 2018; Ashtari et al., 2021; Jongen et al., 2016 & Yahiaoui et al., 2017.
Óseo/muscular	Hipopotasemia Osteonecrosis Hemiparesia Dificultad para caminar Ataxia Espasmo muscular Miopatía Osteoporosis	Ashtari et al., 2021; Sahraian et al., 2012; Jongen et al., 2016 & Ocejo & Correa, 2021.
Psiquiátricos	Cambios de estado de ánimo Psicosis Deterioro de memoria Trastorno del sueño Depresión Ansiedad	Rotondo et al., 2018; Ashtari et al., 2021; Jongen et al., 2016 & Skauby et al., 2017.
Metabólico/endocrino	Hiperglucemia Supresión de eje hipotálamo-pituitario- suprarrenal	Nociti et al, 2018; Rotondo et al., 2018; Ashtari et al., 2021 & Skauby et al., 2017.
Respiratorio	Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) Disminución/saturación de O2 Disnea	Ashtari et al., 2021

Tabla 6. Reacciones adversas asociadas a metilprednisolona en pacientes con esclerosis múltiple clasificadas de acuerdo con los diferentes sistemas afectados (continuación)

Sistema	Síntomas	Referencias
Hematológico	Leucocitosis Neutrofilia Linfopenia	Nociti et al, 2018 & Ocejo & Correa, 2021.
Hepático	Hepatitis aguda con necrosis lítica Enzimas hepáticas elevadas Lesión hepática	Zoubek et al., 2019; Rivero et al., 2008; Rotondo et al., 2018; Milovanovic et al., 2020 & Dumortier et al., 2017.
Otros	Náuseas Vómito Pérdida de peso Desequilibrio Cambio en el gusto Entumecimiento Mareo Debilidad Hirsutismo	Zoubek et al., 2019; Rotondo et al., 2018; Sahraian et al., 2012; Jongen et al., 2016; Miqdad et al., 2022; Milovanovic et al., 2020 & Skauby et al., 2017.

Cabe mencionar que otros factores pueden influir en los efectos adversos de los glucocorticoides como es el caso de la vejez, la naturaleza de la enfermedad o la interacción con otros medicamentos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) puesto que aumenta el desarrollo de úlceras gástricas, o inhibidores del CYP3A4 como la claritromicina, ya que se aumentan significativamente las concentraciones de los CC al reducir su aclaramiento (Smets, I., *et al.* 2017; Muhammad, Y., *et al.* 2022).

### Farmacocinética

Los glucocorticoides sufren metabolismo hepático y hasta el 95% de los metabolitos conjugados son excretados de manera renal mientras que el resto se pierde en el intestino (Kapugi, M., y Cunningham, K. 2019; Alan, I. S., y Alan, B. 2018). La prednisona es un profármaco de liberación retardada que se metaboliza en prednisolona (fármaco activo) en el hígado y disminuye la inflamación a través de los mecanismos descritos anteriormente (Puckett, Y., *et al.* 2022).

### Metabolismo de fármacos

El metabolismo de los fármacos es el proceso por el cual se alteran químicamente a través de sistemas enzimáticos especializados para que sus centros lipofílicos se conviertan en centros hidrofílicos, como consecuencia, se aumenta su solubilidad en agua facilitando así su eliminación mediante la orina o bilis. Este proceso es de suma importancia ya que la naturaleza lipofílica de estos compuestos, ocasiona que permanezcan más tiempo en el cuerpo lo cual podría conducir a una toxicidad, además, atenúa su actividad biológica. El metabolismo de fármacos se puede dividir en reacciones de fase I u oxidación y fase II o conjugación (González, F.J., *et al.* 2017; Zhao, M., *et al.* 2021)

La fase I comprende reacciones de oxidación, reducción e hidrolíticas que permiten la introducción de grupos funcionales como -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH. Estos grupos funcionales alteran de manera drástica las propiedades biológicas del fármaco conduciendo generalmente a la desactivación de este, sin embargo, en algunos casos

provoca la bioactivación del fármaco. Los fármacos inactivos que se convierten en activos mediante el metabolismo, se denominan profármacos. Las reacciones de esta fase son llevadas a cabo por enzimas del citocromo P450 (CYP), monooxigenasas y epóxihidrolasas (González, F.J., *et al.* 2017; Zhao, M., *et al.* 2021).

En el caso de las reacciones de fase II, los fármacos previamente modificados en la fase I, se conjugan a una segunda molécula que es polar para producir un metabolito más hidrosoluble. Es por ello que es importante que el sustrato posea oxígeno, nitrógeno o azufre puesto que sirven como aceptores de la parte hidrófila como el glutatión, ácido glucurónico o grupo acetilo. Las enzimas que catalizan las reacciones de esta fase son transferasas, las más importantes son las sulfotransferasas (SULT), uridina difosfato glucuronosiltransferasa (UGT), N-acetiltransferasa (NAT), metiltransferasa (MT) y glutatión-S-transferasa (GST) (González, F.J., *et al.* 2017; Zhao, M., *et al.* 2021).

## Enzimas del citocromo P450

### Generalidades

Las enzimas del citocromo P450 (CYP) son hemoproteínas conformadas por alrededor de 400-500 aminoácidos y un grupo hemo como sitio activo y fueron identificadas a principios de la década de 1980. Se pueden activar transcripcionalmente por varios xenobióticos y por sustratos endógenos como esteroides, ácidos biliares o grasas insaturadas y se expresan principalmente en el hígado, pero también pueden presentarse en otros órganos como los riñones, el tracto gastrointestinal, los pulmones, la piel o las glándulas suprarrenales (Zhao, M., *et al.* 2021; Manikandan, P. y Nagini, S. 2018).

### Nomenclatura y clasificación

La nomenclatura de estas enzimas depende de la familia, la subfamilia y el gen que las codifica. Así pues, se denominan con las letras "CYP" y un número arábigo que indica la familia a la que pertenece y se refiere a un grupo de enzimas que muestran un 40% de homología en la secuencia de aminoácidos. Luego, sigue una letra que indica la subfamilia y cada subfamilia están formada por enzimas con una homología de 55-65%. Posteriormente, se añade otro número arábigo que representa al gen/isoenzima que las codifica (Manikandan, P. y Nagini, S. 2018).

El proyecto del genoma humano ha identificado 57 CYP, los cuales están organizados en 18 familias y 43 subfamilias (Waring R.H. 2020). De estos 57 CYP, las isoformas pertenecientes a las familias CYP1, 2 y 3 son las responsables del metabolismo de alrededor del 75-80% de los medicamentos y de aproximadamente el 50% de la eliminación de estos, mientras que las otras familias tienen funciones endógenas (Zhao, M., *et al.* 2021; Manikandan, P. y Nagini, S. 2018).

### Importancia

La importancia de estas enzimas radica en que no solo convierten los medicamentos en productos más hidrofílicos, sino que contribuyen a las variaciones interindividuales en las respuestas a los medicamentos debido a variantes genéticas, epigenéticas y/o factores ambientales (género, edad, enfermedad, nutrición) (Zhao, M., *et al.* 2021).

Asimismo, algunos medicamentos son metabolizados por una sola isoforma mientras que otros pueden ser metabolizados por varias isoformas (Waring R.H. 2020).

La variación genética en los CYP generalmente es ocasionada por polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que alteran la secuencia y por ende la actividad de la isoforma (Waring R.H. 2020). Estos polimorfismos pueden ocurrir tanto en los intrones como en los exones del gen, mientras que en los primeros afectan la expresión génica, en los segundos pueden alterar la función del producto proteico (Manikandan, P y Nagini, S. 2018). Las variaciones se pueden clasificar en dos tipos principales que son la pérdida y la ganancia de función. En el primer caso, se reduce la eliminación de los fármacos y también se mejoran las concentraciones plasmáticas de estos y generalmente, se debe a un empalme alternativo que conduce a proteínas no funcionales, codones de terminación prematuros o intrones retenidos. Por el contrario, las variantes de ganancia de función son resultado de un mayor número de copias de los genes funcionales o variantes en los promotores lo que ocasiona una mejor eliminación de los fármacos, así como una reducción de sus concentraciones (Zhao, M., *et al.* 2021 y Waring R.H. 2020).

Con respecto a los fenotipos que se atribuyen a la respuesta a los medicamentos debido a las variaciones genéticas de los CYP, se han identificado cuatro tipos los cuales son, los metabolizadores lentos (PM), los metabolizadores intermedios (IM), los metabolizadores extensos (EM) y los metabolizadores ultrarrápidos (UM). De modo que, los PM generalmente sufren más reacciones adversas a una dosis normal del medicamento ya que son homocigotos para los alelos variantes o por la delección completa del gen, no obstante, si se trata de un profármaco, es posible que en lugar de sufrir RAM presente una falta de eficacia terapéutica. Los IM son heterocigotos para alelos específicos y los EM presentan dos alelos funcionalmente competentes. En cambio, los UM tienen dos o más genes activos en el mismo alelo, por ende, tienen una baja eficacia terapéutica y no responden a los medicamentos a una dosis normal, aunque si se trata de un profármaco pueden sufrir RAM al ser bioactivado (Zhao, M., *et al.* 2021).

### Subfamilia CYP3A

La subfamilia CYP3A, consta de cuatro genes *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* y *CYP3A43* ubicados en el cromosoma 7q22.1 y tiene un tamaño de 231 Kb (Tornio, A., y Backman, J.T. 2018 y Zanger, U. M., y Schwab, M. 2013). En el caso de *CYP3A4* y *CYP3A5* (Figura 7), son responsables del metabolismo de más del 65% de los medicamentos utilizados hoy en día y se expresan abundantemente en el hígado adulto, mientras que la expresión de las otras dos isoformas es menor, asimismo, la gran similitud de secuencia entre estas dos isoformas (>85%) resulta en una selectividad de sustrato superpuesta (Zanger, U. M., y Schwab, M. 2013; Zhao, M., *et al.* 2021; Manikandan, P. y Nagini, S. 2018).

Fujino, C. y colaboradores (2021), mencionan que los cambios en la expresión de enzimas de la subfamilia CYP3A a la que pertenece *CYP3A5* puede alterar el metabolismo de sustancias endógenas afectando la homeostasis del cuerpo lo que a su vez puede provocar efectos adversos como enfermedades y toxicidad.

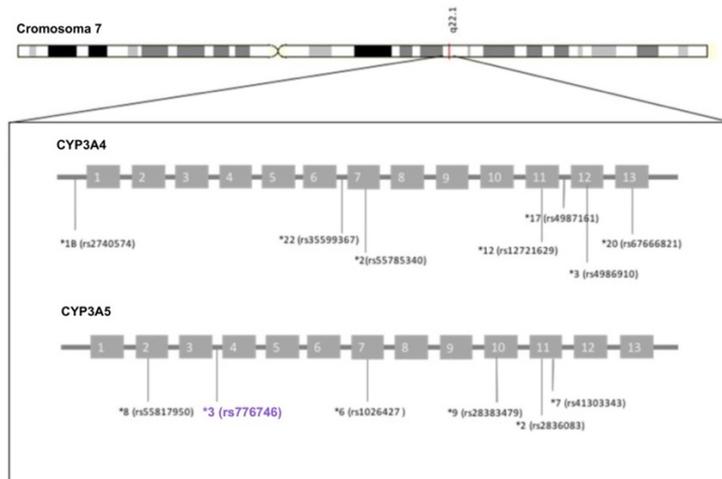


Figura 7. Ubicación de polimorfismos de CYP3A4 y CYP3A5 (Saiz-Rodríguez, M., *et al.* 2020)

### Gen CYP3A5

El gen *CYP3A5* abarca una región de aproximadamente 32 kilobases (kb) y está conformado por 13 exones y codifica la proteína CYP3A5 que está compuesta por 502 aminoácidos (Rodríguez-Antona, C., *et al.* 2022; Chen, L. y Prasad, G.V.R. 2018). Esta proteína se expresa principalmente en el hígado, el cual es un órgano vital en la fisiología humana debido a que es el lugar donde se metabolizan compuestos tanto exógenos como endógenos para ayudar a su eliminación del cuerpo (Guy, J.F., *et al.* 2017). De manera extrahepática, esta enzima se expresa en los intestinos, riñones, glándulas suprarrenales, próstata, testículos, pulmones, sangre, cerebro, glándula pituitaria y músculos esqueléticos (Klyushova, L.S., *et al.* 2022).

Entre los compuestos exógenos metabolizados por CYP3A5, se encuentran el 30% de los fármacos prescritos clínicamente como son antibióticos (eritromicina), benzodiazepinas (diazepam), bloqueadores de canales de calcio (amlodipino), estatinas (simvastatina) e inmunosupresores como Tracolimus y metilprednisolona (Bochud, M., *et al.* 2009 & Vuppalanchi, R. 2018).

En cuanto a los compuestos endógenos, Fujino, C., *et al.* (2021) y Klyushova, L.S., *et al.* (2022), mencionan que CYP3A5 está involucrado en el metabolismo del colesterol, ácidos biliares, cortisol, vitamina D y hormonas sexuales como la testosterona, estradiol y progesterona. Entre estos compuestos, la vitamina D destaca ya que como se mencionó anteriormente, su deficiencia se ha estudiado como un factor ambiental involucrado en la etiología de la EM. Ghandi, F. y colaboradores (2021) mencionan que esta deficiencia lleva a una formación desregulada de células T, NK y células B en el SNC que a su vez conduce a una inflamación que daña las neuronas y oligodendrocitos. Por otro lado, el exceso de vitamina D también ha sido objeto de estudio como en el caso de Häusler, D. y colaboradores (2019) quienes demostraron tanto en ratones sanos como con EAE y en células T humanas *in vitro*, que dosis altas de vitamina D agravan la inflamación y la pérdida de mielina en el cerebro y la médula espinal ya que se activan en mayor medida células Th1 y Th17 que son de fenotipo proinflamatorio asimismo, aumentó la capacidad fagocítica de los macrófagos lo que genera una respuesta inmune autorreactiva. Por el contrario, la frecuencia de células Treg fue ligeramente menor lo cual puede permitir una mayor presencia de células autorreactivas en el SNC (Ward, M. y Goldman, MD. 2022).

Otro compuesto endógeno metabolizado por CYP3A5 es el colesterol y del cual se obtienen el 4 $\beta$ -hidroxicolesterol y 25-hidroxicolesterol (25-HC) (Fujino, C., *et al.* 2021; Wright, W.C., *et al.* 2019). En general, el colesterol es esencial tanto para la estructura de la membrana celular pues organiza microdominios o balsas lipídicas, donde se encuentran receptores, canales iónicos y enzimas de señalización, como para la composición de la mielina. Asimismo, este compuesto es precursor de hormonas esteroides, vitamina D y ácidos biliares y también tiene un papel importante en la regulación y señalización inmunitaria. (Odnoshivkina, U. G., *et al.* 2022 y Lorincz, B., *et al.* 2022).

Cabe mencionar que el colesterol sintetizado en la periferia no puede traspasar la BHE, por lo que, el colesterol se sintetiza de *ново* en el SNC con ayuda de la vía de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A-reductasa (HMGCR) (Pineda-Torra, I., *et al.* 2021). Este colesterol periférico es transportado en el torrente sanguíneo mediante lipoproteínas y de las cuales existen dos tipos principales: las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas lipoproteínas se unen a apoproteínas para formar apolipoproteínas (Apo). La ApoA-I es la apolipoproteína principal de HDL mientras que, la ApoB es el principal componente de LDL (Pashaei, S., *et al.* 2021 y Gardner, L. A., y Levin, M. C. 2015).

Por otro lado, los oxisteroles como el 25-HC, regulan el equilibrio del colesterol en las células y pueden atravesar barreras vasculares como la BHE. Así, la producción adecuada de 25-HC ayuda a modular la neuroinflamación y reduce la pérdida neuronal puesto que ciertas células gliales durante condiciones patológicas exhiben receptores de alta afinidad a este compuesto, tal es el caso del receptor acoplado a proteína G 183 (GPR183) el cual al ser estimulado en oligodendrocitos, se vio involucrado en la remielinización en un modelo de esclerosis múltiple. En cuanto a los astrocitos, la activación de GPR183 inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias (Odnoshivkina, U. G., *et al.* 2022).

El 25-HC también es un ligando del receptor hepático X (LXR), el cual previene las respuestas inflamatorias mediante la regulación a la baja de genes proinflamatorios como la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y el TNF- $\alpha$  (Pineda-Torra, I., *et al.* 2021). Este receptor está presente en macrófagos y al estimularlo, cambia el fenotipo de estas células de proinflamatorio (M1) a antiinflamatorio (M2) (Crick, P.J., *et al.* 2017 y Odnoshivkina, U. G., *et al.* 2022). En el caso de células T, al activar el LXR, se reduce la infiltración de éstas al SNC y se inhibe su diferenciación hacia un fenotipo inflamatorio (Th17) reduciendo así, la gravedad de EAE (Pineda-Torra, I., *et al.* 2021).

Por otra parte, la activación de los LXRs controla genes que ayudan al transporte de los lípidos como por ejemplo, los transportadores dependientes de ATP (ABC) que contribuyen al transporte inverso del colesterol puesto que un exceso de colesterol es tóxico para las células. También controla las apolipoproteínas (Apo) como ApoE y ApoA-I que transportan el colesterol entre células (Odnoshivkina, U. G., *et al.* 2022; Pineda-Torra, I., *et al.* 2021 y Griffiths, W. J., & Wang, Y. 2022). En el caso de los ABC, ABCA1 y ABCG1 son las más importantes para prevenir la formación de células espumosas, las cuales son células con exceso de colesterol intracelular, el cual a su vez, induce la activación del inflammasoma y la producción de citocinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Aguilar-Ballester, M., *et al.* 2020).

Con respecto a las apolipoproteínas, ApoA-I presenta un posible papel protector en la inflamación y la autoinmunidad puesto que actúa como un factor de inhibición de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y también, es responsable de la inhibición de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, que ayudan a la extravasación de células T autorreactivas a través de la BHE en la patogénesis de EM (Gardner, L. A., y Levin, M. C. 2015 y Meyers, L., *et al.* 2014). Otro receptor de 25-HC es el receptor huérfano relacionado a RAR (ROR), el cual al activarse ayuda a suprimir la neuroinflamación mediante la inhibición de la actividad del factor transcripcional NF- $\kappa$ B y la inhibición de producción de citocinas proinflamatorias por parte de células gliales (Odnoshivkina, U. G., *et al.* 2022).

Cabe mencionar que, la expresión de esta isoforma se ha encontrado predominante en el sexo femenino cuando se han analizado muestras de tejido hepático (Rodríguez-Antona, C., *et al.* 2022; Idda, M.L., *et al.* 2021). De acuerdo con Thangavel, C., *et al.* (2013), esta diferencia es debida a la presencia de la hormona de crecimiento ya que las mujeres pueden expresar CYP3A5 aún en presencia de concentraciones subóptimas de esta hormona, mientras que los hombres no.

#### Polimorfismo *CYP3A5\*3* (rs7767446)

En 2001, Hustert y colaboradores descubrieron la presencia de una variante (6986A>G) en el intrón 3 de *CYP3A5* que resulta en un empalme alternativo y la creación de un codón de parada prematuro. Este empalme provoca una proteína truncada que da paso a una reducción grave de las enzimas *CYP3A5* funcionales (Guo, J., *et al.* 2022). Así, los individuos homocigotos para el alelo *CYP3A5\*3* no expresan enzimas *CYP3A5*, mientras que los individuos que portan al menos un alelo *CYP3A5\*1* pueden expresar enzimas *CYP3A5* en diversos grados (Htun, Y.Y., *et al.* 2018).

La frecuencia alélica de este polimorfismo varía entre las poblaciones, siendo muy común en estadounidenses, europeos, asiáticos del este y del sur, con una frecuencia del 80, 94, 71 y 67%, respectivamente (Zhou, Y. *et al.*, 2017). En el caso de la población de mexicana, la frecuencia varía de acuerdo a la zona geográfica estudiada. Esto es debido a que esta población se divide en dos grupos, de acuerdo con Henderson, L.M. y colaboradores (2018). El primer grupo son los grupos indígenas que cuentan con más de 68 etnias y presentan diferencias entre ellas. El segundo grupo son los mestizos, que representan el 85% de los habitantes de México y son resultado de la mezcla entre europeos, amerindios y esclavos africanos, que se inició hace 500 años después de la conquista española, la cual provocó una disminución geográfica en las poblaciones nativas debido a las guerras, hambrunas y enfermedades epidemiológicas (Torres-Valadez, R., *et al.* 2022; Aguilar-Velázquez, J.A. y Rangel-Villalobos, H. 2021 y Sosa-Macías, M., y Lleren, A. 2013).

En cuando a *CYP3A5* solo el 10% de los caucásicos (Europa) lo expresan mientras que aproximadamente el 60% de los africanos tienen una copia de éste y es por ello que tienen una tendencia a producir la enzima funcional, sin embargo, esto puede deberse a que este alelo aumenta la retención de Na<sup>+</sup> y agua, otorgando una ventaja en clima seco como pasa en poblaciones de África (Guy, J.F., *et al.* 2017 y Galaviz-Hernández, C., *et al.* 2020).

Así, este polimorfismo ha sido objeto de estudio en diversas poblaciones para determinar su relación con diversas enfermedades como el cáncer de próstata o la hipertensión y principalmente, establecer la respuesta farmacológica a ciertos medicamentos como el Tracolimus.

## JUSTIFICACIÓN

En México y según datos de la Secretaría de Salud, aproximadamente 20 mil personas padecen esclerosis múltiple, convirtiéndose en la segunda causa de discapacidad entre los jóvenes después de los accidentes de tráfico (INSABI, 2022). Por esto, es importante seguir investigando sobre los factores asociados al desarrollo de esta enfermedad y así, proporcionar información acerca de los posibles mecanismos implicados en la patogénesis para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos.

Es importante mencionar que aún en los tratamientos ya existentes, como es el caso del tratamiento agudo que ayuda a disminuir y controlar los brotes, siguen existiendo limitantes como la falta de eficacia o la presencia de reacciones adversas a medicamentos (RAM) causados por la variación en la capacidad metabolizadora de las personas (Waring R. H. 2020).

De este modo, la proteína CYP3A5 es de interés al estar involucrada en mantener tanto la homeostasis del cuerpo al metabolizar compuestos endógenos para su desecho, cómo por ser encargada de metabolizar fármacos inmunosupresores como los corticoesteroides, utilizados en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Teniendo en cuenta esto y gracias a la farmacogenética, ha sido posible comprender cómo la variabilidad genética influye en el tratamiento farmacológico y así, poder personalizar tanto el tratamiento como la atención al paciente.

Finalmente, la prevalencia de polimorfismos genéticos varía a lo largo de las poblaciones y si bien se han realizado estudios sobre la genotipificación de CYP3A5\*3, han sido principalmente para poblaciones europeas, asiáticas y/o africanas y pocos han sido dirigidos hacia la población mestizo mexicana que presenta esta enfermedad (Sosa-Macías, M., y Llerena, A. 2013)

## OBJETIVO GENERAL

Genotipificar el polimorfismo *CYP3A5\*3* en pacientes mexicanos con esclerosis múltiple mediante PCR-RFLP.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Especificar el peso molecular del amplicón con base en la secuencia de nucleótidos del gen y la secuencia de oligonucleótidos.
2. Determinar la calidad de DNA de muestras mediante electroforesis.
3. Determinar la cantidad de DNA de muestras mediante espectrofotometría en luz UV.
4. Reconocer la secuencia y peso molecular del amplicón de *CYP3A5\*3* mediante la técnica de PCR-RFLP.

5. Determinar la frecuencia de genotipos y alelos de *CYP3A5\*3* en población mexicana tanto en pacientes como en un grupo control.
6. Comparar la frecuencia de genotipos y alelos de *CYP3A5\*3* con la reportada en otras poblaciones.
7. Determinar la asociación de *CYP3A5\*3* con el desarrollo de la esclerosis múltiple mediante el análisis de casos y controles.

## HIPÓTESIS

La frecuencia del polimorfismo *CYP3A5\*3* en la muestra de estudio es diferente a la reportada en otras poblaciones. Es probable que el polimorfismo *CYP3A5\*3* esté asociado a esclerosis múltiple en población mestizo mexicana, si su frecuencia es diferente entre controles y pacientes.

## METODOLOGÍA

### Selección de muestras

Las muestras de pacientes fueron seleccionadas del banco de DNA genómico del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS) en base a los siguientes criterios:

#### Criterios de inclusión para pacientes

- Pacientes con diagnóstico con esclerosis múltiple (EM)
- Población mestizo mexicana
- Género y edad de inicio de la enfermedad indistinto

#### Criterios de exclusión para pacientes

- Diagnóstico de enfermedad desmielinizante diferente a esclerosis múltiple
- Pacientes pertenecientes a una población diferente a mestizo mexicana

#### Criterios de eliminación para pacientes

- Muestras de DNA con baja calidad y/o poco volumen que impedirían realizar la metodología experimental.

Las muestras de voluntarios sanos fueron seleccionadas del mismo banco y de acuerdo a los siguientes criterios:

#### Criterios de inclusión para población sana

- Personas sin ningún tipo de enfermedad neurológica
- Población mestizo mexicana
- Género y edad de inicio de la enfermedad indistinto

### Obtención de muestra sanguínea y extracción de DNA

Se les brindó una carta de consentimiento informado a cada uno de los pacientes para conseguir una muestra de sangre periférica mediante punción venosa que fue

recolectada en tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante.

Posteriormente, el DNA genómico fue extraído a partir de linfocitos mediante la eliminación de los eritrocitos a partir del procedimiento de lisis con buffer TTS (Tris-Tritónx100-Sacarosa) como se observa en el anexo 1.

#### Cuantificación de DNA

Se midió la concentración (ng/ $\mu$ L) y pureza (relación 260 nm/280 nm) de las muestras de DNA mediante espectrofotometría empleando el equipo *JenWay*® *Genova nano* previamente calibrado con 3  $\mu$ L de agua inyectable, usada como blanco.

#### Evaluación de la integridad del DNA

Las muestras de DNA se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 100V durante aproximadamente 20 minutos en buffer de corrimiento TBE 1X (Tris-EDTA-Ácido bórico) para luego analizar el gel de agarosa en un transiluminador ultravioleta. Para cargar el gel se ocupó 2  $\mu$ L de muestra mezclada con 1  $\mu$ L de colorante de carga tipo III (azul de bromofenol y xileno cianol FF) y 1  $\mu$ L de GelRed® 5X (Anexo 2)

La integridad se clasificó de acuerdo con un sistema de cruces donde:

+: DNA degradado.

++: banda de DNA visible, pero con degradación.

+++: banda de DNA visible íntegra, pero con poca degradación.

++++: banda de DNA visible e íntegro.

#### Genotipificación

El análisis de genotipos se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa seguida por la digestión con enzimas de restricción conocida como PCR-RFLP.

#### Amplificación de DNA por PCR

Se amplificaron las regiones génicas donde se ubica el polimorfismo *CYP3A5\*3* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la Tabla 7 y Figura 8 se muestran los oligonucleótidos y las condiciones de PCR empleados, que se basan en la técnica descrita previamente por Seredina y colaboradores (2012).

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación del polimorfismo *CYP3A5\*3*.

Polimorfismo	Primer	Secuencia	Longitud (nt)	Tamaño de amplicón (pb)
CYP3A5*3	Forward	5'-catcagttagtagacagatga-3'	21	292
	Reverse	5'-ggtccaacaggaagaata-3'	21	

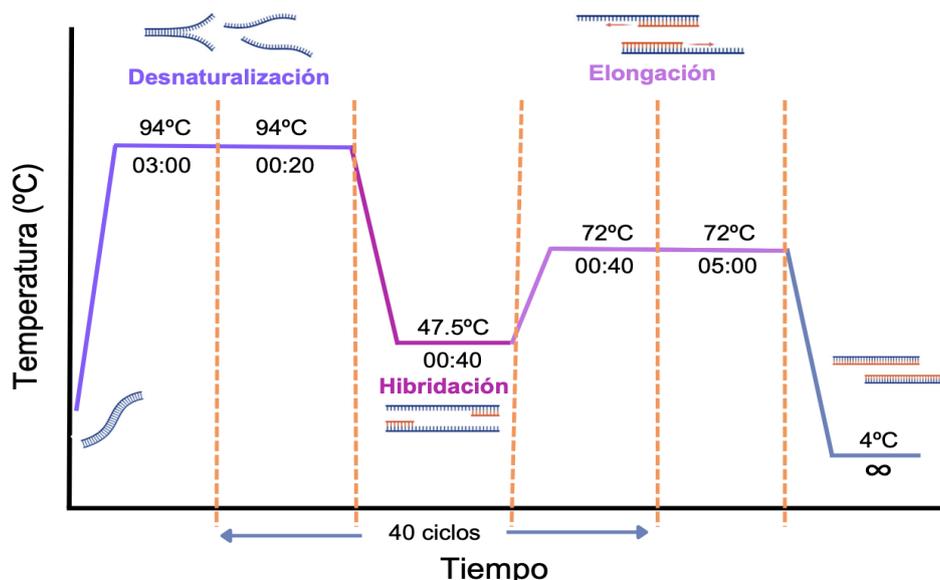


Figura 8. Condiciones de reacción de PCR para polimorfismo *CYP3A5*.

Referente a la composición de la reacción de la PCR, como es la concentración de DNA y la concentración de oligonucleótidos se muestra en la Tabla 8. Cabe mencionar que en este protocolo fue utilizado el reactivo conocido como MasterMix de la marca QIAGEN, el cual contiene dNTP's (desoxinucleótidos trifosfato) a una concentración de 10 mM, Taq polimerasa (2.5 unidades/reacción) y 3 mM de iones Magnesio (MgCl).

Tabla 8. Componentes de la reacción para PCR para *CYP3A5*.

Reactivo	Concentración	Cantidad (µL)
DNA genómico	200-300 ng/µL	2
Primer F	200 ng/µL	1
Primer R	200 ng/µL	1
Mastermix	Variable	10
H <sub>2</sub> O libre nucleasas	c.b.p	6

Para comprobar que se obtuvieron los amplicones esperados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% a 100 V durante 20 minutos en buffer TBE 1X. En cada pozo se colocó 2 µL del producto de PCR, 1 µL de colorante de carga y 1 µL de GelRed® 5X. Se utilizó un marcador de peso molecular marca *Invitrogen*<sup>TM</sup> 50 pb DNA Ladder para verificar el tamaño del amplicón.

#### Digestión de DNA con enzimas de restricción

Posterior a la amplificación, se realizó la detección de la presencia o la ausencia del polimorfismo *CYP3A5*\*3 mediante la técnica de restricción de fragmentos con longitud polimórfica (RFLP), la cual hace uso de endonucleasas de restricción. La enzima empleada y sus sitios de corte se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Sitio de corte y fragmentos generados por las enzimas utilizadas para RFLP.

Polimorfismo	Enzima de restricción	Sitio de corte
<i>CYP3A5</i> *3	<i>SspI</i> (Thermo Scientific)	5' GGTGAN <sub>8</sub> / 3' 3' CCACTN <sub>7</sub> / 5'

Para llevar a cabo esta técnica, cada reacción se preparó como se indica en la Tabla 10 y los tubos se incubaron en un termociclador (Labnet™ MultiGene™ OptiMax) durante 16 horas a 37°C. Cabe mencionar que el buffer 1X utilizado en las reacciones, está compuesto por 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl y 0.1 mg/mL de BSA, como se puede observar en la guía de usuario perteneciente a la enzimas de restricción (Anexo 3).

Tabla 10. Condiciones para RFLP

Gen	DNA amplificado	Buffer 1X	Enzima de restricción	H <sub>2</sub> O
CYP3A5	15 µL	2 µL	0.5 µL de SspI (10U/µL)	2.4 µL

#### Electroforesis con geles de acrilamida

Una vez transcurrido el tiempo de digestión enzimática, se realizó una electroforesis vertical en gel de acrilamida 10% para CYP3A5 (Tabla 11) para observar los fragmentos obtenidos e identificarlos según su peso molecular como se aprecia en la Figura 9.

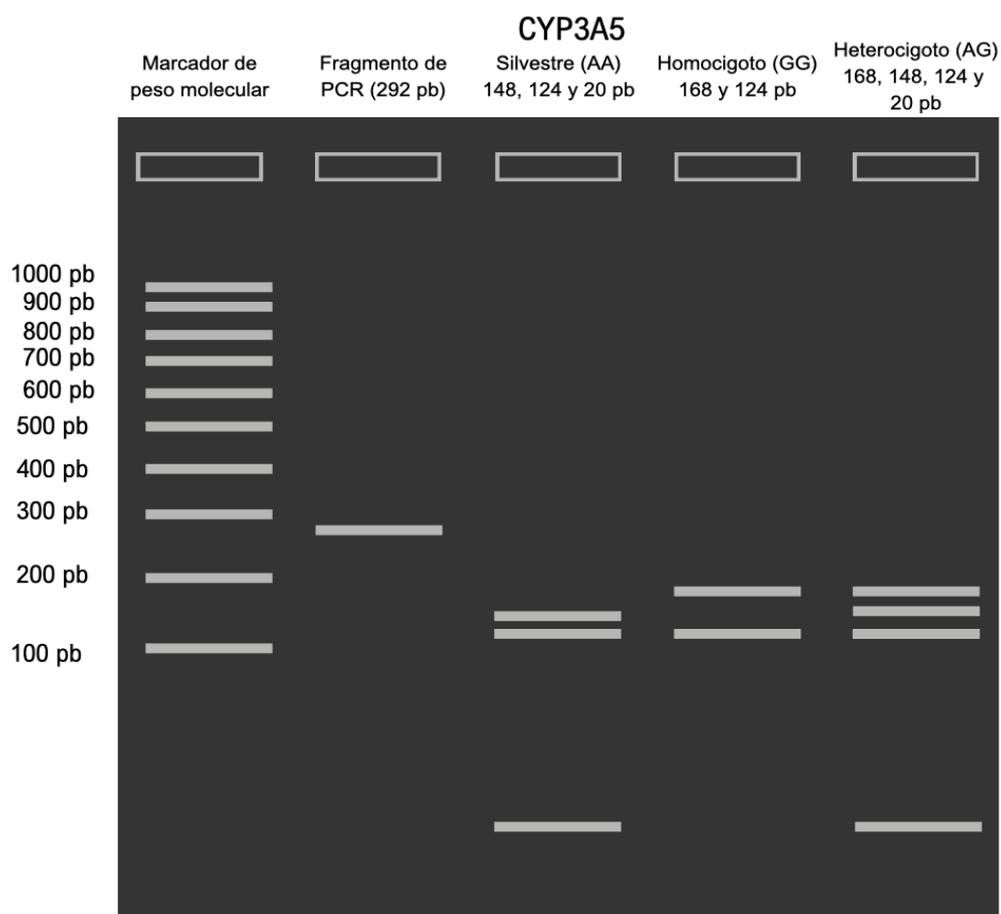


Figura 9. Fragmentos generados por la enzima *SspI* para cada genotipo del polimorfismo CYP3A5\*3.

Tabla 11. Condiciones para la elaboración de un gel de acrilamida al 10% y 15% y condiciones de corrida.

Condiciones de elaboración	
Reactivos	Gel 10%
Acrilamida al 40%	17.0 mL
Agua bidestilada	45.4 mL
TBE 10X	7.0 mL
Persulfato de amonio 10%	0.55 mL
TEMED	0.035 mL
Condiciones de corrida	
Corriente	250-300 V
Tiempo	3-4 horas

Una vez elaborados los geles, se cargaron 22  $\mu$ L de la muestra digerida mezclada con 8  $\mu$ L de GelRed® 5X y 8  $\mu$ L de colorante de carga. De igual forma, se colocó un marcador de peso molecular de 100 pb marca AXYGEN. Pasado el tiempo de corrida, el gel de acrilamida fue observado en un transiluminador UV marca SCIENTIFIC.

### Análisis estadístico

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

- La frecuencia genotípica y alélica para cada SNP.
- El equilibrio de Hardy-Weinberg mediante una prueba de Chi-cuadrado ( $X^2$ ).
- Se realizó la comparación de las frecuencias alélicas con otras poblaciones.

## RESULTADOS

### Características de muestras de DNA obtenidas

Se identificaron un total de 280 muestras de DNA genómico del banco de DNA del INNMVS las cuales presentan un diagnóstico de esclerosis múltiple. Cabe mencionar que de cada paciente se obtuvieron entre 3 y 4 alícuotas de DNA.

Para saber si eran adecuadas para ser utilizadas, se determinó su concentración, pureza e integridad, obteniendo una concentración promedio de 215.92 ng/ $\mu$ L ( $\pm$ 142.10) y una pureza promedio de 1.75 ( $\pm$ 0.05). En el caso de la integridad se evaluó mediante un sistema de cruces como se muestra en la imagen 3.

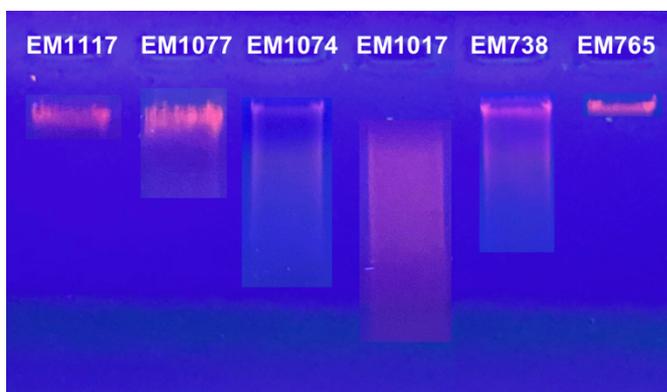


Imagen 3. Integridad de muestras de DNA en agarosa al 0.8%. La muestra EM1117 y 765 muestran una integridad de +++. La muestra EM 1077 y 738 presentan una integridad de +++ ya que siguen teniendo DNA íntegro pero ya hay aparición de DNA degradado. La muestra 1074 tiene una integridad de ++ debido a que presenta una mayor degradación y la muestra EM1017 está completamente degradada por lo cual se le otorga una +.

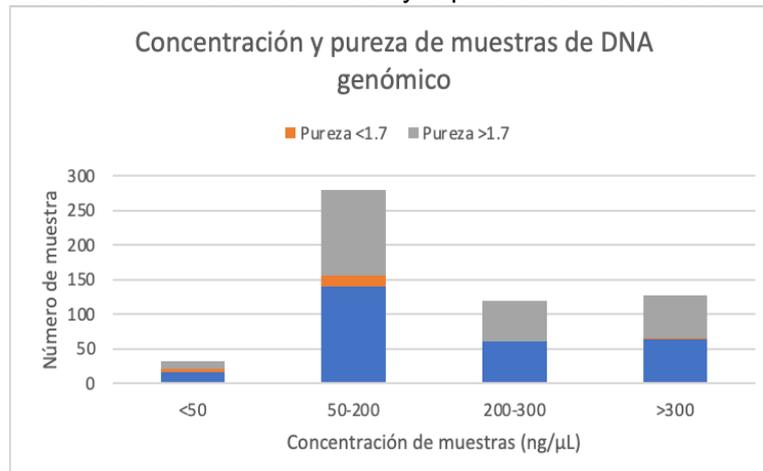
## Características de la población

Del total de muestras analizadas, 190 (67.86%) muestras pertenecen a pacientes del sexo femenino mientras que 90 (47.37%) muestras pertenecen a pacientes del sexo masculino. Además, la población general presenta una edad de inicio de la enfermedad de  $31.41 \pm 10.84$  años.

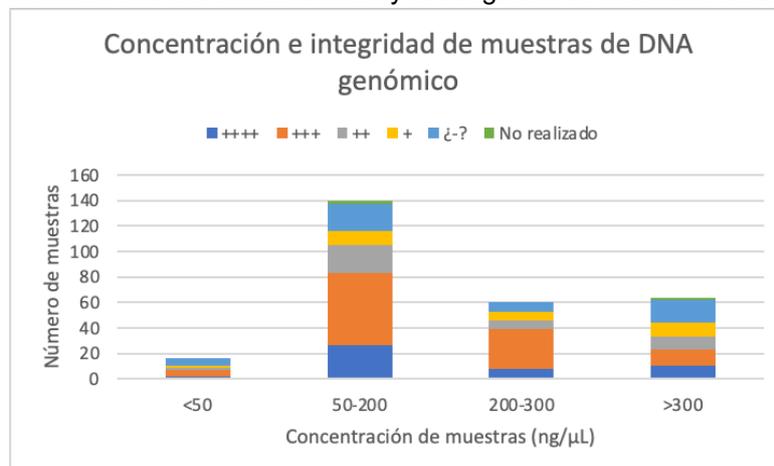
## Reacción de PCR de punto final

Las muestras elegidas para amplificación se basaron en las tres características mencionadas anteriormente por lo que fue importante hacer una correlación de ellas. En la gráfica 1 podemos observar que si bien las muestras que tienen la concentración ideal para llevar a cabo el trabajo (200-300 ng/ $\mu$ L) no forman parte del grupo mayoritario, presentan una pureza mayor a 1.7, además, la mayoría de estas muestras tienen una integridad buena (+++) (gráfica 2). Por otro lado, el grupo mayoritario está conformado por muestras que tienen una concentración de 50 a 200 ng/ $\mu$ L y presentaron en general una pureza mayor a 1.7 y una integridad buena a excelente. En el caso de muestras con una baja concentración (<50 ng/ $\mu$ L), fueron pocas y si bien representaron una cierta dificultad para su amplificación, se pudo contrarrestar con ayuda de su integridad y pureza.

Gráfica 1. Correlación entre la concentración y la pureza de muestras de DNA genómico.



Gráfica 2. Correlación entre la concentración y la integridad de muestras de DNA genómico.



Una vez que se ajustaron los valores de concentración de acuerdo con la pureza e integridad y se realizó la PCR de punto final, se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y marcador de peso molecular que los fragmentos obtenidos fueron los de interés como se muestra en la imagen 4.

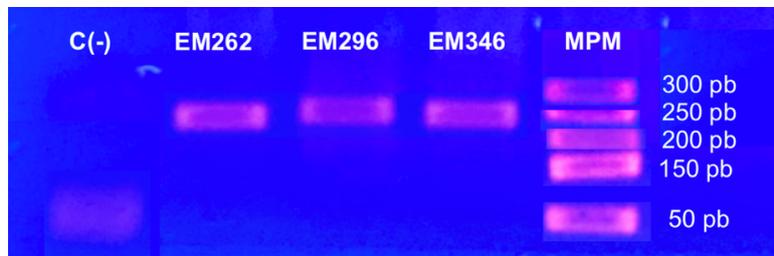


Imagen 4. Electroforesis de agarosa al 1% para amplificación de DNA genómico mediante PCR de punto final. En la parte superior del pozo se indican las siglas de identificación de las muestras. En el pozo 1 se colocó el control negativo para verificar que no hubo contaminación en la reacción y se observan los oligonucleótidos empleados. Las muestras señaladas presentaron una banda correspondiente al producto amplificado de CYP3A5 de 292 pb de acuerdo con el marcador de peso molecular *Invitrogen*<sup>TM</sup> 50 pb DNA Ladder.

### Genotipos encontrados del polimorfismo CYP3A5 mediante RFLP

En la imagen 5 se muestran los genotipos encontrados en la población estudiada para CYP3A5 así, los individuos homocigotos que portan el alelo A, generan dos sitios de corte para *SspI* lo que provoca la presencia de bandas de 148, 124 y 20 pb, aunque esta última no es apreciable en el gel. En el caso del genotipo homocigoto \*3/\*3, al presentar el alelo G, se pierde un sitio de reconocimiento para la enzima por lo que sólo se generan dos bandas, una de 168 pb y otra de 124 pb. Así pues, para los individuos heterocigotos se observan bandas de 168, 148, 124 y 20 pb, donde las bandas de 148, 124 y 20 pb son resultado del corte por el sitio de reconocimiento que se encuentra en la secuencia del fragmento, mientras que los fragmentos 168 pb y 124 pb son generados por la presencia del alelo G.

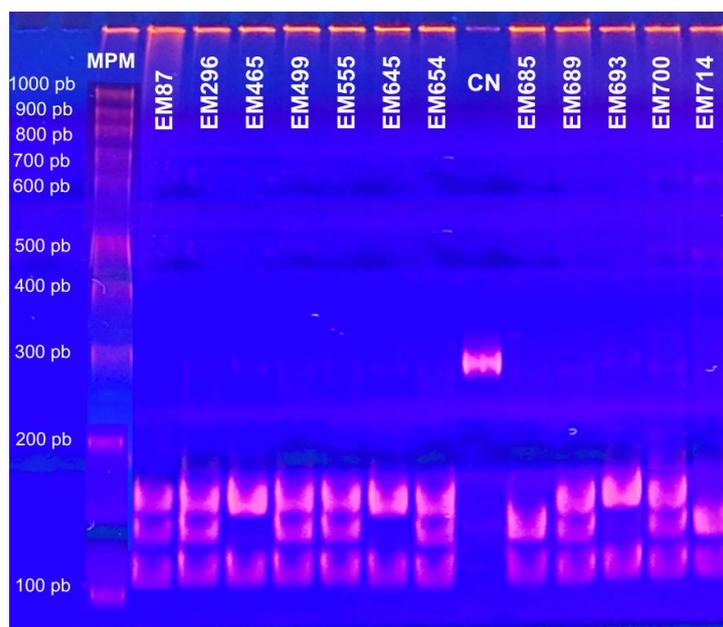


Imagen 5. Electroforesis en gel de acrilamida al 10% para la identificación de genotipos de CYP3A5. Las muestras EM 87, 296, 499, 555, 654, 689 y 700, presentan un genotipo \*1/\*3, mientras que las muestras EM 465, 645 y 693, son homocigotas mutadas (\*3/\*3) y las muestras EM 685 y 714, presentan un genotipo \*1/\*1. Donde MPM: marcador de peso molecular de 100 pb marca AXYGEM; CN: control negativo, es decir, muestra amplificada sin digerir.

Frecuencias alélicas y genotípicas calculadas de *CYP3A5* tanto en población sana como en pacientes con EM

En la Tabla 12, se recopila el cálculo de la frecuencia de cada alelo y genotipo para cada uno de los polimorfismos, además, se muestran los resultados de  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ) para comprobar la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg en la población estudiada. En esta tabla puede observarse que el alelo predominante del gen *CYP3A5*, tanto en pacientes como en población sana fue G. En tanto que, los genotipos encontrados con mayor frecuencia fueron AG y GG para *CYP3A5* en pacientes y controles, respectivamente. Además, en base a los resultados de  $\chi^2$  se observa que la población de pacientes estudiada no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para la variante, sin embargo, la población de controles sí presenta un equilibrio Hardy-Weinberg.

Tabla 12. Frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP3A5* en pacientes con EM y controles.

Parámetro	Pacientes			Controles		
	A	G		A	G	
Frecuencia alélica	0.2964 (29.64%)	0.7036 (70.36%)		0.3137 (31.37%)	0.6863 (68.63%)	
N	166	394		102	210	
Frecuencia genotípica	AA	AG	GG	AA	AG	GG
	0.05 (5%)	0.4929 (49.29%)	0.4571 (45.71%)	0.1090 (10.90%)	0.4359 (43.59%)	0.4551 (45.51%)
N	14	138	128	17	68	71
N total	280			156		
$\chi^2$ obtenida	9.23			0.27		
$\chi^2$ tablas	3.8415			3.8415		

#### Asociación de polimorfismo con esclerosis múltiple en población estudiada

De acuerdo con la Tabla 13, el genotipo A/A es más frecuente en el grupo control (10.90%) que en el grupo de los pacientes (5%) y muestra un efecto protector (OR = 0.43; IC 95%: 0.20 - 0.91;  $p = 0.013$ ) en el desarrollo de esclerosis múltiple. Por otro lado, el alelo G (OR = 2.31; IC 95%: 1.10 – 4.93;  $p = 0.013$ ) representa un factor de riesgo de desarrollar EM.

Tabla 13. Asociación genotípica y alélica de *CYP3A5* en población mestizo mexicana.

Genotipo	Casos (N=280)	Controles (N=156)	OR	IC 95%	p
G/G	128 (45.71%)	71 (45.51%)	1.008	0.68-1.50	0.484
G/A	138 (49.29%)	68 (43.59%)	1.26	0.85-1.87	0.128
A/A	<b>14 (5%)</b>	<b>17 (10.90%)</b>	<b>0.43</b>	<b>0.20-0.91</b>	<b>0.013←</b>

Tabla 13. Asociación genotípica y alélica de *CYP3A5* en población mestizo mexicana (continuación)

Alelo	Casos	Controles	OR	IC 95%	p
<b>G</b>	<b>266</b> <b>(63.64%)</b>	<b>139</b> <b>(62%)</b>	<b>2.32</b>	<b>1.10-4.93</b>	<b>0.013←</b>
<b>A</b>	152 (36.36%)	85 (38%)	0.99	0.67-1.47	0.484

Donde: ←, Estadísticamente significativo; OR, Odds ratio; IC, intervalo de confianza; N, número de individuos.

Comparación de frecuencia alélica de *CYP3A5* entre la población sana mestizo mexicana estudiada y la reportada en distintas poblaciones

Como se observa en la Tabla 14, la frecuencia alélica del polimorfismo *CYP3A5*\*3 es similar a las poblaciones de América latina, Asia Central y del Sur y de Etiopía. Por el contrario, las frecuencias alélicas son diferentes a las reportadas para las poblaciones de América del Norte, Cercano Oriente, Europa, Asia Oriental y África principalmente en Tanzania, Marruecos y Túnez ( $P < 0.05$ ).

Tabla 14. Comparación de frecuencia alélica de *CYP3A5* del grupo estudiado con distintas poblaciones.

Población	N	Alelos		$\chi^2$	p	Referencia
		A N (%)	G N (%)			
<b>América latina</b>						
<b>Mestizo mexicano</b>	156	17 (31.37%)	139 (68.63%)	-	-	Presente estudio
<b>Indio Americano (Tepehuanes)</b>	94	12 (28.7%)	82 (71.3%)	0.1989	0.3274	Galaviz-Hernández, C., et al. 2020
<b>El Salvador</b>	112	6 (23.7%)	106 (76.3%)	2.541	0.05698	Sinues, B., et al. 2007
<b>Nicaragua</b>	120	7 (23.8%)	113 (76.2%)	2.183	0.07218	Sinues, B., et al. 2007
<b>Brazil</b>	111	12 (36%)	99 (64%)	0.0005	0.4946	Suarez-Kurtz, G., et al. 2007
<b>América del Norte</b>						
<b>Mexicano americano</b>	236	11 (21.8%)	225 (78.2%)	5.493	<b>0.01134</b>	Guy, J.W., et al. 2017
<b>Africanos americanos</b>	89	44 (70%)	45 (30%)	44.83	<b>0.00000001</b>	Givens, R. C., et al. 2003
<b>Indio Americano (Tribu Salish y Kootenai)</b>	94	1 (7.53%)	93 (92.47%)	8.455	<b>0.0009843</b>	Fohner, A., et al. 2013.
<b>África</b>						
<b>Tanzania</b>	144	94 (81%)	50 (19%)	94.68	<b>0.0000001</b>	Mirghani, R. A., et al. 2006.
<b>Marruecos</b>	82	1 (7.9%)	81 (92.1%)	7.171	<b>0.002194</b>	Novillo, A., et al. 2015
<b>Túnez</b>	102	2 (12.1%)	100 (87.9%)	7.192	<b>0.002707</b>	Novillo, A., et al. 2015
<b>Etiopía</b>	150	16 (32.7%)	134 (67.3%)	0.004219	0.4749	Gebeyehu, E., et al. 2011

Tabla 14. Comparación de frecuencia alélica de CYP3A5 del grupo estudiado con distintas poblaciones (continuación).

Cercano oriente						
Jordania	229	1 (7.4%)	228 (92.6%)	22.72	<b>0.000000741</b>	Yousef, A. M., et al. 2012.
Turquía	160	0 (4%)	160 (96%)	18.37	<b>1.927E-07</b>	Arıcı, M. y Özhan, G. 2016
Europa						
Caucásico	237	2 (6.8%)	235 (93.2%)	20.61	<b>0.000003338</b>	Guy, J.W., et al. 2017
Español	177	1 (9%)	176 (91%)	17.26	<b>0.000008474</b>	Gervasini, G., et al. 2005.
Suecia	136	1 (7%)	135 (93%)	12.93	<b>0.0000759</b>	Mirghani, R. A., et al. 2006.
Bulgaria	160	1 (6.9%)	159 (93.1%)	15.47	<b>0.00002036</b>	Petrova, D. T., et al. 2007.
Asia Oriental						
China	161	4 (15.2%)	157 (84.8%)	9.037	<b>0.00129</b>	Li, D., et al. 2007.
Japón	200	11 (23.2%)	189 (76.8%)	3.513	<b>0.03316</b>	Fukuen, S., et al. 2002.
Corea	194	11 (23.5%)	183 (76.5%)	3.201	<b>0.03968</b>	Park, S. Y., et al. 2008.
Asia Central y del Sur						
India	208	23 (32.9%)	185 (67.1%)	0.002334	0.4834	Bajpai, P., et al. 2010.
Bangladesh	116	11 (30.6%)	105 (69.4%)	0.1437	0.3576	Islam, M. S., et al. 2014.

Donde:  $p < 0.05$ , estadísticamente significativo.

## DISCUSIÓN

Aún no se ha realizado un estudio que implique la asociación del polimorfismo CYP3A5\*3 y el desarrollo de esclerosis múltiple, por lo que el presente estudio es el primero en su tipo ya que estudia esta relación. Así pues, se determinó el genotipo de CYP3A5 tanto en un grupo de pacientes con EM como en un grupo de personas sanas. El resultado obtenido fue que el alelo más frecuente en ambos grupos es el alelo mutado (G) (Tabla 12), el cual produce una proteína no funcional debido a un empalme alternativo del ARN que provoca la terminación de la proteína de manera prematura (Galaviz-Hernández., *et al.* 2020). Si bien este alelo es el más frecuente en ambos grupos, al realizar la asociación entre el alelo y la EM, se encontró que éste se puede considerar como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (OR = 2.31; IC 95%: 1.10 – 4.93;  $p = 0.013$ ; Tabla 13).

En el caso del metabolismo de la vitamina D, se han realizado estudios para relacionar tanto la deficiencia como el exceso de ésta con el desarrollo de EM. Así, Häusler y colaboradores (2019) determinaron que un excedente de esta vitamina, provoca un aumento en los niveles de calcio ( $Ca^{2+}$ ) que acentúa la activación, proliferación y el estado inflamatorio de las células inmunitarias así como su capacidad para infiltrarse en SNC a través de la BHE. Del mismo modo, se ha observado que pacientes con EM a los que se les administró dosis altas de vitamina D, presentaban hipercalcemia y un aumento en la tasa de recaídas y en la actividad de la resonancia magnética (Lorincz, B., *et al.* 2022). Los resultados obtenidos en este trabajo son congruentes con estos estudios ya que la presencia del alelo G de CYP3A5\*3, provoca un defecto

en la hidroxilación de la vitamina D, lo que se traduce en un intento fallido de ser eliminada del cuerpo, causando el acúmulo de ésta (Fujino, C., *et al.* 2021; Guo, J., *et al.* 2022).

No obstante, aunque existe una relación entre la EM y la hipervitaminosis, ésta última fue producida mediante suplementos ingeridos como parte de la dieta, la cual es la fuente menor de vitamina D en comparación con la luz solar por lo que se recomienda realizar estudios donde se relacione directamente el polimorfismo CYP3A5\*3 y la vitamina D con la EM.

De igual manera, la presencia del polimorfismo CYP3A5\*3 altera el metabolismo del colesterol produciendo un aumento de LDL, así, los resultados mostrados en la Tabla 13, sugieren que la activación, diferenciación y función de las células inmunitarias difieren entre los pacientes con EM y la población sana (Pineda-Torra, I., *et al.* 2021). Esto es similar a lo reportado por Lorincz, B., *et al.* (2022), pues pacientes con EM presentaron niveles elevados de LDL oxidada en comparación con controles sanos y estos niveles se correlacionaron con una mayor cantidad de lesiones T2 y una progresión en la EDSS. De igual manera, en pacientes con EMRR, un LDL sérico elevado se correlacionó con nuevas lesiones de MRI (Pineda-Torra, I., *et al.* 2021).

Siguiendo con el metabolismo del colesterol, Crick, P.J. y colaboradores (2017), encontraron disminuido el nivel de 25-HC en pacientes con EMRR. Estos resultados coinciden con los nuestros ya que la ausencia de la proteína funcional debido a la presencia del alelo G, ocasiona que los niveles de 25-HC sean bajos y por ende, también bajan los niveles de ApoA-I agravando así la inflamación y neurodegeneración (Guy, J.F., *et al.* 2017; Wright, W.C., *et al.* 2019; Odnoshivkina, U. G., *et al.* 2022). Esto coincide a su vez con los estudios de Gardner, L. A., y Levin, M. C. (2015) y Meyers, L., *et al.* (2014), quienes observaron una expresión menor de ApoA-I en pacientes con EMSP y EMPP en comparación con pacientes con EMRR y controles, así como, que ratones deficientes de ApoA-I desarrollaron una EAE más grave que los ratones con niveles normales de ApoA-I.

Los resultados mostrados en la Tabla 13 con respecto al alelo silvestre (A), indican que no se considera estadísticamente significativo como un factor protector para la EM, sin embargo, el genotipo silvestre homocigoto (A/A) es más frecuente en personas sanas que en pacientes y sí muestra un efecto protector en el desarrollo de la enfermedad de manera estadística (OR = 0.43; IC 95%: 0.20 - 0.91; p = 0.013, Tabla 13). Este resultado se traduce en que la presencia de la proteína funcional, produce niveles normales de 25-HC por lo que los LXRs son estimulados, aumentando la ubiquitinación de los receptores de LDL e inhibiendo así, la producción tanto de citocinas proinflamatorias como de moléculas de adhesión que ayudan a la extravasación de células inmunes autorreactivas (Odnoshivkina, U. G., *et al.* 2022; Gardner, L. A., y Levin, M. C. 2015; Meyers, L., *et al.* 2014-9).

En general, el resultado obtenido en este estudio, sugiere que el metabolismo lento de compuestos endógenos como la vitamina D o el colesterol, podría estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad (Htun, Y.Y., *et al.* 2018; Fujino, C., *et al.* 2021).

Con respecto al metabolismo de fármacos, los corticoesteroides como la prednisolona son de interés en este estudio ya que son la primera línea para el manejo de recaídas agudas de EM y la literatura menciona la participación de CYP3A5 en su metabolismo debido a la 6 $\beta$ -hidroxilación del cortisol, un corticosteroide natural (Smets, I., *et al.* 2017; Fujino, C., *et al.* 2021). Así, los resultados encontrados en la presente investigación (Tabla 12), coinciden con el de Skauby y colaboradores (2021), quienes encontraron que las personas que portan el alelo A de CYP3A5\*1, presentan un mayor aclaramiento de prednisolona. Por otro lado, un metabolismo lento de prednisolona está relacionado con la presencia del alelo G del CYP3A5\*3, lo cual se traduce en una eliminación reducida del fármaco y el aumento de concentración plasmática del mismo (Zhao, M., *et al.* 2021; Waring R.H. 2020). Así, a una dosis estándar, los metabolizadores lentos debido al alelo mutado, sufren algunas de las RAM mostradas en la Tabla 6 (Zhao, M., *et al.* 2021). Debido a esto, es de importancia conocer si el paciente es portador del polimorfismo CYP3A5\*3 para así, brindarle atención y tratamiento farmacológico personalizado.

El segundo aspecto a analizar, es la comparación de la frecuencia alélica de CYP3A5 en diversas poblaciones ya que diversos estudios han identificado la ascendencia de la población como un factor de riesgo tanto en la susceptibilidad a la EM como en la progresión clínica y discapacidad de la misma (Gonzalez-Covarrubias, V., *et al.* 2019). Como puede observarse en la Tabla 14, si bien la literatura habla de una ascendencia africana, la población sana estudiada no tiene similitud con esta población a excepción de Etiopía, esto puede deberse a que los africanos solo contribuyeron a la mezcla entre el 1.92% al 6.91% de acuerdo con Huerta-Chagoya, A. y colaboradores (2019).

Ahora bien, la población sana mestizo-mexicana estudiada presenta similitud con la población de Asia del Sur (India y Bangladesh), lo cual ya se había observado en estudios anteriores; por ejemplo, Ordoñez, G. y colaboradores (2015) encontraron manifestaciones clínicas parecidas entre estas dos poblaciones como el hecho de que la neuromielitis óptica es más frecuente como síntoma inicial, tienen una proporción hombre/mujer muy semejante y que en los últimos años, ha habido un aumento en la incidencia de esta enfermedad en estas poblaciones. De igual manera, García-Roca, P., *et al.* (2012) no encontró diferencia significativa entre mexicanos e individuos del sur de Asia. La población sana de este estudio y de acuerdo con la Tabla 14, comparte frecuencia alélica de CYP3A5 con brasileños, nicaragüenses, tepehuanes y salvadoreños. La similitud entre grupos latinos se ha visto anteriormente y por ello Huddart, R., *et al.* (2019), propone realizar la agrupación de estas poblaciones para investigaciones farmacogenéticas pues la población latina crea un patrón genético único en comparación con otras regiones geográficas.

Además, Dobson, R. y Giovannoni, G. (2019) mencionan la importancia de la migración como factor de riesgo o protección, según sea el caso. Así pues, como se observa en la Tabla 14, la descendencia de los mexicanos o africanos que en teoría presentan una baja frecuencia de CYP3A5\*3, al migrar a América del Norte, adquirieron la frecuencia de su nueva ubicación geográfica (Guy, J.F., *et al.* 2017; Galaviz-Hernández, C., *et al.* 2020).

Finalmente, Vargas-Alarcón, G. y colaboradores (2014) hacen hincapié en que la distribución de diversos polimorfismos como *CYP3A5*, distingue a la población mexicana de los caucásicos, africanos y asiáticos y que el conocimiento de esta frecuencia en población mexicana, es útil para comprender la patogenésis de EM y además, ayuda a entender mejor la respuesta clínica a medicamentos utilizados para tratar esta enfermedad como es el caso de los inmunosupresores.

## CONCLUSIÓN

- El alelo G de *CYP3A5*\*3 está asociado como factor de riesgo para desarrollar esclerosis múltiple; los portadores de este alelo pueden presentar un acúmulo tóxico de compuestos endógenos que causan inflamación y neurodegeneración.
- El genotipo homocigoto silvestre (A/A) de *CYP3A5* se considera un factor de protección contra la EM y ayuda a una mejor biodisponibilidad de corticoesteroides.
- La frecuencia de *CYP3A5*\*3 de la población sana mestizo mexicana estudiada es similar a la observada en poblaciones asiáticas del sur y de América Latina como brasileños, salvadoreños, tepehuanes y nicaranguenses.
- La frecuencia de *CYP3A5*\*3 en población europea, africana y americana del norte, difiere con la calculada en la población sano mestizo mexicana estudiada.

# ANEXOS

## ANEXO 1

Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica

Técnica de Covarrubias modificada de Buffone y Darlington; Millar y Polesy; Maniatis y Fritsch.

1. Obtención de muestra de sangre periférica mediante punción venosa
2. Transferir 3 mL de sangre a un tubo cónico de 15 mL
3. Agregar tres veces el volumen de buffer TTS (Tris 10mM, Tritón 1%, Sacarosa 0.32 M).
4. Agitar tubo mediante inversión varias veces.
5. Centrifugar el tubo cónico con muestra y buffer TTS a 5,000 rpm durante 10 minutos.
6. Decantar el sobrenadante cuidadosamente y dejar aproximadamente 1 mL de sedimento (botón de linfocitos)
7. Agregar 1 mL de buffer TTS y resuspender el botón.
8. Transferir a un tubo de 1.5 mL.
9. Centrifugar a 13,500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
10. Decantar el sobrenadante.
11. Repetir de dos a tres veces el paso 7-10.
12. Adicionar 570 µL de NaCl 5 mM al botón de linfocitos y agitar durante 2 minutos.
13. Colocar 30 µL de SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% y agitar por 5 minutos.
14. Agregar 200 µL de NaCl saturado y agitar por 10 minutos.
15. Centrifugar a 13, 500 rpm por 15 minutos a 4°C.
16. Decantar el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
17. Agregar 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1) y mezclar por inversión durante 10 minutos.
18. Centrifugar a 13,500 rpm a 4°C durante 15 minutos.
19. Tomar la fase superior y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
20. Agregar el doble de volumen de etanol absoluto frío para así precipitar el DNA.
21. Centrifugar a 11,000 rpm por 10 minutos a 4°C y decantar el sobrenadante sin perder el botón.
22. Agregar 500 µL de etanol al 70% frío para lavar el botón de DNA y resuspender.
23. Centrifugar a 11,000 rpm por 10 minutos y decantar.
24. Repetir paso 22 y 23, una vez más.
25. Secar al vacío el botón de DNA y resuspender en agua estéril (máximo 200 µL).
26. Finalmente, incubar a 50°C por una hora en termomixer.

## ANEXO 2

Preparación de soluciones y reactivos utilizados en electroforesis con geles de agarosa.

### A. Preparación del gel de agarosa al 0.8%

1. Pesar 2 g de agarosa en balanza analítica.
2. Medir 250 mL de buffer TBE 1X en probeta.
3. Transferir el buffer TBE 1X a matraz Erlenmeyer.
4. Agregar la agarosa previamente pesada.
5. Calentar hasta que la agarosa se haya disuelto por completo.
6. Verter mezcla en la cama/bandeja de electroforesis previamente nivelada.
7. Colocar peine para formar los pocillos.
8. Esperar a que la mezcla se enfríe y así el gel se solidifique.
9. Una vez polimerizado, quitar el peine y demás accesorios y colocar el gel en la cámara de electroforesis de manera que los pocillos queden en el extremo donde se localiza el polo negativo.

### B. Preparación de buffer TBE 10X

1. Pesar 108 g de Tris Base en balanza analítica.
2. Transferir a un vaso de precipitado de 500 mL que contenga aproximadamente 350 mL de agua bidestilada.
3. Calentar y mezclar en parrilla eléctrica con agitación hasta que se disuelva.
4. Una vez disuelto, agregar 7.3 g de EDTA previamente pesado.
5. Calentar y mezclar en parrilla eléctrica con agitación.
6. Añadir 55 g de ácido bórico y mezclar hasta que se disuelva.
7. Transferir solución a una probeta de 1000 mL.
8. Aforar probeta con agua bidestilada.
9. Mezclar solución mediante inversión.

### C. Preparación de buffer TBE 1X

1. Medir 100 mL de buffer TBE 10X en probeta de 1000 mL.
2. Aforar probeta con agua bidestilada.
3. Mezclar mediante inversión.

### D. Preparación de colorante de carga tipo III

1. Pesar 0.125 g de azul de bromofenol (0.25% p/v) en balanza analítica.
2. Transferirlo a un matraz aforado de 50 mL.
3. Pesar 0.125 g de xileno cianol FF (0.25% p/v) en balanza analítica.
4. Transferir al matraz aforado.
5. Medir 15 mL de glicerol (30% v/v) en probeta de 25 mL.
6. Verterlo al matraz aforado.
7. Aforar matraz con agua destilada.
8. Mezclar muy bien mediante inversión.
9. Repartir la mezcla en tubos de 1.5 mL.
10. Almacenar a 4°C.

E. Preparación de GelRed® 100x a partir de solución Stock.

1. Medir 10  $\mu\text{L}$  de GelRed® 10,000X con micropipeta de 20  $\mu\text{L}$ .
2. Transferir a tubo de 1.5 mL.
3. Agregar 990  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada.
4. Mezclar con ayuda de vórtex.
5. Envolver tubo con papel aluminio para evitar que el GelRed® tenga el menor contacto con la luz solar debido a que es un colorante fluorescente muy sensible.

F. Preparación de GelRed® 5x

1. Tomar con micropipeta 50  $\mu\text{L}$  de GelRed® 100X previamente preparado.
2. Colocar en tubo de 1.5 mL.
3. Agregar 950  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada.
4. Mezclar con ayuda de vórtex.
5. Almacenar protegido de la luz solar.

# ANEXO 3

Manual de usuario: *SspI*, 10U/μL, 500 U

**Thermo**  
SCIENTIFIC

## PRODUCT INFORMATION

# SspI

#ER0771 500 U

Lot: \_\_\_\_\_ Expiry Date: \_\_\_\_\_

5'...**A A T↓A T T**...3'  
3'...**T T A↑T A A**...5'

Concentration: 10 U/μL  
Source: *Sphaerotilus species*  
Supplied with: 1 mL of 10X Buffer G  
1 mL of 10X Buffer Tango

Store at -20°C



BSA included

[www.thermoscientific.com/onebio](http://www.thermoscientific.com/onebio)

## Storage Buffer

SspI is supplied in: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA and 50% glycerol.

## Recommended Protocol for Digestion

- Add:  
nuclease-free water 16 μL  
10X Buffer G 2 μL  
DNA (0.5-1 μg/μL) 1 μL  
SspI 0.5-1 μL\*
- Mix gently and spin down for a few seconds.
- Incubate at 37°C for 1-16 hours\*.

The digestion reaction may be scaled either up or down.

## Recommended Protocol for Digestion of PCR Products Directly after Amplification

- Add:  
PCR reaction mixture 10 μL (~0.1-0.5 μg of DNA)  
nuclease-free water 18 μL  
10X Buffer G 2 μL  
SspI 1-2 μL\*
- Mix gently and spin down for a few seconds.
- Incubate at 37°C for 1-16 hours\*.

\* See Star Activity.

## Thermal Inactivation

SspI is inactivated by incubation at 65°C for 20 min.

## RECOMMENDATIONS

**1X Buffer G** (for 100% SspI digestion)  
10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 0.1 mg/mL BSA.

## Incubation temperature

37°C.

## Unit Definition

One unit is defined as the amount of SspI required to digest 1 μg of lambda DNA in 1 hour at 37°C in 50 μL of recommended reaction buffer.

## Dilution

Dilute with the Dilution Buffer (#B19): 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA and 50% glycerol.

## Double Digests

Thermo Scientific Tango Buffer is provided to simplify buffer selection for double digests. 98% of Thermo Scientific restriction enzymes are active in a 1X or 2X concentration of Tango™ Buffer. Please refer to [www.thermoscientific.com/doubledigest](http://www.thermoscientific.com/doubledigest) to choose the best buffer for your experiments.  
1X Tango Buffer: 33 mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0.1 mg/mL BSA.

Rev.10



53

## ENZYME PROPERTIES

### Enzyme Activity in Thermo Scientific REase Buffers, %

B	G	O	R	Tango	2X Tango
20-50	100	0-20	50-100	100	20-50

## Star Activity

An excess of SspI (20 U/μg DNA x 1 hour) may result in star activity.

## Methylation Effects on Digestion

Dam: never overlaps – no effect.  
Dcm: never overlaps – no effect.  
CpG: never overlaps – no effect.  
EcoKI: never overlaps – no effect.  
EcoBI: may overlap – no effect.

## Stability during Prolonged Incubation

A minimum of 0.1 units of the enzyme is required for complete digestion of 1 μg of lambda DNA in 16 hours at 37°C.

## Digestion of Agarose-embedded DNA

A minimum of 5 units of the enzyme is required for complete digestion of 1 μg of agarose-embedded lambda DNA in 16 hours.

## Number of Recognition Sites in DNA

λ	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	pTZ19R/U	M13mp18/19
20	1	1	1	1	2	6

For **CERTIFICATE OF ANALYSIS** see back page

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

### Overdigestion Assay

No detectable change in the specific fragmentation pattern is observed after a 15-fold overdigestion with Sspl (15 U/μg lambda DNA x 1 hour) (*see* Star Activity).

### Ligation and Recleavage (L/R) Assay

The ligation and recleavage assay was replaced with LO test after validating experiments showed LO test ability to trace nuclease and phosphatase activities with sensitivity that is higher than L/R by a factor of 100.

### Labeled Oligonucleotide (LO) Assay

No detectable degradation of single-stranded or double-stranded labeled oligonucleotides occurred during incubation with 10 units of Sspl for 4 hours.

Quality authorized by:



Jurgita Zilinskiene

### PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively *for research purposes and in vitro use only*. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.

Please refer to [www.thermoscientific.com/onebio](http://www.thermoscientific.com/onebio) for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adcock, I. M., & Mumby, S. (2017). Glucocorticoids. *Handbook of experimental pharmacology*, 237, 171–196. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_98](https://doi.org/10.1007/164_2016_98)
2. Aguilar-Ballester, M., Herrero-Cervera, A., Vinué, Á., Martínez-Hervás, S., & González-Navarro, H. (2020). Impact of Cholesterol Metabolism in Immune Cell Function and Atherosclerosis. *Nutrients*, 12(7), 2021. <https://doi.org/10.3390/nu12072021>
3. Aguilar-Juárez PA, Castillo-Lara RA, Ceballos-Godina M, Colorado-Ochoa HJ y col. (2019) Consenso para el diagnóstico y tratamiento de la esclerosis múltiple en pacientes del ISSSTE. *Med Int Méx.* septiembre-octubre;35(5):732-771. <https://doi.org/10.24245/mim.v35i5.3284>
4. Aguilar-Velázquez, J. A., & Rangel-Villalobos, H. (2021). "Distribution of paternal lineages in Mestizo populations throughout Mexico: an in silico study based on Y-STR haplotypes". *Journal of human genetics*, 66(3), 327–332. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-00824-7>
5. Alan, I. S., & Alan, B. (2018). Side Effects of Glucocorticoids. *Pharmacokinetics and Adverse Effects of Drugs - Mechanisms and Risks Factors*. doi: 10.5772/intechopen.72019
6. Almeida, C., Venade, G., Duarte, D., Vaz, A., & Nascimento, E. (2022). Type 1 Diabetes Mellitus and Multiple Sclerosis: An Association to Consider. *Cureus*, 14(10), e30762. <https://doi.org/10.7759/cureus.30762>
7. Alter, M., & Olivares, L. (1970). Multiple sclerosis in Mexico. An epidemiologic study. *Archives of neurology*, 23(5), 451–459. <https://doi.org/10.1001/archneur.1970.00480290071008>
8. Arıcı, M.; Özhan, G. (2016) The evaluation of CYP3A4 and CYP3A5 genetic profiles in Turkish population. *J. Fac. Pharm. Istanbul*,46, 15–22.
9. Ashtari, F., Soltani, R., Shokouhi, S., Rismanbaf, A., Hajiahmadi, S., & Hakamifard, A. (2021). Adverse reaction of methylprednisolone pulse therapy: Acute respiratory distress syndrome. *Clinical case reports*, 9(7), e04468. <https://doi.org/10.1002/ccr3.4468>
10. Atlas of MS (2022) Epidemiology of multiple sclerosis. Disponible en: <https://www.atlasofms.org/>
11. Bäärnhielm, M., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2014). Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20(6), 726–732. <https://doi.org/10.1177/1352458513509508>
12. Bajpai, P., Tripathi, A. K., & Agrawal, D. (2010). Genetic polymorphism of CYP3A5 in Indian chronic myeloid leukemia patients. *Molecular and cellular biochemistry*, 336(1-2), 49–54. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0268-1>
13. Balcer, L.J. & Frohman, E.M. (2010) Evaluación de la pérdida de la función visual en esclerosis múltiple medida por agudeza con letras de bajo contraste. *Neurology* 74 (Suppl 3), S18-S25.
14. Barnes P. J. (2017). Glucocorticosteroids. *Handbook of experimental pharmacology*, 237, 93–115. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_62](https://doi.org/10.1007/164_2016_62)
15. Bertado-Cortés, B., Venzor-Mendoza, C., Rubio-Ordoñez, D., Pérez-Pérez, J. R., Novelo-Manzano, L. A., Villamil-Osorio, L. V., Jiménez-Ortega, M. J., Villalpando-Gueich, M. L., Sánchez-Rosales, N. A., & García-Talavera, V. (2020). Demographic and clinical characterization of multiple sclerosis in Mexico: The REMEMBER study. *Multiple sclerosis and related disorders*, 46, 102575. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102575>
16. Bochud, M., Bovet, P., Burnier, M., & Eap, C. B. (2009). CYP3A5 and ABCB1 genes and hypertension. *Pharmacogenomics*, 10(3), 477–487. <https://doi.org/10.2217/14622416.10.3.477>

17. Brownlee, W. J., Hardy, T. A., Fazekas, F., & Miller, D. H. (2017). Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet (London, England)*, 389(10076), 1336–1346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30959-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30959-X)
18. Cavanagh, J. J., & Levy, M. (2021). Differential diagnosis of multiple sclerosis. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*, 50(2), 104092. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2021.104092>
19. Chen, L., & Prasad, G. V. R. (2018). CYP3A5 polymorphisms in renal transplant recipients: influence on tacrolimus treatment. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 11, 23–33. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S107710>
20. Comité Mexicano para el Tratamiento e Investigación en Esclerosis Múltiple, MEXCTRIMS (2022) Esclerosis múltiple. En: <http://www.mexctrims.com/em/>
21. Cree BAC, Hauser SL. Multiple Sclerosis In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20e New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018.
22. Crick, P. J., Griffiths, W. J., Zhang, J., Beibel, M., Abdel-Khalik, J., Kuhle, J., Sailer, A. W., & Wang, Y. (2017). Reduced Plasma Levels of 25-Hydroxycholesterol and Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Bile Acid Precursors in Multiple Sclerosis Patients. *Molecular neurobiology*, 54(10), 8009–8020. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0281-9>
23. Cruz-Correa, O. F., León-Cachón, R. B., Barrera-Saldaña, H. A., & Soberón, X. (2017). Prediction of atorvastatin plasmatic concentrations in healthy volunteers using integrated pharmacogenetics sequencing. *Pharmacogenomics*, 18(2), 121–131. <https://doi.org/10.2217/pgs-2016-0072>
24. Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis - a review. *European journal of neurology*, 26(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
25. Esclerosis Múltiple España, EME (2019) Tipos de Esclerosis Múltiple. En: <https://esclerosismultiple.com/esclerosis-multiple/tipos-de-esclerosis-multiple/>
26. Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., & Rocca, M. A. (2018). Multiple sclerosis. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 43. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0041-4>
27. Fohner, A., Muzquiz, L. I., Austin, M. A., Gaedigk, A., Gordon, A., Thornton, T., Rieder, M. J., Pershouse, M. A., Putnam, E. A., Howlett, K., Beatty, P., Thummel, K. E., & Woodahl, E. L. (2013). Pharmacogenetics in American Indian populations: analysis of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, and CYP2C9 in the Confederated Salish and Kootenai Tribes. *Pharmacogenetics and genomics*, 23(8), 403–414. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283629ce9>
28. Fujino, C., Sanoh, S., & Katsura, T. (2021). Variation in Expression of Cytochrome P450 3A Isoforms and Toxicological Effects: Endo- and Exogenous Substances as Regulatory Factors and Substrates. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 44(11), 1617–1634. <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00332>
29. Fukuen, S., Fukuda, T., Maune, H., Ikenaga, Y., Yamamoto, I., Inaba, T., & Azuma, J. (2002). Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5\*3 and \*6, in a Japanese population. *Pharmacogenetics*, 12(4), 331–334. <https://doi.org/10.1097/00008571-200206000-00009>
30. Galaviz-Hernández, C., Lalalde-Ramos, B. P., Lares-Assef, I., Macías-Salas, A., Ortega-Chavez, M. A., Rangel-Villalobos, H., & Sosa-Macías, M. (2020). Influence of Genetic Admixture Components on CYP3A5\*3 Allele-Associated Hypertension in Amerindian Populations From Northwest Mexico. *Frontiers in pharmacology*, 11, 638. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00638>
31. Gandhi, F., Jhaveri, S., Avanthika, C., Singh, A., Jain, N., Gulraiz, A., Shah, P., & Nasir, F. (2021). Impact of Vitamin D Supplementation on Multiple Sclerosis. *Cureus*, 13(10), e18487. <https://doi.org/10.7759/cureus.18487>
32. García-Roca, P., Medeiros, M., Reyes, H., Rodríguez-Espino, B. A., Alberú, J., Ortiz, L., Vásquez-Perdomo, M., Elizondo, G., Morales-Buenrostro, L. E., Mancilla Urrea, E., & Castañeda-Hernández, G. (2012). CYP3A5 polymorphism in Mexican renal

- transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Archives of medical research*, 43(4), 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.05.005>
33. Gardner, L. A., & Levin, M. C. (2015). Importance of Apolipoprotein A-I in Multiple Sclerosis. *Frontiers in pharmacology*, 6, 278. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00278>
  34. Garg, N., & Smith, T. W. (2015). An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and behavior*, 5(9), e00362. <https://doi.org/10.1002/brb3.362>
  35. Gebeyehu, E., Engidawork, E., Bijnsdorp, A., Aminy, A., Diczfalusy, U., & Aklillu, E. (2011). Sex and CYP3A5 genotype influence total CYP3A activity: high CYP3A activity and a unique distribution of CYP3A5 variant alleles in Ethiopians. *The pharmacogenomics journal*, 11(2), 130–137. <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.16>
  36. Gervasini, G., Vizcaino, S., Gasiba, C., Carrillo, J. A., & Benitez, J. (2005). Differences in CYP3A5\*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and Other Caucasian populations. *Therapeutic drug monitoring*, 27(6), 819–821. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000186914.32038.a0>
  37. Ghasemi, N., Razavi, S., & Nikzad, E. (2017). Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell journal*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4867>
  38. Givens, R. C., Lin, Y. S., Dowling, A. L., Thummel, K. E., Lamba, J. K., Schuetz, E. G., Stewart, P. W., & Watkins, P. B. (2003). CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 95(3), 1297–1300. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00322.2003>
  39. Gonzalez F.J., & Coughtrie M, & Tukey R.H. (2017). Metabolismo de los fármacos. Brunton L.L., & Chabner B.A., & Knollmann B.C.(Eds.), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 12e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1882&sectionid=138607404>
  40. Gonzalez-Covarrubias, V., Morales-Franco, M., Cruz-Correa, O. F., Martínez-Hernández, A., García-Ortíz, H., Barajas-Olmos, F., Genis-Mendoza, A. D., Martínez-Magaña, J. J., Nicolini, H., Orozco, L., & Soberón, X. (2019). Variation in Actionable Pharmacogenetic Markers in Natives and Mestizos From Mexico. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1169. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01169>
  41. Griffiths, W. J., & Wang, Y. (2022). Cholesterol metabolism: from lipidomics to immunology. *Journal of lipid research*, 63(2), 100165. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100165>
  42. Guo, J., Yu, B., Zou, J., Zhang, L., Wang, T., Zhou, J., & Qiu, T. (2022). Correlation between CYP3A5 gene polymorphism and BK virus infection in kidney transplant recipients. *Transplant immunology*, 75, 101709. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101709>
  43. Guy, J., F. Harralson, A., Pooler, K., & S. Kidd, R. (2017). The Frequency of CYP3A5 Expression in a Mexican Population Compared to a Caucasian Population. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 14(4), 1–8. <https://doi.org/10.9734/JAMPS/2017/35168>
  44. Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *The American journal of medicine*, 133(12), 1380–1390.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
  45. Häusler, D., Torke, S., Peelen, E., Bertsch, T., Djukic, M., Nau, R., Larochelle, C., Zamvil, S. S., Brück, W., & Weber, M. S. (2019). High dose vitamin D exacerbates central nervous system autoimmunity by raising T-cell excitatory calcium. *Brain: a journal of neurology*, 142(9), 2737–2755. <https://doi.org/10.1093/brain/awz190>
  46. Hedström, A. K., Lima Bomfim, I., Barcellos, L., Gianfrancesco, M., Schaefer, C., Kockum, I., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2014). Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology*, 82(10), 865–872. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000203>

47. Hedström, A. K., Lima Bomfim, I., Hillert, J., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2015). Obesity interacts with infectious mononucleosis in risk of multiple sclerosis. *European journal of neurology*, 22(3), 578–e38. <https://doi.org/10.1111/ene.12620>
48. Henderson, L. M., Claw, K. G., Woodahl, E. L., Robinson, R. F., Boyer, B. B., Burke, W., & Thummel, K. E. (2018). P450 Pharmacogenetics in Indigenous North American Populations. *Journal of personalized medicine*, 8(1), 9. <https://doi.org/10.3390/jpm8010009>
49. Hodgens, A. & Sharman, T. (2022). Corticosteroids. *StatPearls Publishing LLC*. PMID: 32119499 Bookshelf ID: [NBK554612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119499/)
50. Htun, Y. Y., Swe, H. K., & Saw, T. M. (2018). CYP3A5\*3 Genetic Polymorphism and Tacrolimus Concentration in Myanmar Renal Transplant Patients. *Transplantation proceedings*, 50(4), 1034–1040. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.02.032>
51. Huddart, R., Fohner, A. E., Whirl-Carrillo, M., Wojcik, G. L., Gignoux, C. R., Popejoy, A. B., Bustamante, C. D., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2019). Standardized Biogeographic Grouping System for Annotating Populations in Pharmacogenetic Research. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 105(5), 1256–1262. <https://doi.org/10.1002/cpt.1322>
52. Huerta-Chagoya, A., Moreno-Macías, H., Fernández-López, J. C., Ordóñez-Sánchez, M. L., Rodríguez-Guillén, R., Contreras, A., Hidalgo-Miranda, A., Alfaro-Ruiz, L. A., Salazar-Fernandez, E. P., Moreno-Estrada, A., Aguilar-Salinas, C. A., & Tusié-Luna, T. (2019). A panel of 32 AIMs suitable for population stratification correction and global ancestry estimation in Mexican mestizos. *BMC genetics*, 20(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0707-7>
53. Hustert, E., Haberl, M., Burk, O., Wolbold, R., He, Y. Q., Klein, K., Nuessler, A. C., Neuhaus, P., Klattig, J., Eiselt, R., Koch, I., Zibat, A., Brockmöller, J., Halpert, J. R., Zanger, U. M., & Wojnowski, L. (2001). The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*, 11(9), 773–779. <https://doi.org/10.1097/00008571-200112000-00005>
54. Idda, M. L., Campesi, I., Fiorito, G., Vecchietti, A., Urru, S. A. M., Solinas, M. G., Franconi, F., & Floris, M. (2021). Sex-Biased Expression of Pharmacogenes across Human Tissues. *Biomolecules*, 11(8), 1206. <https://doi.org/10.3390/biom11081206>
55. Instituto de Salud para el Bienestar (2022). Día mundial de la esclerosis múltiple. Obtenido de: <https://www.gob.mx/insabi/articulos/dia-mundial-de-la-esclerosis-multiple-30-de-mayo?idiom=es>
56. Islam, M. S., Mostofa, A. G., Ahmed, M. U., Bin Sayeed, M. S., Hassan, M. R., & Hasnat, A. (2014). Association of CYP3A4, CYP3A5 polymorphisms with lung cancer risk in Bangladeshi population. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(2), 1671–1678. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1230-0>
57. Jongen, P. J., Stavrakaki, I., Voet, B., Hoogervorst, E., van Munster, E., Linssen, W. H., Sinnige, L. G., Verhagen, W. I., Visser, L. H., van der Kruijk, R., Verheul, F., Boringa, J., Heerings, M., Gladdines, W., Lönnqvist, F., & Gaillard, P. (2016). Patient-reported adverse effects of high-dose intravenous methylprednisolone treatment: a prospective web-based multi-center study in multiple sclerosis patients with a relapse. *Journal of neurology*, 263(8), 1641–1651. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8183-3>
58. Kapugi, M., & Cunningham, K. (2019). Corticosteroids. *Orthopedic nursing*, 38(5), 336–339. <https://doi.org/10.1097/NOR.0000000000000595>
59. Klyushova, L. S., Perepechaeva, M. L., & Grishanova, A. Y. (2022). The Role of CYP3A in Health and Disease. *Biomedicines*, 10(11), 2686. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112686>
60. Kosmidou, M., Katsanos, A.H., Katsanos, K.H. et al. (2017) Multiple sclerosis and inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol* 264, 254–259. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8340-8>
61. Kotowski, M. J., Bogacz, A., Bartkowiak-Wieczorek, J., Tejchman, K., Dziewanowski, K., Ostrowski, M., Czerny, B., Grześkowiak, E., Machaliński, B., & Sieńko, J. (2019).

- Effect of Multidrug-Resistant 1 (MDR1) and CYP3A4\*1B Polymorphisms on Cyclosporine-Based Immunosuppressive Therapy in Renal Transplant Patients. *Annals of transplantation*, 24, 108–114. <https://doi.org/10.12659/AOT.914683>
62. Kuhlmann, T., Moccia, M., Coetzee, T., Cohen, J. A., Correale, J., Graves, J., Marrie, R. A., Montalban, X., Yong, V. W., Thompson, A. J., Reich, D. S., & International Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis (2022). Multiple sclerosis progression: time for a new mechanism-driven framework. *The Lancet. Neurology*, 22(1), 78–88. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00289-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00289-7)
63. Lemus, H. N., Warrington, A. E., & Rodriguez, M. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. *Neurologic clinics*, 36(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.08.002>
64. Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., & Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Revue neurologique*, 172(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.006>
65. Lewis, P. A., & Spillane, J. E. (2019). Multiple Sclerosis. The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease, 221–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811069-0.00007-0>
66. Li, D., Zhang, G. L., Lou, Y. Q., Li, Q., Wang, X., & Bu, X. Y. (2007). Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A5 and MDR1 haplotype in mainland Chinese Han, Uygur and Kazakh ethnic groups. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 32(1), 89–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2007.00791.x>
67. Lorincz, B., Jury, E. C., Vrablik, M., Ramanathan, M., & Uher, T. (2022). The role of cholesterol metabolism in multiple sclerosis: From molecular pathophysiology to radiological and clinical disease activity. *Autoimmunity reviews*, 21(6), 103088. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103088>
68. Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., ... & Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), 278–286. <https://n.neurology.org/content/83/3/278.short>
69. Macaron, G., & Ontaneda, D. (2019). Diagnosis and Management of Progressive Multiple Sclerosis. *Biomedicines*, 7(3), 56. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030056>
70. Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current drug targets*, 19(1), 38–54. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557v>
71. Marcus R. What Is Multiple Sclerosis? *JAMA*. 2022 Nov 22;328(20):2078. doi: 10.1001/jama.2022.14236. PMID: 36413229.
72. Martínez-Altarrriba, M. C., Ramos-Campoy, O., Luna-Calcaño, I. M., & Arrieta-Antón, E. (2015). Revisión de la esclerosis múltiple (1). A propósito de un caso [A review of multiple sclerosis (1). Presentation of a case]. *Semergen*, 41(5), 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.semereg.2014.07.009>
73. Meyers, L., Groover, C. J., Douglas, J., Lee, S., Brand, D., Levin, M. C., & Gardner, L. A. (2014). A role for Apolipoprotein A-I in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 277(1-2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.10.010>
74. Milovanovic, T., Jankovic, K., Boricic, I., Dragasevic, S., Stojkovic Lalosevic, M., & Dumic, I. (2020). Methylprednisolone induced liver injury in a patient with multiple sclerosis. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*, 29(1), 119–120. <https://doi.org/10.15403/jgld-686>
75. Miqdad, M. A., Mohamad, A., Ali, F., Mourad, A. R., & Alamri, A. (2022). Methylprednisolone-Induced Symptomatic Sinus Bradycardia in a Multiple Sclerosis Patient: A Case Report. *Cureus*, 14(1), e21443. <https://doi.org/10.7759/cureus.21443>
76. Mirghani, R. A., Sayi, J., Aklillu, E., Allqvist, A., Jande, M., Wennerholm, A., Eriksen, J., Herben, V. M., Jones, B. C., Gustafsson, L. L., & Bertilsson, L. (2006). CYP3A5 genotype has significant effect on quinine 3-hydroxylation in Tanzanians, who have

- lower total CYP3A activity than a Swedish population. *Pharmacogenetics and genomics*, 16(9), 637–645. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000230411.89973.1b>
77. Mora, J. R., Iwata, M., & von Andrian, U. H. (2008). Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature reviews. Immunology*, 8(9), 685–698. <https://doi.org/10.1038/nri2378>
  78. Muhammad, Y., Amandeep, G. & Sidharth, S. (2022). Corticosteroid Adverse Effects. *StatPearls Publishing LLC*. PMID: [30285357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30285357/) Bookshelf ID: [NBK531462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30285357/)
  79. Nicolaidis, N. C., Pavlaki, A. N., Maria Alexandra, M. A., & Chrousos, G. P. (2018). Glucocorticoid Therapy and Adrenal Suppression. In K. R. Feingold (Eds.) et. al., *Endotext*. MDText.com, Inc. PMID: [25905379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905379/) Bookshelf ID: [NBK279156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905379/)
  80. Nociti, V., Biolato, M., De Fino, C., Bianco, A., Losavio, F. A., Lucchini, M., Marrone, G., Grieco, A., & Mirabella, M. (2018). Liver injury after pulsed methylprednisolone therapy in multiple sclerosis patients. *Brain and behavior*, 8(6), e00968. <https://doi.org/10.1002/brb3.968>
  81. Nourbakhsh, B., & Mowry, E. M. (2019). Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 25(3), 596–610. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000725>
  82. Novillo, A., Romero-Lorca, A., Gaibar, M., Bahri, R., Harich, N., Sánchez-Cuenca, D., Esteban, E., & Fernández-Santander, A. (2015). Genetic diversity of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms in North African populations from Morocco and Tunisia. *The International journal of biological markers*, 30(1), e148–e151. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000118>
  83. Ocejo, A., & Correa, R. (2021). Methylprednisolone. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
  84. Odnozhivkina, U. G., Kuznetsova, E. A., & Petrov, A. M. (2022). 25-Hydroxycholesterol as a Signaling Molecule of the Nervous System. *Biochemistry. Biokhimiia*, 87(6), 524–537. <https://doi.org/10.1134/S0006297922060049>
  85. Oh, J., Vidal-Jordana, A., & Montalban, X. (2018). Multiple sclerosis: clinical aspects. *Current opinion in neurology*, 31(6), 752–759. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000622>
  86. Ordoñez, G., Romero, S., Orozco, L., Pineda, B., Jiménez-Morales, S., Nieto, A., García-Ortiz, H., & Sotelo, J. (2015). Genomewide admixture study in Mexican Mestizos with multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*, 130, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2014.11.026>
  87. Park, S. Y., Kang, Y. S., Jeong, M. S., Yoon, H. K., & Han, K. O. (2008). Frequencies of CYP3A5 genotypes and haplotypes in a Korean population. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 33(1), 61–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2008.00879.x>
  88. Pashaei, S., Mohammadi, P., Yarani, R., Haghgoo, S. M., & Emami Aleagha, M. S. (2021). Carbohydrate and lipid metabolism in multiple sclerosis: Clinical implications for etiology, pathogenesis, diagnosis, prognosis, and therapy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 712, 109030. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109030>
  89. Petrova, D. T., Yaramov, N., Toshev, S., Nedeva, P., Maslyankov, S., von Ahsen, N., Oellerich, M., & Toncheva, D. (2007). Genotyping of CYP3A5 polymorphisms among Bulgarian patients with sporadic colorectal cancer and controls. *Onkologie*, 30(11), 559–563. <https://doi.org/10.1159/000108285>
  90. Pineda-Torra, I., Siddique, S., Waddington, K. E., Farrell, R., & Jury, E. C. (2021). Disrupted Lipid Metabolism in Multiple Sclerosis: A Role for Liver X Receptors?. *Frontiers in endocrinology*, 12, 639757. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.639757>
  91. Puckett, Y., Gabbar, A., & Bokhari, A.A. (2022) Prednisone. *StatPearls Publishing LLC*. PMID: [30521230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30521230/) Bookshelf ID: [NBK534809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30521230/)
  92. Rahmzadeh, R., Moghadasi, A.N., Navardi, S., Minagar, A. & Sahraian, M.A. (2018) Chapter 1 - Multiple Sclerosis: Clinical Features, Pathophysiology, Diagnosis, and Management, Editor(s): Alireza Minagar, Neuroinflammation (Second Edition),

Academic Press, Pages 1-20, ISBN 9780128117095, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811709-5.00001-6>.

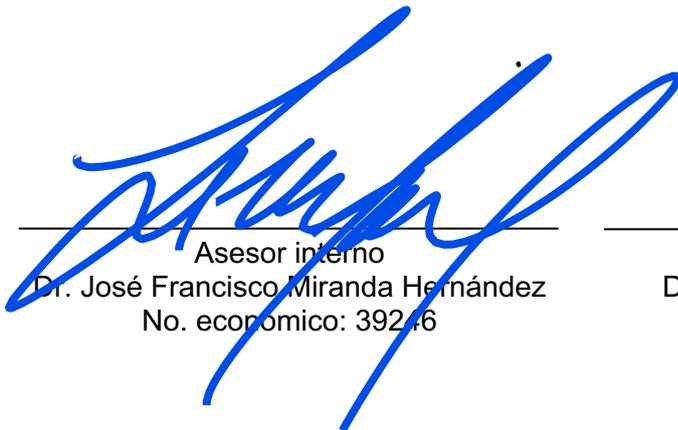
93. Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *The New England journal of medicine*, 353(16), 1711–1723. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050541>
94. Rivero Fernández, M., Riesco, J. M., Moreira, V. F., Moreno, A., López San Román, A., Arranz, G., & Ruiz Del Arbol, L. (2008). Toxicidad hepática recurrente secundaria a metilprednisolona intravenosa [Recurrent acute liver toxicity from intravenous methylprednisolone]. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*, 100(11), 720–723. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082008001100010>
95. Rodriguez-Antona, C., Savieo, J. L., Lauschke, V. M., Sangkuhl, K., Drögemöller, B. I., Wang, D., van Schaik, R. H. N., Gilep, A. A., Peter, A. P., Boone, E. C., Ramey, B. E., Klein, T. E., Whirl-Carrillo, M., Pratt, V. M., & Gaedigk, A. (2022). PharmVar GeneFocus: CYP3A5. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 112(6), 1159–1171. <https://doi.org/10.1002/cpt.2563>
96. Rojas, Juan I, Pattrucco, Liliana, & Cristiano, Edgardo. (2019). Evaluación clínica y por imágenes de la esclerosis múltiple progresiva. *Medicina (Buenos Aires)*, 79(1), 37-43. Recuperado de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802019000100006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802019000100006&lng=es&tlng=es).
97. Rotondo, E., Graziosi, A., Di Stefano, V., & Mohn, A. A. (2018). Methylprednisolone-induced hepatotoxicity in a 16-year-old girl with multiple sclerosis. *BMJ case reports*, 11(1), e226687. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-226687>
98. Sahraian, M. A., Yadegari, S., Azarpajouh, R., & Foroughpour, M. (2012). Avascular necrosis of the femoral head in multiple sclerosis: report of five patients. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 33(6), 1443–1446. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0914-8>
99. Saiz-Rodríguez, M., Almenara, S., Navares-Gómez, M., Ochoa, D., Román, M., Zubiaur, P., Koller, D., Santos, M., Mejía, G., Borobia, A. M., Rodríguez-Antona, C., & Abad-Santos, F. (2020). Effect of the Most Relevant CYP3A4 and CYP3A5 Polymorphisms on the Pharmacokinetic Parameters of 10 CYP3A Substrates. *Biomedicines*, 8(4), 94. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8040094>
100. Schaeffer, J., Cossetti, G., Mallucci, G. & Pluchino, S. (2015). Chapter 30 - Multiple Sclerosis. Editor(s): Michael J. Zigmond, Lewis P. Rowland, Joseph T. Coyle, *Neurobiology of Brain Disorders*, Academic Press, Pages 497-520, ISBN 9780123982704. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398270-4.00030-6>.
101. Seredina, T. A., Goreva, O. B., Talaban, V. O., Grishanova, A. Y., & Lyakhovich, V. V. (2012). Association of cytochrome P450 genetic polymorphisms with neoadjuvant chemotherapy efficacy in breast cancer patients. *BMC medical genetics*, 13, 45. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-45>
102. Shah, A., Panchal, V., Patel, K., Alimohamed, Z., Kaka, N., Sethi, Y., & Patel, N. (2022). Pathogenesis and management of multiple sclerosis revisited. *Disease-a-month : DM*, 101497. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2022.101497>
103. Sintzel, M. B., Rametta, M., & Reder, A. T. (2018). Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurology and therapy*, 7(1), 59–85. <https://doi.org/10.1007/s40120-017-0086-4>
104. Sinues, B., Vicente, J., Fanlo, A., Vasquez, P., Medina, J. C., Mayayo, E., Conde, B., Arenaz, I., & Martinez-Jarreta, B. (2007). CYP3A5\*3 and CYP3A4\*1B allele distribution and genotype combinations: differences between Spaniards and Central Americans. *Therapeutic drug monitoring*, 29(4), 412–416. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31811f390a>
105. Skauby, R. H., Bergan, S., Andersen, A. M., Vethe, N. T., & Christensen, H. (2021). In vitro assessments predict that CYP3A4 contributes to a greater extent than

- CYP3A5 to prednisolone clearance. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 129(6), 427–436. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13645>
106. Smets, I., Van Deun, L., Bohyn, C., van Pesch, V., Vanopdenbosch, L., Dive, D., Bissay, V., Dubois, B., & Belgian Study Group for Multiple Sclerosis (2017). Corticosteroids in the management of acute multiple sclerosis exacerbations. *Acta neurologica Belgica*, 117(3), 623–633. <https://doi.org/10.1007/s13760-017-0772-0>
107. Sociedad Nacional de Esclerosis Múltiple (2023). Cómo se diagnostica la esclerosis múltiple. Obtenido de: <https://www.nationalmssociety.org/es/sintomas-diagnostico/diagnostico-esclerosis-multiple>
108. Solomon A. J. (2019). Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 25(3), 611–635. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000728>
109. Sosa-Macías, M., & Llerena, A. (2013). Cytochrome P450 genetic polymorphisms of Mexican indigenous populations. *Drug metabolism and drug interactions*, 28(4), 193–208. <https://doi.org/10.1515/dmdi-2013-0037>
110. Suarez-Kurtz, G., Perini, J. A., Bastos-Rodrigues, L., Pena, S. D., & Struchiner, C. (2007). Impact of population admixture on the distribution of the CYP3A5\*3 polymorphism. *Pharmacogenomics*, 8(10), 1299–1306. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.10.1299>
111. Sun, M., Liu, N., Xie, Q., Li, X., Sun, J., Wang, H., & Wang, M. (2021). A candidate biomarker of glial fibrillary acidic protein in CSF and blood in differentiating multiple sclerosis and its subtypes: A systematic review and meta-analysis. *Multiple sclerosis and related disorders*, 51, 102870. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.102870>
112. Świechowski, R., Jeleń, A., Mirowski, M., Talarowska, M., Gałęcki, P., Pietrzak, J., Wodziński, D., & Balcerczak, E. (2019). Estimation of CYP3A4\*1B single nucleotide polymorphism in patients with recurrent Major Depressive Disorder. *Molecular genetics & genomic medicine*, 7(6), e669. <https://doi.org/10.1002/mgg3.669>
113. Tamashiro, E. Y., Felipe, C. R., Genvigir, F. D. V., Rodrigues, A. C., Campos, A. B., Hirata, R. D. C., Tedesco-Silva, H., & Medina-Pestana, J. O. (2017). Influence of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on tacrolimus and sirolimus exposure in stable kidney transplant recipients. *Drug metabolism and personalized therapy*, 32(2), 89–95. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2016-0036>
114. Thangavel, C., Boopathi, E., & Shapiro, B. H. (2013). Inherent sex-dependent regulation of human hepatic CYP3A5. *British journal of pharmacology*, 168(4), 988–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02222.x>
115. Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., Mowry, E. M., ... Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet. Neurology*, 17(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
116. Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, 391(10130), 1622–1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1)
117. Tornio, A., & Backman, J. T. (2018). Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 83, 3–32. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2018.04.007>
118. Torres-Valadez, R., Roman, S., Ojeda-Granados, C., Gonzalez-Aldaco, K., & Panduro, A. (2022). Differential distribution of gene polymorphisms associated with hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and hypoalphalipoproteinemia among Native American and Mestizo Mexicans. *World journal of hepatology*, 14(7), 1408–1420. <https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i7.1408>

119. Travers, B. S., Tsang, B. K., & Barton, J. L. (2022). Multiple sclerosis: Diagnosis, disease-modifying therapy and prognosis. *Australian journal of general practice*, 51(4), 199–206. <https://doi.org/10.31128/AJGP-07-21-6103>
120. Vargas-Alarcón, G., Ramírez-Bello, J., de la Peña, A., Calderón-Cruz, B., Peña-Duque, M. A., Martínez-Ríos, M. A., Ramírez-Fuentes, S., Pérez-Méndez, O., & Fragoso, J. M. (2014). Distribution of ABCB1, CYP3A5, CYP2C19, and P2RY12 gene polymorphisms in a Mexican Mestizos population. *Molecular biology reports*, 41(10), 7023–7029. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3590-y>
121. Vuppalanchi, R. (2018) *Metabolism of Drugs and Xenobiotics, Practical Hepatic Pathology: a Diagnostic Approach (Second Edition)*, Elsevier, Pages 319-326, ISBN 9780323428736, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42873-6.00022-6>.
122. W. Guy, J., F. Harralson, A., Pooler, K., & S. Kidd, R. (2017). The Frequency of CYP3A5 Expression in a Mexican Population Compared to a Caucasian Population. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 14(4), 1–8. <https://doi.org/10.9734/JAMPS/2017/35168>
123. Ward, M., & Goldman, M. D. (2022). Epidemiology and Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 28(4), 988–1005. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000001136>
124. Waring R. H. (2020). Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 50(1), 9–18. <https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1648911>
125. Wildner, P., Stasiołek, M., & Matysiak, M. (2020). Differential diagnosis of multiple sclerosis and other inflammatory CNS diseases. *Multiple sclerosis and related disorders*, 37, 101452. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101452>
126. Wright, W. C., Chenge, J., & Chen, T. (2019). Structural Perspectives of the CYP3A Family and Their Small Molecule Modulators in Drug Metabolism. *Liver research*, 3(3-4), 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.08.001>
127. Wu, G.F., Cross, A.H. (2021). Immunology of Multiple Sclerosis. In: Piquet, A.L., Alvarez, E. (eds) *Neuroimmunology*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-61883-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61883-4_9)
128. Yahiaoui, N., Roche, M., Aissaoui-Hoffmann, N., Keita, B. A., & Mallaret, M. (2017). Intravenous methylprednisolone induced acute pancreatitis. *European journal of clinical pharmacology*, 73(5), 645–646. <https://doi.org/10.1007/s00228-017-2207-5>
129. Yamout, B. I., & Alroughani, R. (2018). Multiple Sclerosis. *Seminars in neurology*, 38(2), 212–225. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1649502>
130. Yamout, B., Sahraian, M., Bohlega, S., Al-Jumah, M., Goueider, R., Dahdaleh, M., Inshasi, J., Hashem, S., Alsharoqi, I., Khoury, S., Alkhawajah, M., Koussa, S., Al Khaburi, J., Almahdawi, A., Alsaadi, T., Slassi, E., Daodi, S., Zakaria, M., & Alroughani, R. (2020). Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of multiple sclerosis: 2019 revisions to the MENACTRIMS guidelines. *Multiple sclerosis and related disorders*, 37, 101459. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101459>
131. Yousef, A. M., Bulatova, N. R., Newman, W., Hakooz, N., Ismail, S., Qusa, H., Zahran, F., Anwar Ababneh, N., Hasan, F., Zaloom, I., Khayat, G., Al-Zmili, R., Naffa, R., & Al-Diab, O. (2012). Allele and genotype frequencies of the polymorphic cytochrome P450 genes (CYP1A1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19) in the Jordanian population. *Molecular biology reports*, 39(10), 9423–9433. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1807-5>
132. Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
133. Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., & Qin, S. (2021). Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12808. <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>

134. Zhou, Y., Ingelman-Sundberg, M., & Lauschke, V. M. (2017). Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 102(4), 688–700. <https://doi.org/10.1002/cpt.690>
135. Żochowska, D., Wyzgał, J., & Paćzek, L. (2012). Impact of CYP3A4\*1B and CYP3A5\*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. *Annals of transplantation*, 17(3), 36–44. <https://doi.org/10.12659/aot.883456>
136. Zoubek, M. E., Pinazo-Bandera, J., Ortega-Alonso, A., Hernández, N., Crespo, J., Contreras, F., Medina-Cáliz, I., Sanabria-Cabrera, J., Sanjuan-Jiménez, R., González-Jiménez, A., García-Cortés, M., Lucena, M. I., Andrade, R. J., & Robles-Díaz, M. (2019). Liver injury after methylprednisolone pulses: A disputable cause of hepatotoxicity. A case series and literature review. *United European gastroenterology journal*, 7(6), 825–837. <https://doi.org/10.1177/2050640619840147>

**Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos**



---

Asesor interno  
Dr. José Francisco Miranda Hernández  
No. económico: 39246



---

Asesor externo  
Dr. Jorge Luis Guerrero Camacho  
Céd. Prof: 8281388