

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES C3435T Y G2677T/A Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN MDR1 EN PACIENTES EPILÉPTICOS RESISTENTES A CARBAMAZEPINA Y FENITOÍNA DEL HOSPITAL HONORIO DELGADO ESPINOZA DE AREQUIPA - 2018

Tesis presentada por la Bachiller:

Chirinos Reymer, Alexa Andrea

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

Ing. Carpio Carpio, José Miguel

AREQUIPA – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000037474

N° Trámite en Fac. 357-2017
Fecha Recep. Fac. 18-08-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **CHIRINOS REYMER, Alexa Andrea**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"IDENTIFICACION DE LAS MUTACIONES C3435T Y G2677T/A Y ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN MDRI EN PACIENTES EPILEPTICOS RESISTENTES A CARBAMAZEPINA Y FENITOINA DEL HOSPITAL HONORIO DELGADO ESPINOZA DE AREQUIPA"

DICTAMINADORES: **Dra. Yenny López Valencia** 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
FIRMAS: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 06/09/2017

ASESOR: **Ing. José Miguel Carpio Carpio**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
FIRMA FECHA 28/09/17

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas**
- 2) **Dra Yenny López Valencia**
- 3) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

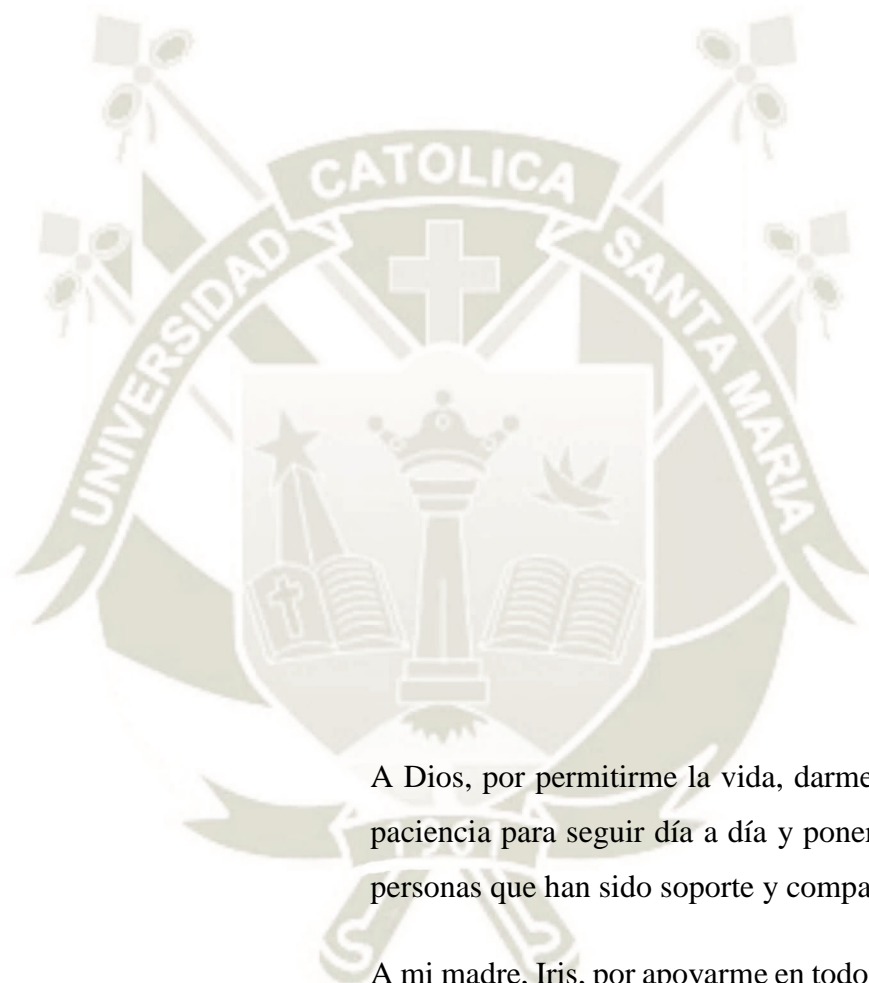
Atentamente
FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE José Villanueva Salas
VOCAL Dra. Yenny López Valencia
SECRETARIO Mgter. Jaime Barreda del Carpio

FECHA 18/10/18 HORA 19:00 hs LOCAL SUM Facultad

FIRMA DEL DECANO FECHA 12/10/18

DEDICATORIA



A Dios, por permitirme la vida, darme la fortaleza y la paciencia para seguir día a día y poner en mi camino a personas que han sido soporte y compañía.

A mi madre, Iris, por apoyarme en todo momento, ser mi ejemplo de superación, por sus consejos, los valores que me ha inculcado, la confianza que depositó en mí y sobre todo por su amor incondicional.

A mi familia, por los consejos, la confianza y por compartir numerosas alegrías conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A FONDECYT, por el financiamiento recibido para el desarrollo de esta investigación.

A José Villanueva, PhD, por su invaluable apoyo y consejos recibidos durante la realización de este trabajo.

A mi asesor, Ing. José Carpio, por la orientación y el apoyo recibidos para desarrollar y concluir mi tesis.

Al Laboratorio de Biología Molecular y Farmacología Experimental de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas de la UCSM, por el permiso y apoyo para llevar a cabo mi tesis.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un desorden neurológico que se caracteriza por convulsiones recurrentes y afecta a aproximadamente 50 millones de personas alrededor del mundo. Un tercio de los pacientes que padecen esta enfermedad no responden al tratamiento para reducir las convulsiones, a pesar de recibirlo en monoterapia o incluso politerapia. Cada individuo reacciona de manera diferente a un fármaco debido a la diferencia entre los organismos y principalmente al genoma único que poseen; por lo tanto, no todos respondemos de la misma manera ante un tratamiento con fármacos. Los estudios de farmacogenética proveen información útil acerca de mutaciones que afectan la respuesta hacia un fármaco.

La glicoproteína-P pertenece a un grupo importante de transportadores ABC, involucrados en la regulación de la farmacocinética de varios fármacos y funciona como mecanismo de defensa exportando las moléculas, sustratos de ella, hacia afuera de las células donde se encuentra. Dentro de las moléculas que son sustrato de la proteína transmembrana se encuentran varios antiepilépticos como la carbamazepina y fenitoína, los cuales, para lograr el efecto terapéutico deseado, deben atravesar la barrera hematoencefálica que tiene como proteína transportadora a la glicoproteína-P. La sobreexpresión de esta proteína en la barrera hematoencefálica reduciría las concentraciones de antiepilépticos en las regiones activas de los focos epilépticos debido a que los reconoce como xenobióticos y este mecanismo se relaciona con el desarrollo de la resistencia a fármacos en epilepsia.

Grupos de investigación de diferentes partes del mundo han estudiado la relación que existe entre la resistencia al tratamiento de la epilepsia y las mutaciones que afectan al gen MDR1. Numerosos polimorfismos de nucleótido único (SNP), sinónimos y no sinónimos, han sido identificados en el gen MDR1, algunos de los cuales se ubican en regiones codificantes y parecen alterar la función de la proteína que codifica.

En el Perú no se han realizado estudios previos sobre la frecuencia de mutaciones del gen MDR1 en la población, por lo tanto, no se tiene información de si afectan o no, ni cómo afectarían en el caso de un paciente que padece epilepsia y recibe tratamiento. El presente trabajo tiene por objetivo identificar dos de las posibles mutaciones del gen MDR1, C3435T y G2677T/A y evaluar la expresión de dicho gen en personas con diagnóstico de epilepsia del Hospital Honorio Delgado Espinoza de Arequipa, y como consecuencia determinar si existe una relación entre la presencia de las mutaciones o la sobreexpresión de la glicoproteína-P y la resistencia ante fármacos antiepilépticos.



RESUMEN

La Glicoproteína-P, codificada por el gen MDR1, es una proteína transmembrana y pertenece al grupo de transportadores ABC; actúa como mecanismo de defensa en el organismo exportando varias moléculas, entre ellas los fármacos antiepilépticos, fuera del cerebro, donde deben lograr su efecto terapéutico. A lo largo de nuestro ADN podemos encontrar mutaciones y, es frecuente hallar algunas de ellas en el gen MDR1, las dos más relevantes son C3435T y G2677T/A, que podrían afectar la estructura o funcionamiento de la proteína. Se ha relacionado la presencia de estos SNPs y la sobreexpresión de la Glicoproteína-P con la resistencia a fármacos antiepilépticos, es decir, la falta de reducción del número e intensidad de convulsiones en pacientes tratados con ellos. Este estudio se realizó con el objetivo de identificar las mutaciones ya mencionadas y evaluar la expresión de la proteína en una población de Arequipa. Se recolectaron en total 146 muestras divididas en tres grupos: farmacorrespondedores, farmacorresistentes y controles. Para la identificación de mutaciones se aplicó la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y para medir la expresión del gen MDR1 se utilizó PCR en tiempo real (qPCR). Los resultados para el análisis de mutaciones se reportaron como la frecuencia de los genotipos y la frecuencia alélica. Finalmente se concluyó que la resistencia a los fármacos fenitoína y carbamazepina no está asociada a la presencia de las mutaciones C3435T y G2677T/A ni a la sobreexpresión de la Glicoproteína-P.

Palabras clave: Glicoproteína-P, mutación, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, expresión genética, PCR tiempo real.

ABSTRACT

P-glycoprotein, encoded by the gene MDR1, is a transmembrane protein and belongs to the ABC family of transporters; it acts as a defense mechanism in the organism exporting numerous molecules, like antiepileptic drugs (AEDs), outside the brain where they have to achieve their therapeutic effect. Over the DNA there could be mutations and in the MDR1 gene we usually can find some of them, the most important are C3435T and G2677T/A, they could affect the structure or the function of the protein. It has been related the presence of this SNPs and the overexpression of P-glycoprotein with the resistance to AEDs, this means, the lack of reduction of the number and intensity of the seizures in patients treated with them. This study was carry out with the aim of identify the mutations and measure the expression of the protein in a population of Arequipa. A total of 146 samples was divided into three groups: responder, resistant and control. For the identification of the changings it was applied the technique of restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) and for the measurement of the expression of the gene MDR1 it was used real-time PCR. The results for the analysis of mutations were reported as genotypic and allelic frequency. In conclusion, the resistance to phenytoin and carbamazepine is not related to the presence of C3435T and G2677T/A mutations, neither to overexpression of P-glycoprotein.

Keywords: P-glycoprotein, mutation, restriction length fragment polymorphism, gene expression, real-time PCR.

ÍNDICE DE CONTENIDO

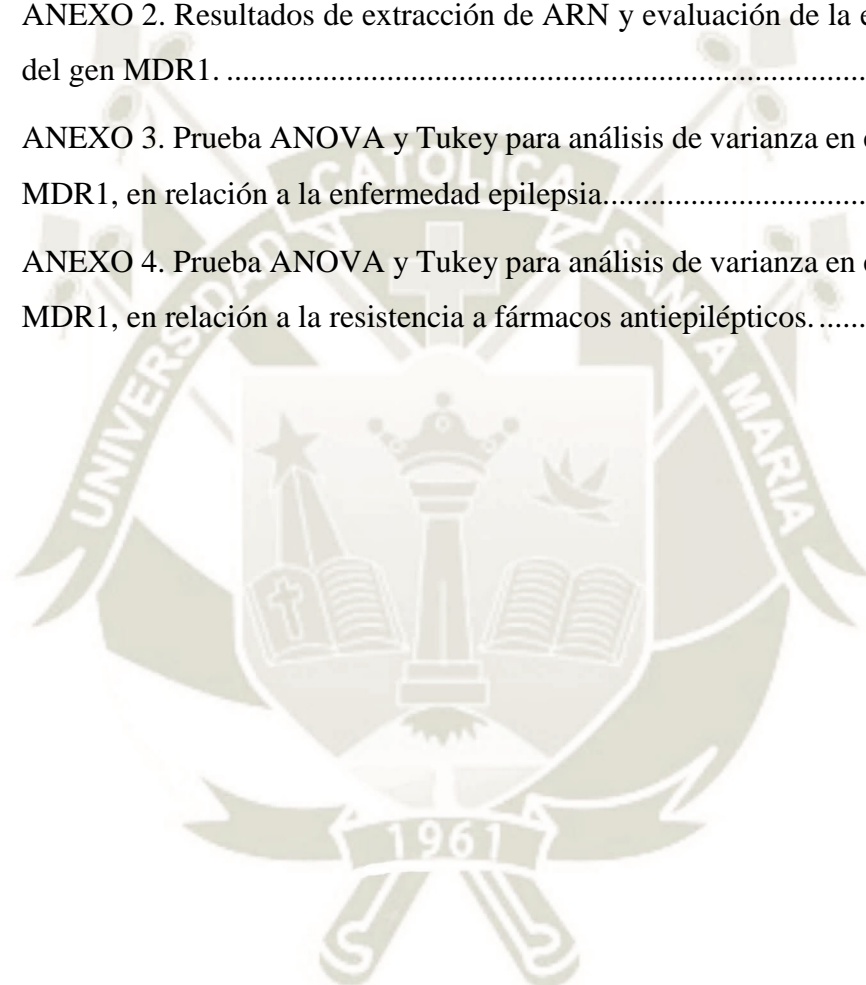
INTRODUCCIÓN	I
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XV
CAPÍTULO I.....	1
1.1. OBJETIVOS.....	1
1.2. HIPÓTESIS	2
CAPÍTULO II	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. La epilepsia.....	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Resistencia a fármacos antiepilépticos.....	5
2.2. La glicoproteína-P	6
2.2.1 Generalidades.....	6
2.2.2 Funciones de la glicoproteína-P	7
2.3. El gen MDR1.....	8
2.3.1 Mutaciones en el gen MDR1.....	8
2.3.1.1 C3435T	8
2.3.1.2 G2677T/A.....	9
2.3.1.3 C1236T.....	9
2.3.2 Estado mutacional del gen MDR1 en algunas poblaciones	9
2.4. El rol de la glicoproteína-P en la resistencia a fármacos antiepilépticos	10

2.5.	Medicina personalizada	11
2.3.3	La farmacogenética y farmacogenómica	12
2.6.	Reacción en cadena de la polimerasa	13
2.4.1	Fundamento de la PCR	13
2.4.2	Componentes de la PCR	14
2.4.3	Etapas de la PCR.....	15
2.4.3.1	Activación de la enzima	15
2.4.3.2	Desnaturalización	15
2.4.3.3	Alineamiento	16
2.4.3.4	Extensión o elongación	16
2.4.4	Detección de productos	17
2.4.5	PCR en tiempo real	17
2.4.5.1	Tipos de cuantificación de la expresión genética.....	19
a)	Cuantificación absoluta	19
b)	Cuantificación relativa	19
2.7.	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción	20
2.5.1	Fundamento de la técnica.....	21
2.5.2	Enzimas de restricción	21
2.5.2.1	Tipos de enzimas de restricción	22
a)	Tipo I.....	22
b)	Tipo II.....	23
c)	Tipo III	23
d)	Tipo IV	23
2.5.2.2	Patrones de corte de las enzimas de restricción	23
a)	Extremos romos.....	23
b)	Extremos cohesivos o pegajosos	23

CAPÍTULO III	24
MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Lugar de ejecución	24
3.2. Materiales	24
3.2.1 Material biológico	24
3.2.2 Material de laboratorio	24
3.2.3 Reactivos	25
3.2.4 Kits	26
3.2.5 Equipos.....	26
3.3. Métodos	27
3.3.1 Selección de pacientes.....	27
3.3.2 Obtención de muestras de sangre de pacientes con epilepsia y voluntarios	30
3.3.3 Detección de mutaciones C3435T y G2677T/A en el gen MDR1 mediante RFLP	30
3.3.3.1 Extracción de ADN genómico a partir de células sanguíneas.....	30
3.3.3.2 Evaluación de la integridad y calidad del ADN	30
3.3.3.3 Cuantificación del ADN	31
3.3.3.4 Amplificación del gen MDR1 por PCR convencional	31
3.3.3.5 Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción	33
3.3.3.6 Electroforesis de productos de PCR y productos de digestión.....	33
3.3.4 Evaluación de la expresión del gen MDR1 mediante qPCR.....	34
3.3.4.1 Extracción de ARN total a partir de células sanguíneas.....	34
3.3.4.2 Evaluación de la integridad y calidad del ARN	34
3.3.4.3 Cuantificación del ARN	34
3.3.4.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	35

3.3.4.5	Cuantificación del ADNc obtenido por fluorometría.....	36
3.3.4.6	Medición de la expresión relativa del gen MDR1 por qPCR.....	36
3.3.5	Análisis estadístico.....	37
CAPÍTULO IV	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1.	Obtención de las muestras sanguíneas de voluntarios con epilepsia y voluntarios sanos	39
4.2.	Detección de las mutaciones C3435T y G2677T/A en el gen MDR1 mediante RFLP	40
4.2.1	Extracción de ADN genómico y evaluación de la calidad e integridad... ..	41
4.2.2	Cuantificación del ADN obtenido por fluorometría	42
4.2.3	Amplificación del gen MDR1 por PCR convencional.....	43
4.2.4	Electroforesis de productos de PCR.....	43
4.2.5	Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción.....	45
4.2.6	Electroforesis de productos digeridos con enzimas de restricción.....	46
4.2.7	Reporte de las mutaciones C3435T y G2677T/A y análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas.	49
4.3.	Evaluación de la expresión del gen MDR1 mediante qPCR.....	59
4.3.1	Extracción de ARN total y evaluación de la integridad y calidad	59
4.3.2	Cuantificación del ARN obtenido por fluorometría.....	60
4.3.3	Síntesis de ADNc y cuantificación por fluorometría	61
4.3.4	Medición de la expresión relativa del gen MDR1 por qPCR.....	61
4.3.5	Reporte de la expresión del gen MDR1 en voluntarios con epilepsia: farmacorrespondedores, farmacorresistentes; y voluntarios control.	63
CAPÍTULO V	69
CONCLUSIONES	69

RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	81
ANEXO 1. Resultados de extracción de ADN y detección de mutaciones C3435T y G2677T/A.....	81
ANEXO 2. Resultados de extracción de ARN y evaluación de la expresión relativa del gen MDR1.	96
ANEXO 3. Prueba ANOVA y Tukey para análisis de varianza en expresión del gen MDR1, en relación a la enfermedad epilepsia.....	122
ANEXO 4. Prueba ANOVA y Tukey para análisis de varianza en expresión del gen MDR1, en relación a la resistencia a fármacos antiepilépticos.....	123



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos o cebadores utilizados para realizar la PCR de las mutaciones C3435T, G2677T y G2677A del gen MDR1.....	31
Tabla 2. Concentración final de los cebadores y protocolos de amplificación para las mutaciones C3435T, G2677T y G2677A del gen MDR1.....	32
Tabla 3. Enzimas de restricción usadas para la digestión de los productos de PCR y condiciones de digestión.	33
Tabla 4. Protocolo de síntesis de ADN complementario (ADNc)	35
Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos o cebadores utilizados para realizar la PCR tiempo real (qPCR) del gen MDR1 y gen de referencia GAPDH.....	36
Tabla 6. Concentración final de los cebadores y protocolo de amplificación para el gen MDR1 y el gen de referencia GAPDH.....	37
Tabla 7. Características demográficas de las poblaciones en estudio.	40
Tabla 8. Tamaño de los amplicones de las regiones que comprenden las mutaciones.	43
Tabla 9. Tamaño de los fragmentos obtenidos por digestión con enzimas de restricción.....	46
Tabla 10. Distribución genotípica y alélica de la mutación C3435T del gen MDR1 en relación al desarrollo de la enfermedad.	52
Tabla 11. Distribución genotípica y alélica de la mutación C3435T del gen MDR1 en relación a la resistencia a fármacos antiepilépticos. (Grupo A: Farmacorrespondedores y Grupo B: Farmacorresistentes)	53
Tabla 12. Distribución genotípica y alélica de la mutación C3435T del gen MDR1 en relación al desarrollo de la enfermedad.	55
Tabla 13. Distribución genotípica y alélica de la mutación G2677T/A del gen MDR1 en relación a la resistencia a fármacos antiepilépticos. (Grupo A: Farmacorrespondedores y Grupo B: Farmacorresistentes).....	57
Tabla 14. Estadística descriptiva para los resultados de expresión relativa en las poblaciones comparadas: Grupo A (farmacorrespondedores), Grupo B (farmacorresistentes), Epilepsia y Controles.....	64

Tabla 15. Medidas de absorbancia del ADN a 260nm y 280nm y relación de pureza (260/280). A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.	81
Tabla 16. Concentraciones de ADN medidas por fluorimetría. A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.	87
Tabla 17. Presencia y genotipos de las mutaciones C3435T y G2677T/A en voluntarios con epilepsia farmacorrespondedores (GRUPO A).....	91
Tabla 18. Presencia y genotipos de las mutaciones C3435T y G2677T/A en voluntarios con epilepsia farmacorresistentes (GRUPO B).....	93
Tabla 19. Presencia y genotipos de las mutaciones C3435T y G2677T/A en voluntarios control (GRUPO C).....	94
Tabla 20. Medidas de absorbancia del ARN a 230nm, 260nm y 280nm y relación de pureza (260/280 y 260/230). A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.	96
Tabla 21. Concentraciones de ARN medidas por fluorimetría. A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.	107
Tabla 22. Concentraciones de ADNc medidas por fluorimetría. A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.	111
Tabla 23. Valores de expresión relativa de voluntarios con epilepsia farmacorrespondedores (GRUPO A).	113
Tabla 24. Valores de expresión relativa de voluntarios con epilepsia farmacorresistentes (GRUPO B).	116
Tabla 25. Valores de expresión relativa de voluntarios control (GRUPO C).	118
Tabla 26. Tabla ANOVA para Expresión por Grupo.	122
Tabla 27. Pruebas de Múltiples Rangos para Expresión por Grupo.	122
Tabla 28. Tabla ANOVA para Expresión por Grupo.	123
Tabla 29. Pruebas de Múltiples Rangos para Expresión por Grupo.	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Glicoproteína-P (Pg-P) como transportador de flujo de sustratos a nivel de la membrana. ⁽²⁰⁾	6
Figura 2. Localización de la glicoproteína-P a nivel del organismo humano. ⁽²⁶⁾	7
Figura 3. Transporte de los fármacos antiepilépticos (antiepileptic drugs-AED) a nivel de la barrera hematoencefálica. ⁽¹⁵⁾	10
Figura 4. Diversidad en los fenotipos de respuesta a fármacos. ⁽³⁴⁾	11
Figura 5. Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
Figura 6. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ⁽⁴⁰⁾	16
Figura 7. Mecanismo de unión de las moléculas de SYBR Green durante la qPCR, mayor afinidad cuando se ha unido al ADN de doble hebra. ⁽⁴⁹⁾	18
Figura 8. Metodología para la detección de productos mediante electroforesis.	30
Figura 9. Metodología para la amplificación del gen MDR1.	32
Figura 10. Metodología para la cuantificación de ácidos nucleicos.	35
Figura 11. A) Corrida electroforética del ADN extraído de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 90V/30min. B) Corrida electroforética del ADN extraído de voluntarios control. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 90V/30min.	42
Figura 12. Corrida electroforética de los productos de PCR de la mutación C3435T de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 2%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/15min. Amplicón de 208 pb.....	44
Figura 13. Corrida electroforética de los productos de PCR de la mutación G2677T de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 2%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/15min. Amplicón de 226 pb.....	44
Figura 14. Corrida electroforética de los productos de PCR de la mutación G2677A de voluntarios control. Agarosa: 2%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/15min. Amplicón de 222 pb.....	45
Figura 15. Corrida electroforética de los productos digeridos para la mutación C3435T (voluntarios con epilepsia). Agarosa: 2.5%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/15min.	47

Figura 16. Corrida electroforética de los productos digeridos para la mutación G2677T (voluntarios con epilepsia). Agarosa: 4%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/30min, 65V/15min.	47
Figura 17. Corrida electroforética de los productos digeridos para la mutación G2677A (voluntarios con epilepsia). Agarosa: 4%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/25min, 65V/15min.	48
Figura 18. Frecuencia de las mutaciones C3435T y G2677T/A. A) GRUPO A: voluntarios farmacorrespondedores. B) GRUPO B: voluntarios farmacorresistentes. C) GRUPO C: voluntarios control.	50
Figura 19. A) Frecuencia de los genotipos CC (homocigoto normal), TT (homocigoto mutado) y CT (heterocigoto) de la mutación C3435T, relacionando la mutación con el desarrollo de la enfermedad. B) Frecuencia de los alelos C (normal) y T (mutado) de la mutación C3435T, relacionando la mutación con el desarrollo de la enfermedad.	51
Figura 20. Frecuencia de los genotipos CC (homocigoto normal), TT (homocigoto mutado) y CT (heterocigoto) de la mutación C3435T, relacionando la mutación con la farmacorresistencia. B) Frecuencia de los alelos C (normal) y T (mutado) de la mutación C3435T, relacionando la mutación con la farmacorresistencia.	53
Figura 21. A) Frecuencia de los genotipos GG (homocigoto normal), TT y AA (homocigotos mutados) y GT, GA y AT (heterocigotos) de la mutación G2677T/A, relacionando la mutación con el desarrollo de la enfermedad. B) Frecuencia de los alelos G (normal), T y A (mutados) de la mutación G2677T/A, relacionando la mutación con el desarrollo de la enfermedad.	55
Figura 22. A) Frecuencia de los genotipos GG (homocigoto normal), TT y AA (homocigotos mutados) y GT, GA y AT (heterocigotos) de la mutación G2677T/A, relacionando la mutación con la farmacorresistencia. B) Frecuencia de los alelos G (normal), T y A (mutados) de la mutación G2677T/A, relacionando la mutación con la farmacorresistencia.	57
Figura 23. Corrida electroforética de los ARN extraídos de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30min.	60
Figura 24. Curvas de amplificación por qPCR de los genes MDR1 y GAPDH (gen de referencia).	62
Figura 25. Curvas de disociación de los genes MDR1 y GAPDH.	63

Figura 26. Distribución de los valores de expresión relativa de la Glicoproteína-P en dos poblaciones: voluntarios con epilepsia y voluntarios control.....	65
Figura 27. Distribución de los valores de expresión relativa de la Glicoproteína-P en dos grupos de voluntarios con epilepsia: farmacorrespondedores y farmacorresistentes.	67
Figura 28. Corrida electroforética de extracción de ADN de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 100 V/30 min	85
Figura 29. Corrida electroforética de extracción de ADN de voluntarios control. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 100 V/30 min	86
Figura 30. Corrida electroforética de extracción de ARN de voluntarios con epilepsia (E001 hasta E050). Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30 min.....	103
Figura 31. Corrida electroforética de extracción de ARN de voluntarios con epilepsia (E052 hasta E083). Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30 min.....	104
Figura 32. Corrida electroforética de extracción de ARN de voluntarios control (C001 hasta C039). Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30 min.	105
Figura 33. Corrida electroforética de extracción de ARN de voluntarios con epilepsia (C040 hasta C080). Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30 min.	106

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
µg	microgramos
µL	microlitros
A	Adenina
ABCB1	transportador de unión ATP (<i>ATP binding cassette</i>)
Abs	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AED	fármacos antiepiépticos (<i>antiepileptic drugs</i>)
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ATP	adenosin trifosfato
BHE	barrera hematoencefálica
C	citosa
CNS	sistema nervioso central (<i>central nervous system</i>)
Cp	punto de cruce (<i>crossing point</i>)
Ct	ciclo umbral (<i>threshold cycle</i>)
dNTP's	desoxi nucleótidos trifosfatados
dsADN	ácido desoxirribonucleico de doble hebra (<i>double stranded ADN</i>)
EDTA	ácido etilen-diamino-tetraacético
G	guanina
GAPDH	gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GUS	β-glucoronidasa
MDR1	gen de resistencia a múltiples drogas (<i>multi-drug resistance 1</i>)
Mg ⁺²	Magnesio divalente
mL	mililitros
ng	nanogramos
nM	nanomolar

OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
P-gp	glicoproteína-P (<i>P-glycoprotein</i>)
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RFLP	polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
SAM	S-adenosil-metionina
SNP	polimorfismo de nucleótido único (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
ssADN	ácido desoxirribonucleico de una hebra (<i>single stranded ADN</i>)
T	timina
TAE	tris acetato EDTA
Tm	temperatura de fusión de los cebadores (<i>melting temperature</i>)
UV	luz ultravioleta

CAPÍTULO I

1.1. OBJETIVOS

General

Identificar la presencia de mutaciones y la expresión del gen MDR1 en pacientes epilépticos resistentes a carbamazepina y fenitoína del Hospital Honorio Delgado Espinoza de Arequipa y su relación con la epilepsia y la farmacorresistencia.

Específicos

- Extraer ADN genómico y ARN total a partir de células sanguíneas empleando el método en fase sólida utilizando columnas de sílica.
- Medir la concentración, calidad e integridad del ADN genómico y ARN total extraídos, por fluorometría, espectrofotometría y electroforesis.
- Amplificar el gen MDR1 empleando la técnica de PCR convencional.
- Identificar la presencia de las mutaciones C3435T y G2677T/A en el gen MDR1 empleando polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).
- Evaluar la expresión del gen MDR1 por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR).

1.2. HIPÓTESIS

Dado que las mutaciones y sobreexpresión en el gen MDR1 se han relacionado a la resistencia frente a los tratamientos para la epilepsia; es probable que la sobreexpresión genética y las mutaciones en dicho gen en pacientes epilépticos se relacionen también con la farmacorresistencia en dicha enfermedad.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. La epilepsia

La definición de epilepsia incluye tres elementos, resumidos en:

“Es un desorden cerebral que se caracteriza por la predisposición a desarrollar al menos una convulsión, acompañada de una alteración en el cerebro que puede generar más convulsiones. Además de provocar alteraciones en aspectos neurobiológicos, cognitivos, psicológicos y sociales.”⁽¹⁾

2.1.1 Generalidades

Actualmente la epilepsia afecta a unos 50 millones de personas dentro de las cuales el 80% vive en países con ingresos bajos y medianos. Entre 4 a 10 por cada 1000 personas padecen epilepsia activa (con ataques y necesidad de tratamiento). Sin embargo, en países de ingresos bajos y medianos la incidencia es mayor, entre 7 y 14 por 1000 personas. Anualmente se diagnostica epilepsia a 2,4 millones de personas, entre 30 y 50 por cada 100 000 y esta cifra se puede duplicar en países con ingresos bajos.^(2,3)

Esta enfermedad se considera crónica, no transmisible y las convulsiones que presenta son movimientos involuntarios que afectan a una parte o a la totalidad del cuerpo y en ocasiones acompañadas de pérdida de la consciencia y del control de los esfínteres. Dichas convulsiones se deben a múltiples descargas eléctricas de grupos de células cerebrales.

La epilepsia idiopática es aquella en la cual no se conocen las causas y la secundaria o sintomática puede deberse a las siguientes causas⁽²⁾:

- Daño cerebral por lesiones prenatales o perinatales,
- Malformaciones congénitas o alteraciones genéticas,
- Traumatismo encéfalo craneal grave,
- Accidente cerebrovascular,
- Infecciones cerebrales como meningitis o neurocisticercosis,
- Tumores cerebrales

El tratamiento con fármacos antiepilépticos (*antiepileptic drugs*, AEDs), tiene cuatro objetivos ⁽⁴⁾:

- Eliminar o reducir la frecuencia de las convulsiones.
- Evadir los efectos adversos asociados al tratamiento a largo plazo.
- Ayudar a los pacientes a restaurar su actividad psicosocial y vocacional
- Mantener un estilo de vida normal.

Hasta el momento no existen tratamientos disponibles que prevengan el desarrollo de la enfermedad o induzcan una remisión permanente o cura. La decisión para seleccionar un tratamiento con AED debe estar basada en un análisis de las causas como crisis aisladas, sean convulsivas o no ya que así sean crisis menores pueden presentar alteraciones psicosociales, profesionales y de seguridad. En caso la epilepsia sea refractaria se plantea un estudio y tratamiento quirúrgico. ^(5,6)

Estos fármacos deben atravesar la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro y causar el efecto terapéutico deseado. ⁽⁴⁾

- Fenitoína

Actúa sobre los canales de sodio de la membrana de la célula neuronal, limitando la proliferación de la actividad convulsiva y reduciendo la propagación de las convulsiones. Promoviendo el flujo de sodio de las neuronas, la fenitoína tiende a estabilizar el umbral contra la hiperexcitabilidad causada por la excesiva estimulación o cambios ambientales capaces de reducir la gradiente de sodio en la membrana. Incluye la reducción de la potenciación post-tetánica en la sinapsis lo que impide a los focos convulsivos hacer detonar áreas adyacentes. ⁽⁷⁾

- Carbamazepina

Es un anticonvulsivante cuyo mecanismo de acción es desconocido, pero se cree que inhibe las descargas repetitivas bloqueando los canales de sodio. El alivio de dolor puede que esté asociado con el bloqueo de la transmisión sináptica en el núcleo trigeminal y el control de las convulsiones con la reducción de la potenciación post-tetánica de la transmisión sináptica en la médula espinal.⁽⁸⁾

2.1.2 Resistencia a fármacos antiepilépticos

Una gran parte de los pacientes que padecen epilepsia responden al tratamiento con antiepilépticos (farmacorrespondedores), mientras que en un tercio de los pacientes no se observa reducción en el número de convulsiones a pesar de la administración de fármacos antiepilépticos o una combinación de ellos (farmacorresistencia), también conocida como epilepsia refractaria. Sin embargo, la falta de control sobre la epilepsia no siempre significa que exista farmacorresistencia, sino que es una pseudo resistencia, debida a un diagnóstico incorrecto o a la falta de análisis de causas que deben ser consideradas antes de diagnosticar como resistente a un paciente como: tratamiento con un fármaco inapropiado; una dosis incorrecta; errores en la orden de exámenes auxiliares como electroencefalogramas o resonancias magnéticas; errores en el reconocimiento de status epiléptico subclínico; falla en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los AEDs en la selección de las dosis; retraso en el reconocimiento de epilepsia refractaria con el consecuente retraso en la identificación de pacientes que pueden ser tratados con cirugía.^(9,10)

La farmacorresistencia en la epilepsia se define como el fracaso de la prueba de dos tratamientos elegidos y usados adecuadamente, en monoterapia o combinación, para lograr la reducción de convulsiones.⁽¹¹⁾

La epilepsia es una condición heterogénea con causas variables; la resistencia a los fármacos antiepilépticos incluye factores genéticos y ambientales, cambios estructurales o anormalidades en la red neuronal y en el funcionamiento de los neurotransmisores.⁽¹²⁾ Existen dos hipótesis para explicar la farmacorresistencia: primero, la hipótesis del transportador que señala un aumento en la expresión o función

de los transportadores de drogas en la barrera hematoencefálica (BHE), permitiendo un acceso limitado de los fármacos hacia el sistema nervioso, por lo tanto, las concentraciones de antiepilépticos son demasiado bajas como para inducir efectos terapéuticos.⁽¹³⁾ Segundo, la hipótesis del *Target* indica que cambios estructurales y/o funcionales en los receptores provocan una reducción en su sensibilidad hacia los AEDs.^(14,15)

2.2. La glicoproteína-P

2.2.1 Generalidades

La glicoproteína-P (*P-Glycoprotein*, P-gp), es una proteína transmembrana que pertenece al grupo de los transportadores ABC (*ATP binding cassette*) dependientes de ATP. Su peso es de 170 kD y está compuesta por 1280 aminoácidos formando dos mitades, cada una compuesta por seis dominios transmembrana y un dominio de unión al ATP. Se localiza en diferentes tejidos del organismo, tales como intestino, hígado, riñón, leucocitos, páncreas, placenta y cerebro (barrera hematoencefálica) (Figura 2).⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ Además de encontrarse en tejidos normales, se ha encontrado sobre expresada en células tumorales donde restringe la entrada de agentes quimioterapéuticos hacia las células, siendo así una barrera en el tratamiento del cáncer por quimioterapia. Una sola molécula de P-gp puede transportar sustancias con un rango de peso molecular desde 260 g/mol hasta 1202 g/mol.⁽¹⁹⁾

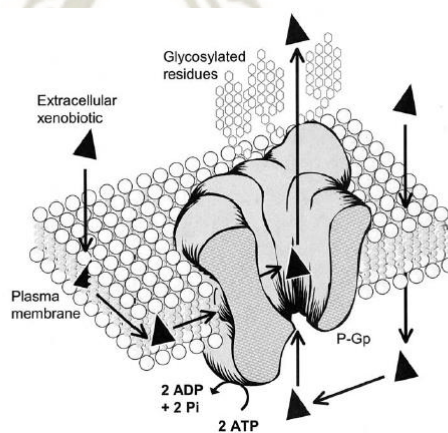


Figura 1. Glicoproteína-P (Pg-P) como transportador de flujo de sustratos a nivel de la membrana.⁽²⁰⁾

2.2.2 Funciones de la glicoproteína-P

Esta proteína funciona como mecanismo de defensa y permite o no la entrada y salida de sustancias. Se trata de una bomba de flujo dependiente de energía (ATP) que juega un importante rol en la biodisponibilidad y citotoxicidad de un amplio rango de drogas y xenobióticos. (Figura 1) Puede reducir potencialmente la absorción, la biodisponibilidad y el tiempo de retención de numerosos fármacos.^(16,19)

Las funciones que cumple dependen del tejido en el que se encuentren como por ejemplo en el sistema nervioso central, protege del paso de xenobióticos y en la placenta protege al feto de los fármacos.⁽²¹⁾

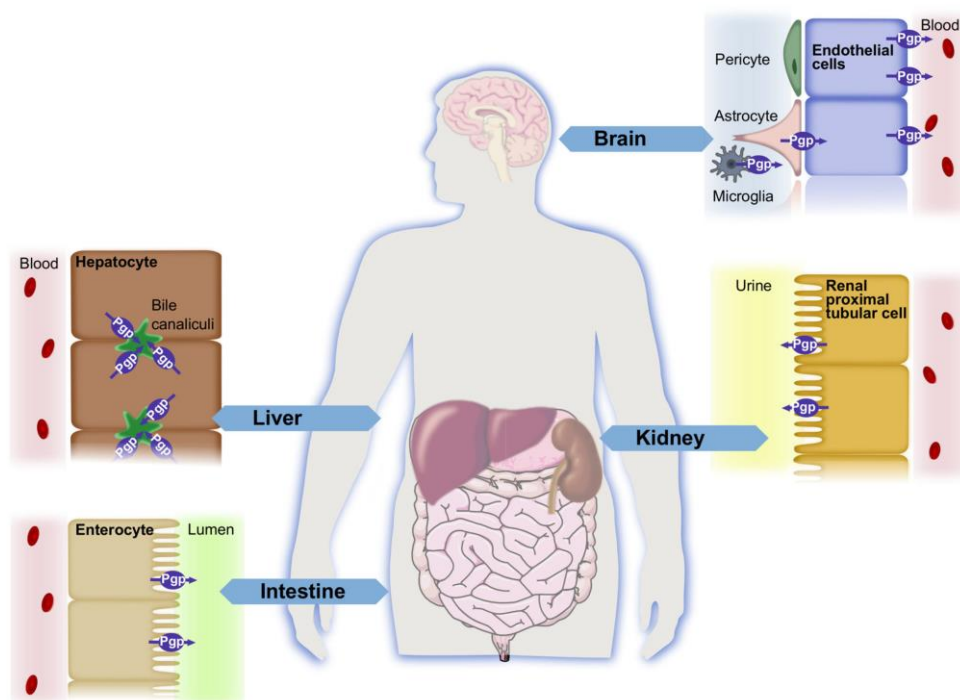


Figura 2. Localización de la glicoproteína-P a nivel del organismo humano.⁽²⁶⁾

Posee una cualidad única, un amplio rango en especificidad de sustrato, desde pequeñas moléculas como cationes orgánicos, carbohidratos, aminoácidos y algunos antibióticos, hasta macromoléculas como polisacáridos y proteínas.⁽²²⁾ Algunos estudios han demostrado que para definir la afinidad de los compuestos hacia la P-gp son importantes dos aspectos: la lipofilicidad y el número de puentes de hidrógeno de

un compuesto. El rango de sustratos de la P-gp incluye distintos agentes farmacológicos usados en la quimioterapia contra el cáncer, hipertensión, alergia, infección, inmunosupresión, inflamación y neurología; es por ello que muchos de los antiepilépticos, de naturaleza lipofílica, son sustratos de esta proteína.^(20,23) Cabe destacar que muchos sustratos de la P-gp son también sustratos del citocromo P450, a pesar de no existir alguna homología en la secuencia o en la estructura de ambos.

En el caso particular de la epilepsia, la glicoproteína-P impide que los fármacos antiepilépticos atraviesen la barrera hematoencefálica, o que sólo bajas concentraciones del fármaco lleguen al cerebro disminuyendo así el efecto terapéutico. Además, la sobreexpresión de transportadores de fármacos (glicoproteína-P) a nivel de la barrera hematoencefálica también se relaciona con la resistencia a los antiepilépticos, ya que reduce la acumulación de los fármacos y evita la acción terapéutica.^(24,25)

2.3. El gen MDR1

La P-gp está codificada por el gen MDR1 (*Multi Drug Resistance 1*), también llamado ABCB1, que está localizado en el cromosoma 7, región 7q21.12. Comprende 28 exones y tiene una longitud de 251.3 Kb.⁽²⁶⁾ Su ADNc abarca aproximadamente 4.8kb y sus exones se encuentran en un rango de tamaño desde 49 hasta 587 pb.⁽¹⁸⁾

2.3.1 Mutaciones en el gen MDR1

En el gen MDR1 (gen de resistencia a múltiples fármacos) se han identificado numerosos polimorfismos que se ubican en regiones codificantes y que pueden alterar la función de la proteína. C3435T, G2677T/A y C1236T son las mutaciones más frecuentes y más estudiados del gen MDR1.

2.3.1.1 C3435T

Se encuentra localizada en el exón 26, provoca la transición citosina por timina (C→T), representa una mutación sinónima, es decir el cambio de nucleótido no produce cambio en el aminoácido que codifica, isoleucina (Ile) y se ubica en el

segundo dominio ATP de la P-gp. Además, ha sido asociada a una disminución en la expresión de la P-gp en placenta, hígado y leucocitos.^(16,18,27) Muchos estudios han revelado que la presencia del alelo T se relaciona con una reducción en la expresión por encontrarse en una región promotora del gen, a pesar de ser una mutación silenciosa por no cambiar el aminoácido codificado.⁽²⁸⁾

2.3.1.2 G2677T/A

En este polimorfismo las transversiones guanina por timina (G→T) y guanina por adenina (G→A) representan mutaciones no sinónimas ya que el cambio de guanina por timina produce el cambio de alanina (Ala) por serina (Ser) y el cambio de guanina por adenina, produce el cambio por treonina (Thr). Se ubica en el exón 21.^(16,27)

2.3.1.3 C1236T

Esta mutación provoca la transición de citosina por timina (C→T), es sinónima y está localizada en el exón 12 que codifica la región TM6, esencial para la unión del substrato. Esta mutación en combinación con la C3435T puede producir alteración en la estructura tridimensional de la proteína.⁽¹⁶⁾ Sin embargo, por si sola parece no afectar ni la expresión ni la función de la proteína, además no se ha demostrado que afecte a la estabilidad del ARNm.⁽²⁹⁾

2.3.2 Estado mutacional del gen MDR1 en algunas poblaciones

Se ha reportado información sobre las frecuencias alélicas para los polimorfismos en el gen MDR1 C3435T, los Caucásicos (ingleses) presentan mayor frecuencia alélica (52%) que los asiáticos, chinos, (47%). La población africana (ghaneses) por el contrario mostró menor frecuencia alélica que las otras poblaciones (17%). La población americana (chilenos) presenta una frecuencia alélica de 32%.

En el caso de la mutación G2677T/A del gen MDR1 se reportan dos variantes G2677T y G2677A, la frecuencia alélica reportada para la primera, en caucásicos (alemanes) y asiáticos (japoneses) fue de 42%, y en americanos (chilenos) fue 26%, mayores a la de afroamericanos (11%). Por otro lado, la variante G2677A es menos

frecuente ya que la mayor frecuencia alélica se reporta en asiáticos (22%), seguida por americanos (chilenos) con 9% y finalmente en caucásicos 2%.⁽³⁰⁾

2.4. El rol de la glicoproteína-P en la resistencia a fármacos antiepilépticos

La glicoproteína-P es un ejemplo de transportador de proteínas y ha sido propuesta como mediadora en la farmacoresistencia en diferentes enfermedades como cáncer⁽³¹⁾, infecciones, enfermedades inflamatorias y desórdenes del sistema nervioso central (CNS).

La mayor parte de los fármacos antiepilépticos, entre ellos fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, lamotrigina y levetiracetam, son sustratos de la P-gp, por su naturaleza lipofílica, ella se encarga de mediar su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE). (Figura 3)⁽³²⁾

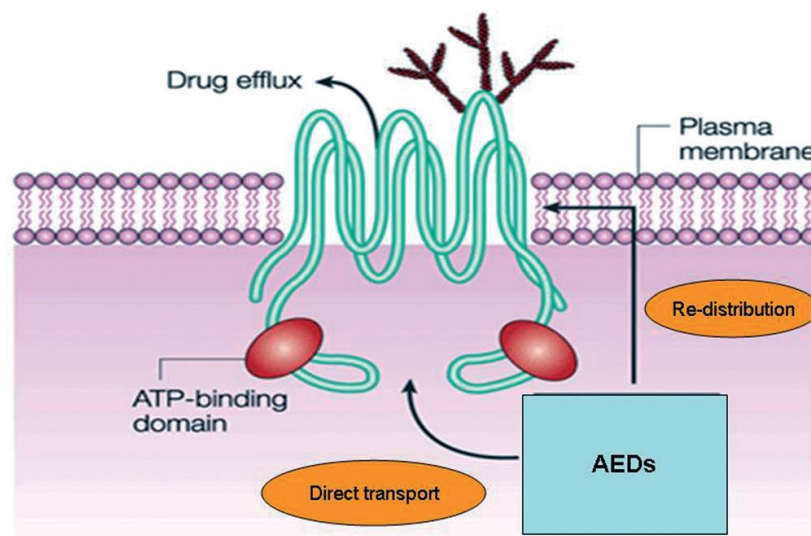


Figura 3. Transporte de los fármacos antiepilépticos (antiepileptic drugs-AED) a nivel de la barrera hematoencefálica.⁽¹⁵⁾

Varios estudios en animales han demostrado que existe sobreexpresión de esta proteína de transporte en casos de epilepsia, lo que ocasiona que las concentraciones

de fármaco que deben llegar al cerebro no sean las suficientes, por ello no hay un efecto deseado.^(15,33)

2.5. Medicina personalizada

La eficacia de un tratamiento, las reacciones adversas a determinados fármacos y las enfermedades refractarias son evidentes en grupos de pacientes con diagnósticos idénticos, aparentemente. (Figura 4) Existen numerosos estudios donde las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos se atribuyen a polimorfismos en genes que codifican enzimas metabolizadoras, transportadores u objetivos de los fármacos; los cuales se heredan, permanecen estables a lo largo de la vida de un individuo y cuyos efectos pueden ser profundos, haciéndolos potencialmente útiles para estrategias de prescripción de fármacos.⁽³⁴⁾

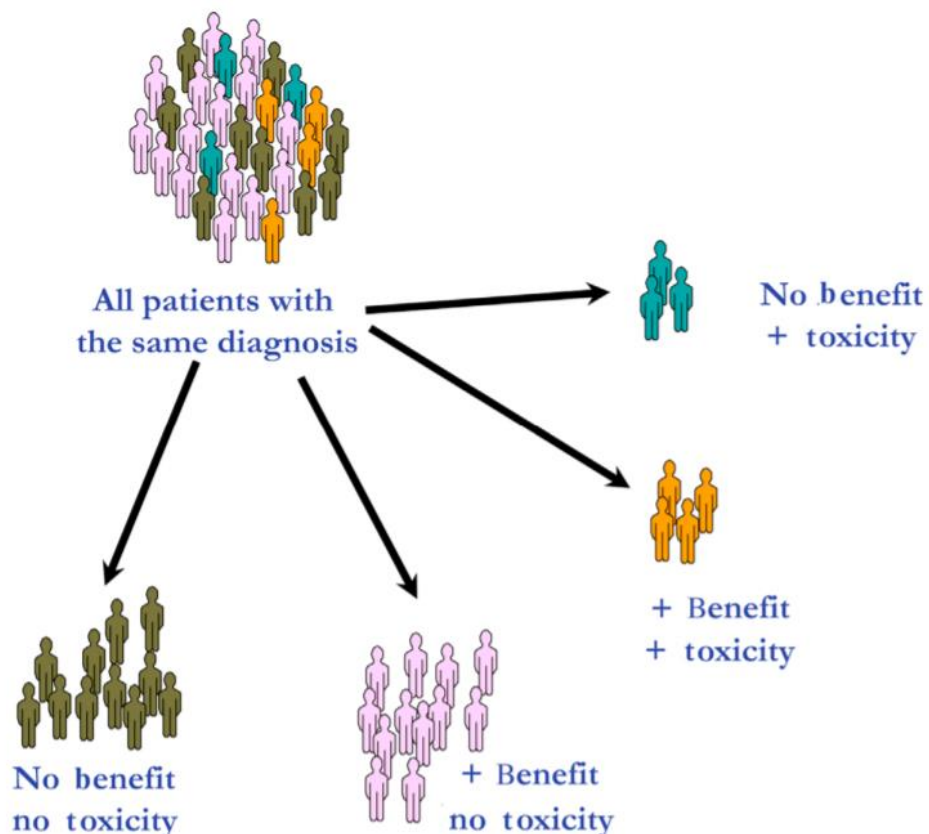


Figura 4. Diversidad en los fenotipos de respuesta a fármacos.⁽³⁴⁾

Cuando se estudia la acción de un fármaco en un individuo, se toman en cuenta dos objetivos: qué cantidad de fármaco se necesita para que llegue a su destino en el organismo y cómo van a responder las células a dicho fármaco. Es por ello que la respuesta a fármacos presenta variabilidad entre individuos.⁽³⁵⁾

La visión de la medicina en el futuro es la medicina personalizada, que ofrece un tratamiento correcto para la persona correcta en la dosis correcta, maximizando la eficacia del tratamiento y reduciendo la toxicidad en cada paciente. Tiene como objetivo brindar un tratamiento individualizado y predecir el resultado de aplicar diferentes tratamientos a diferentes pacientes.⁽³⁶⁾

2.3.3 La farmacogenética y farmacogenómica

La variabilidad ante la respuesta a fármacos entre individuos se debe a diferentes factores, como son la genómica, epigenómica, el medio ambiente y características personales de cada paciente como el género, edad y probable medicación. En los últimos años la farmacogenómica ha permitido comprender la susceptibilidad a enfermedades y la fisiopatología, promoviendo el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La farmacogenómica implica la efectividad de un tratamiento, la propensión a enfermedades por parte de las personas y el desarrollo de los fármacos.⁽³⁷⁾

Generalmente se confunden los términos farmacogenética y farmacogenómica, es por ello que en el 2002 la Agencia Europea para la evaluación de productos medicinales (EMA, *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) definió:

- Farmacogenética: es el estudio de variaciones interindividuales en la secuencia del ADN relacionadas a la respuesta a los fármacos, debidas a la herencia genética.^(38,39)
- Farmacogenómica: es el estudio de la variabilidad de la expresión de genes individuales, relevantes en la propensión hacia las enfermedades, así como la respuesta hacia un fármaco a nivel celular, tisular, individual o de una población.⁽³⁸⁾

La farmacogenómica es considerada como una evolución de la farmacogenética ya que la primera involucra el estudio del genoma completo (ADN) y sus productos (ARN), en aspectos relacionados con la respuesta a fármacos, utilizando tecnologías de alto rendimiento; en tanto que la segunda estudia sólo un número limitado de genes para caracterizar las bases moleculares de la respuesta individual a fármacos. ⁽³⁸⁾

2.6. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) fue desarrollada en los años 80 por Kary Mullis, que recibió el premio Nobel en 1994. Es una técnica molecular que permite la amplificación de una región específica de ADN billones de veces utilizando la enzima ADN polimerasa, permitiendo así una posterior manipulación del ADN con otras técnicas moleculares. ^(40,41)

Se utiliza para amplificar una región específica de ADN generalmente hasta 10 kb, sin embargo, existen técnicas que permiten amplificar fragmentos de hasta 40 kb. ⁽⁴²⁾

2.4.1 Fundamento de la PCR

La enzima ADN polimerasa, que normalmente está presente en la replicación del ADN en nuestras células, sintetiza una cadena complementaria al fragmento diana utilizando una pequeña secuencia de nucleótidos llamado primer o cebador. El primer se une a la secuencia de ADN en un sitio específico, donde la polimerasa se une y sintetiza una hebra complementaria usando los oligonucleótidos para completar la secuencia. Los cebadores limitan el fragmento que será sintetizado por la enzima, es por eso que el resultado son millones de copias de la secuencia flanqueada por ellos. ⁽⁴¹⁾

La reacción se lleva a cabo en un termociclador, un equipo que logra hacer cambios de temperatura de manera rápida y controlada; permitiendo que se realicen las tres etapas del proceso de amplificación. ⁽⁴⁰⁾ Los termocicladores modernos utilizan

el efecto Peltier que permite el calentamiento y enfriamiento del bloque que contiene los tubos de PCR mediante la inversión de la corriente eléctrica. ⁽⁴²⁾

2.4.2 Componentes de la PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa se necesita ^(42,43) (Figura 5):

- ADN templado o molde: es el molde que utilizará la enzima polimerasa para sintetizar una hebra complementaria. Puede utilizarse ADN genómico, de una o doble hebra; un fragmento o incluso un ADN circular.
- Enzima ADN polimerasa: existen varias enzimas que varían en fidelidad, eficiencia y su habilidad para sintetizar productos de PCR. Actualmente se utiliza la *Taq* polimerasa que debe soportar altas temperaturas sin bloquear su actividad, esta enzima lleva el nombre por la bacteria de donde se aisló *Thermus aquaticus* y es muy termoestable ya que esta bacteria vive en aguas termales.
- Oligonucleótidos o Cebadores (*primers*): secuencias de nucleótidos sencillas que flanquean el fragmento deseado y representan el factor más importante para la eficiencia y especificidad de la reacción. Son complementarios al extremo 3' del ADN molde.
- Desoxi nucleótidos trifosfatados (dNTPs): necesarios para que la enzima polimerasa los incluya en la síntesis de la nueva hebra de ADN.
- Cationes divalentes: Mg^{+2} como cofactor de la enzima
- Solución *buffer*: provee un ambiente químico favorable para la actividad óptima y estabilidad de la enzima; mantiene el pH entre 8.3 – 8.8 a temperatura ambiente durante la reacción.

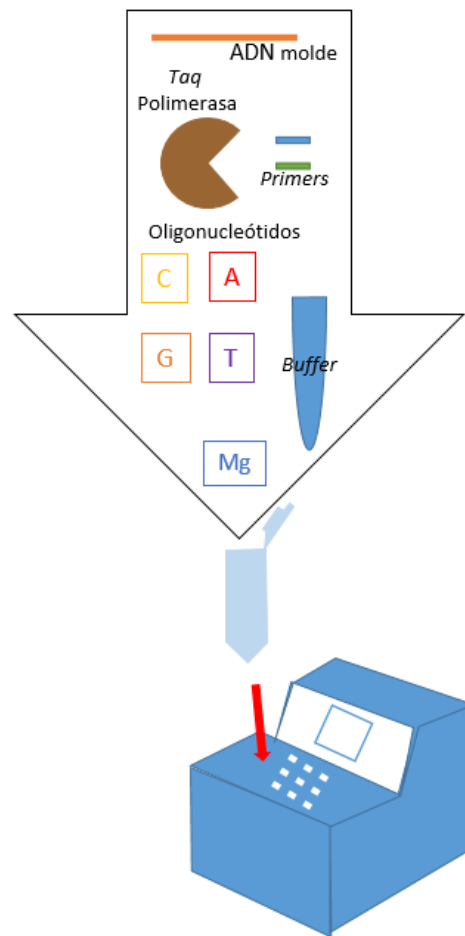


Figura 5. Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.4.3 Etapas de la PCR

2.4.3.1 Activación de la enzima

Consiste en la activación de ciertas ADN polimerasas durante 1 a 9 minutos a 94-96°C. Estas enzimas son conocidas como *hot-start*.⁽⁴²⁾

2.4.3.2 Desnaturalización

Consiste en la separación de la doble cadena del ADN (dsADN) elevando la temperatura del mismo hasta aproximadamente 90-95°C. La separación se realiza por la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias, obteniéndose una ADN de hebra simple (ssADN).⁽⁴²⁾

2.4.3.3 Alineamiento

En este paso la temperatura disminuye, lo que permite la alineación de los cebadores a la hebra complementaria del ADN desnaturalizado. La temperatura de este paso varía entre 55-65°C y depende de la T_m (*melting temperature*, temperatura de fusión) de los cebadores elegidos. ^(40,42)

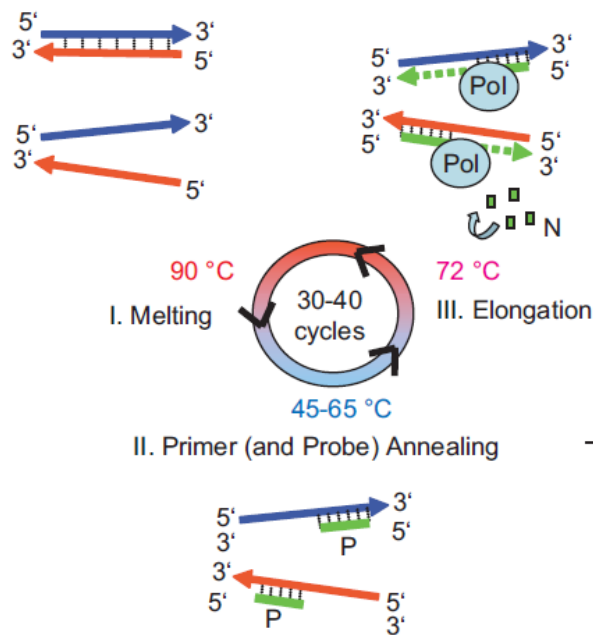


Figura 6. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁽⁴⁰⁾

2.4.3.4 Extensión o elongación

Se lleva a cabo a 72°C, temperatura óptima de actividad de la Taq polimerasa que sintetizará nuevas hebras de ADN usando como punto de inicio los cebadores y agregando los oligonucleótidos (dNTPs) en dirección 5' a 3'. El tiempo de extensión dependerá tanto de la polimerasa utilizada como del tamaño del amplicón que será amplificado. ^(40,42)

En algunas ocasiones será necesario un paso final llamado extensión o elongación final con el fin de asegurar que las nuevas hebras de ADN se encuentren completas. ⁽⁴²⁾

Estos tres pasos se repiten entre 30-40 ciclos y cada repetición resulta en el doble de copias de la anterior. Finalizados los ciclos no se genera más producto de PCR ya que se han agotado todos los reactivos.⁽⁴⁰⁾

2.4.4 Detección de productos

La visualización de productos de PCR (amplicones) es esencial para determinar la calidad y cantidad de la secuencia de ADN amplificada. La prueba “*gold-standard*” para el análisis de productos es la secuenciación, pero para fines prácticos se utiliza la electroforesis que permite la visualización de los productos amplificados. Se utilizan geles de agarosa para separar los productos de PCR y el tamaño se determina por comparación con un marcador de peso molecular, que contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido. La visualización se basa en una tinción con un reactivo que se intercala entre dos cadenas de ADN y es visible gracias a su fluorescencia ante la exposición a luz ultravioleta (UV).^(42,44)

- **Electroforesis**

Es la migración de moléculas por acción de la corriente eléctrica sobre una matriz que no es afectada por la electroforesis y permite limitar y controlar el movimiento. Se utiliza generalmente para analizar ácidos nucleicos y proteínas. Los ácidos nucleicos migran desde el polo negativo (cátodo) hacia el polo positivo (ánodo), ya que se encuentran cargados negativamente gracias al grupo fosfato que contienen. Las moléculas migran a velocidades inversas a su tamaño, es por ello que un fragmento de ADN más pequeño atraviesa con más facilidad la “*malla*” que representa el gel de agarosa, y un fragmento más largo tardará más en llegar hacia el ánodo.^(45,46)

2.4.5 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR), permite monitorear el proceso de amplificación mientras este se lleva a cabo, fusionando los pasos de amplificación y detección. Se utilizan colorantes que emiten fluorescencia y actúan como reporteros. Esta técnica se basa en medir una señal, la fluorescencia, que corresponde a la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo de PCR. El punto en el cual la fluorescencia pasa el umbral (*threshold*) se considera como

el punto en el cual la reacción de amplificación comienza y se denomina C_t (*threshold cycle*).⁽⁴⁷⁾

La diferencia entre los componentes de una PCR convencional y una qPCR es el uso de un fluorocromo, quien emitirá la señal que cuantifica el termociclador y generalmente se usa como cadena molde un ADN de cadena simple.

El fluorocromo más utilizado es el SYBRgreen (Figura 7), es un agente intercalante que emite fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN amplificado cuando se intercala en un ADN de doble hebra, sin embargo, suele ser inespecífico ya que se puede unir a cualquier secuencia de ADN, ya sea la deseada o alguna amplificación inespecífica.⁽⁴⁸⁾

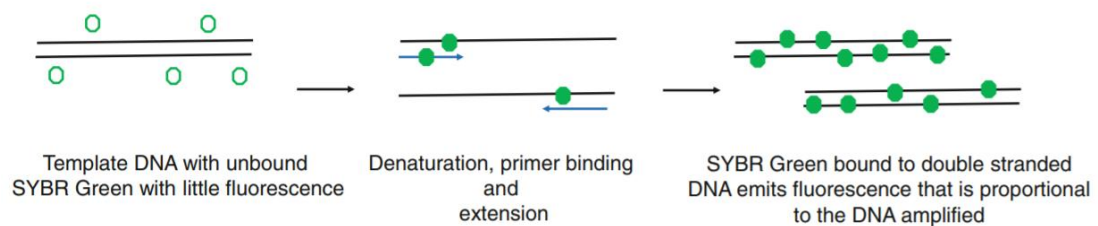


Figura 7. Mecanismo de unión de las moléculas de SYBR Green durante la qPCR, mayor afinidad cuando se ha unido al ADN de doble hebra.⁽⁴⁹⁾

También se utilizan sondas marcadas que tienen dos partes, un *quencher* que bloquea la emisión de fluorescencia y un reportero que emite la señal. Esta sonda funciona como un segundo *primer*, se une a la secuencia de ADN y cuando la polimerasa se une para iniciar la unión de oligonucleótidos se escinde el reportero y ocasiona es la emisión de fluorescencia.⁽⁵⁰⁾

Una de las aplicaciones más importantes de la qPCR es el análisis de expresión de genes. El proceso de una qPCR para el análisis de expresión de genes requiere un paso extra. Ya que se parte de un gen que ya fue expresado, se extrae el ARN mensajero (ARNm) de una célula que luego debe ser convertido a ADN

complementario (ADNc) de manera in vitro, utilizando la enzima retrotranscriptasa, la cual se obtiene de retrovirus que transcriben el ADN usando el ARN como molde.⁽⁴⁰⁾

2.4.5.1 Tipos de cuantificación de la expresión genética

a) **Cuantificación absoluta**

La cuantificación absoluta utiliza diluciones seriadas de estándares de concentración conocida de ADN genómico y ADNc para realizar una curva de calibración. Esta curva genera una relación lineal entre el Ct y la cantidad de ARN o ADNc que permite determinar una concentración en muestras desconocidas basándose en el valor Ct.^(51,52)

b) **Cuantificación relativa**

La cuantificación relativa determina los cambios en los niveles de ARN mensajero (ARNm) en estado estacionario en múltiples muestras y lo expresa en relación a los cambios de nivel de un ARN control interno. Se utiliza un estándar externo o una muestra referente, conocida como un gen de referencia. Se puede realizar una co-amplificación en un mismo tubo o en un tubo separado.⁽⁵³⁾ Los genes de referencia se expresan de manera constante en diversos tejidos, en cualquier etapa de desarrollo y no deben ser afectados por el tratamiento experimental, por ello funcionan como controles. La ventaja de usarlos es que funcionan como referencias ya que han sido sometidos a las mismas condiciones que el o los genes cuya expresión se desea analizar ya que se trata del mismo mRNA. Los más utilizados son: la β -actina, GAPDH, GUS, la subunidad 18S del ARN ribosomal (ARNr).⁽⁵¹⁾

Los resultados de este tipo de cuantificación se expresan como una relación entre gen de interés/gen de referencia y existen diversos modelos matemáticos para calcular la expresión del gen de interés. El más conocido es el “método delta delta” que compara la expresión relativa entre tratamientos aplicados a la muestra. Fue desarrollada por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer). Esta fórmula corresponde a una simplificación de la ecuación original propuesta por Pffafl donde se considera la eficiencia de la PCR en tiempo real. En el “método delta delta” se asume que la

eficiencia de la amplificación por PCR en tiempo real es la óptima e idéntica ($E=2$) tanto para la muestra con tratamiento, como para el control.⁽⁵⁴⁾

$$R = 2^{-[\Delta CP_{muestra} - \Delta CP_{control}]}$$

$$R = 2^{-\Delta \Delta CP}$$

Donde:

R: Relación de expresión

CP: “*crossing point*” o punto de cruce, se refiere al ciclo en el cual la curva de reacción intercepta el umbral o “*threshold*”.

CP_{muestra}: punto de cruce de la muestra con tratamiento.

CP_{control}: punto de cruce de la muestra sin tratamiento.

2.7. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

La técnica de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragments Length Polymorphism*, RFLP), se usa para diferentes propósitos, especialmente para la detección de polimorfismos en el ADN para estudiar la variación genética en organismos vivos. La gran cantidad de datos que existe sobre los polimorfismos provee información importante sobre genes involucrados en enfermedades genéticas, desarrollo de fármacos, genética de poblaciones, estudios de evolución e investigaciones forenses.⁽⁵⁵⁾

Los RFLP's se observan como las diferencias en tamaño y número de fragmentos generados por una enzima de restricción. Dichos fragmentos varían como resultado del cambio de uno o más nucleótidos en la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción.⁽⁴⁵⁾

2.5.1 Fundamento de la técnica

Los RFLP se basan en la digestión con una endonucleasa (enzima) de un producto de PCR (amplicón). Dicha enzima reconoce la región específica en la secuencia del producto de PCR donde se encuentra la mutación y lo corta. Los resultados se revelan mediante electroforesis en gel, que separa los fragmentos cortados por las enzimas de restricción.⁽⁴⁵⁾

Para realizar el procedimiento se necesita un control interno de ADN que tiene el sitio de restricción que reconoce la enzima que estamos utilizando, para confirmar la actividad apropiada de la enzima; y las muestras que serán sometidas a la digestión con la(s) enzimas de restricción. En la electroforesis se evidencia uno o más fragmentos que resultan del corte de las enzimas, por ello es necesario conocer el sitio de restricción, el tamaño del amplicón y el número y tamaño de los fragmentos que resultan de la digestión. Además, se utiliza un marcador de peso molecular para verificar el tamaño de los fragmentos.⁽⁵⁵⁾

2.5.2 Enzimas de restricción

Inicialmente Werner Arber propuso que las bacterias podían protegerse de ADN extraño, generalmente de virus y bacteriófagos, a través de un mecanismo de defensa genético que consistía en que una enzima cortaba esas moléculas de ADN en sitios específicos llamados sitios de restricción, sin embargo, su propio ADN genómico se encontraba protegido por un proceso de metilación realizado por una enzima ADN metiltransferasa. La enzima con actividad endonucleasa fue nombrada inicialmente como “endonucleasa R” pero luego el nombre cambió a enzimas de restricción y posteriormente otros microbiólogos aislaron otras enzimas de otras bacterias. Con el paso de los años, los científicos han aislado más de 800 enzimas de restricción que reconocen y cortan más de 100 diferentes sitios de restricción.⁽⁵⁶⁾

Las enzimas son conocidas como endonucleasas de restricción ya que cortan por dentro de la doble hélice de ADN y no en los extremos, también son consideradas como una herramienta básica en la ingeniería genética.⁽⁴⁶⁾

La mayor parte de las enzimas realizan el corte en un ADN de doble hebra (dsADN), pero existen algunas pocas que lo hacen en ADN de una sola hebra (ssADN), aunque con menor eficiencia. Los sitios de restricción tienen generalmente entre 4 a 6 nucleótidos de largo y son secuencias palíndromas, es decir, la secuencia es la misma leyéndola de izquierda a derecha y viceversa.⁽⁵⁷⁾

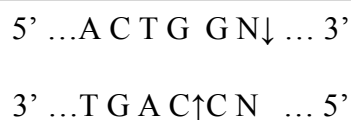
- MboI reconoce la secuencia palíndroma GATC, trabaja a 37°C y es sensible a ciertas secuencias de ADN metilado.⁽⁵⁸⁾



- BanI reconoce la secuencia palíndroma GGYRCC, trabaja a 37°C y es sensible a algunas secuencias de ADN metilado.⁽⁵⁹⁾



- BsrI reconoce la secuencia ACTGG, trabaja a 65°C no puede realizar el corte si la secuencia de ADN se encuentra metilada.⁽⁶⁰⁾



2.5.2.1 Tipos de enzimas de restricción

Las enzimas de restricción se clasifican en 4 tipos basados en diferentes criterios como estructura, cofactores, especificidad de la secuencia de restricción y la posición del corte desde el sitio de restricción.⁽²⁵⁾

a) Tipo I

Reconoce secuencias de ADN específicas, pero corta en sitios aleatorios que pueden estar alejados hasta 1000 pares del sitio de reconocimiento, por ello no tienen

aplicaciones prácticas. Tienen actividad metilasa y requieren ATP y S-adeosil-L-metionina (SAM).⁽⁵⁷⁾

b) Tipo II

Reconocen y cortan directamente el sitio de reconocimiento. No tienen actividad metilasa y son ATP independientes, pero requieren Mg^{+2} como cofactor. A esta clase pertenecen la mayoría de las enzimas comerciales que son usadas para el análisis de ADN y en la clonación molecular.⁽⁵⁷⁾

c) Tipo III

Reconocen secuencias específicas, pero hacen el corte en un sitio diferente, aproximadamente a 20 - 30 nucleótidos del sitio de reconocimiento. Necesitan dos secuencias diferentes, no palíndromas, reversamente orientadas para realizar el corte. Requieren S-adeosil-L-metionina y ATP para su actividad metilasa y de digestión respectivamente.⁽⁵⁷⁾

d) Tipo IV

Se utilizan para cortar moléculas de ADN con modificaciones como metilación, hidroximetilación y glucosil-hidroximetilación.⁽⁵⁷⁾

2.5.2.2 Patrones de corte de las enzimas de restricción

Las enzimas de que cortan en la secuencia de reconocimiento (tipo II) pueden generar dos tipos de cortes:

a) Extremos romos

Las enzimas cortan el dsADN en la posición exacta del sitio de reconocimiento en ambas hebras, generando un extremo plano bicatenario.⁽⁵⁷⁾

b) Extremos cohesivos o pegajosos

Las enzimas cortan asimétricamente en el sitio de restricción generando un corte en forma de escalón, resultando extremos de una sola hebra que pueden alinearse y solaparse con extremos de ADN que tienen una hebra complementaria.⁽⁵⁷⁾

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El trabajo en su totalidad fue ejecutado en el Laboratorio de Biología Molecular y Farmacología experimental (H-401) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María (UCSM) - Arequipa

3.2. Materiales

3.2.1 Material biológico

- El material biológico empleado corresponde a muestras de sangre periférica (células sanguíneas), extraídas de voluntarios con epilepsia y voluntarios control (sanos). Las muestras de voluntarios con epilepsia fueron obtenidas en el Servicio de Neurología del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza de Arequipa.

3.2.2 Material de laboratorio

- Micropipetas (P1000, P200, P100, P20 y P10)
- Probetas de 25, 500 y 1000 mL
- Vaso de precipitado de 25, 50 y 100 mL

- Matraz Erlenmeyer de 50 y 100 mL
- Tubos falcon estériles de 15 y 50 mL
- Tubos de 1.5 mL
- Tubos de PCR de 200 μ L
- Placas de 96 pozos para qPCR
- Film adhesivo para placas de qPCR
- Tips estériles para micropipetas de 1000, 200 y 20 μ L
- Racks para tubos falcon, tubos de 1.5 mL y 200 μ L
- Placas de cultivo celular de 96 pozos
- Parafilm
- Vacutainer con anticoagulante EDTA
- Algodón
- Ligadura

3.2.3 Reactivos

- Etanol 96° y 70°
- Agarosa grado biología molecular
- Agarosa ultrapura
- Agua grado biología molecular
- *Buffer* tris-acetato-EDTA 50x (TAE)

- Cebadores u oligonucleótidos
- Enzimas de restricción (MboI, BanI, BsrI)
- Marcador de peso molecular 100bp
- *Buffer* de carga (*Loading dye*)
- Agente intercalante de ADN (SybrSafe y RunSAFE)
- Buffer tris-acetato-EDTA 50x (TAE)

3.2.4 Kits

- innuPREP Blood ADN kit (analytikjena)
- innuMIX Standard PCR MasterMix (analytikjena)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)
- innuPERP Blood RNA kit (analytikjena)
- Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen)
- OneScript cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Materials, abm)
- innuMIX qPCR SyGreen Sensitive (analytikjena).

3.2.5 Equipos

- Centrífuga para tubos falcon y para tubos de 1.5 mL (Scilogex – D3024R)
- Termobloque para tubos de 1.5 mL (Biosan – TS-100)
- Termociclador (Peqlab – peqstar)

- Termociclador tiempo real (Eppendorf – Mastercycler Realplex² egradient S)
- Cámara de electroforesis horizontal tipo submarino (BIO-RAD – Mini-Sub Cell GT)
- Transiluminador UV (Cleaver scientific Ltd – Clear View)
- Congeladora
- Cabina de PCR (Cleaver scientific Ltd – Clean View UV Cabinet CSL-UVCAB)
- Fluorómetro (Invitrogen - Qubit 2.0)
- Lector de placas de quimioluminiscencia (Thermo scientific – Varioskan LUX)
- Agitador vórtex (Labnet International – S0200-230V-EU)
- Mini spin
- Microondas

3.3. Métodos

3.3.1 Selección de pacientes

Criterios de selección

Se incluirán pacientes epilépticos que sean atendidos en consulta externa del servicio de Neurología del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza en el período comprendido entre el año 2017 y el 2018. Los pacientes deben satisfacer los criterios descritos a continuación:

Criterios de inclusión

- Pacientes epilépticos mestizos que acudan a consulta externa del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza.
- Pacientes con una o más crisis por mes a pesar de haber recibido adecuadamente y con dosis plena diaria 1 o 2 Fármacos Antiepilépticos de primera línea.
- Falta de eficacia de dos Fármacos Antiepilépticos en monoterapia y/o una combinación de ellos (poli terapia), pese a recibir una dosis terapéutica y cumpliendo indicaciones de manejo.
- Pacientes de ambos sexos, adultos, con edad entre 15 y 80 años.
- Pacientes con Epilepsia farmacorresistente entre los 15 y 80 años.
- Pacientes con diagnósticos clínico de epilepsia.
- Pacientes que se encuentran actualmente en monoterapia o poli terapia con máximo de 2 antiepilépticos que incluya fenitoína y/o carbamazepina.
- Pacientes con función hepática normal, valores de transaminasas pirúvica y oxaloacética, fosfatasa alcalina y bilirrubina dentro de los límites de normalidad.

Criterios de Exclusión

- Pacientes que no deseen participar en el estudio
- Pacientes inadecuadamente diagnosticados (eventos paroxísticos no epilépticos) o tratados (pseudoresistentes), es decir con selección inapropiada del Fármaco Antiepiléptico.

- Pacientes con uso concomitante de antagonistas de canales de calcio, esteroides, macrólidos, recibidos con un mes de anterioridad al ingreso del estudio.
- Pacientes con sospecha o diagnóstico de enfermedad degenerativa o progresiva del sistema nervioso (por ej. enfermedad mitocondria)
- Pacientes que consuman alguno de los siguientes fármacos que inhiben la glicoproteína P: Amiodarona, amitriptilina, astemizol, carvedilol, claritromicina, cortisol, diltiazem, disulfiram, eritromicina, fluoperazina, haloperidol, nifedipina, rifampicina, ritonavir, Simvastatina, testosterona, tacrolimus o verapamilo.
- Pacientes con concomitancia de enfermedades crónicas como autoinmunidad, diabetes o cáncer.
- Mujeres embarazadas
- Pacientes con hipersensibilidad conocida o intolerancia a los fármacos en estudio o a los excipientes de su formulación.

Los pacientes serán clasificados en tres grupos; sensibles y resistentes a los fármacos.

Grupos de estudio:

- GRUPO A (n=23), pacientes sensibles a la terapia con anticonvulsivantes.
- GRUPO B (n=23), pacientes resistentes a la terapia con anticonvulsivantes.
- GRUPO C (n=45) grupo control, pacientes sin epilepsia o historial familiar de epilepsia.

Los “n” indicados para cada grupo de estudio representan el mínimo de pacientes que se utilizarán en el presente estudio para realizar el análisis estadístico.

3.3.2 Obtención de muestras de sangre de pacientes con epilepsia y voluntarios

Se obtuvieron las muestras de sangre (5 mL) por venopunción en el brazo y se depositaron en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA.

3.3.3 Detección de mutaciones C3435T y G2677T/A en el gen MDR1 mediante RFLP

3.3.3.1 Extracción de ADN genómico a partir de células sanguíneas

Se utilizó el método en fase sólida utilizando columnas de sílica, innuPREP Blood DNA Mini Kit (analytikjena).⁽⁶¹⁾ según las instrucciones del fabricante. Se realizaron dos extracciones por cada muestra de sangre. El ADN fue rotulado con un código y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis.

3.3.3.2 Evaluación de la integridad y calidad del ADN

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%).⁽⁶²⁾ Se pesó 0.15 g de agarosa y se añadió 15 mL de *buffer* TAE 1X, luego se calentó la mezcla. Se vertió en el molde donde se colocó el peine para la formación de pozos. En cada pozo se cargaron 8 μl de muestra con 2 μl de RunSafe. La corrida se realizó a 90 V durante 30 minutos utilizando *buffer* TAE 0,5 X. Las bandas se revelaron colocando el gel en el transiluminador (luz UV).



Figura 8. Metodología para la detección de productos mediante electroforesis.

La calidad del material genético se evaluó por espectrofotometría en un lector de placas de quimioluminiscencia Varioskan LUX (Thermo Scientific). Se realizó una dilución 1/10 utilizando agua grado biología molecular y se midió la absorbancia del ADN a dos longitudes de onda: 280 y 260 nm.

3.3.3.3 Cuantificación del ADN

La cuantificación se realizó por fluorometría utilizando el Qubit dsDNA HS Assay Kit y 1 μ L de ADN extraído. El procedimiento de cuantificación incluyó la medición de dos estándares de ADN que se incluyen en el kit. Se preparó una solución de trabajo (*working solution*) diluyendo el reactivo Qubit dsDNA HS Reagent con el Qubit dsDNA HS Buffer (1:200) por cada muestra y estándar. Para cuantificar los estándares se mezcló en un tubo 190 μ L de solución de trabajo con 10 μ L de cada estándar y para las muestras 199 μ L de solución de trabajo con 1 μ L de ADN extraído. Cada tubo se agitó, se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente durante 2 minutos y se leyó en el fluorómetro Qubit 2.0.

3.3.3.4 Amplificación del gen MDR1 por PCR convencional

Se utilizó el innuMIX Standard PCR MasterMix (analytikjena). La secuencia de los cebadores específicos para cada mutación se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos o cebadores utilizados para realizar la PCR de las mutaciones C3435T, G2677T y G2677A del gen MDR1.

Mutación	Secuencia
C3435T	<i>Forward:</i> 5'- TTGATGGCAAAGAAATAAAGC-3'
	<i>Reverse:</i> 5'- CTTACATTAGGCAGTGACTCG-3'
G2677T	<i>Forward:</i> 5'-TTTGCAGGCTATAGGTTCCAG-3'
	<i>Reverse:</i> 5'- TTTAGTTTGACTCACCTTCCCG-3'
G2677A	<i>Forward:</i> 5'- TTTGCAGGCTATAGGTTCCAG-3'
	<i>Reverse:</i> 5'- GTTTGACTCACCTTCCCG-3'

La concentración final de los cebadores y el protocolo de amplificación se muestran en la Tabla 2. La cantidad de ADN añadida en cada reacción fue entre 50 y 100 ng; el volumen agregado fue calculado para cada muestra a partir de los datos de cuantificación de la Tabla 16 del Anexo 1.

Tabla 2. Concentración final de los cebadores y protocolos de amplificación para las mutaciones C3435T, G2677T y G2677A del gen MDR1.

Mutación	Concentración final de los cebadores	Protocolo de amplificación		
		Temperatura	Tiempo	Ciclos
C3435T	500 nM	94°C	4 min	35 ciclos
		94°C	30 s	
		56°C	30 s	
		72°C	30 s	
		72°C	5 min	
G2677T	500 nM	94°C	3 min	40 ciclos
		94°C	20 s	
		55°C	20 s	
		72°C	30 s	
		72°C	5 min	
G2677A	300 nM	94°C	3 min	40 ciclos
		94°C	20 s	
		55°C	20 s	
		72°C	30 s	
		72°C	5 min	

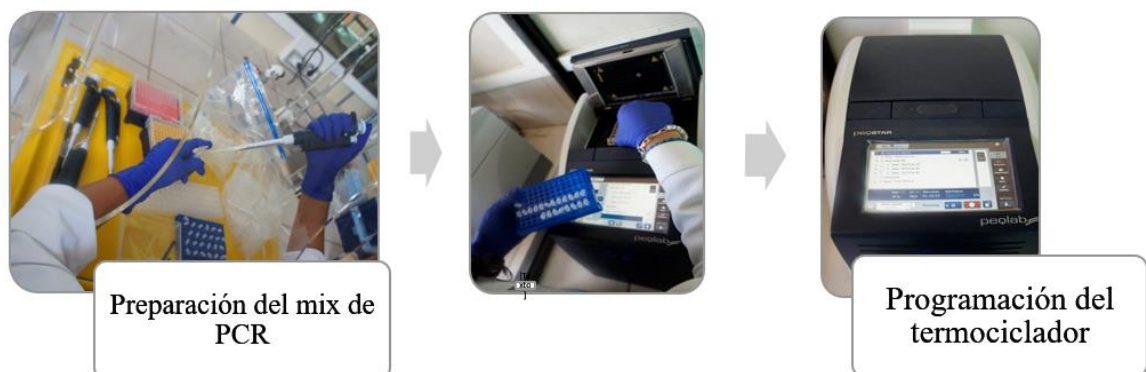


Figura 9. Metodología para la amplificación del gen MDR1.

El mix, con un volumen final de 30 μ L, se preparó en la cabina de PCR, previamente esterilizada durante 15 minutos con luz UV, y el ADN se añadió fuera de la cabina. Se colocaron las muestras en el termociclador y se insertó el protocolo de amplificación dependiendo de los cebadores utilizados⁽⁶³⁾ indicados en la Tabla 2. La reacción de PCR se hizo por duplicado para cada muestra. Los productos de PCR se almacenaron a -20°C .

3.3.3.5 Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción

Se utilizaron enzimas de restricción MboI, BanI y BsrI para la digestión de los productos de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante de cada una. La digestión enzimática se llevó a cabo en el termobloque según las condiciones indicadas en la Tabla 3. Se realizaron dos digestiones por producto de PCR. Los productos de digestión se almacenaron a -20°C .

Tabla 3. Enzimas de restricción usadas para la digestión de los productos de PCR y condiciones de digestión.

Mutación	Enzima de restricción	Temperatura de digestión	Tiempo de digestión
C3435T	MboI	37°C	4 horas
G2677T	BanI	37°C	4 horas
G2677A	BsrI	65°C	4 horas

3.3.3.6 Electroforesis de productos de PCR y productos de digestión

Se prepararon geles de agarosa al 2% para los geles de todos los productos de PCR⁽⁶²⁾. Para los geles de productos de digestión se utilizó agarosa ultrapura al 2.5% para los productos de digestión de la región C3435T y 4% para los productos de digestión de las regiones G2677A y G2677T con de *buffer* TAE 1X, calentando la mezcla.⁽⁶⁴⁾ Después de enfriar se añadió 2.5 μ l de SYBR Safe y se vertió la mezcla en el molde. En cada pozo se cargaron 8 μ l de muestra más 2 μ l de *Loading buffer* 6X.

En uno de los pozos de cada gel se cargó el marcador de peso molecular ThermoSCIENTIFIC gene ruler 100pb ADN ladder, siguiendo las instrucciones del fabricante.⁽⁶⁵⁾ La corrida se realizó a 70-80 V durante 30-50 minutos utilizando *buffer* TAE 0,5 X. Las bandas se revelaron colocando el gel en el transiluminador (luz UV).

3.3.4 Evaluación de la expresión del gen MDR1 mediante qPCR

3.3.4.1 Extracción de ARN total a partir de células sanguíneas

La extracción del ARN total se realizó con el método en fase sólida utilizando columnas de sílica, innuPREP Blood RNA kit (analytikjena) según las instrucciones del fabricante.⁽⁶⁶⁾ La extracción de ARN se hizo por duplicado, luego este fue rotulado con un código y almacenado a -20°C.

3.3.4.2 Evaluación de la integridad y calidad del ARN

La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%).⁽⁶²⁾ Se pesó 0.15 g de agarosa y se añadió 15 mL de *buffer* TAE 1X, luego se calentó la mezcla. Se vertió en el molde donde se colocó el peine para la formación de pozos. En cada pozo se cargaron 8 µl de muestra con 2 µl de RunSafe. La corrida se realizó a 80 V durante 30 minutos utilizando *buffer* TAE 0,5 X. Las bandas fueron reveladas colocando el gel en el transiluminador (luz UV).

La calidad se evaluó por espectrofotometría. Se midió la absorbancia de cada ARN extraído en el lector de placas de quimioluminiscencia. Se diluyó el ARN 1/10 con agua grado biología molecular y se midió a las longitudes de onda 230 nm, 260 nm y 280 nm.

3.3.4.3 Cuantificación del ARN

La cuantificación se realizó por fluorometría utilizando el Qubit RNA HS Assay Kit y 2 µL de ARN extraído. El procedimiento de cuantificación incluyó la medición de dos estándares de ARN que se incluyen en el kit. Se preparó una solución de trabajo (*working solution*) diluyendo el Qubit RNA HS Reagent con el Qubit RNA HS Buffer (1:200) por cada muestra y estándar. Para cuantificar los estándares se mezcló en un tubo 190 µL de solución de trabajo con 10 µL de cada estándar y para

las muestras 198 μL de solución de trabajo con 2 μL de ARN extraído. Cada tubo se agitó, se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente durante 2 minutos y se leyó en el fluorómetro Qubit 2.0.

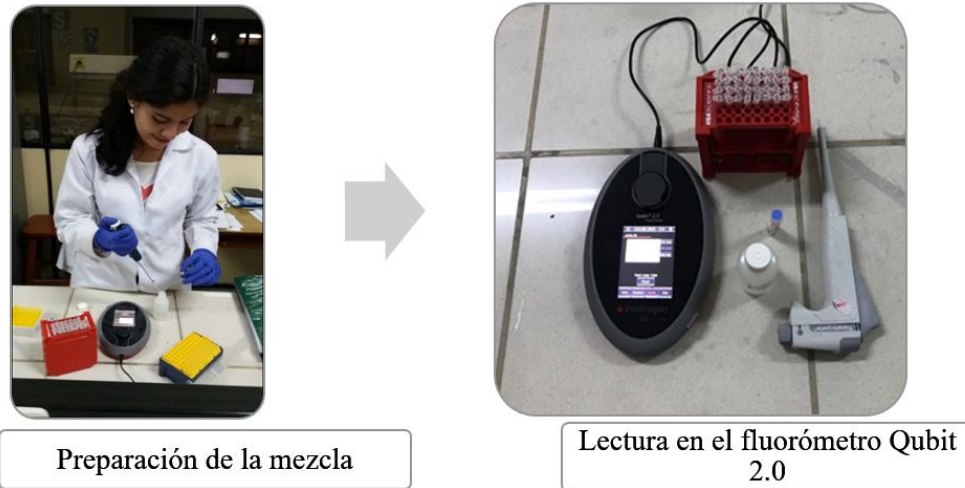


Figura 10. Metodología para la cuantificación de ácidos nucleicos.

3.3.4.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se utilizó el kit OneScript cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Materials, abm) de acuerdo a las instrucciones del fabricante⁽⁶⁷⁾ siguiendo el protocolo de la Tabla 4.

Se añadió un volumen de 10 μL de ARN para todas las reacciones de síntesis, con el fin de obtener la máxima cantidad de ADNc, por ser más estable que el ARN.

El ADNc obtenido fue almacenado a -20°C para su posterior utilización.

Tabla 4. Protocolo de síntesis de ADN complementario (ADNc)

Temperatura	Tiempo
25°C	10 min
42°C	15 min
85°C	5 min

3.3.4.5 Cuantificación del ADNc obtenido por fluorometría.

La cuantificación se realizó por fluorometría utilizando el Qubit dsDNA HS Assay Kit y 1 μ L de ADNc sintetizado.

El procedimiento de cuantificación se realizó al igual que la cuantificación del ADN extraído en la sección 3.3.3.3.

3.3.4.6 Medición de la expresión relativa del gen MDR1 por qPCR

El ADNc se llevó a amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) empleando oligonucleótidos o cebadores específicos, acompañados del fluoróforo SYBRGreen con el kit innuMIX qPCR SyGreen Sensitive (analytikjena). Además de la amplificación del gen MDR1, se amplificó un gen de referencia al mismo tiempo, el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). La secuencia de los cebadores se indica en la siguiente tabla:

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos o cebadores utilizados para realizar la PCR tiempo real (qPCR) del gen MDR1 y gen de referencia GAPDH.

Mutación	Secuencia
MDR1	<i>Forward:</i> 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'
	<i>Reverse:</i> 5'-TGTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'
GAPDH	<i>Forward:</i> 5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
	<i>Reverse:</i> 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

La concentración final de los cebadores de ambos genes y el protocolo de amplificación se señala en la Tabla 6, para un volumen final de reacción de 20 μ L. La cantidad de ADNc añadida en cada reacción fue de 2.5 ng; el volumen agregado a cada reacción que fue calculado para cada muestra a partir de los datos de cuantificación de

la Tabla 22 del Anexo 2. El mix de reacción se preparó en placas de 96 pozos especiales para qPCR dentro de la cabina de PCR, previamente esterilizada durante 15 minutos con luz UV, y el ADN se añadió fuera de la cabina. Se sellaron las placas con film adhesivo, se colocaron en el termociclador tiempo real y se insertó el protocolo de amplificación correspondiente a los cebadores utilizados.⁽⁶⁸⁾

Por cada muestra, se realizó la reacción en duplicado para el gen MDR1 y solo una vez para el gen GAPDH.

Tabla 6. Concentración final de los cebadores y protocolo de amplificación para el gen MDR1 y el gen de referencia GAPDH.

Gen	Concentración final de los cebadores	Protocolo de amplificación		
MDR1	250 nM	95°C	3 min	35 ciclos
		95°C	15 s	
		58.5°C	30 s	
		72°C	30 s	
GAPDH	250 nM	95°C	3 min	35 ciclos
		95°C	15 s	
		58.5°C	30 s	
		72°C	30 s	

Una vez obtenidos los resultados, mediante la técnica del Pfaffl ($\Delta\Delta(C_t)$) se evaluó la expresión genética relativa, utilizando la siguiente fórmula:

$$R = 2^{-[\Delta CP_{muestra} - \Delta CP_{control}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

3.3.5 Análisis estadístico

Para el análisis de mutaciones se estimó por conteo directo la frecuencia alélica y genotípica, observando los alelos y genotipos presentes en cada voluntario. La asociación entre genotipos y grupos de estudio, así como la relación entre frecuencia

alélica y grupos, fue examinada por razón de momios (*odds ratio*, OR) con un intervalo de confianza (IC) de 95% y un análisis Chi cuadrado.

Para el análisis de la expresión del gen MDR1 se utilizó el análisis de varianza ANOVA y Prueba de Tukey.

La significancia estadística fue definida como $P < 0.05$.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de las muestras sanguíneas de voluntarios con epilepsia y voluntarios sanos

Se recolectaron 83 muestras de voluntarios con epilepsia, asistentes al consultorio externo de Neurología del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza, previo consentimiento informado firmado por el paciente. El total de muestras obtenidas se separó en dos grupos teniendo en cuenta la historia clínica de cada voluntario, utilizando para este trabajo 66 de las muestras recolectadas:

- GRUPO A: Farmacorrespondedores (43 voluntarios con epilepsia)
- GRUPO B: Farmacorresistentes (23 voluntarios con epilepsia)

De la misma manera, previo consentimiento informado firmado, se recolectaron 80 muestras de voluntarios sanos, no relacionados a la enfermedad, conformando el grupo C.

- GRUPO C: Control (80 voluntarios control)

Se asignó un código a cada muestra recolectada, para el caso de voluntarios con epilepsia las muestras fueron desde E001 hasta E083 y para el caso de voluntarios control desde C001 hasta E080.

Como se muestra en la Tabla 7, se trabajó con un total de 146 muestras, divididas en los tres grupos ya señalados. Para participar en el estudio todos los voluntarios debían tener entre 15 y 80 años de edad, siendo la edad promedio de 36 años en voluntarios con epilepsia y 26 años en voluntarios control. Teniendo en cuenta el número total de participantes, se trabajó con un número mayor de muestras femeninas.

Finalmente, respecto al tratamiento de los voluntarios con epilepsia, la mayor parte se encontraban en monoterapia con fenitoína o carbamazepina, únicos fármacos considerados para el presente estudio.

Tabla 7. Características demográficas de las poblaciones en estudio.

Característica	Grupo de estudio		
	GRUPO A: Fármaco respondedores (n=43)	GRUPO B: Fármaco resistentes (n=23)	GRUPO C: Controles (n=80)
Edad promedio \pm DS	36.49 \pm 15.439	36.30 \pm 15.067	26.88 \pm 11.438
Género Femenino	27	10	45
Género Masculino	16	13	35
Monoterapia ¹	24	12	-
Politerapia ²	19	11	-

¹ Voluntarios en tratamiento con un solo fármaco antiepiléptico (fenitoína o carbamazepina)

² Voluntarios en tratamiento con 2 o 3 fármacos antiepilépticos (fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, levetiracetam, ácido valproico, lamotrigina)

4.2. Detección de las mutaciones C3435T y G2677T/A en el gen MDR1 mediante RFLP

Las mutaciones C3435T y G2677T/A son consideradas polimorfismos de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*), que son cambios en un solo nucleótido en una secuencia de ADN que pueden o no ocasionar cambios en los aminoácidos que conforman una proteína; por lo tanto, cambios en la estructura, función o expresión de proteínas. Ya que se consideran SNPs, estos pueden ser identificados mediante la técnica de RFLP, que consiste en cortar con enzimas de restricción el fragmento donde se encuentra la mutación en estudio y determinar según el tamaño de los fragmentos resultantes si el individuo posee dicha mutación; además observando los fragmentos después de la digestión se determina el genotipo del individuo que puede ser homocigoto o heterocigoto.

4.2.1 Extracción de ADN genómico y evaluación de la calidad e integridad

Las mutaciones se encuentran a lo largo de nuestro ADN y para poder identificarlas es necesario partir de esa gran molécula que se obtiene a partir de cualquier célula de nuestro organismo. En el presente trabajo se utilizaron células sanguíneas, por ser sencillas de obtener y por contener una gran cantidad de ADN.

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de las células sanguíneas de los voluntarios con epilepsia y control utilizando el método de fase sólida con columnas de sílica.

Después de la extracción fue necesario determinar si la calidad del ADN es buena, regular o mala; ya sea que esté contaminado con sales, otros compuestos o incluso otros ácidos nucleicos.

La calidad del ADN se evaluó por espectrofotometría en un lector de placas, utilizando placas de 96 pozos. Se realizó la medición a dos longitudes de onda: 260 nm y 280 nm. La relación 260/280 dio valores entre 1.7 y 2.2 en voluntarios con epilepsia, y entre 1.7 y 2.1 en voluntarios control; indicando una pureza de aceptable a óptima para la totalidad de los ADN evaluados.⁽⁶⁹⁾ (La Tabla 15 de Anexos muestra todas las lecturas y los valores de la relación 260/280 del total de ADN).

Para el grupo de voluntarios con epilepsia, el 84.8% de los ADN extraídos mostró una calidad óptima y el 15.2%, calidad aceptable; mientras que en el grupo de voluntarios control, el 95.6% fue de calidad óptima y el 4.4% de calidad aceptable.

Además de la evaluar la calidad por medio de valores, se evaluó la integridad mediante visualización, de manera que se pueda observar una molécula íntegra, representada por una banda definida. Esta se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

Como resultado se observaron bandas definidas reveladas ante luz UV, lo que verifica la integridad del total de los ADN extraídos (Figura 11).⁽⁶⁹⁾ (En las Figuras 28 y 29 de Anexos se puede observar la corrida electroforética del total de muestras, tanto de voluntarios con epilepsia como de voluntarios control). El ADN es una molécula muy pesada, es por ello que la banda se visualiza muy cerca del pozo donde fue cargada

la muestra, a pesar de haber sido corrida a un alto voltaje y durante 30 minutos. No se observó ninguna banda de ADN degradado, lo que verifica la correcta extracción de la totalidad de las muestras.

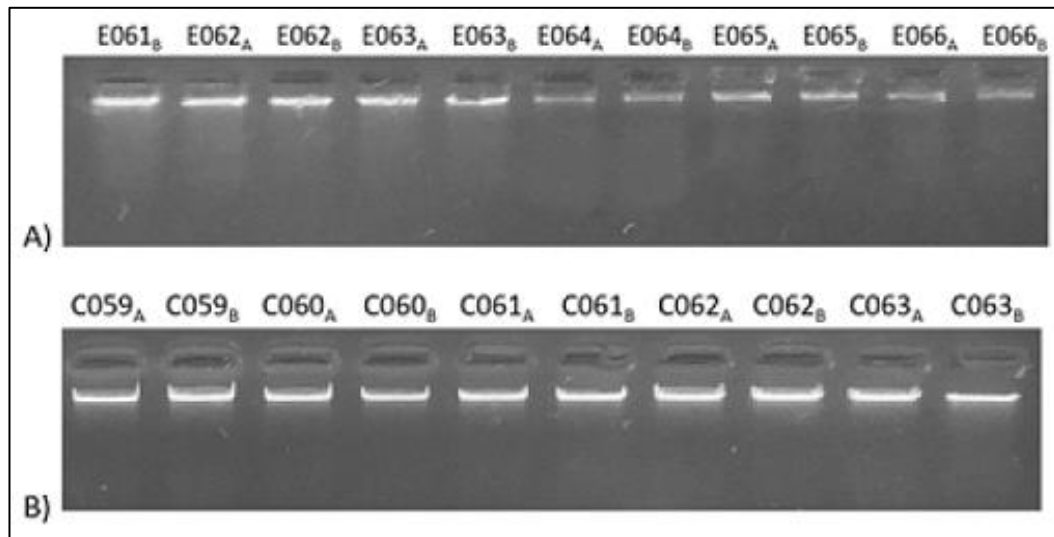


Figura 11. A) Corrida electroforética del ADN extraído de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 90V/30min. B) Corrida electroforética del ADN extraído de voluntarios control. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 90V/30min.

4.2.2 Cuantificación del ADN obtenido por fluorimetría

Se midió la concentración del ADN obtenido en el fluorómetro Qubit 2.0. El reactivo que permite la cuantificación es un fluoróforo que se intercala en el ADN de doble hebra y emite fluorescencia proporcional a la concentración de ADN en la muestra colocada y ésta es detectada por el equipo. El fluorómetro muestra la concentración de ADN en $\mu\text{g/mL}$; la cual debe ser multiplicada por un factor para hallar la concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Los valores obtenidos para la cuantificación de ADN de voluntarios con epilepsia oscilan entre $4.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y $276 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y las concentraciones de ADN de voluntarios control oscilan entre $3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y $204 \text{ ng}/\mu\text{L}$. (La Tabla 16 en Anexos muestra las concentraciones de todos los ADN extraídos, de voluntarios con epilepsia y control)

4.2.3 Amplificación del gen MDR1 por PCR convencional

Se amplificó el gen MDR1 mediante la técnica de PCR convencional, ya que se parte de un ADN íntegro y lo que se busca es obtener solamente la región de interés, que suelen ser fragmentos de ADN no muy pesados.

Se prepararon 3 reacciones de PCR para cada ADN extraído ya que fue necesario amplificar la región específica donde se localiza cada mutación. Se utilizó un par de cebadores para la mutación C3435T (*forward* y *reverse*) y tres cebadores para la mutación G2677T/A (*forward* en común para G2677T y G2677A y un *reverse* para cada uno).

La especificidad de los cebadores se comprobó alineándolos con la secuencia de la región donde se encuentra la mutación, obtenida de la base de datos SNP (Polimorfismos de nucleótido único, *Single Nucleotide Polymorphism*) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI).⁽⁷⁰⁾

Se utilizaron dos protocolos de amplificación diferentes, indicados en la Tabla 2 en métodos.

Tabla 8. Tamaño de los amplicones de las regiones que comprenden las mutaciones.

Mutación	Tamaño de amplicón (pb)
C3435T	208
G2677T	226
G2677A	222

4.2.4 Electroforesis de productos de PCR

Para comprobar que durante la PCR se haya amplificado la región deseada se realizó la electroforesis de cada producto de PCR en gel de agarosa al 2% y en cada gel se cargó en un pozo marcador de peso molecular de 100 pb para comprobar el tamaño del amplicón. Además, con cada PCR se preparó una reacción blanco, que contenía todos los reactivos excepto el ADN y en lugar de este se agregó agua en el

mismo volumen. La finalidad del blanco es demostrar que la reacción fue llevada a cabo de manera correcta y sin alguna contaminación que pueda interferir con los resultados.

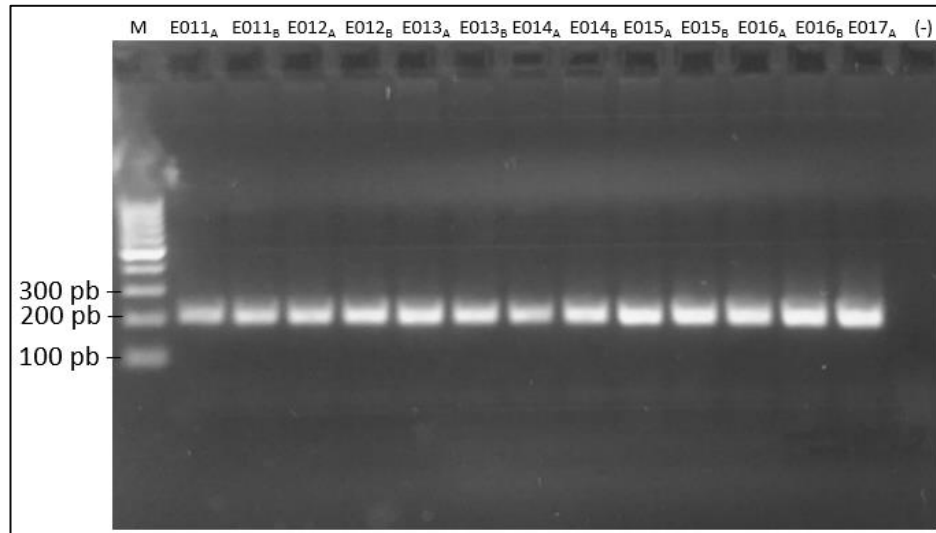


Figura 12. Corrida electroforética de los productos de PCR de la mutación C3435T de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 2%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/15min. Amplicón de 208 pb.

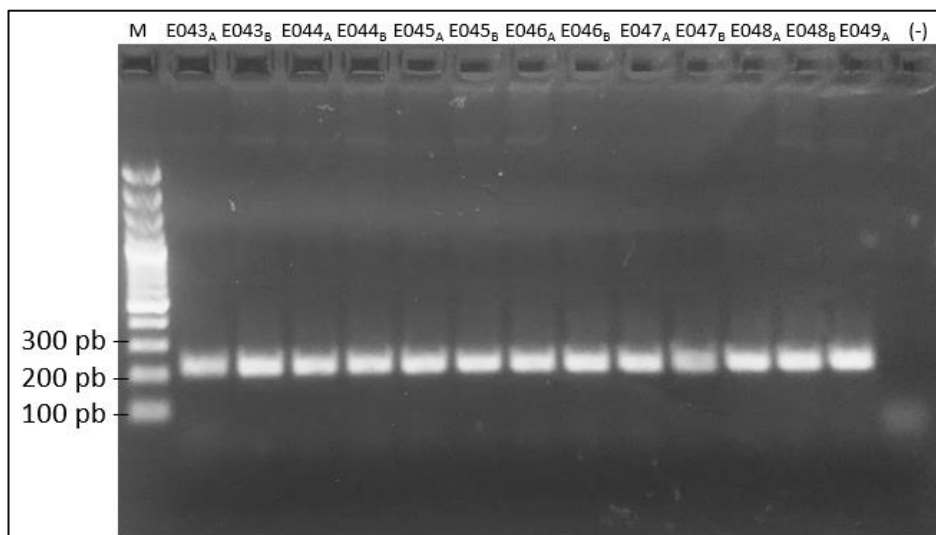


Figura 13. Corrida electroforética de los productos de PCR de la mutación G2677T de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 2%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/15min. Amplicón de 226 pb.

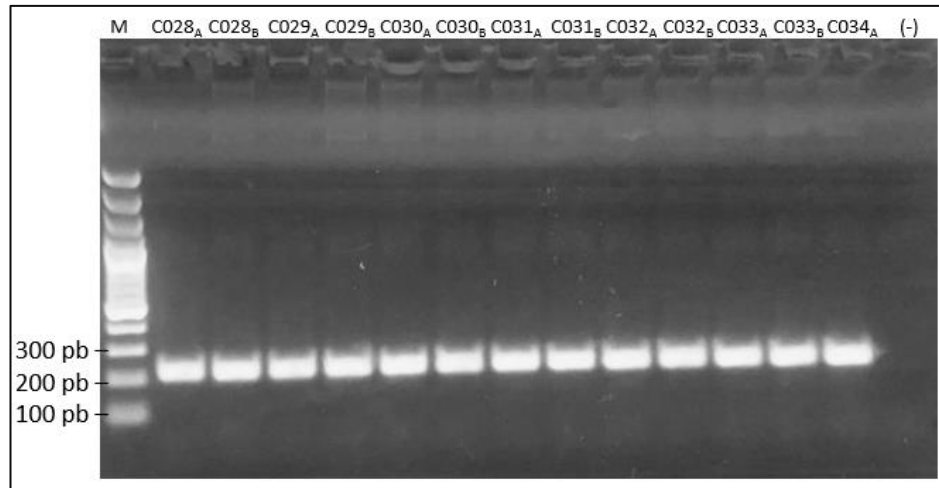


Figura 14. Corrida electroforética de los productos de PCR de la mutación G2677A de voluntarios control. Agarosa: 2%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/15min. Amplicón de 222 pb.

En todos los productos de PCR corridos se observaron bandas definidas e íntegras, ninguna se observó degradada y todas coincidieron con los tamaños esperados en comparación con el marcador de peso molecular (Figuras 12, 13 y 14). En el caso de los blancos, ninguno mostró banda, lo que comprueba que ninguna reacción de PCR estuvo contaminada.

4.2.5 Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción

Se seleccionaron enzimas de restricción para cada mutación, ya que ellas reconocen un sitio específico para realizar el corte. Con ayuda de la herramienta NEBcutter 2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)⁽⁷¹⁾ se hizo un sondeo de todas las enzimas que podrían cortar la secuencia diana y se buscó específicamente la enzima cuyo sitio de restricción incluya el nucleótido que puede ser mutado, de tal manera que la enzima corte o no corte únicamente cuando el nucleótido sea el normal o el mutado. Así se logró la identificación de un individuo que tiene la mutación o no, ya sea de forma homocigota o heterocigota.

Las enzimas seleccionadas fueron MboI para la mutación C3435T; BanI y BsrI para la mutación G2677T/A, la primera para el cambio de nucleótido por T y la segunda para el cambio de nucleótido por A.

Se realizó un análisis de restricción utilizando la herramienta bioinformática Restriction Mapper (<http://www.restrictionmapper.org/>)⁽⁷²⁾, el cual dio como resultado los tamaños de los fragmentos que se obtendrían tras la digestión de los amplicones con las enzimas de restricción (Tabla 9).

Tabla 9. Tamaño de los fragmentos obtenidos por digestión con enzimas de restricción.

Mutación	Tamaño de amplicón original (pb)	Tamaño de los fragmentos (pb)	
C3435T	208	145	63
G2677T	226	200	26
G2677A	222	208	14

Una vez obtenidos los productos de PCR de cada muestra y de cada mutación, se sometieron a digestión enzimática con una enzima de restricción durante 4 horas.

4.2.6 Electroforesis de productos digeridos con enzimas de restricción

Se analizaron los productos de digestión midiendo el tamaño de los fragmentos obtenidos, visualizándolos bajo luz UV en geles de agarosa cuya concentración dependió del tamaño de los fragmentos esperados.

Se utilizaron geles preparados con agarosa ultrapura ya que los tamaños de los fragmentos eran muy cercanos. La agarosa ultrapura permite la separación de fragmentos de tamaños cercanos, con diferencia de hasta 10 pb.

En la Figura 15 podemos observar los tres genotipos para la mutación C3435T. Para esta mutación, la enzima MboI corta el amplicón solamente cuando el genotipo es homocigoto normal, es decir, sin cambio de nucleótido (CC) y se observan las bandas de 145pb y 63 pb, como es el caso de la muestra E043. En el caso de la muestra E041 se observa la banda de 208 pb, es decir, la enzima no realizó corte y el amplicón está completo, lo que indica el genotipo homocigoto mutado con el cambio de nucleótido (TT). Finalmente, las muestras E039, E040 y E042 presentan 3 bandas, la de 208 pb, la de 145 pb y la de 63 pb; lo que nos dice que el individuo presenta el genotipo heterocigoto, es decir, tanto el alelo normal como el alelo mutado (CT). Sin

embargo, no podemos asegurar cual es el alelo dominante, sino sólo que el individuo presenta la mutación.

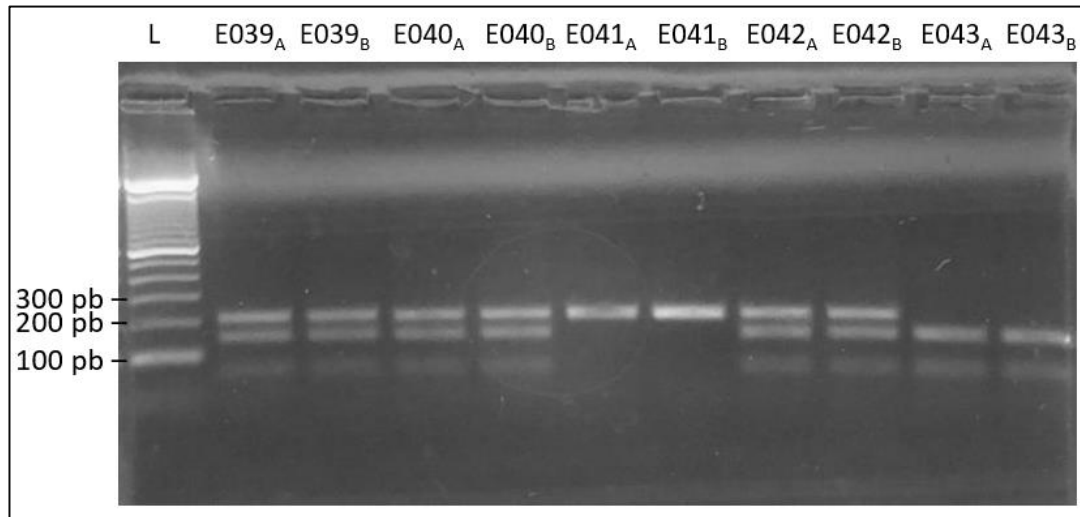


Figura 15. Corrida electroforética de los productos digeridos para la mutación C3435T (voluntarios con epilepsia). Agarosa: 2.5%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/15min.

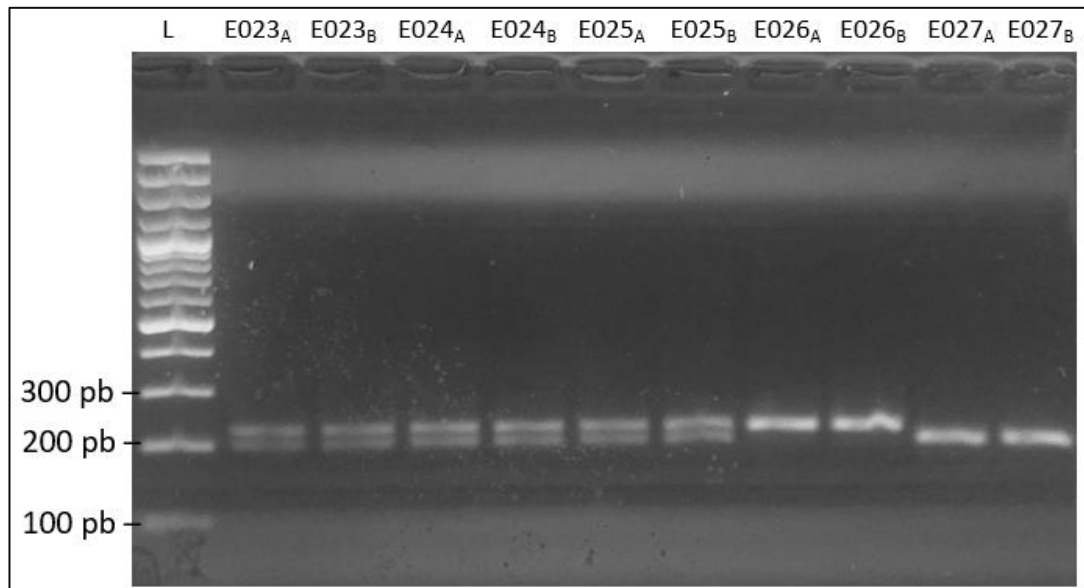


Figura 16. Corrida electroforética de los productos digeridos para la mutación G2677T (voluntarios con epilepsia). Agarosa: 4%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/30min, 65V/15min.

En la Figura 16 se observan 5 muestras que han sido digeridas con la enzima *BanI*, cada una con su respectivo duplicado. La enzima mencionada corta el amplicón en 200 pb y 26 pb cuando el voluntario, en este caso el E027, no presenta la mutación, es decir, el genotipo homocigoto normal (GG). En la figura no se logra observar la banda de 26 pb ya que es muy pequeña y tras 1 hora de corrida electroforética tiende a desaparecer. El voluntario E026 solo muestra la banda de 226 pb, lo que indica que *BanI* no realizó el corte y se conserva el amplicón, es decir, tiene la mutación y es el genotipo homocigoto mutado (TT). En el caso de los voluntarios E023 hasta E025 se observan las dos bandas de 226 pb y 200 pb (la banda de 26 pb está presente pero no se observa por el tiempo de corrida), por lo que se infiere que el voluntario es el genotipo heterocigoto (GT).

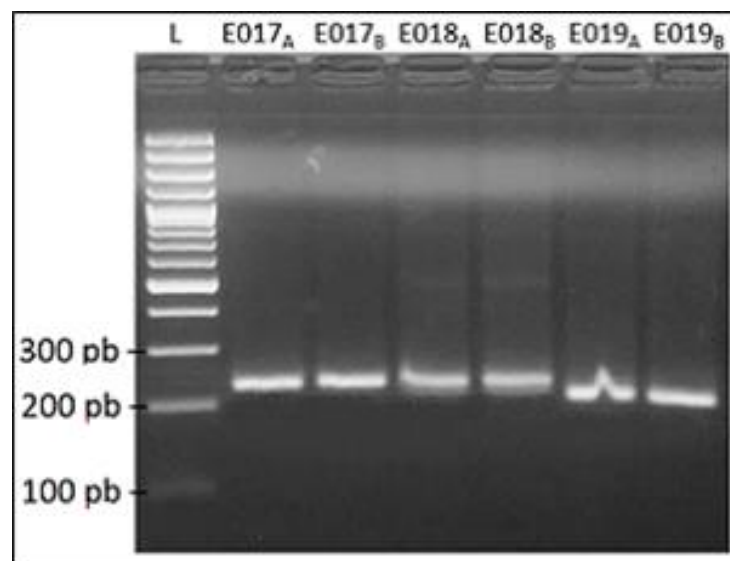


Figura 17. Corrida electroforética de los productos digeridos para la mutación G2677A (voluntarios con epilepsia). Agarosa: 4%. Condiciones de corrida: 80V/15min, 70V/25min, 65V/15min.

En la Figura 17 se observan los resultados de la electroforesis de los tres genotipos para la mutación G2677A. Primero, en los carriles del voluntario E017 se observa una única banda de 222 pb, que corresponde al amplicón completo, es decir, la enzima *BsrI* no realizó el corte en la secuencia, lo que determina el genotipo

homocigoto normal (GG). Segundo, en los carriles que corresponden al voluntario E018 se observan dos bandas muy juntas de 222 pb y de 208 pb, lo que significa que la enzima realizó el corte y la banda de 14 pb no se observa por el tamaño y tiempo de corrida. Estas tres bandas determinan el genotipo heterocigoto para la mutación G2677A (GA). Tercero, el voluntario E019 muestra una banda de 208 pb (la banda de 14 pb no se visualiza por el tamaño y tiempo de corrida); por lo tanto, dicho voluntario presenta el genotipo homocigoto mutado (AA).

En la mutación G2677T/A el nucleótido G puede cambiar tanto por T como por A, así que existe el genotipo que incluye ambos nucleótidos mutados (AT), lo que se evidenció al realizar todas las corridas electroforéticas de todos los voluntarios; aquellos que presentaron la mutación con el nucleótido T, también la presentaron con el nucleótido A.

4.2.7 Reporte de las mutaciones C3435T y G2677T/A y análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas.

Como ya se explicó en la sección 4.2.6, la presencia de las mutaciones se evidencia según el o los fragmentos visualizados en un gel de agarosa. La enzima puede o no cortar el amplicón si el individuo presenta los siguientes genotipos:

- Homocigoto normal: que no presenta la mutación en ninguno de sus alelos.
- Homocigoto mutado: que presenta la mutación en ambos alelos.
- Heterocigoto: que presenta la mutación en sólo uno de sus alelos.

Los gráficos observados en la Figura 18 muestran la distribución de las mutaciones C3435T y G2677T/A en los tres grupos de estudio, donde se observa que el 62% de los individuos estudiados presentan al menos una de las dos mutaciones. Tanto en voluntarios farmacorrespondedores como farmacorresistentes es más frecuente la presencia de la mutación G2677T/A, mientras que los controles presentan en la misma proporción las dos mutaciones. Cabe destacar que en la distribución observada fueron considerados tanto individuos con genotipo homocigoto como heterocigoto ya que ambos genotipos poseen mínimo un alelo mutado.

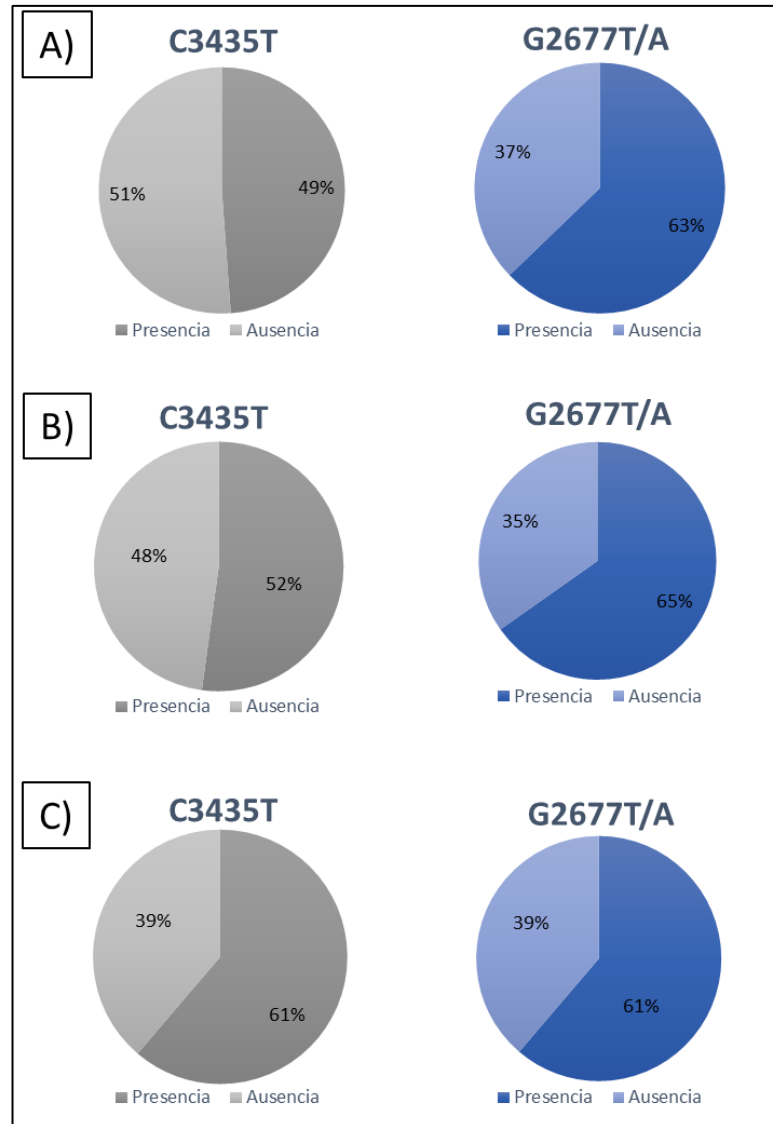


Figura 18. Frecuencia de las mutaciones C3435T y G2677T/A. A) GRUPO A: voluntarios farmacorrespondedores. B) GRUPO B: voluntarios farmacorresistentes. C) GRUPO C: voluntarios control.

En el estudio, se determinó el número de voluntarios que presentan cada una de las mutaciones por recuento, así mismo, se determinó la frecuencia de genotipos y la frecuencia alélica. (Las Tablas 17, 18 y 19 de Anexos muestran los resultados para el total de las muestras analizadas).

En primer lugar, se analizó la mutación C3435T de dos maneras: la primera comparando el total de voluntarios epilépticos con los voluntarios control, con el fin de determinar si la presencia de la mutación se asocia con la enfermedad; y la segunda

comparando el grupo de Farmacorrespondedores (A) con el de Farmacorresistentes (B), para comprobar si la presencia de la mutación influye en la farmacorresistencia.

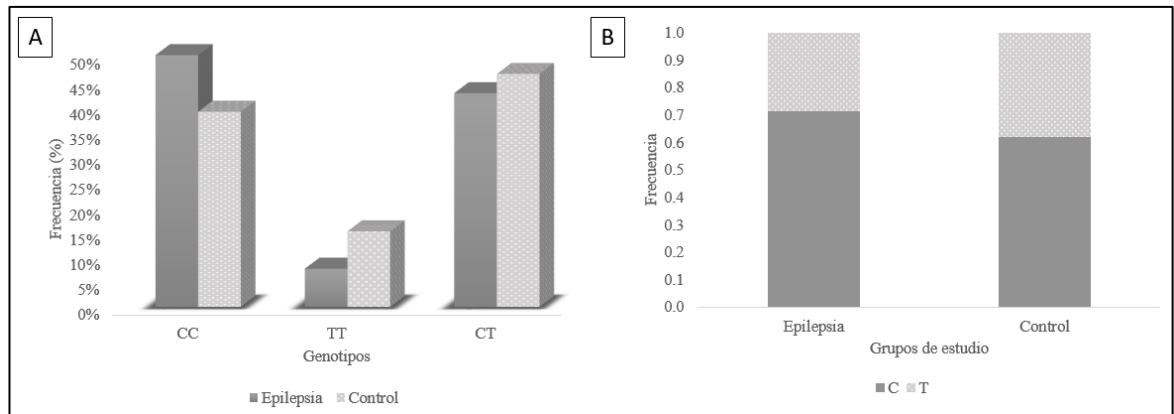


Figura 19. A) Frecuencia de los genotipos CC (homocigoto normal), TT (homocigoto mutado) y CT (heterocigoto) de la mutación C3435T, relacionando la mutación con el desarrollo de la enfermedad. B) Frecuencia de los alelos C (normal) y T (mutado) de la mutación C3435T, relacionando la mutación con el desarrollo de la enfermedad.

La primera comparación se visualiza en la Figura 19 mediante dos gráficos. En la Figura 19A se observa que los genotipos TT y CT, donde se manifiesta la mutación, son más frecuentes en voluntarios control, con 15% y 46% respectivamente; indicio de que no necesariamente los individuos que tienen la enfermedad son los que presentan con más frecuencia la mutación. También se comparó la frecuencia alélica, la cual se refiere a la frecuencia de aparición de un alelo en una determinada población. Para este caso el “n” se duplicó, ya que cada individuo posee dos copias de cada gen, por lo tanto, dos alelos.⁽⁷³⁾ La Figura 19B la describe expresada como fracción de la unidad, en ella se observa que el alelo C es más frecuente que el alelo T y que las frecuencias alélicas son muy similares en ambas poblaciones.

Al comparar estadísticamente los datos de los grupos Epilepsia y Control en la Tabla 10 se determinó que tanto en la frecuencia genotípica como en la frecuencia alélica no existe diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre ambos grupos; por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad no está influido por la presencia de esta mutación.

Tabla 10. Distribución genotípica y alélica de la mutación C3435T del gen MDR1 en relación al desarrollo de la enfermedad.

Genotipos	GRUPO EPILEPSIA (n=66)		GRUPO CONTROL (n=80)		OR (IC 95%)	Valor-P
	n	%	n	%		
CC	33	50.0%	31	38.8%	1	0.2375
CT	28	42.4%	37	46.3%	0.71 (0.35-1.42)	
TT	5	7.6%	12	15.0%	0.39 (0.12-1.24)	

Alelos	GRUPO EPILEPSIA (n=132)		GRUPO CONTROL (n=160)		OR (IC 95%)	Valor-P
	n	%	n	%		
C	94	0.71	99	0.62	1	0.0934
T	38	0.29	61	0.38	0.66 (0.40-1.07)	

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza

La segunda comparación se muestra en los gráficos de la Figura 20. En la gráfica A se observa la distribución de los tres genotipos en los grupos A y B. La mayor parte de individuos que presentan la mutación, genotipos TT y CT, con 9% y 44% de frecuencia respectivamente, son farmacorresistentes, es decir, no se observa una reducción de crisis epilépticas a pesar de estar en tratamiento con fenitoína y/o carbamazepina. Además, el genotipo TT es el menos frecuente en la población en estudio con un 7% en voluntarios farmacorrespondedores y casi 9% en farmacorresistentes.

Como se esperaba, la frecuencia de los genotipos TT y CT es mayor en farmacorresistentes que en farmacorrespondedores; sin embargo, según los datos de la Tabla 11 no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en la frecuencia genotípica entre los grupos farmacorrespondedores y farmacorresistentes.

Además, se determinó la frecuencia alélica, los resultados se visualizan en la Figura 20B, donde la frecuencia del alelo C (normal o *wild type*) es mayor para los dos grupos analizados y la frecuencia de los alelos C y T es muy similar en los grupos farmacorrespondedores y farmacorresistentes.

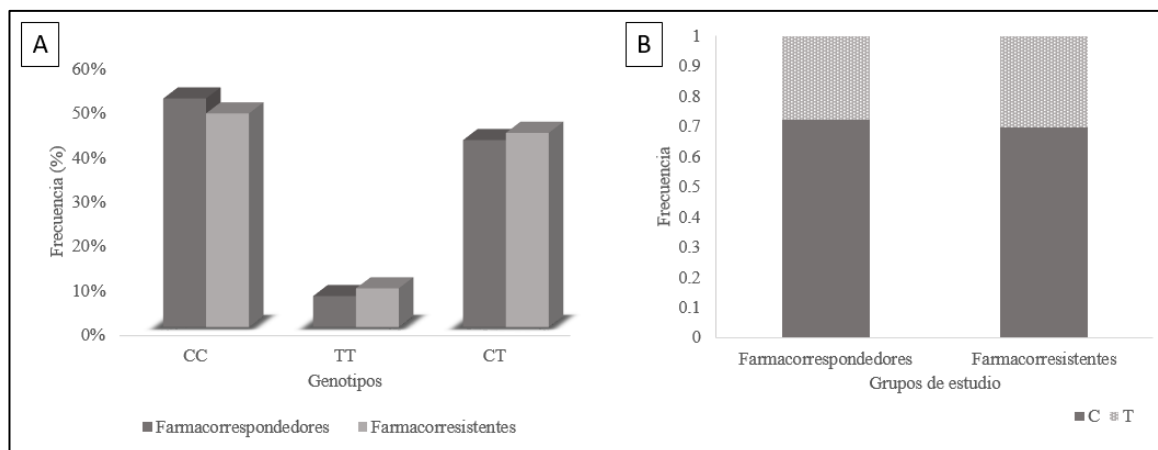


Figura 20. Frecuencia de los genotipos CC (homocigoto normal), TT (homocigoto mutado) y CT (heterocigoto) de la mutación C3435T, relacionando la mutación con la farmacorresistencia. B) Frecuencia de los alelos C (normal) y T (mutado) de la mutación C3435T, relacionando la mutación con la farmacorresistencia.

Tabla 11. Distribución genotípica y alélica de la mutación C3435T del gen MDR1 en relación a la resistencia a fármacos antiepilépticos. (Grupo A: Farmacorrespondedores y Grupo B: Farmacorresistentes)

Genotipos	GRUPO A (n=43)		GRUPO B (n=23)		OR (IC 95%)	Valor-P
	n	%	n	%		
CC	22	51.2%	11	47.8%	1	0.9507
CT	18	41.9%	10	43.5%	0.75 (0.11-5.17)	
TT	3	7.0%	2	8.7%	0.90 (0.31-2.60)	
Alelos	GRUPO A (n=132)		GRUPO B (n=160)		OR (IC 95%)	Valor-P
	n	%	n	%		
C	62	0.72	32	0.70	1	0.7599
T	24	0.28	14	0.30	0.88 (0.40-1.94)	

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza

Comparando los dos grupos de voluntarios con epilepsia, ambos presentan la misma frecuencia alélica y el análisis estadístico mostrado en la Tabla 11 lo corrobora; no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en la frecuencia de los alelos entre los grupos farmacorrespondedores y farmacorresistentes. Ambos

análisis estadísticos indicados en la Tabla 11 muestran que no existe relación entre la resistencia a fármacos antiepilépticos y la presencia de la mutación C3435T.

Contrariamente a lo esperado, los voluntarios control presentaron con mayor incidencia la mutación del exón 26; estos resultados coinciden con un estudio realizado en Italia donde se halló una frecuencia mayor de la mutación en los controles y se concluye que no existe relación entre la resistencia a fármacos antiepilépticos y la presencia de la mutación C3435T.⁽⁷⁴⁾ Sin embargo, otro estudio realizado en India reportó que si existe relación.⁽⁷⁵⁾ En América del Sur sólo se ha realizado un estudio de este tipo en Chile; sin embargo, sólo se reportan las frecuencias de las mutaciones del gen MDR1 sin relacionarlas con la epilepsia refractaria.⁽³⁰⁾

En el 2003 un estudio realizado por Siddiqui et al. fue el primero en reportar asociación entre la mutación C3435T y la epilepsia refractaria, y que esto se debía a la genética de poblaciones.⁽⁷⁶⁾ En el 2002, Sakaeda et al, señalaron que la presencia del alelo T conlleva a la sobreexpresión de la P-gp en la barrera hematoencefálica, lo que explicaría porque un paciente con epilepsia desarrolla una epilepsia refractaria, ya que los niveles adecuados de fármaco no llegan al cerebro.⁽⁷⁷⁾

Existe mucha discrepancia en los resultados de varios estudios realizados, de hecho, se han realizado estudios cuyo objetivo es probar que no existe asociación alguna como el de Sills et al. en el 2005 donde lo comprueban y sugieren realizar más estudios para comprobar si realmente la epilepsia refractaria y las mutaciones se relacionan.⁽⁷⁸⁾ La mayoría de estudios se han realizado en países de Asia, Europa y África, lo que permite inferir que lo que realmente influye en la relación entre la presencia de mutaciones del gen MDR1 y la resistencia a fármacos antiepilépticos son las diferencias étnicas, es por ello que en algunas poblaciones sí se encuentra una relación y en otras no.

La segunda mutación más frecuente en el gen MDR1 es G2677T/A ubicada en el exón 21 y tiene dos posibles cambios de nucleótido, lo que aumenta el número de genotipos y alelos posibles; también fue analizada de dos maneras: comparando el total de voluntarios con epilepsia con voluntarios control; y comparando los grupos Farmacorrespondedores y Farmacorresistentes.

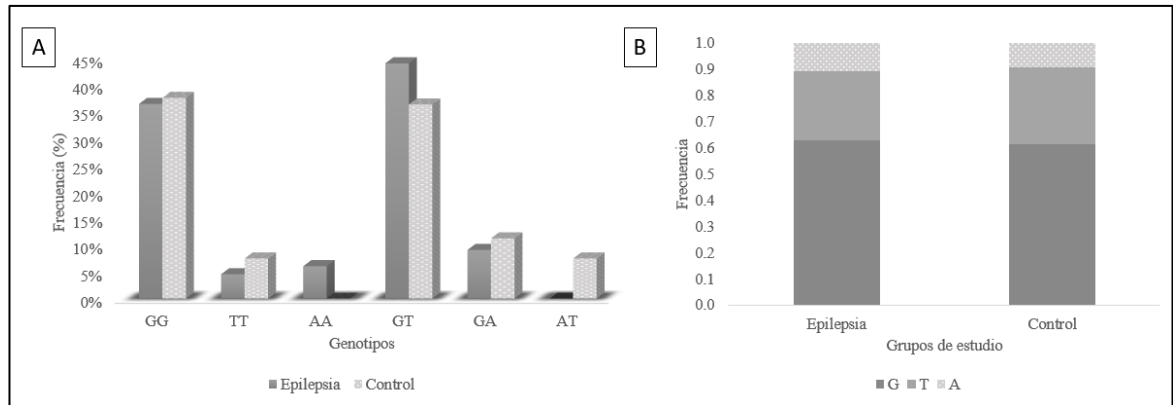


Figura 21. A) Frecuencia de los genotipos GG (homocigoto norma<l), TT y AA (homocigotos mutados) y GT, GA y AT (heterocigotos) de la mutación G2677T/A, relacionando la mutación con el desarrollo de la enfermedad. B) Frecuencia de los alelos G (normal), T y A (mutados) de la mutación G2677T/A, relacionando la mutación con el desarrollo de la enfermedad.

Tabla 12. Distribución genotípica y alélica de la mutación C3435T del gen MDR1 en relación al desarrollo de la enfermedad.

Genotipos	GRUPO EPILEPSIA (n=66)		GRUPO CONTROL (n=80)		OR (IC 95%)	Valor-P
	n	%	n	%		
GG	24	36.4%	30	37.5%	1	0.0509
GT	29	43.9%	29	36.3%	1.25 (0.59-2.63)	
GA	6	9.0%	9	11.3%	0.83 (0.26-2.67)	
AT	0	0.0%	6	7.5%	0	
TT	3	4.5%	6	7.5%	0.63 (0.14-2.76)	
AA	4	6.0%	0	0.0%	0	

Alelos	GRUPO EPILEPSIA (n=132)		GRUPO CONTROL (n=160)		OR (IC 95%)	Valor-P
	n	%	n	%		
G	83	0.63	98	0.61	1	0.8386
T	35	0.27	47	0.29	0.88 (0.52-1.49)	
A	14	0.11	15	0.09	1.10 (0.50-2.42)	

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza

En el gráfico de barras de la Figura 21A el genotipo más frecuente tanto para el grupo epilepsia como para el grupo control es GT con 44% y 36% respectivamente, seguido por el homocigoto normal (GG). El genotipo AA no se encuentra presente en

grupo control, mientras que en el grupo epilepsia no existe el genotipo AT. En el gráfico de la Figura 21B se muestran las frecuencias alélicas aparentemente iguales en ambos grupos, siendo el alelo más frecuente el normal (G), seguido por el T y finalmente en menor proporción el alelo A.

Luego se comparó estadísticamente los grupos Epilepsia y el grupo Control en la Tabla 12 y según los resultados del análisis no existe diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos; por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad no está asociado a la presencia de la mutación G2677T/A.

Finalmente se realizó una comparación entre los grupos farmacorrespondedores y farmacorresistentes para determinar la relación entre la mutación G2677T/A y la farmacorresistencia; así en la Figura 22A se comparó las frecuencias de los seis posibles genotipos de dicha mutación. El genotipo más frecuente en los dos grupos fue el GT (heterocigoto), con 42% y 48% en los grupos A y B respectivamente; seguido por el homocigoto normal (GG). Los genotipos que incluyen el nucleótido A son los menos frecuentes para los dos grupos, siendo el más raro el genotipo AT que no está presente en ninguno de los grupos de voluntarios epilépticos; es por ello que no se consideró el último genotipo para realizar el análisis estadístico.

Desde el punto de vista de frecuencia alélica, ilustrada en la Figura 22B, el alelo G (wild type) es el más frecuente en los dos grupos, aproximadamente 60%, seguido por el alelo T con 30% y finalmente el alelo A con el 10% restante, los dos últimos considerados mutantes. La frecuencia del alelo A coincide con los resultados de la mayor parte de los estudios similares a este y es considerado el menos recurrente en distintas poblaciones. Además, ambos grupos parecen presentar la misma frecuencia para los tres alelos.

En la Tabla 13 se encuentran las frecuencias genotípicas expresadas en la figura anterior y el análisis estadístico que confirma que no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre los grupos farmacorresistentes y farmacorrespondedores. Así como también se realizó la comparación de frecuencias

alélicas y según el valor P, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos farmacorrespondedores y farmacorresistentes.

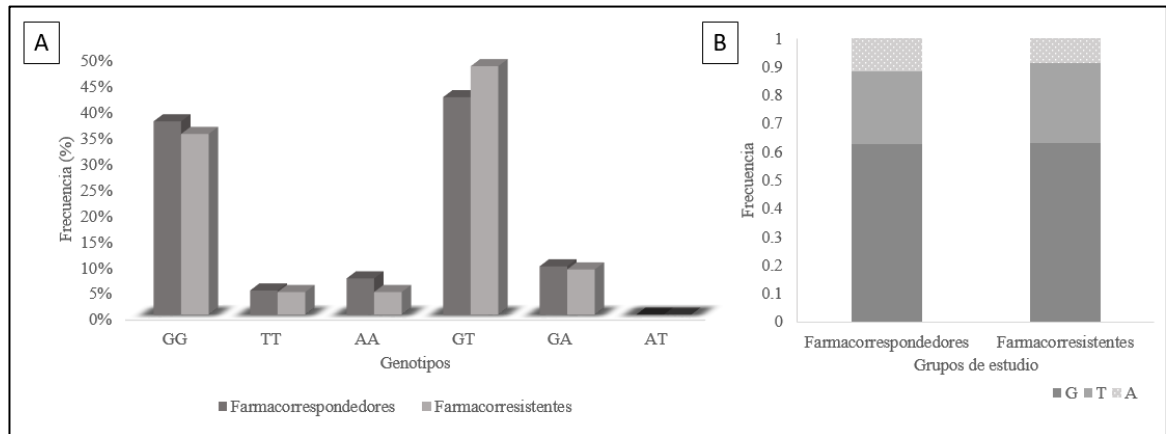


Figura 22. A) Frecuencia de los genotipos GG (homocigoto normal), TT y AA (homocigotos mutados) y GT, GA y AT (heterocigotos) de la mutación G2677T/A, relacionando la mutación con la farmacorresistencia. B) Frecuencia de los alelos G (normal), T y A (mutados) de la mutación G2677T/A, relacionando la mutación con la farmacorresistencia.

Tabla 13. Distribución genotípica y alélica de la mutación G2677T/A del gen MDR1 en relación a la resistencia a fármacos antiepilépticos. (Grupo A: Farmacorrespondedores y Grupo B: Farmacorresistentes).

Genotipos	GRUPO A (n=43)		GRUPO B (n=23)		OR (IC 95%)	Valor-P
	n	%	n	%		
GG	16	37.2%	8	34.8%	1	0.9881
GT	18	41.9%	11	47.8%	0.82 (0.26-2.54)	
GA	4	9.3%	2	8.7%	1.00 (0.15-6.67)	
AT	0	0.0%	0	0.0%	0	
TT	2	4.7%	1	4.3%	1.00 (0.08-12.76)	
AA	3	7.0%	1	4.3%	1.50 (0.13-16.80)	
Alelos	GRUPO A (n=86)		GRUPO B (n=46)		OR (IC 95%)	Valor-P
	n	%	n	%		
G	54	0.63	29	0.63	1	0.8503
T	22	0.26	13	0.28	0.91 (0.40-2.07)	
A	10	0.12	4	0.09	1.34 (0.39-4.66)	

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza

En los dos análisis estadísticos de frecuencia genotípica y frecuencia alélica se demuestra que no existe relación entre la presencia de la mutación G2677T/A y la resistencia a fenitoína y carbamazepina en pacientes con epilepsia.

Comparando los resultados con trabajos realizados anteriormente, estos coinciden. En 2006, en Korea realizaron un estudio con el mismo objetivo, y el genotipo más frecuente fue el GT al igual que en el presente; además, señalaron que no había asociación entre la resistencia a fármacos antiepilépticos y la presencia de los genotipos mutados, mientras que estudios previos señalaban que dicha mutación está asociada a la resistencia en diferentes estadios de la enfermedad, pero la información que existe hasta el momento es insuficiente para determinarlo.⁽⁷⁹⁾ De la misma manera en el 2014, en otro estudio realizado en Turquía concluyeron que la frecuencia de los genotipos y alelos de la mutación G2677T/A no difiere entre pacientes farmacorrespondedores y farmacorresistentes.⁽⁶³⁾ Al igual que para la mutación C3435T, no se han reportado estudios en Latinoamérica relacionando la presencia de mutaciones con la resistencia a fármacos antiepilépticos.

También se han realizado estudios con el objetivo contrario, en 2009, Lakhan et al, publicaron que en la población del norte de India las mutaciones del gen MDR1 no están asociadas con la resistencia a fármacos, no hubo diferencia entre los resultados de pacientes farmacorrespondedores y farmacorresistentes.⁽⁸⁰⁾

Los resultados contradictorios en este tipo de estudios realizados previamente podrían deberse a otro tipo de factores como el tamaño de muestra, la propia naturaleza de la población en estudio, la diferencia entre los tipos de epilepsia y la causa de la enfermedad y la influencia del medio ambiente sobre los genes.

En general, los resultados de ambas mutaciones demuestran que, en la población de Arequipa, las frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones C3435T y G2677T/A, no están asociadas a la resistencia a fenitoína y carbamazepina como tratamiento para la epilepsia. Además, en ambos casos se encontró una mayor frecuencia de dichas mutaciones en voluntarios sanos, no relacionados a la enfermedad.

4.3. Evaluación de la expresión del gen MDR1 mediante qPCR

La expresión de un gen parte del ADN conocido como código genético, que es transcrito a ARN. En la transcripción se eliminan los intrones del ADN, que son regiones que generalmente no codifican nada, y solo quedan exones que representan las regiones importantes para que el gen sea expresado. En el presente trabajo se midió la expresión relativa, por ello se utilizó un gen de referencia.

Así, el primer paso para medir la expresión fue extraer el ARN total para luego convertirlo en ADN complementario y mediante PCR tiempo real medir la expresión tanto del gen en estudio, el MDR1, como el gen de referencia, GAPDH.

4.3.1 Extracción de ARN total y evaluación de la integridad y calidad

Se realizó la extracción de ARN total a partir de las células sanguíneas de los voluntarios con epilepsia y control utilizando el método de fase sólida con columnas de sílica.

La calidad del ARN se evaluó por espectrofotometría en un lector de placas de quimioluminiscencia, utilizando placas de 96 pozos. Se realizó la medición a tres longitudes de onda: 230 nm, 260 nm y 280 nm. La relación 260/280 tanto de voluntarios con epilepsia como de voluntarios control, dio valores desde 1.9 hasta 2.2; indicando una pureza de aceptable a óptima para la totalidad de los ARN evaluados.⁽⁶⁹⁾

Por otro lado, la relación 260/230 dio valores mayores a 1.5, lo que indica que no hay contaminación por sales, carbohidratos o fenoles. (Los valores de las lecturas de absorbancia y las relaciones 260/280 y 260/230 de las muestras de ARN se observan en la Tabla 20 de Anexos)

El 73.5% de los ARN de voluntarios con epilepsia contaban con una calidad óptima y 26.5% con calidad aceptable. En el grupo de voluntarios control el 80.6% de los ARN se consideran de calidad óptima y el 19.4% de calidad aceptable.

Se evaluó la integridad del ARN obtenido mediante electroforesis, obteniéndose bandas definidas reveladas ante luz UV, lo que verifica la integridad de la totalidad de ARN extraídos. (Figura 23) El ARN ribosomal (ARNr) representa la

mayor parte del ARN total, aproximadamente el 75% del ARN total, el otro 25% está conformado por el ARN mensajero (ARNm) y el ARN de transferencia (ARNt), además de otros micro ARN que representan un porcentaje demasiado pequeño. Es así como en la corrida electroforética en el gel de agarosa, el ARN se observa como dos o tres bandas, ordenadas por tamaño, correspondientes a las subunidades 28S, 18S y 5,8S del ARNr; sin embargo, la mayoría de las veces no se logra visualizar la última banda 5,8S debido a que es muy pequeña en comparación a las otras dos.⁽⁸¹⁾ (En las Figuras 30 hasta la 32 de Anexos se puede observar la corrida electroforética del total de muestras, tanto de voluntarios con epilepsia como de voluntarios control)

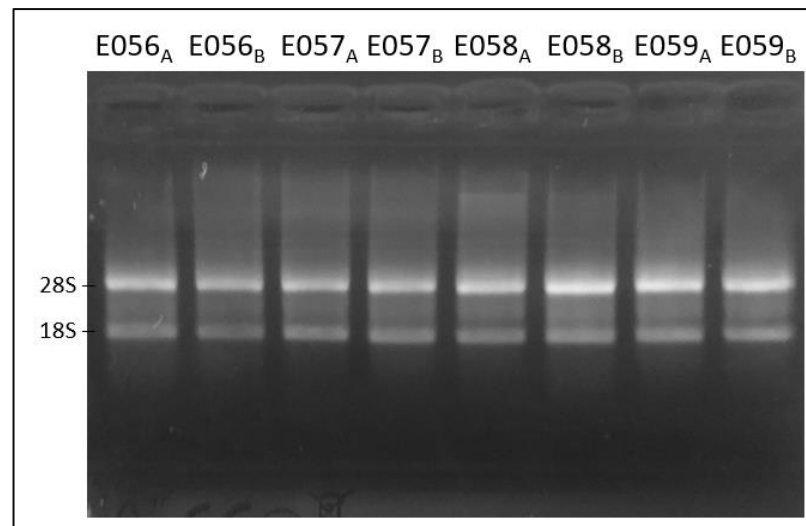


Figura 23. Corrida electroforética de los ARN extraídos de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30min.

4.3.2 Cuantificación del ARN obtenido por fluorometría

Se cuantificó la concentración del ARN obtenido en el fluorómetro Qubit 2.0. Para este caso el reactivo que permite la cuantificación es un fluoróforo al igual que el que se utiliza en la cuantificación de ADN, pero este se intercala en el ARN de doble hebra, emite fluorescencia proporcional a la concentración de ARN en la muestra que se está midiendo y ésta es detectada por el equipo. El fluorómetro muestra la concentración de ARN en ng/mL la cual se convierte en ng/ μ L multiplicando el valor

obtenido por un factor según el volumen de ARN utilizado; para luego realizar los cálculos a fin de colocar una cantidad de 2.5 ng de ARN en la qPCR.

Los valores obtenidos para la cuantificación de ARN tanto de voluntarios con epilepsia como voluntarios control, oscilan entre 4 ng/ μ L y 83 ng/ μ L. (la Tabla 21 de Anexos muestra las concentraciones de los ARN extraídos de voluntarios con epilepsia y control).

4.3.3 Síntesis de ADNc y cuantificación por fluorometría

Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) de todas las muestras de ARN extraídas, tanto de voluntarios con epilepsia como de voluntarios control.

La síntesis de ADNc fue relevante para medir la expresión del gen MDR1, ya que para el ensayo es necesario tener una secuencia de ADN y no de ARN; y lo obtuvimos con una enzima retro-transcriptasa.

La cuantificación del ADNc se realizó de la misma manera que la del ADN genómico, por fluorometría. Los valores de concentraciones de ADNc de voluntarios con epilepsia oscilaron entre 0.77 ng/ μ L y 3.40 ng/ μ L; y los de voluntarios control entre 1.14 ng/ μ L y 15.36 ng/ μ L. (La Tabla 22 de Anexos muestra las concentraciones de ADNc de voluntarios con epilepsia y control)

4.3.4 Medición de la expresión relativa del gen MDR1 por qPCR

Para medir la expresión del gen MDR1 se realizó una PCR en tiempo real, que permite observar la amplificación de la región deseada mientras se lleva a cabo gracias a la fluorescencia emitida por los amplicones que se van sintetizando. La fluorescencia es emitida por un agente que se intercala en los amplicones sintetizados y en este caso el *SYBRgreen*. Se utilizó como gen de referencia GAPDH ya que se midió la expresión relativa.

Este método dio dos valores para cada reacción. El primero, el ciclo umbral (*threshold cycle*, Ct) de cada gen, que significa el número de ciclo en el que la curva de reacción cruza el umbral, este valor indica cuántos ciclos tomó al equipo detectar una señal de amplificación de la muestra. El segundo, la temperatura de fusión (*melting*

temperature, T_m) de cada gen, que señala la temperatura a la cual la mitad del amplicón se encuentra completa y la otra mitad se encuentra desnaturalizada. Esta temperatura es única para cada gen y con ella se pudo comprobar que se amplificó el gen esperado.

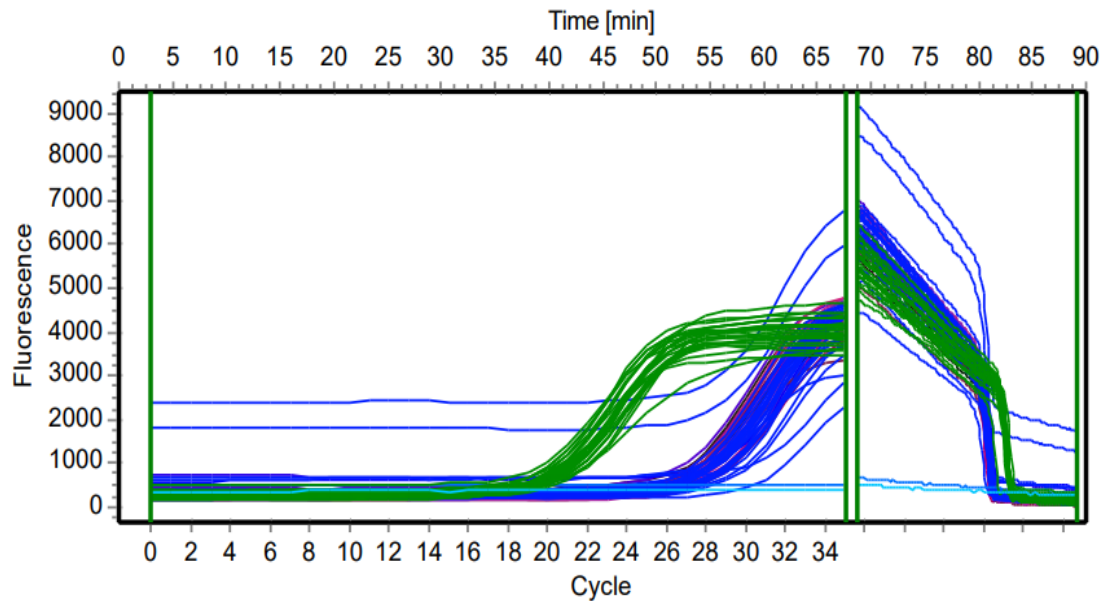


Figura 24. Curvas de amplificación por qPCR de los genes MDR1 y GAPDH (gen de referencia).

En el lado izquierdo de la Figura 24 se puede observar la curva de amplificación, en color verde para el gen de referencia GAPDH que amplificó entre los ciclos 17 a 25 y en color azul para el gen MDR1 que amplificó entre los ciclos 24 a 29. Generalmente se escogen como genes de referencia aquellos que tengan en el protocolo de amplificación, una temperatura de alineamiento similar a la del gen en estudio, con el fin de que se pueda amplificar correctamente y en ciclos tempranos, entre 16 y 22; mientras que el gen en estudio da valores de C_t más tardíos que el gen de referencia. Además, se observan dos líneas rectas por debajo de las demás curvas que corresponden a los controles negativos para ambos genes. Estos controles no muestran amplificación alguna al no haber ningún artefacto que pueda interferir con la amplificación y demuestran que los resultados son fiables y que ningún resultado puede ser algún falso positivo.

En el lado derecho de la imagen, se observa la segunda parte de la qPCR, que corresponde al protocolo establecido por el equipo para realizar las curvas de disociación (curvas de *melting*).

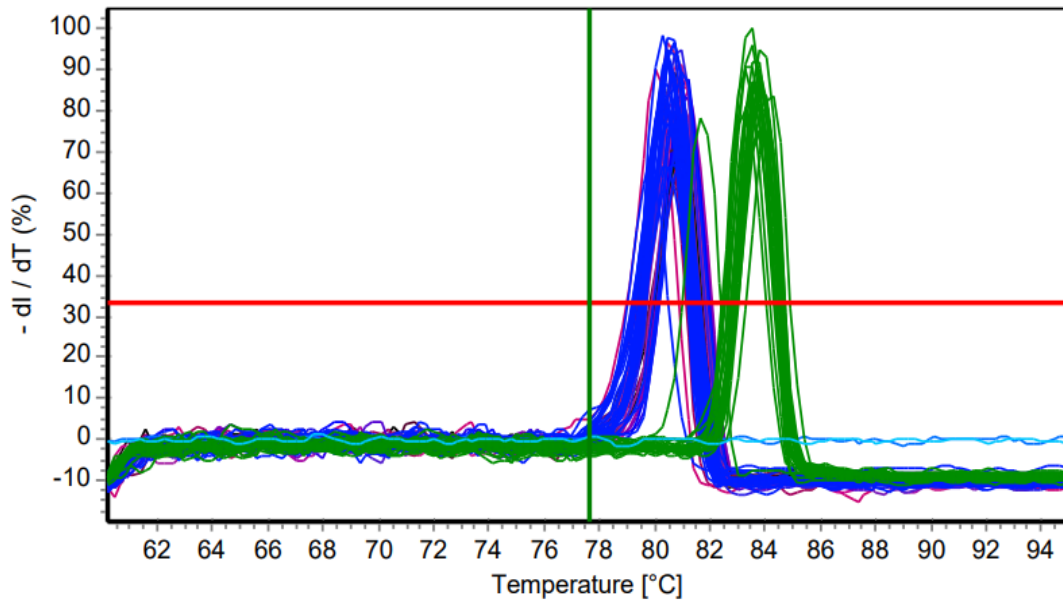


Figura 25. Curvas de disociación de los genes MDR1 y GAPDH.

En la Figura 25 se observan las curvas de disociación resultantes para los genes MDR1 en color azul y GAPDH en color azul. La T_m promedio del gen MDR1 fue 80.3 ± 0.56 y del gen GAPDH fue 83.4 ± 0.45 para todas las muestras analizadas, como se observa en la imagen, lo que indica que se logró la amplificación de los genes esperados. También se observan dos curvas que no presentan picos y corresponden a los controles blanco de ambos genes, con los que se comprueba que las reacciones no estuvieron contaminadas con algún ADN extraño.

4.3.5 Reporte de la expresión del gen MDR1 en voluntarios con epilepsia: farmacorrespondedores, farmacorresistentes; y voluntarios control.

Los valores de expresión relativa del gen MDR1 se hallaron mediante el uso de la fórmula de Pffaf1 o el método llamado “delta delta Ct” que da como resultado la relación de expresión del gen MDR1 respecto al gen GAPDH, se expresan como un

ratio de expresión. (Los resultados de expresión de todas las muestras se encuentran en las Tablas 23, 24 y 25 de Anexos)

Se realizaron dos comparaciones entre los resultados de expresión: una entre voluntarios con epilepsia en general (tanto farmacorrespondedores como farmacorresistentes) y voluntarios control, con el fin de relacionar la enfermedad epilepsia con la expresión del gen MDR1; y otra entre el grupo de farmacorrespondedores y el grupo de farmacorresistentes, con el objetivo de establecer si existe asociación entre la sobreexpresión del gen MDR1 y la farmacorresistencia a fenitoína y carbamazepina.

Tabla 14. Estadística descriptiva para los resultados de expresión relativa en las poblaciones comparadas: Grupo A (farmacorrespondedores), Grupo B (farmacorresistentes), Epilepsia y Controles.

	Grupo A (n=43)	Grupo B (n=23)	Grupo Epilepsia (n=66)	Grupo Control (n=80)
Expresión mínima	0.278	0.206	0.206	0.114
Expresión máxima	49.597	43.177	49.597	20.073
Promedio	10.762	9.305	10.254	2.121
Mediana	4.048	3.598	3.919	0.740
Desviación estándar	12.807	12.833	12.736	3.512
Coficiente de variabilidad	119.0%	137.9%	124.2%	165.6%

En la Tabla 14 se muestra el resumen de los resultados de los grupos A, B, epilepsia y control, donde los valores de expresión en los grupos A y B se observan similares, teniendo rangos de expresión que van desde 0.2 hasta 49 y en promedio 10 para el grupo A y 9 para el grupo B; a diferencia del grupo control que presenta valores de expresión desde 0.1 hasta 20 y en promedio 2.1, donde se trabajó con voluntarios sanos. El grupo epilepsia comprende tanto los voluntarios del grupo A como los del grupo B, así que los valores de la tabla representan la combinación de los grupos antes mencionados. Evidentemente la desviación estándar es muy grande en los grupos A,

B y epilepsia comparada con la del grupo control, es por ello que los valores de los tres primeros grupos son altamente dispersos.

En el grupo control, la mayor parte (51 muestras) tienen un valor de expresión menor a la unidad; por lo tanto, se considera como una expresión normal, que será considerada como referencia para hallar los valores de expresión de los grupos A y B. Así en el grupo A, el 74.4% (32) de las muestras tenían expresión >1 , valores considerados como una expresión elevada o sobreexpresión; en el grupo B, el 65.2% (15) de las muestras eran >1 ; y en el grupo control, sólo el 36.2% (29) de las muestras tuvieron expresión >1 .

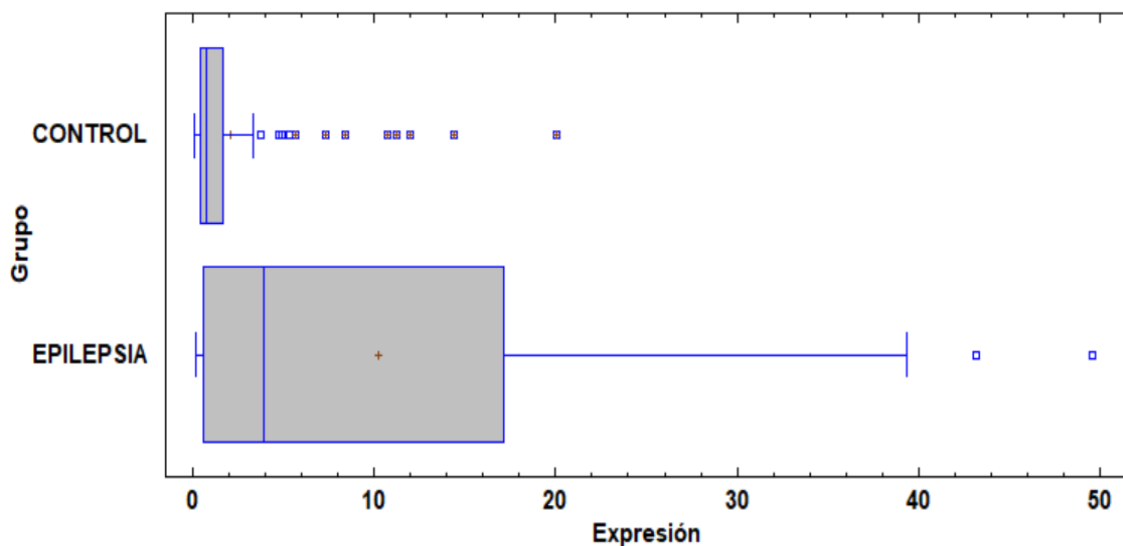


Figura 26. Distribución de los valores de expresión relativa de la Glicoproteína-P en dos poblaciones: voluntarios con epilepsia y voluntarios control.

La primera comparación se realizó entre los grupos epilepsia y control; y la distribución de datos se muestra en la Figura 26, donde los controles tienen un rango de expresión más reducido que el del grupo epilepsia. Comparando la figura y la Tabla 14, los rangos de expresión son diferentes y es debido a los valores atípicos, es decir, valores que escapan de los límites de la distribución por ser muy distantes. La caja del grupo control se ubica en la parte izquierda, cercanas al cero; por ello podemos decir que la mitad de los datos de dicho grupo, tienen un nivel de expresión menor a 1.

Para establecer si la expresión de la Glicoproteína-p se relaciona con la epilepsia se realizó un análisis de varianza ANOVA y una prueba de Tukey. Según los resultados (Tabla 26 del Anexo 3) donde el valor de P es 0.0000 ($P < 0.05$), se puede confirmar que existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos epilepsia y control; y la prueba de Tukey (Tabla 27 del Anexo 3) lo confirma. Por lo tanto, la expresión de la Glicoproteína-P sí se encuentra asociada a la enfermedad de la epilepsia.

Por otra parte, ya que uno de los objetivos principales de esta investigación es comprobar si la sobreexpresión de la Glicoproteína-P está asociada con la resistencia a fármacos antiepilépticos, se compararon los resultados de expresión de farmacorrespondedores con farmacorresistentes. Se realizó una distribución de los datos obtenidos para comparar la expresión en los grupos A y B y se muestra en la Figura 27, donde se observa que los rangos de expresión de ambos grupos no coinciden con los indicados en la Tabla 14; debido a los datos atípicos. En el caso del grupo A se observa un valor de 49.6 y en el grupo B dos valores 37.2 y 43.2; en los tres casos estos valores indican una sobreexpresión de la Glicoproteína-P; sin embargo, otros valores que se encuentran dentro del rango observado también indican sobreexpresión, pero no tan elevada.

El promedio de los datos de expresión representado con una cruz no coincide con la mediana de los datos señalada en los gráficos con una línea vertical en el interior de las cajas, debido a la gran dispersión de los valores. Por último, se observa que ambas cajas se ubican en la parte izquierda del gráfico, indicando que la mitad de los datos de los dos grupos tienen valores bajos, que no sobrepasan valores de expresión de 20 en farmacorrespondedores y 13 en farmacorresistentes.

Según el análisis de varianza (ANOVA) realizado (Tabla 28 del Anexo 3) el valor P es 0.6613 ($P > 0.05$), es decir, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos A y B; y la prueba de Tukey (Tabla 29 del Anexo 3) lo confirma. Por lo tanto, la sobreexpresión de la Glicoproteína-P no se encuentra asociada a la resistencia a fármacos antiepilépticos.

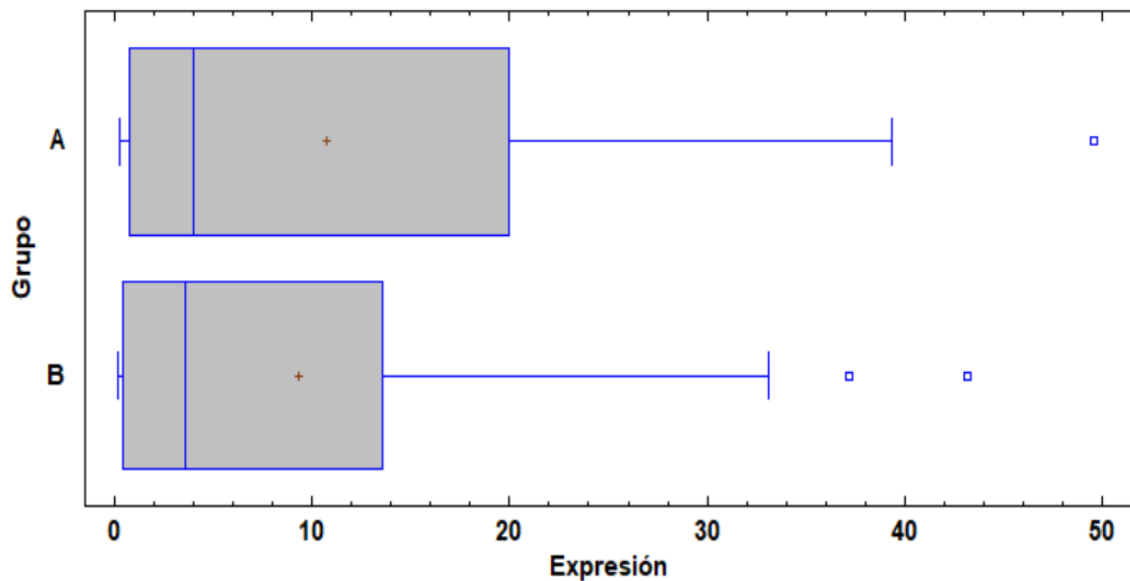


Figura 27. Distribución de los valores de expresión relativa de la Glicoproteína-P en dos grupos de voluntarios con epilepsia: farmacorrespondedores y farmacorresistentes.

Cabe destacar que la expresión evaluada es en general para la P-gp, es decir, se considera la P-gp de todo el organismo, no sólo la de la barrera hematoencefálica; sin embargo, los datos de expresión nos dan una idea de cómo se encuentra la expresión de esta proteína y en caso de estar sobreexpresada se puede esperar que la dosis de un fármaco en un órgano diana, en este caso el cerebro, no sea la dosis deseada.

No se han reportado estudios acerca de la expresión de la P-gp en muestras sanguíneas de pacientes con epilepsia, la mayor parte de estudios se han relacionado con diferentes tipos de cáncer, donde la sobreexpresión de la P-gp afecta en la respuesta a la quimioterapia. Sin embargo, Tishler et al. evaluaron la expresión del gen MDR1 en muestras de cerebro de pacientes con epilepsia refractaria y mediante la técnica de PCR cuantitativa y luego hibridación utilizando sondas; los resultados demostraron que la expresión del gen MDR1 estaba incrementada en pacientes con epilepsia refractaria, por lo tanto, la sobreexpresión si tenía relación con la falta de respuesta a fármacos antiepilépticos.⁽⁸²⁾

Adicionalmente, en un caso de estudio en Argentina realizado por Lazarowski et al. utilizaron la inmunohistoquímica sobre una biopsia de cerebro para evaluar la

expresión de la P-gp en una paciente con epilepsia refractaria cuyas concentraciones de fenitoína en plasma se consideraban subterapéuticas, por lo que no tenían efecto sobre las crisis convulsivas; el experimento demostró que la P-gp se encontraba sobreexpresada por lo que concluyeron que la resistencia a la fenitoína y las bajas concentraciones de la misma encontradas en plasma fueron consecuencia de la elevada expresión de dicha proteína.⁽⁸³⁾



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Se resolvió que no existe relación entre la epilepsia y la presencia de las mutaciones C3435T y G2677T/A; así como estas mutaciones tampoco están asociadas a la resistencia a los fármacos fenitoína y carbamazepina. Además, se comprobó que el gen MDR1 se encuentra sobre expresado en la población de voluntarios con epilepsia, tanto en farmacorrespondedores como en farmacorresistentes, por lo que la expresión de dicho gen influye en el desarrollo de la enfermedad. Finalmente se determinó que la farmacorresistencia a fenitoína y carbamazepina, no está relacionada con la expresión elevada de la Glicoproteína-P.
2. Se extrajo ADN genómico y ARN total de 66 muestras sanguíneas de voluntarios con epilepsia del Hospital Honorio Delgado Espinoza, y 80 muestras sanguíneas de voluntarios control.
3. Se midió la concentración de ADN genómico y ARN total extraído de muestras sanguíneas mediante la técnica de fluorometría; obteniendo resultados mínimos de 3 ng/ μ L hasta un máximo de 276 ng/ μ L para el ADN y valores desde 4 ng/ μ L hasta 83 ng/ μ L para el ARN, dichas concentraciones fueron óptimas para el análisis molecular de las muestras. Se midió la calidad de ADN genómico y ARN total extraído de muestras sanguíneas mediante la técnica de espectrofotometría; obteniendo para el caso del ADN un 90.8% (1.8-2) de muestras con calidad óptima y 9.2% con calidad aceptable (1.6-1.8) y para el ARN un 77.4% de muestras con calidad óptima (2-2.2) y un 22.6% con calidad aceptable (<1.7), además ninguna muestra presentó contaminación. Se determinó la integridad de ADN genómico y ARN total extraídos de muestras sanguíneas mediante la técnica de electroforesis en gel

de agarosa, obteniendo el 100 % de ADN y el 100% de ARN íntegros, respecto a su estructura molecular.

4. Se amplificó el gen MDR1 por PCR convencional, obteniendo amplicones de 208pb para la mutación C3435T, 226pb para la mutación G2677T y 222pb para la mutación G2677A.
5. Se identificaron las mutaciones C3435T y G2677T/A en tres grupos de estudio: farmacorrespondedores, farmacorresistentes y controles, empleando RFLP.
6. Se evaluó la expresión del gen MDR1 en tres grupos de estudio: farmacorrespondedores, farmacorresistentes y controles, por PCR en tiempo real.

RECOMENDACIONES

1. Se sugiere acompañar este tipo de estudios con el dosaje serológico del fármaco en estudio, con el fin de confirmar los resultados, en caso de existir una relación entre la presencia de una mutación y la sobreexpresión de un gen con la farmacorresistencia.
2. Se sugiere ampliar el estudio, evaluando otros Polimorfismos relacionados a dicha enfermedad, como el CYP 2C9, CYP 2C19 y CYP 3A4, los cuales se refieren al metabolismo de fármacos y pueden esclarecer el porqué de la farmacorresistencia.
3. Se recomienda evaluar la expresión genética de otros genes implicados en síndromes epilépticos específicos como los de canales iónicos neuronales del sodio, potasio, cloro y calcio: SCN1A, SCN1B, SCN2A, KCNQ2, KCNQ3, CLCN2 Y CACNA1H.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fisher RS, Boas W van E, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. abril de 2005;46(4):470-2.
2. Epilepsia [Internet]. World Health Organization. 2018 [citado 24 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
3. Facts about Seizures and Epilepsy [Internet]. Epilepsy Foundation. 2013 [citado 24 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.epilepsy.com/learn/about-epilepsy-basics/facts-about-seizures-and-epilepsy>
4. Goldenberg MM. Overview of Drugs Used for Epilepsy and Seizures. *P & T*. julio de 2010;35(7):392-415.
5. Rowland LP, Pedley TA, Merritt HH, editores. *Merritt's neurology*. 12th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. 1172 p.
6. Ministerio de Salud. Guía de Práctica Clínica de Epilepsia [Internet]. Lima-Perú: Ministerio de Salud; 2015 dic [citado 17 de septiembre de 2018] p. 37. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3392.pdf>
7. Phenytoin - DrugBank [Internet]. DrugBank. 2005 [citado 29 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00252>
8. Carbamazepine [Internet]. DrugBank. 2005 [citado 3 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00564>
9. Laxer KD, Trinkka E, Hirsch LJ, Cendes F, Langfitt J, Delanty N, et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy & Behavior*. agosto de 2014;37:59-70.

10. Kanner A. Common Errors Made in the Diagnosis and Treatment of Epilepsy. *Seminars in Neurology*. julio de 2008;28(03):364-78.
11. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies: Definition of Drug Resistant Epilepsy. *Epilepsia*. 3 de noviembre de 2009;51(6):1069-77.
12. Buzoianu AD, Sabin O, Bocşan CI, Militaru C. MDR1 GENE POLYMORPHISM AND REFRACTORY EPILEPSY. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology*. 2009;13(4):375-80.
13. Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews Neuroscience*. agosto de 2005;6(8):591-602.
14. Beck H. Plasticity of Antiepileptic Drug Targets. *Epilepsia*. marzo de 2007;48(s1):14-8.
15. Radhakrishnan K, Das A, Balan S, Banerjee M. Drug resistance in epilepsy and the ABCB1 gene: The clinical perspective. *Indian Journal of Human Genetics*. 2011;17(4):S12-21.
16. Brambila-Tapia AJL. MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications. *Revista de Investigación Clínica*. 2013;65(5):445-54.
17. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 de noviembre de 1987;84(21):7735-8.
18. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. mayo de 2009;1794(5):860-71.
19. Amin ML. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights*. enero de 2013;7:27-34.

20. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim R. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. enero de 2004;75(1):13-33.
21. Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Advanced Drug Delivery Reviews*. noviembre de 2002;54(10):1295-310.
22. Fung KL, Hunt R, Kimchi-Sarfaty C, Gottesman MM. Genetic Polymorphisms of P-glycoprotein: Echoes of Silence. En: *ABC transporters--40 years on*. Anthony M. George. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 105-34.
23. Lin JH, Yamazaki M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics: Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetics*. 2003;42(1):59-98.
24. Maleki M, Sayyah M, Kamgarpour F, Karimipoor M, Arab A, Rajabi A, et al. Association between ABCB1-T1236C Polymorphism and Drug- Resistant Epilepsy in Iranian Female Patients. *Iran Biomed J*. julio de 2010;14(3):89-96.
25. Sisodiya SM. Mechanisms of antiepileptic drug resistance: Current Opinion in Neurology. abril de 2003;16(2):197-201.
26. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clinical Pharmacokinetics*. julio de 2015;54(7):709-35.
27. Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) Gene Polymorphism and its Clinical Implications: *Clinical Pharmacokinetics*. 2004;43(9):553-76.
28. Hoffmeyer S, Burk O, Eichelbaum M, Brinkmann U, von Richter O, Arnold H, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug- resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *MEDICAL SCIENCES*. marzo de 2000;97(7):3473-8.

29. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability: Pharmacogenetics and Genomics. octubre de 2005;15(10):693-704.
30. Wielandt N AM, Vollrath R V, Chianale B J. Polimorfismos del gen de resistencia a múltiples drogas (MDR1) en poblaciones chilenas: mapuche, mestiza y maorí. Revista médica de Chile. septiembre de 2004;132(9):1061-8.
31. Águila DJF, Ramos DOC, Álvarez DIV. RESISTENCIA A DROGAS MEDIADA POR LA GLICOPROTEÍNA P. Rev Cubana Oncol. 1998;14(2):111-20.
32. Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. Neuropharmacology. diciembre de 2008;55(8):1364-75.
33. Löscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. Epilepsia. enero de 2009;50(1):1-23.
34. Hicks JK, McLeod HL. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. En: Genomic and Precision Medicine [Internet]. Elsevier; 2017 [citado 15 de julio de 2018]. p. 89-107. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128006856000047>
35. Adams JU. Pharmacogenomics and Personalized Medicine. Nature Education. 2008;1(1):194.
36. Dickmann LJ, Ware JA. Pharmacogenomics in the age of personalized medicine. Drug Discovery Today: Technologies. septiembre de 2016;21-22:11-6.
37. Schwab M, Schaeffeler E. Pharmacogenomics: a key component of personalized therapy. Genome Medicine. noviembre de 2012;4(11):93.
38. Mini E, Nobili S. Pharmacogenetics: implementing personalized medicine. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism. 2009;6(1):17-24.

39. Nebert DW. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clinical Genetics*. octubre de 1999;56(4):247-58.
40. Ishmael FT, Stellato C. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. octubre de 2008;101(4):437-43.
41. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, Souza PRE de, Carvalho A de AT, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. marzo de 2009;40(1):1-11.
42. Shafique S. *Polymerase Chain Reaction*. Lulu.com; 84 p.
43. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press; 2001. 1365 p.
44. Pelt-Verkuil E van, Belkum A van, Hays JP. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Science & Business Media; 2008. 330 p.
45. Buckingham L. *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. F.A. Davis; 2011. 577 p.
46. Solari AJ. *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. Ed. Médica Panamericana; 2004. 572 p.
47. Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative Real-Time PCR-Based Analysis of Gene Expression. En: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2011 [citado 24 de junio de 2018]. p. 99-109. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123851185000062>
48. Walker JM, Rapley R. *Molecular Biology and Biotechnology*. Royal Society of Chemistry; 2009. 626 p.
49. Gupta V, Sengupta M, Prakash J, Tripathy (auth.) BC. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology* [Internet]. 1.^a ed. Springer Singapore; 2017 [citado 16 de

- septiembre de 2018]. 543 p. Disponible en: <http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=549816f78a7c97dbe05a7a60ec662895>
50. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 de enero de 2006;19(1):165-256.
 51. Seifi M, Ghasemi A, Heidarzadeh S, Khosravi M, Namipashaki A, Soofiyan VM, et al. Overview of Real-Time PCR Principles. *Polymerase Chain Reaction*. :39.
 52. Yilmaz A, Onen HI, Alp E, Menevse S. Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. En: *Polymerase Chain Reaction*. Patricia Hernandez-Rodriguez. 2012. p. 229-54.
 53. Pfaffl MW. Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR. En: Bustin SA, editor. *A-Z of Quantitative PCR*. California, USA: International University Line; 2004. p. 87-112.
 54. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 1 de mayo de 2001;29(9):2002-7.
 55. Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols*. noviembre de 2007;2(11):2857-64.
 56. Pray LA. Restriction Enzymes _ Learn Science at Scitable.html. *Nature Education*. 2008;1(1):38.
 57. Sugathan S, Pradeep NS, Abdulhameed S. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology: Volume 2 : Exploring Potential Biomolecules*. Springer; 2017. 442 p.
 58. MboI (10 U/L) - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Thermo Fisher Scientific. 2018 [citado 20 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0811>

59. BshNI (BanI) (10 U/L) - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Thermo Fisher Scientific. 2018 [citado 26 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1001>
60. BseNI (BsrI) (10 U/L) - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Thermo Fisher Scientific. 2018 [citado 26 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0881>
61. Analytik-jena, editor. innuPREP Blood DNA Mini Kit [Internet]. Analytik-jena; 2017 [citado 25 de junio de 2018]. Disponible en: https://www.analytik-jena.de/fileadmin/content/pdf_life_science/Manual/Manual_innuPREP_Blood_DNA_Mini_Kit_en.pdf
62. Agarose Low Melting Point [Internet]. Cleaver Scientific. [citado 13 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.cleaverscientific.com/electrophoresis-products/agarose-low-melting-point/>
63. Seven M, Batar B, Unal S, Yesil G, Yuksel A, Guven M. The drug-transporter gene MDR1 C3435T and G2677T/A polymorphisms and the risk of multidrug-resistant epilepsy in Turkish children. *Molecular Biology Reports*. enero de 2014;41(1):331-6.
64. UltraPure Agarose - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Thermo Fisher Scientific. 2018 [citado 13 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500500>
65. Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder [Internet]. [citado 25 de junio de 2018]. Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012995_GeneRuler_100bp_DNALadder_50ug_UG.pdf
66. Analytik-jena. innuPREP Blood RNA Kit [Internet]. Analytik-jena; 2017 [citado 25 de junio de 2018]. Disponible en: https://www.analytik-jena.de/fileadmin/content/pdf_life_science/Manual/Manual_innuPREP_Blood_RNA_Kit.pdf

67. Applied Biological Materials. EasyScript RT and cDNA kit [Internet]. Disponible en: <https://www.abmgood.com/cDNA-Synthesis-Kit-G234.html>
68. Gao B, Yang F-M, Yu Z-T, Li R, Xie F, Chen J, et al. Relationship between the expression of MDR1 in hepatocellular cancer and its biological behaviors. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):6995-7001.
69. Banco Nacional de ADN Carlos III. Control de Calidad | Banco Nacional de ADN [Internet]. Banco Nacional de ADN Carlos III; [citado 2 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.bancoadn.org/control-de-calidad.html>
70. Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. National Center for Biotechnology Information [Internet]. National Center for Biotechnology Information. [citado 28 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
71. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* julio de 2003;31(12):3688-91.
72. RestrictionMapper version 3 [Internet]. RestrictionMapper version 3. 2003 [citado 28 de agosto de 2018]. Disponible en: <http://www.restrictionmapper.org/>
73. Silver L. Allele Frequency. En: *Encyclopedia of Genetics* [Internet]. Elsevier; 2001 [citado 22 de septiembre de 2018]. p. 37. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122270800000276>
74. Manna I, Gambardella A, Labate A, Mumoli L, Ferlazzo E, Pucci F, et al. Polymorphism of the multidrug resistance 1 gene MDR1/ABCB1 C3435T and response to antiepileptic drug treatment in temporal lobe epilepsy. *Seizure.* enero de 2015;24:124-6.
75. Shaheen U, Prasad DKV, Sharma V, Suryaprabha T, Ahuja YR, Jyothy A, et al. Significance of MDR1 gene polymorphism C3435T in predicting drug response in epilepsy. *Epilepsy Research.* febrero de 2014;108(2):251-6.

76. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, et al. Association of Multidrug Resistance in Epilepsy with a Polymorphism in the Drug-Transporter Gene *ABCB1*. *New England Journal of Medicine*. 10 de abril de 2003;348(15):1442-8.
77. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2002;25(11):1391-400.
78. Sills GJ, Mohanraj R, Butler E, McCrindle S, Collier L, Wilson EA, et al. Lack of Association between the C3435T Polymorphism in the Human Multidrug Resistance (MDR1) Gene and Response to Antiepileptic Drug Treatment. *Epilepsia*. 2005;46(5):643-7.
79. Kim YO, Kim MK, Woo YJ, Lee MC, Kim JH, Park KW, et al. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance 1 gene in Korean epileptics. *Seizure*. enero de 2006;15(1):67-72.
80. Lakhan R, Misra UK, Kalita J, Pradhan S, Gogtay NJ, Singh MK, et al. No association of *ABCB1* polymorphisms with drug-refractory epilepsy in a north Indian population. *Epilepsy & Behavior*. enero de 2009;14(1):78-82.
81. Slater RJ. Agarose Gel Electrophoresis of RNA. En: Slater RJ, editor. *Experiments in Molecular Biology* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 1986 [citado 2 de septiembre de 2018]. p. 121-9. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-405-0_13
82. Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, Barbaro N, Annett GM, Raffel C. MDR1 Gene Expression in Brain of Patients with Medically Intractable Epilepsy. *Epilepsia*. enero de 1995;36(1):1-6.
83. Lazarowski A, Sevlever G, Taratuto A, Massaro M, Rabinowicz A. Tuberculous sclerosis associated with MDR1 gene expression and drug-resistant epilepsy. *Pediatric Neurology*. octubre de 1999;21(4):731-4.

ANEXOS

ANEXO 1. Resultados de extracción de ADN y detección de mutaciones C3435T y G2677T/A

Tabla 15. Medidas de absorbancia del ADN a 260nm y 280nm y relación de pureza (260/280). A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.

Muestra	Abs 260nm	Abs 280nm	260/280	Muestra	Abs 260 nm	Abs 280 nm	260/280
E002-A	2.155	1.070	2.014	C001-A	2.055	1.100	1.869
E002-B	1.648	0.879	1.875	C001-B	0.960	0.443	2.169
E003-A	1.156	0.514	2.249	C002-A	1.439	0.754	1.908
E003-B	3.144	1.768	1.778	C002-B	2.208	1.014	2.177
E004-A	0.772	0.405	1.906	C003-A	1.085	0.519	2.092
E004-B	1.325	0.724	1.830	C003-B	1.919	1.038	1.849
E005-A	2.462	1.203	2.047	C004-A	2.230	1.118	1.995
E005-B	1.472	0.793	1.856	C004-B	1.514	0.714	2.121
E007-A	1.239	0.629	1.970	C005-A	3.005	1.387	2.166
E007-B	2.037	1.034	1.970	C005-B	2.890	1.444	2.002
E008-A	1.845	0.834	2.212	C006-A	1.498	0.838	1.788
E008-B	2.034	1.004	2.026	C006-B	2.258	1.064	2.123
E009-A	0.839	0.392	2.140	C007-A	2.930	1.514	1.935
E009-B	0.927	0.492	1.884	C007-B	1.971	1.102	1.789
E010-A	1.938	1.003	1.932	C008-A	1.165	0.548	2.127
E010-B	1.592	0.739	2.154	C008-B	0.850	0.420	2.026
E011-A	1.479	0.779	1.899	C009-A	2.618	1.438	1.820
E011-B	1.982	1.037	1.911	C009-B	1.818	1.013	1.795
E012-A	1.475	0.723	2.040	C010-A	1.204	0.628	1.918
E012-B	1.893	0.992	1.908	C010-B	1.835	0.906	2.026
E013-A	1.938	0.923	2.100	C011-A	2.893	1.552	1.864
E013-B	2.940	1.635	1.798	C011-B	2.465	1.259	1.958
E015-A	0.833	0.434	1.919	C012-A	1.843	1.020	1.807
E015-B	1.323	0.718	1.843	C012-B	3.348	1.840	1.820
E016-A	1.365	0.713	1.914	C013-A	3.237	1.637	1.978
E016-B	1.452	0.721	2.014	C013-B	2.640	1.238	2.132
E017-A	1.345	0.693	1.941	C014-A	2.014	0.990	2.034
E017-B	2.943	1.421	2.071	C014-B	1.770	0.972	1.821
E019-A	0.935	0.423	2.210	C015-A	1.837	0.878	2.092
E019-B	1.454	0.752	1.934	C015-B	2.334	1.194	1.955

E022-A	1.953	1.064	1.835	C016-A	1.069	0.521	2.053
E022-B	2.848	1.605	1.774	C016-B	2.683	1.501	1.787
E023-A	1.382	0.795	1.738	C017-A	3.246	1.525	2.129
E023-B	1.824	0.877	2.081	C017-B	0.962	0.491	1.958
E024-A	0.821	0.385	2.135	C018-A	0.871	0.446	1.952
E024-B	1.342	0.766	1.751	C018-B	2.600	1.302	1.997
E025-A	1.443	0.841	1.715	C019-A	1.745	0.882	1.979
E025-B	0.923	0.443	2.083	C019-B	1.698	0.783	2.169
E026-A	1.437	0.814	1.765	C020-B	1.261	0.638	1.975
E026-B	2.741	1.425	1.924	C020-B	2.944	1.453	2.026
E028-A	1.384	0.775	1.785	C021-A	2.542	1.216	2.091
E028-B	3.121	1.572	1.985	C021-B	3.158	1.540	2.050
E029-A	1.683	0.737	2.283	C022-A	1.461	0.703	2.079
E029-B	1.678	0.779	2.154	C022-B	1.651	0.815	2.026
E030-A	2.509	1.102	2.276	C023-A	1.865	0.898	2.076
E030-B	2.422	1.238	1.957	C023-B	1.782	0.974	1.829
E031-A	0.816	0.378	2.156	C024-A	2.631	1.324	1.987
E031-B	3.016	1.586	1.902	C024-B	1.975	0.905	2.182
E032-A	2.983	1.519	1.964	C025-A	0.903	0.431	2.097
E032-B	1.995	1.094	1.824	C025-B	2.306	1.292	1.785
E033-A	1.841	1.010	1.822	C026-A	2.512	1.376	1.825
E033-B	0.830	0.373	2.228	C026-B	0.837	0.386	2.168
E034-A	1.351	0.690	1.959	C027-A	3.389	1.881	1.802
E034-B	2.614	1.152	2.269	C027-B	1.075	0.522	2.061
E035-A	0.979	0.491	1.992	C028-A	1.744	0.804	2.169
E035-B	3.013	1.399	2.154	C028-B	2.950	1.494	1.974
E036-A	1.921	0.903	2.127	C029-A	2.514	1.229	2.046
E036-B	2.796	1.342	2.084	C029-B	1.235	0.644	1.917
E037-A	2.987	1.341	2.228	C030-A	0.803	0.415	1.935
E037-B	1.506	0.727	2.071	C030-B	1.745	0.875	1.994
E039-A	1.466	0.647	2.265	C031-A	2.370	1.142	2.076
E039-B	1.173	0.594	1.974	C031-B	2.806	1.304	2.152
E040-A	3.380	1.915	1.765	C032-A	2.366	1.129	2.095
E040-B	2.325	1.053	2.207	C032-B	2.059	0.995	2.069
E041-A	1.280	0.739	1.733	C033-A	2.081	1.058	1.966
E041-B	3.417	1.630	2.096	C033-B	1.459	0.782	1.865
E042-A	3.486	1.854	1.880	C034-A	2.483	1.181	2.102
E042-B	2.993	1.488	2.011	C034-B	1.229	0.586	2.097
E043-A	1.833	0.825	2.221	C035-A	2.572	1.237	2.080
E043-B	2.081	0.982	2.120	C035-B	3.192	1.624	1.966
E045-A	2.905	1.549	1.875	C036-A	2.621	1.359	1.928
E045-B	1.825	1.011	1.805	C036-B	1.713	0.806	2.124
E046-A	0.932	0.498	1.871	C037-A	2.652	1.399	1.896
E046-B	1.848	0.929	1.989	C037-B	1.173	0.642	1.827

E047-A	2.512	1.386	1.812	C038-A	1.410	0.670	2.104
E047-B	1.192	0.601	1.982	C038-B	1.330	0.726	1.833
E050-A	3.446	1.875	1.838	C039-A	3.363	1.812	1.856
E050-B	1.893	1.061	1.784	C039-B	1.795	0.852	2.108
E052-A	1.491	0.792	1.882	C040-A	2.588	1.272	2.035
E052-B	1.876	1.062	1.766	C040-B	3.016	1.601	1.884
E053-A	0.993	0.575	1.728	C041-A	3.478	1.649	2.109
E053-B	1.930	0.966	1.997	C041-B	1.062	0.536	1.982
E054-A	1.809	0.997	1.815	C042-A	1.832	0.884	2.072
E054-B	1.311	0.717	1.829	C042-B	3.062	1.548	1.978
E055-A	3.049	1.586	1.922	C043-A	2.618	1.196	2.189
E055-B	2.652	1.333	1.990	C043-B	3.226	1.648	1.958
E056-A	2.069	1.128	1.835	C044-A	3.424	1.676	2.043
E056-B	2.443	1.301	1.878	C044-B	0.878	0.450	1.950
E057-A	1.251	0.633	1.976	C045-A	1.119	0.562	1.990
E057-B	2.547	1.476	1.726	C045-B	2.065	0.992	2.082
E058-A	2.119	1.138	1.862	C046-A	2.117	1.069	1.981
E058-B	1.112	0.559	1.988	C046-B	0.848	0.435	1.950
E059-A	2.800	1.618	1.730	C047-A	0.950	0.455	2.086
E059-B	1.185	0.683	1.736	C047-B	2.433	1.224	1.987
E060-A	0.907	0.482	1.880	C048-A	2.296	1.082	2.122
E060-B	1.283	0.684	1.875	C048-B	2.796	1.290	2.168
E061-A	2.208	1.187	1.860	C049-A	0.853	0.397	2.147
E061-B	1.438	0.801	1.796	C049-B	3.380	1.702	1.986
E062-A	2.716	1.556	1.745	C050-A	2.313	1.068	2.166
E062-B	2.436	1.279	1.905	C050-B	2.729	1.341	2.035
E064-A	2.491	1.306	1.908	C051-A	3.444	1.591	2.164
E064-B	2.117	1.062	1.993	C051-B	1.124	0.534	2.103
E067-A	1.898	1.110	1.710	C052-A	1.770	0.826	2.143
E067-B	3.206	1.760	1.822	C052-B	2.712	1.304	2.080
E068-A	2.712	1.530	1.773	C053-A	2.208	1.125	1.962
E068-B	3.042	1.547	1.966	C053-B	1.120	0.616	1.819
E069-A	2.620	1.407	1.862	C054-A	1.631	0.889	1.835
E069-B	3.447	1.755	1.964	C054-B	2.655	1.260	2.107
E070-A	2.751	1.458	1.887	C055-A	3.177	1.447	2.196
E070-B	2.529	1.253	2.019	C055-B	1.918	0.959	2.001
E071-A	2.208	1.174	1.880	C056-A	3.279	1.686	1.945
E071-B	1.668	0.834	2.000	C056-B	0.973	0.444	2.192
E072-A	2.600	1.396	1.863	C057-A	1.385	0.678	2.043
E072-B	3.015	1.644	1.834	C057-B	2.669	1.443	1.849
E073-A	2.893	1.580	1.831	C058-A	2.326	1.129	2.060
E073-B	2.135	1.169	1.827	C058-B	1.977	0.979	2.019
E074-A	3.335	1.670	1.997	C059-A	3.135	1.636	1.916
E074-B	2.205	1.060	2.080	C059-B	1.516	0.734	2.064

E075-A	1.665	0.852	1.955	C060-A	2.174	1.182	1.839
E075-B	1.935	0.928	2.085	C060-B	2.212	1.208	1.831
E077-A	0.908	0.444	2.045	C061-A	3.275	1.715	1.910
E077-B	1.983	0.951	2.085	C061-B	3.232	1.555	2.079
E078-A	3.090	1.481	2.087	C062-A	3.287	1.679	1.958
E078-B	2.971	1.416	2.098	C062-B	2.355	1.252	1.881
E080-A	0.867	0.434	2.000	C063-A	1.024	0.481	2.127
E080-B	2.010	1.078	1.865	C063-B	3.309	1.758	1.882
E081-A	2.309	1.248	1.850	C064-A	2.757	1.327	2.078
E081-B	0.875	0.431	2.032	C064-B	1.660	0.772	2.151
E082-A	2.777	1.400	1.983	C065-A	3.467	1.873	1.851
E082-B	3.462	1.763	1.964	C065-B	2.602	1.427	1.824
E083-A	2.846	1.478	1.925	C066-A	3.074	1.541	1.995
E083-B	3.146	1.599	1.968	C066-B	3.153	1.500	2.102
				C067-A	2.547	1.408	1.809
				C067-B	1.580	0.809	1.954
				C068-A	3.071	1.535	2.001
				C068-B	1.581	0.844	1.874
				C069-A	1.514	0.832	1.820
				C069-B	2.998	1.526	1.965
				C070-A	2.437	1.226	1.988
				C070-B	2.383	1.266	1.882
				C071-A	2.292	1.090	2.102
				C071-B	0.854	0.392	2.176
				C072-A	3.043	1.396	2.180
				C072-B	3.038	1.440	2.109
				C073-A	2.489	1.292	1.926
				C073-B	3.496	1.847	1.893
				C074-A	3.119	1.671	1.866
				C074-B	2.630	1.419	1.854
				C075-A	2.337	1.257	1.859
				C075-B	1.529	0.851	1.796
				C076-A	2.700	1.362	1.983
				C076-B	1.502	0.716	2.097
				C077-A	1.578	0.767	2.057
				C077-B	0.892	0.472	1.889
				C078-A	1.969	0.896	2.197
				C078-B	1.471	0.687	2.140
				C079-A	1.464	0.803	1.823
				C079-B	1.959	0.990	1.979
				C080-A	2.444	1.268	1.928
				C080-B	2.398	1.333	1.799

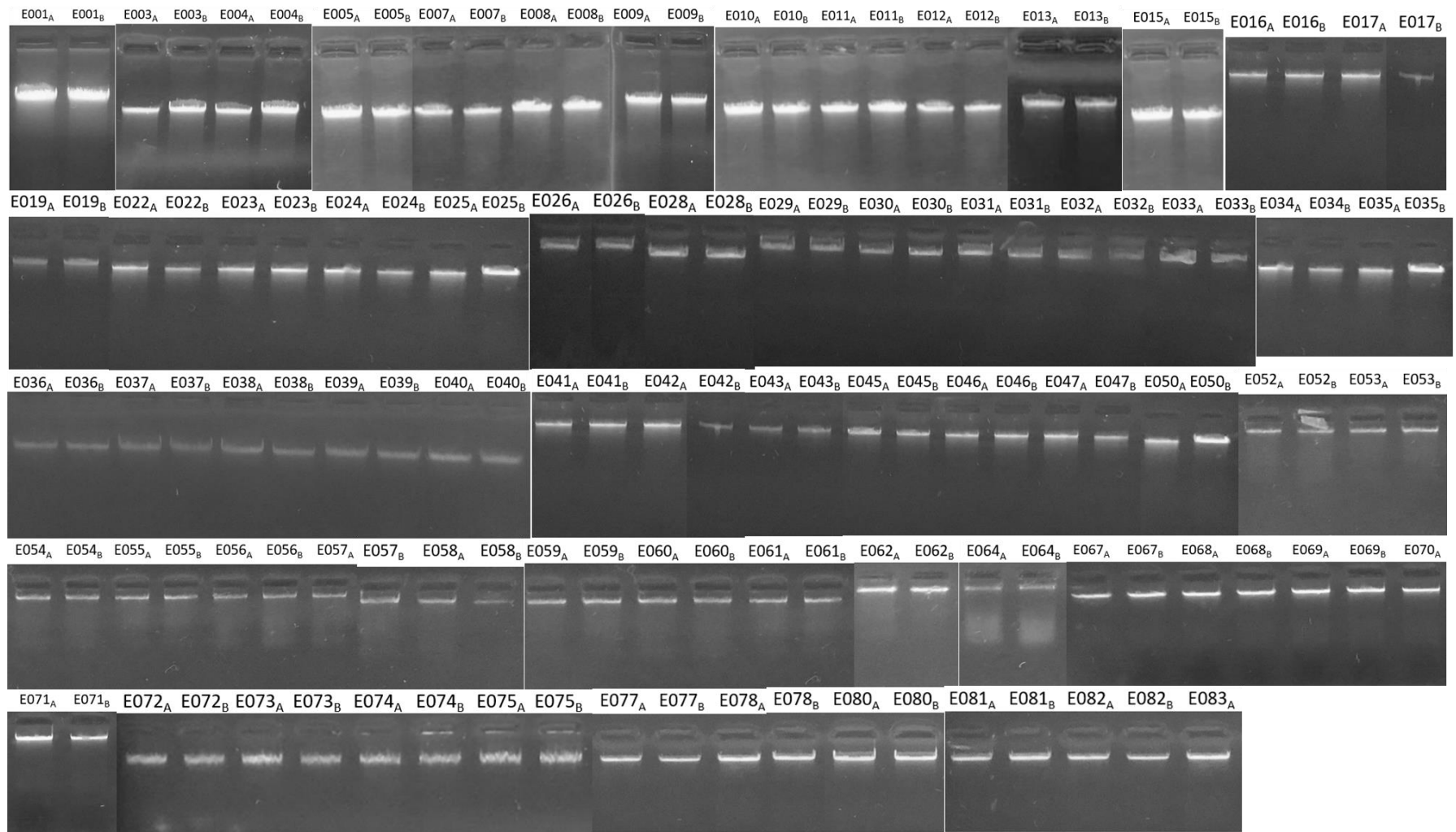


Figura 28. Corrida electroforética de extracción de ADN de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 100 V/30 min

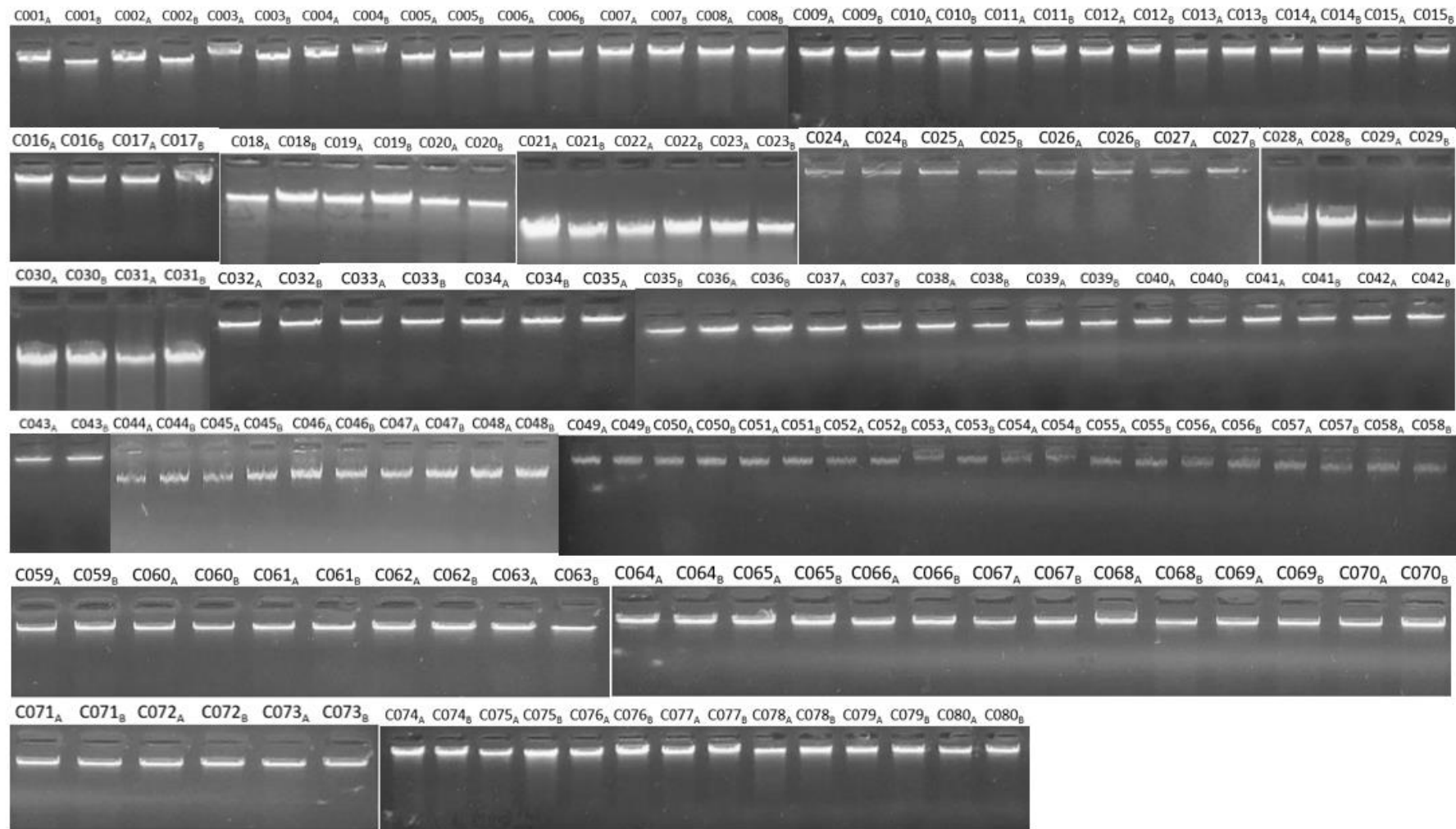


Figura 29. Corrida electroforética de extracción de ADN de voluntarios control. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 100 V/30 min

Tabla 16. Concentraciones de ADN medidas por fluorometría. A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.

Muestra	Concentración ADN Qubit (ng/mL)	Concentración ADN (ng/μL)	Muestra	Concentración ADN Qubit (ng/mL)	Concentración ADN (ng/μL)
E002-A	71.4	14.28	C001-A	1,000.0	200.00
E002-B	88.7	17.74	C001-B	365.0	73.00
E003-A	64.9	12.98	C002-A	180.4	36.08
E003-B	147.0	29.40	C002-B	168.0	33.60
E004-A	94.0	18.80	C003-A	169.8	33.96
E004-B	129.0	25.80	C003-B	78.8	15.76
E005-A	135.0	27.00	C004-A	183.4	36.68
E005-B	125.0	25.00	C004-B	176.0	35.20
E007-A	87.8	17.56	C005-A	164.0	32.80
E007-B	75.0	15.00	C005-B	192.0	38.40
E008-A	117.0	23.40	C006-A	234.0	46.80
E008-B	116.0	23.20	C006-B	86.8	17.36
E009-A	102.0	20.40	C007-A	152.0	30.40
E009-B	83.3	16.66	C007-B	197.0	39.40
E010-A	100.0	20.00	C008-A	101.0	20.20
E010-B	140.0	28.00	C008-B	137.0	27.40
E011-A	102.0	20.40	C009-A	55.4	11.08
E011-B	92.9	18.58	C009-B	75.2	15.04
E012-A	90.4	18.08	C010-A	198.0	39.60
E012-B	85.5	17.10	C010-B	600.0	120.00
E013-A	104.0	20.80	C011-A	164.0	32.80
E013-B	107.0	21.40	C011-B	126.0	25.20
E015-A	201.0	40.20	C012-A	175.0	35.00
E015-B	49.6	9.92	C012-B	161.0	32.20
E016-A	140.0	28.00	C013-A	132.0	26.40
E016-B	127.0	25.40	C013-B	159.0	31.80
E017-A	110.0	22.00	C014-A	169.0	33.80
E017-B	134.0	26.80	C014-B	142.0	28.40
E019-A	156.0	31.20	C015-A	600.0	120.00
E019-B	200.0	40.00	C015-B	214.0	42.80
E022-A	61.9	12.38	C016-A	411.0	82.20
E022-B	52.3	10.46	C016-B	215.0	43.00
E023-A	69.3	13.86	C017-A	16.8	3.36
E023-B	71.0	14.20	C017-B	57.9	11.58
E024-A	159.0	31.80	C018-A	20.9	4.18
E024-B	77.0	15.40	C018-B	170.0	34.00
E025-A	193.0	38.60	C019-A	23.1	4.62
E025-B	102.0	20.40	C019-B	34.5	6.90
E026-A	215.0	43.00	C020-A	36.8	7.36

E026-B	147.0	29.40	C020-B	18.6	3.72
E028-A	286.0	57.20	C021-A	28.3	5.66
E028-B	193.0	38.60	C021-B	259.0	51.80
E029-A	195.0	39.00	C022-A	21.4	4.28
E029-B	182.0	36.40	C022-B	19.5	3.90
E030-A	175.0	35.00	C023-A	166.0	33.20
E030-B	245.0	49.00	C023-B	110.0	22.00
E031-A	152.0	30.40	C024-A	111.0	22.20
E031-B	197.0	39.40	C024-B	250.0	50.00
E032-A	146.0	29.20	C025-A	117.0	23.40
E032-B	214.0	42.80	C025-B	111.0	22.20
E033-A	288.0	57.60	C026-A	56.4	11.28
E033-B	200.0	40.00	C026-B	105.0	21.00
E034-A	310.0	62.00	C027-A	202.0	40.40
E034-B	84.4	16.88	C027-B	600.0	120.00
E035-A	650.0	130.00	C028-A	33.8	6.76
E035-B	291.0	58.20	C028-B	27.7	5.54
E036-A	280.0	56.00	C029-A	208.0	41.60
E036-B	664.0	132.80	C029-B	600.0	120.00
E037-A	1280.0	256.00	C030-A	106.0	21.20
E037-B	267.0	53.40	C030-B	191.0	38.20
E039-A	128.0	25.60	C031-A	600.0	120.00
E039-B	131.0	26.20	C031-B	600.0	120.00
E040-A	91.8	18.36	C032-A	497.0	99.40
E040-B	107.0	21.40	C032-B	260.0	52.00
E041-A	1380.0	276.00	C033-A	115.0	23.00
E041-B	243.0	48.60	C033-B	600.0	120.00
E042-A	250.0	50.00	C034-A	150.0	30.00
E042-B	383.0	76.60	C034-B	109.0	21.80
E043-A	54.2	10.84	C035-A	95.0	19.00
E043-B	48.0	9.60	C035-B	84.7	16.94
E045-A	63.2	12.64	C036-A	278.0	55.60
E045-B	73.1	14.62	C036-B	168.0	33.60
E046-A	155.0	31.00	C037-A	111.0	22.20
E046-B	174.0	34.80	C037-B	189.0	37.80
E047-A	80.4	16.08	C038-A	94.4	18.88
E047-B	93.2	18.64	C038-B	161.0	32.20
E050-A	106.0	21.20	C039-A	142.0	28.40
E050-B	123.0	24.60	C039-B	151.0	30.20
E052-A	600.0	120.00	C040-A	71.3	14.26
E052-B	31.5	6.30	C040-B	112.0	22.40
E053-A	140.0	28.00	C041-A	62.9	12.58
E053-B	96.8	19.36	C041-B	87.3	17.46
E054-A	600.0	120.00	C042-A	91.5	18.30

E054-B	530.0	106.00	C042-B	47.3	9.46
E055-A	95.6	19.12	C043-A	140.0	28.00
E055-B	108.0	21.60	C043-B	137.0	27.40
E056-A	600.0	120.00	C044-A	90.0	18.00
E056-B	132.0	26.40	C044-B	107.0	21.40
E057-A	167.0	33.40	C045-A	105.0	21.00
E057-B	196.0	39.20	C045-B	125.0	25.00
E058-A	134.0	26.80	C046-A	123.0	24.60
E058-B	139.0	27.80	C046-B	131.0	26.20
E059-A	145.0	29.00	C047-A	111.0	22.20
E059-B	100.0	20.00	C047-B	153.0	30.60
E060-A	125.0	25.00	C048-A	140.0	28.00
E060-B	173.0	34.60	C048-B	156.0	31.20
E061-A	121.0	24.20	C049-A	121.0	24.20
E061-B	87.4	17.48	C049-B	135.0	27.00
E062-A	120.0	24.00	C050-A	282.0	56.40
E062-B	23.2	4.64	C050-B	79.9	15.98
E064-A	136.0	27.20	C051-A	114.0	22.80
E064-B	194.0	38.80	C051-B	105.0	21.00
E067-A	92.4	18.48	C052-A	600.0	120.00
E067-B	96.6	19.32	C052-B	203.0	40.60
E068-A	105.0	21.00	C053-A	570.0	114.00
E068-B	197.0	39.40	C053-B	286.0	57.20
E069-A	127.0	25.40	C054-A	133.0	26.60
E069-B	152.0	30.40	C054-B	59.1	11.82
E070-A	71.0	14.20	C055-A	123.0	24.60
E070-B	600.0	120.00	C055-B	600.0	120.00
E071-A	158.0	31.60	C056-A	570.0	114.00
E071-B	151.0	30.20	C056-B	175.0	35.00
E072-A	600.0	120.00	C057-A	165.0	33.00
E072-B	570.0	114.00	C057-B	76.6	15.32
E073-A	79.8	15.96	C058-A	119.0	23.80
E073-B	68.5	13.70	C058-B	61.7	12.34
E074-A	31.8	6.36	C059-A	155.0	31.00
E074-B	54.0	10.80	C059-B	171.0	34.20
E075-A	600.0	120.00	C060-A	87.2	17.44
E075-B	86.4	17.28	C060-B	119.0	23.80
E077-A	79.0	15.80	C061-A	70.1	14.02
E077-B	41.9	8.38	C061-B	196.0	39.20
E078-A	86.8	17.36	C062-A	151.0	30.20
E078-B	76.1	15.22	C062-B	190.0	38.00
E080-A	89.3	17.86	C063-A	296.0	59.20
E080-B	288.0	57.60	C063-B	155.0	31.00
E081-A	101.0	20.20	C064-A	150.0	30.00

E081-B	116.0	23.20	C064-B	600.0	120.00
E082-A	93.3	18.66	C065-A	300.0	60.00
E082-B	113.0	22.60	C065-B	388.0	77.60
E083-A	118.0	23.60	C066-A	105.0	21.00
E083-B	94.6	18.92	C066-B	104.0	20.80
			C067-A	164.0	32.80
			C067-B	84.0	16.80
			C068-A	151.0	30.20
			C068-B	40.1	8.02
			C069-A	274.0	54.80
			C069-B	187.0	37.40
			C070-A	185.0	37.00
			C070-B	308.0	61.60
			C071-A	67.9	13.58
			C071-B	123.0	24.60
			C072-A	118.0	23.60
			C072-B	83.3	16.66
			C073-A	153.0	30.60
			C073-B	139.0	27.80
			C074-A	77.8	15.56
			C074-B	467.0	93.40
			C075-A	600.0	120.00
			C075-B	47.4	9.48
			C076-A	66.1	13.22
			C076-B	70.5	14.10
			C077-A	63.2	12.64
			C077-B	100.0	20.00
			C078-A	445.0	89.00
			C078-B	107.0	21.40
			C079-A	600.0	120.00
			C079-B	600.0	120.00
			C080-A	600.0	120.00
			C080-B	600.0	120.00

Tabla 17. Presencia y genotipos de las mutaciones C3435T y G2677T/A en voluntarios con epilepsia farmacorrespondedores (GRUPO A).

Muestra	Mutación			
	C3435T		G2677T/A	
	Genotipo	Presencia	Genotipo	Presencia
E003	CT	SI	GT	SI
E004	CC	NO	GG	NO
E005	CC	NO	GG	NO
E009	TT	SI	TT	SI
E010	CT	SI	GT	SI
E011	CT	SI	GT	SI
E012	CC	NO	GG	NO
E013	CC	NO	GG	NO
E015	CC	NO	GG	NO
E017	CT	SI	GT	SI
E024	CT	SI	GT	SI
E025	CT	SI	GT	SI
E026	TT	SI	TT	SI
E028	CT	SI	GT	SI
E029	CC	NO	GG	NO
E031	CC	NO	GG	NO
E032	CC	NO	GG	NO
E033	CT	SI	GT	SI
E034	CT	SI	GT	SI
E036	CT	SI	GT	SI
E037	CC	NO	AA	SI
E043	CC	NO	AA	SI
E045	CC	NO	AA	SI
E046	CC	NO	GG	NO
E047	CC	NO	GA	SI
E050	CC	NO	GG	NO
E053	CC	NO	GG	NO
E054	CT	SI	GT	SI
E056	CT	SI	GA	SI
E057	CC	NO	GA	SI
E058	CT	SI	GT	SI
E059	CT	SI	GT	SI
E062	CC	NO	GG	NO
E064	CC	NO	GT	SI
E067	CT	SI	GT	SI
E068	CC	NO	GG	NO
E069	CC	NO	GG	NO
E070	CT	SI	GT	SI
E071	CT	SI	GG	NO

E075	CC	NO	GA	SI
E077	CC	NO	GG	NO
E080	CT	SI	GT	SI
E083	TT	SI	GT	SI



Tabla 18. Presencia y genotipos de las mutaciones C3435T y G2677T/A en voluntarios con epilepsia farmacorresistentes (GRUPO B).

Muestra	Mutación			
	C3435T		G2677T/A	
	Genotipo	Presencia	Genotipo	Presencia
E002	CC	NO	GG	NO
E007	CC	NO	GG	NO
E008	TT	SI	TT	SI
E016	CC	NO	GA	SI
E019	CC	NO	AA	SI
E022	CC	NO	GG	NO
E023	CT	SI	GT	SI
E030	CC	NO	GG	NO
E035	CC	NO	GG	NO
E039	CT	SI	GT	SI
E040	CT	SI	GT	SI
E041	TT	SI	GT	SI
E042	CT	SI	GT	SI
E052	CC	NO	GG	NO
E055	CT	SI	GT	SI
E060	CT	SI	GT	SI
E061	CC	NO	GA	SI
E072	CT	SI	GT	SI
E073	CT	SI	GT	SI
E074	CC	NO	GG	NO
E078	CT	SI	GT	SI
E081	CT	SI	GT	SI
E082	CC	NO	GG	NO

Tabla 19. Presencia y genotipos de las mutaciones C3435T y G2677T/A en voluntarios control (GRUPO C).

Muestra	Mutación			
	C3435T		G2677T/A	
	Genotipo	Presencia	Genotipo	Presencia
C001	TT	SI	TT	SI
C002	CT	SI	GT	SI
C003	CC	NO	GA	SI
C004	CT	SI	GT	SI
C005	TT	SI	TT	SI
C006	CT	SI	GT	SI
C007	CT	SI	AT	SI
C008	CC	NO	GA	SI
C009	TT	SI	GT	SI
C010	CC	NO	GG	NO
C011	CT	SI	AT	SI
C012	CT	SI	GT	SI
C013	CC	NO	GG	NO
C014	CC	NO	GA	SI
C015	CC	NO	GG	NO
C016	CC	NO	GG	NO
C017	CT	SI	GA	SI
C018	CC	NO	GA	SI
C019	CC	NO	GG	NO
C020	CT	SI	GT	SI
C021	CC	NO	GG	NO
C022	TT	SI	GT	SI
C023	CT	SI	GG	NO
C024	CT	SI	GG	NO
C025	TT	SI	GG	NO
C026	TT	SI	TT	SI
C027	CT	SI	GT	SI
C028	TT	SI	TT	SI
C029	CT	SI	GT	SI
C030	CC	NO	GG	NO
C031	CT	SI	GT	SI
C032	CT	SI	GT	SI
C033	CC	NO	GG	NO
C034	CC	NO	GG	NO
C035	TT	SI	GT	SI
C036	CT	SI	GG	NO
C037	CT	SI	GT	SI
C038	CT	SI	GT	SI
C039	CT	SI	GT	SI

C040	CC	NO	GG	NO
C041	CT	SI	GT	SI
C042	CT	SI	GT	SI
C043	CT	SI	AT	SI
C044	CC	NO	GG	NO
C045	CC	NO	GG	NO
C046	CC	NO	GG	NO
C047	CC	NO	GG	NO
C048	CT	SI	GT	SI
C049	TT	SI	TT	SI
C050	CC	NO	GG	NO
C051	CT	SI	GT	SI
C052	CT	SI	GG	NO
C053	CC	NO	GA	SI
C054	CC	NO	GG	NO
C055	CT	SI	GG	NO
C056	CC	NO	GG	NO
C057	CT	SI	GT	SI
C058	CT	SI	GT	SI
C059	CC	NO	GG	NO
C060	CC	NO	GG	NO
C061	CC	NO	GA	SI
C062	CT	SI	GT	SI
C063	CT	SI	AT	SI
C064	CT	SI	GT	SI
C065	CC	NO	GG	NO
C066	CT	SI	GT	SI
C067	CT	SI	AT	NO
C068	CC	NO	GG	NO
C069	TT	SI	GT	SI
C070	CC	NO	GA	SI
C071	CC	NO	GA	SI
C072	CT	SI	GT	SI
C073	CT	SI	GT	SI
C074	CC	NO	GG	NO
C075	CT	SI	AT	SI
C076	CT	SI	GG	NO
C077	CT	SI	GT	SI
C078	CC	NO	GG	NO
C079	TT	SI	GT	SI
C080	TT	SI	TT	SI

ANEXO 2. Resultados de extracción de ARN y evaluación de la expresión relativa del gen MDR1.

Tabla 20. Medidas de absorbancia del ARN a 230nm, 260nm y 280nm y relación de pureza (260/280 y 260/230). A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.

Muestra	Abs 230nm	Abs 260nm	Abs 280nm	260/280	260/230	Muestra	Abs 230nm	Abs 260nm	Abs 280nm	260/280	260/230
E002-A	0.498	0.847	0.425	1.993	1.700	C001-A	0.867	1.539	0.779	1.975	1.775
E002-B	1.244	2.017	0.977	2.065	1.621	C001-B	0.563	0.858	0.395	2.174	1.524
E003-A	0.667	1.324	0.610	2.171	1.984	C002-A	1.020	1.662	0.831	2.000	1.630
E003-B	0.947	1.796	0.852	2.109	1.896	C002-B	0.365	0.649	0.304	2.132	1.777
E004-A	0.458	0.793	0.384	2.066	1.730	C003-A	0.698	1.092	0.523	2.089	1.565
E004-B	0.441	0.713	0.353	2.017	1.615	C003-B	1.078	1.804	0.828	2.179	1.673
E005-A	0.814	1.407	0.654	2.152	1.729	C004-A	0.361	0.764	0.391	1.954	2.114
E005-B	0.451	0.785	0.387	2.027	1.739	C004-B	0.893	1.536	0.735	2.091	1.720
E007-A	0.917	1.726	0.791	2.182	1.882	C005-A	0.888	1.824	0.887	2.056	2.053
E007-B	0.552	0.985	0.482	2.043	1.785	C005-B	0.739	1.161	0.582	1.996	1.570
E008-A	0.520	0.914	0.464	1.969	1.757	C006-A	1.195	2.542	1.249	2.035	2.127
E008-B	1.461	2.593	1.337	1.940	1.775	C006-B	1.165	2.435	1.246	1.955	2.091
E009-A	0.920	1.636	0.745	2.197	1.778	C007-A	0.710	1.146	0.529	2.165	1.614
E009-B	1.679	2.593	1.206	2.150	1.544	C007-B	1.063	1.850	0.941	1.965	1.741
E010-A	1.127	2.243	1.147	1.956	1.991	C008-A	1.593	2.472	1.176	2.102	1.552
E010-B	0.435	0.854	0.427	2.001	1.961	C008-B	0.867	1.584	0.769	2.059	1.826
E011-A	0.579	0.876	0.420	2.087	1.513	C009-A	0.400	0.838	0.423	1.981	2.097
E011-B	0.617	1.101	0.506	2.176	1.785	C009-B	0.338	0.546	0.267	2.046	1.614
E012-A	0.883	1.601	0.745	2.149	1.814	C010-A	1.257	2.183	1.061	2.058	1.737
E012-B	1.271	2.441	1.172	2.082	1.921	C010-B	0.765	1.442	0.693	2.081	1.886

E013-A	0.555	1.053	0.529	1.990	1.896	C011-A	0.404	0.874	0.398	2.198	2.165
E013-B	1.171	1.900	0.893	2.127	1.623	C011-B	0.711	1.458	0.695	2.098	2.051
E015-A	1.804	2.951	1.462	2.018	1.636	C012-A	1.172	2.438	1.208	2.018	2.080
E015-B	1.257	2.427	1.122	2.163	1.931	C012-B	1.282	2.042	0.934	2.186	1.593
E016-A	0.803	1.658	0.847	1.957	2.064	C013-A	0.767	1.466	0.746	1.964	1.912
E016-B	0.842	1.643	0.846	1.941	1.952	C013-B	1.467	2.859	1.316	2.172	1.949
E017-A	0.387	0.621	0.312	1.992	1.605	C014-A	1.452	2.756	1.269	2.172	1.898
E017-B	0.689	1.320	0.648	2.036	1.917	C014-B	1.289	2.204	1.056	2.087	1.710
E019-A	0.424	0.846	0.414	2.044	1.996	C015-A	0.763	1.624	0.740	2.196	2.129
E019-B	0.521	1.002	0.481	2.083	1.924	C015-B	0.803	1.398	0.676	2.068	1.740
E022-A	1.367	2.657	1.252	2.123	1.944	C016-A	0.791	1.460	0.681	2.145	1.845
E022-B	1.515	2.652	1.357	1.955	1.750	C016-B	0.952	1.920	0.958	2.005	2.017
E023-A	0.999	2.042	1.045	1.955	2.044	C017-A	0.348	0.749	0.368	2.038	2.155
E023-B	1.352	2.387	1.167	2.046	1.765	C017-B	1.042	2.244	1.048	2.141	2.154
E024-A	0.659	1.196	0.600	1.992	1.815	C018-A	1.614	2.765	1.284	2.154	1.713
E024-B	1.372	2.392	1.166	2.052	1.744	C018-B	0.423	0.650	0.320	2.032	1.538
E025-A	0.524	0.849	0.407	2.086	1.620	C019-A	0.294	0.566	0.278	2.036	1.926
E025-B	1.085	2.214	1.060	2.088	2.041	C019-B	1.326	2.166	1.082	2.002	1.633
E026-A	0.718	1.219	0.619	1.969	1.698	C020-B	0.636	1.375	0.633	2.171	2.162
E026-B	0.328	0.543	0.272	1.993	1.656	C020-B	0.820	1.332	0.645	2.066	1.625
E028-A	0.783	1.562	0.796	1.962	1.994	C021-A	0.453	0.927	0.438	2.115	2.045
E028-B	1.400	2.206	1.009	2.186	1.576	C021-B	1.289	2.485	1.183	2.100	1.928
E029-A	1.233	2.265	1.053	2.152	1.837	C022-A	1.317	2.113	1.066	1.982	1.604
E029-B	0.881	1.640	0.807	2.031	1.862	C022-B	1.267	2.683	1.325	2.025	2.117
E030-A	0.937	1.647	0.770	2.139	1.757	C023-A	0.694	1.112	0.529	2.104	1.602
E030-B	1.371	2.625	1.335	1.966	1.915	C023-B	0.770	1.288	0.620	2.076	1.673
E031-A	0.545	0.880	0.429	2.053	1.616	C024-A	0.990	1.486	0.734	2.025	1.501

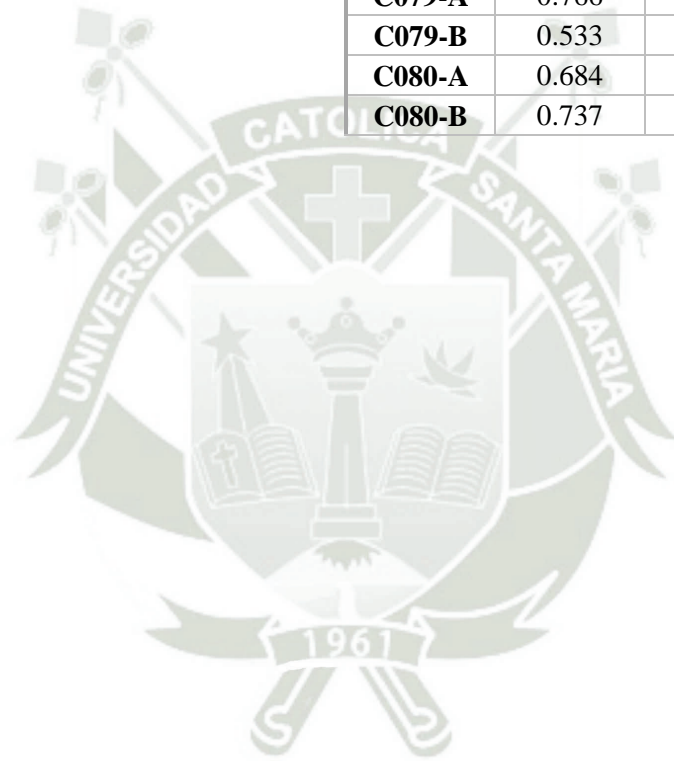
E031-B	0.978	1.478	0.727	2.032	1.512	C024-B	0.643	1.409	0.649	2.171	2.191
E032-A	0.343	0.677	0.343	1.973	1.973	C025-A	1.150	2.195	1.062	2.067	1.909
E032-B	0.852	1.680	0.826	2.035	1.972	C025-B	1.005	1.588	0.808	1.965	1.580
E033-A	0.701	1.174	0.557	2.108	1.674	C026-A	0.353	0.596	0.286	2.082	1.686
E033-B	1.846	2.935	1.422	2.064	1.590	C026-B	1.114	1.895	0.941	2.013	1.701
E034-A	1.133	1.904	0.921	2.067	1.681	C027-A	1.287	2.085	1.032	2.020	1.620
E034-B	0.917	1.763	0.866	2.036	1.923	C027-B	0.291	0.534	0.243	2.199	1.837
E035-A	0.800	1.579	0.744	2.122	1.973	C028-A	1.646	2.897	1.349	2.147	1.760
E035-B	1.628	2.595	1.285	2.019	1.594	C028-B	0.434	0.755	0.369	2.046	1.739
E036-A	1.250	2.546	1.220	2.087	2.036	C029-A	0.763	1.374	0.694	1.980	1.801
E036-B	0.780	1.398	0.680	2.055	1.792	C029-B	1.202	2.491	1.209	2.061	2.073
E037-A	0.870	1.811	0.896	2.021	2.081	C030-A	1.231	2.087	0.964	2.165	1.696
E037-B	0.362	0.557	0.257	2.167	1.540	C030-B	0.485	0.903	0.457	1.977	1.861
E039-A	1.479	2.817	1.327	2.123	1.905	C031-A	0.246	0.503	0.243	2.066	2.042
E039-B	0.922	1.497	0.733	2.042	1.624	C031-B	0.826	1.375	0.683	2.012	1.664
E040-A	0.520	1.015	0.523	1.940	1.952	C032-A	1.024	1.954	0.914	2.139	1.908
E040-B	1.295	2.134	1.070	1.995	1.648	C032-B	1.099	2.357	1.188	1.984	2.145
E041-A	0.763	1.497	0.730	2.052	1.961	C033-A	1.007	1.950	0.952	2.049	1.937
E041-B	1.647	2.996	1.516	1.976	1.819	C033-B	0.758	1.665	0.809	2.057	2.198
E042-A	0.943	1.658	0.780	2.127	1.759	C034-A	0.918	1.686	0.839	2.009	1.837
E042-B	1.081	2.048	0.955	2.144	1.895	C034-B	0.512	1.111	0.535	2.076	2.169
E043-A	0.246	0.500	0.250	1.999	2.033	C035-A	1.250	2.058	1.039	1.981	1.646
E043-B	0.432	0.805	0.398	2.023	1.863	C035-B	0.553	0.897	0.438	2.050	1.622
E045-A	1.773	2.824	1.346	2.098	1.593	C036-A	1.254	2.141	0.979	2.188	1.708
E045-B	0.645	1.003	0.456	2.198	1.554	C036-B	1.775	2.715	1.346	2.017	1.530
E046-A	1.349	2.318	1.068	2.171	1.718	C037-A	1.035	2.186	1.116	1.958	2.112
E046-B	1.356	2.659	1.299	2.047	1.961	C037-B	0.616	1.345	0.627	2.146	2.182

E047-A	1.691	2.679	1.221	2.194	1.584	C038-A	1.218	2.215	1.033	2.145	1.819
E047-B	1.492	2.843	1.312	2.167	1.905	C038-B	0.468	0.845	0.404	2.094	1.805
E050-A	0.284	0.554	0.258	2.149	1.951	C039-A	0.679	1.064	0.530	2.006	1.568
E050-B	0.305	0.541	0.263	2.060	1.776	C039-B	0.617	0.991	0.488	2.029	1.606
E052-A	1.081	1.713	0.813	2.108	1.584	C040-A	1.802	2.873	1.389	2.068	1.594
E052-B	0.842	1.428	0.718	1.989	1.695	C040-B	0.696	1.421	0.652	2.178	2.041
E053-A	0.459	0.789	0.372	2.121	1.720	C041-A	1.391	2.156	1.029	2.096	1.550
E053-B	1.585	2.380	1.106	2.152	1.502	C041-B	1.313	2.552	1.187	2.150	1.943
E054-A	1.421	2.282	1.062	2.149	1.606	C042-A	1.574	2.979	1.384	2.152	1.893
E054-B	1.525	2.740	1.356	2.020	1.797	C042-B	0.351	0.742	0.376	1.976	2.113
E055-A	0.548	1.104	0.522	2.116	2.016	C043-A	0.809	1.456	0.679	2.143	1.799
E055-B	0.277	0.581	0.291	1.995	2.096	C043-B	1.654	2.594	1.235	2.100	1.568
E056-A	1.164	2.063	0.979	2.107	1.773	C044-A	1.148	2.184	1.019	2.144	1.902
E056-B	1.523	2.802	1.283	2.184	1.840	C044-B	1.672	2.746	1.313	2.092	1.642
E057-A	0.401	0.620	0.318	1.948	1.548	C045-A	1.572	2.929	1.497	1.957	1.863
E057-B	1.291	2.108	1.001	2.105	1.633	C045-B	0.379	0.572	0.281	2.036	1.510
E058-A	0.933	1.477	0.731	2.021	1.583	C046-A	0.445	0.795	0.382	2.082	1.787
E058-B	0.959	1.667	0.852	1.957	1.738	C046-B	0.910	1.671	0.783	2.134	1.836
E059-A	0.896	1.552	0.729	2.128	1.732	C047-A	1.026	1.719	0.829	2.073	1.675
E059-B	0.654	1.138	0.584	1.948	1.740	C047-B	0.264	0.544	0.257	2.120	2.060
E060-A	1.010	1.830	0.861	2.125	1.811	C048-A	0.367	0.639	0.308	2.077	1.743
E060-B	1.078	2.153	1.037	2.076	1.998	C048-B	1.259	2.012	0.965	2.086	1.598
E061-A	1.157	1.839	0.910	2.020	1.590	C049-A	1.156	1.885	0.945	1.994	1.630
E061-B	1.067	1.942	0.955	2.033	1.820	C049-B	1.490	2.348	1.199	1.958	1.576
E062-A	1.664	2.743	1.320	2.078	1.648	C050-A	0.258	0.549	0.262	2.093	2.127
E062-B	1.404	2.673	1.254	2.132	1.904	C050-B	1.492	2.888	1.443	2.001	1.936
E064-A	1.546	2.862	1.437	1.992	1.851	C051-A	1.077	1.901	0.929	2.047	1.765

E064-B	0.486	0.917	0.429	2.137	1.885	C051-B	1.391	2.286	1.121	2.040	1.644
E067-A	1.301	2.171	1.074	2.021	1.669	C052-A	1.717	2.948	1.369	2.153	1.717
E067-B	0.631	1.221	0.581	2.100	1.935	C052-B	0.366	0.800	0.395	2.027	2.186
E068-A	0.628	1.317	0.627	2.102	2.097	C053-A	0.699	1.398	0.655	2.133	2.000
E068-B	1.053	1.965	0.903	2.177	1.866	C053-B	1.148	2.270	1.125	2.018	1.977
E069-A	1.052	1.654	0.822	2.012	1.572	C054-A	1.156	1.804	0.887	2.033	1.560
E069-B	1.396	2.302	1.160	1.985	1.649	C054-B	0.395	0.796	0.381	2.088	2.015
E070-A	1.089	2.023	0.967	2.091	1.857	C055-A	0.590	1.270	0.645	1.969	2.153
E070-B	1.666	2.953	1.427	2.070	1.773	C055-B	1.367	2.218	1.060	2.092	1.622
E071-A	0.354	0.566	0.258	2.197	1.600	C056-A	1.387	2.701	1.316	2.053	1.948
E071-B	0.650	1.359	0.696	1.952	2.091	C056-B	0.950	1.535	0.749	2.050	1.615
E072-A	0.315	0.589	0.303	1.944	1.871	C057-A	1.536	2.795	1.418	1.971	1.820
E072-B	1.414	2.563	1.194	2.146	1.813	C057-B	0.350	0.660	0.303	2.179	1.887
E073-A	0.491	0.896	0.458	1.955	1.823	C058-A	0.490	1.042	0.488	2.135	2.125
E073-B	1.262	2.176	1.064	2.046	1.724	C058-B	1.185	2.231	1.077	2.071	1.882
E074-A	1.750	2.636	1.272	2.072	1.506	C059-A	0.956	1.912	0.936	2.043	1.999
E074-B	1.256	2.572	1.262	2.038	2.047	C059-B	0.814	1.589	0.730	2.176	1.952
E075-A	1.615	2.737	1.251	2.188	1.695	C060-A	1.285	2.662	1.333	1.997	2.072
E075-B	0.693	1.318	0.602	2.191	1.902	C060-B	0.549	1.163	0.564	2.061	2.119
E077-A	1.391	2.912	1.392	2.092	2.094	C061-A	0.980	1.772	0.863	2.053	1.808
E077-B	0.665	1.229	0.577	2.129	1.847	C061-B	0.986	1.808	0.915	1.976	1.833
E078-A	0.883	1.848	0.930	1.987	2.094	C062-A	1.287	2.791	1.424	1.960	2.169
E078-B	1.106	1.674	0.843	1.986	1.514	C062-B	1.345	2.752	1.386	1.986	2.046
E080-A	1.271	2.627	1.227	2.141	2.067	C063-A	1.423	2.802	1.386	2.022	1.969
E080-B	1.196	2.193	1.005	2.183	1.834	C063-B	1.089	1.939	0.903	2.147	1.780
E081-A	0.748	1.302	0.657	1.982	1.741	C064-A	0.420	0.707	0.338	2.090	1.683
E081-B	0.673	1.050	0.509	2.064	1.561	C064-B	1.334	2.823	1.417	1.992	2.116

E082-A	0.483	0.873	0.402	2.173	1.808	C065-A	1.328	2.312	1.059	2.184	1.741
E082-B	1.073	1.725	0.908	1.900	1.607	C065-B	0.620	1.296	0.607	2.136	2.091
E083-A	0.588	1.184	0.604	1.961	2.012	C066-A	1.392	2.970	1.435	2.069	2.134
E083-B	1.246	2.535	1.264	2.005	2.034	C066-B	1.099	2.168	1.059	2.047	1.972
						C067-A	1.381	2.605	1.198	2.175	1.886
						C067-B	1.436	2.679	1.310	2.045	1.866
						C068-A	0.971	2.117	1.052	2.013	2.180
						C068-B	0.597	1.222	0.559	2.188	2.046
						C069-A	1.186	2.603	1.326	1.963	2.194
						C069-B	0.675	1.223	0.593	2.064	1.811
						C070-A	0.592	1.161	0.591	1.964	1.961
						C070-B	1.489	2.535	1.168	2.170	1.703
						C071-A	1.055	2.016	1.012	1.992	1.911
						C071-B	1.272	1.966	0.908	2.166	1.545
						C072-A	1.161	1.882	0.931	2.021	1.621
						C072-B	0.269	0.550	0.269	2.042	2.046
						C073-A	1.611	2.576	1.287	2.001	1.599
						C073-B	1.173	2.572	1.290	1.994	2.192
						C074-A	1.199	2.064	1.030	2.003	1.722
						C074-B	1.448	2.996	1.489	2.012	2.069
						C075-A	1.327	2.647	1.223	2.164	1.994
						C075-B	1.210	2.194	1.007	2.178	1.813
						C076-A	0.883	1.924	0.946	2.034	2.180
						C076-B	0.725	1.175	0.573	2.049	1.620
						C077-A	1.259	2.259	1.110	2.036	1.794
						C077-B	0.560	1.150	0.589	1.953	2.052
						C078-A	0.725	1.221	0.595	2.051	1.683

C078-B	0.331	0.585	0.284	2.057	1.767
C079-A	0.766	1.583	0.762	2.077	2.066
C079-B	0.533	1.121	0.514	2.182	2.102
C080-A	0.684	1.115	0.535	2.083	1.630
C080-B	0.737	1.573	0.777	2.024	2.135



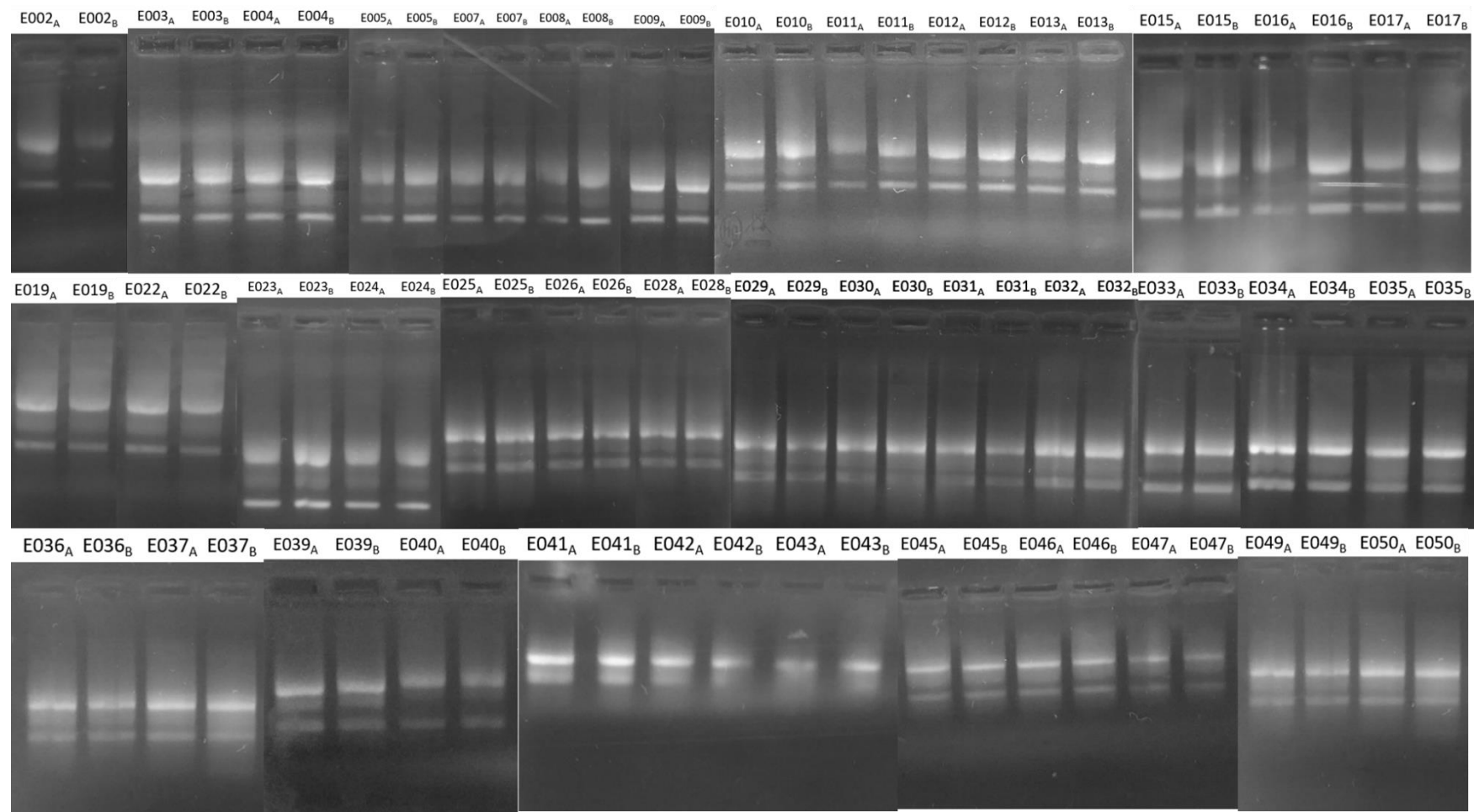


Figura 30. Corrida electroforética de extracción de ARN de voluntarios con epilepsia (E001 hasta E050). Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30 min

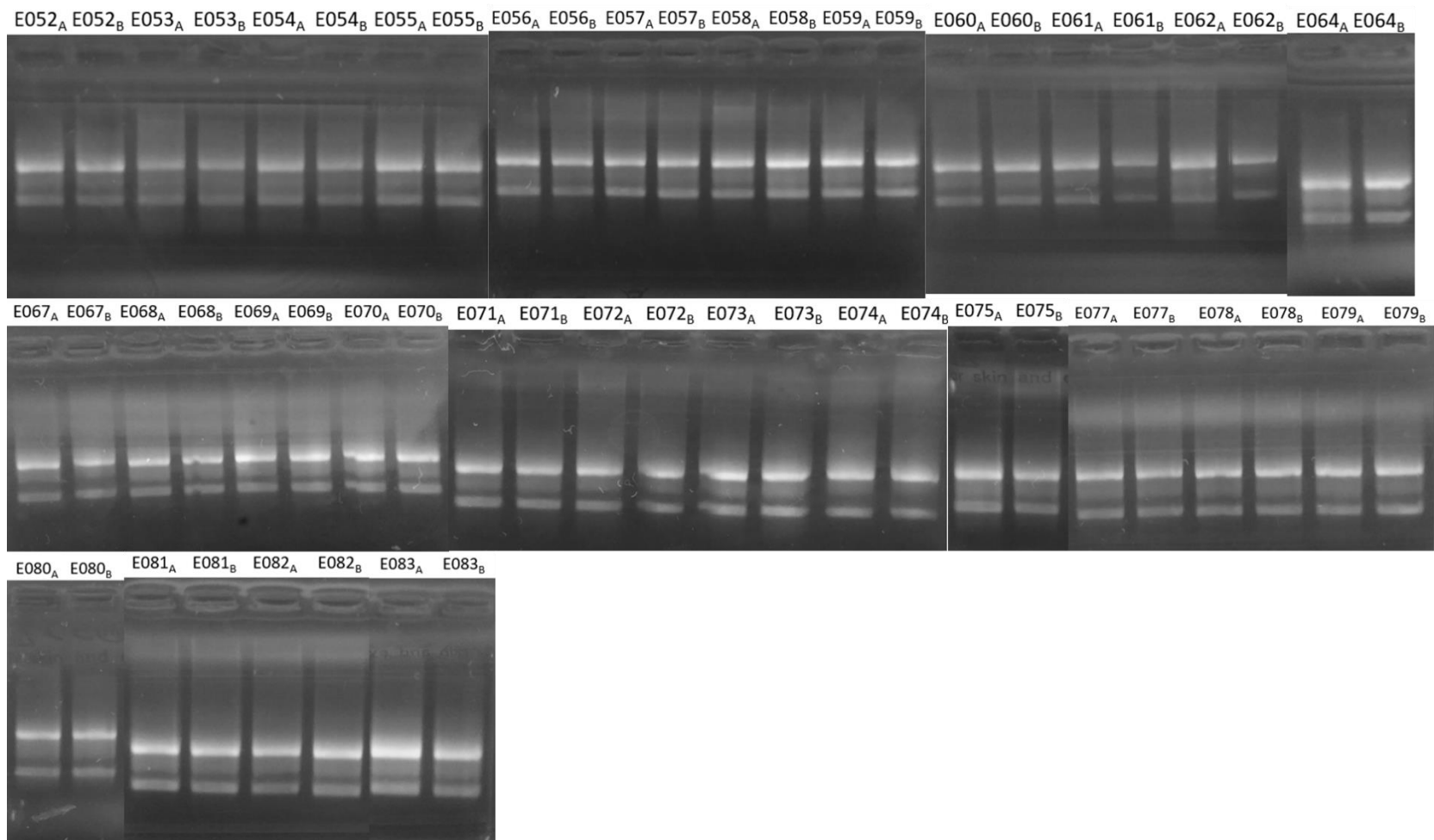


Figura 31. Corrida electroforética de extracción de ARN de voluntarios con epilepsia (E052 hasta E083). Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30 min

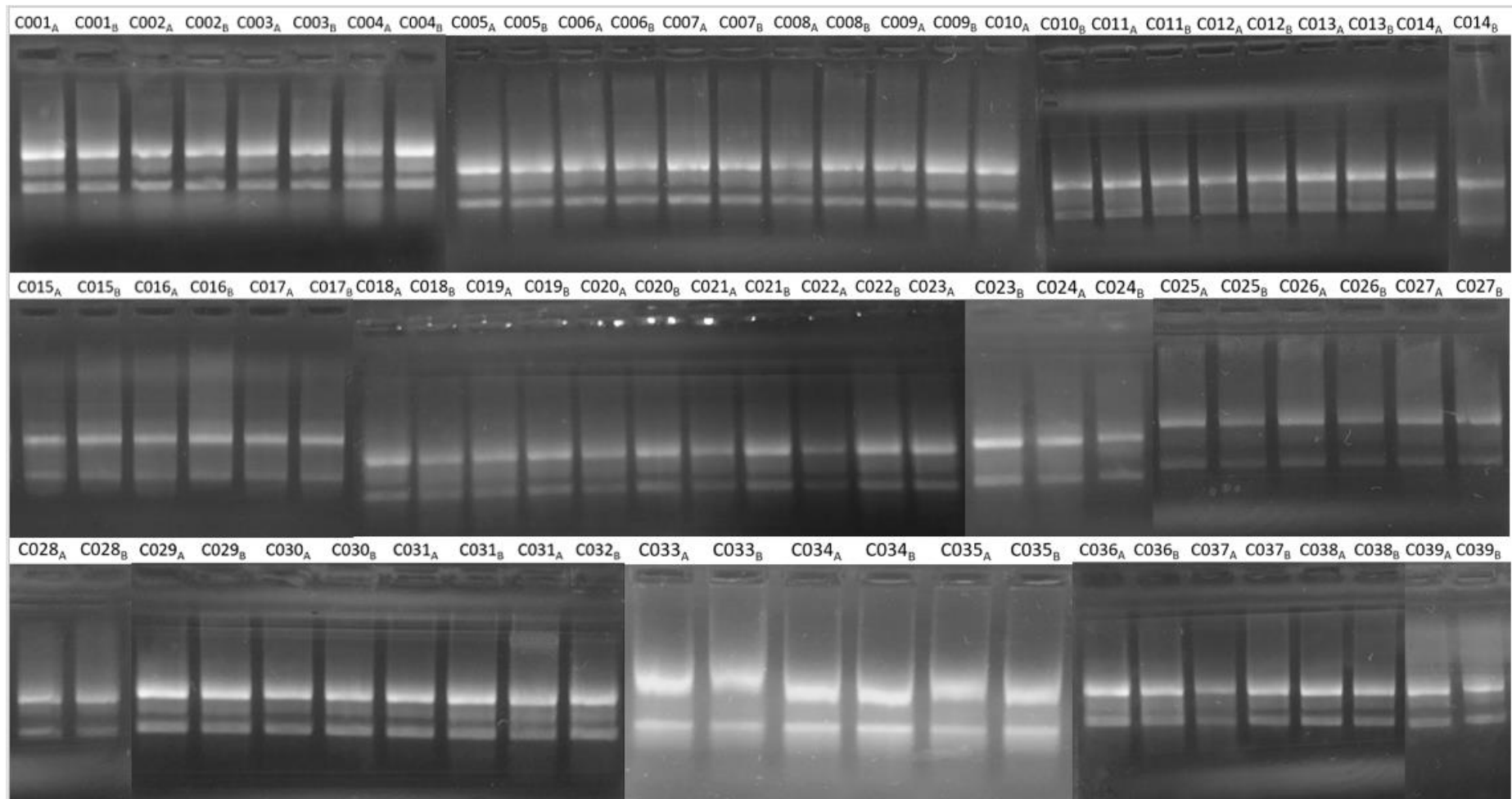


Figura 32. Corrida electroforética de extracción de ARN de voluntarios control (C001 hasta C039). Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30 min.

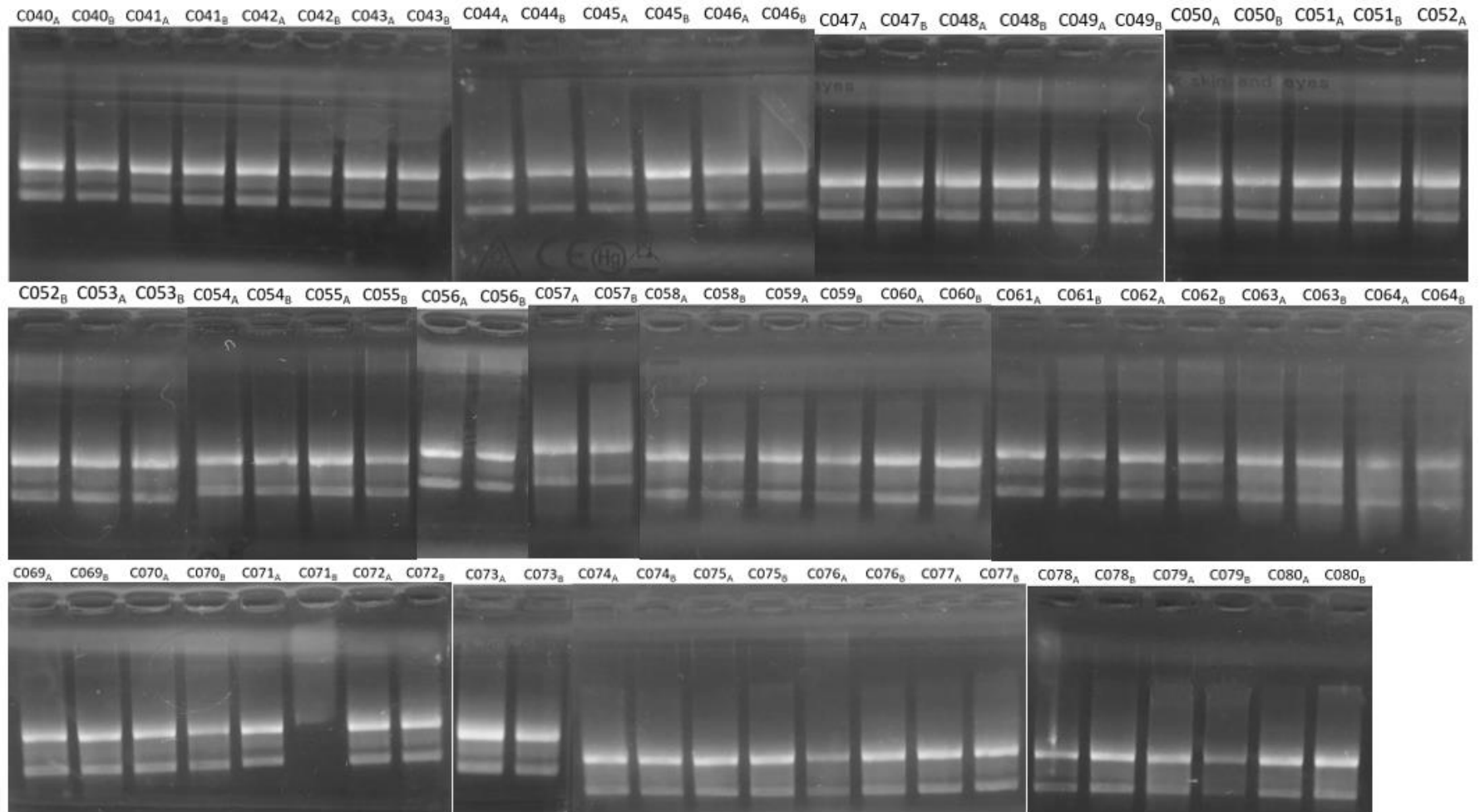


Figura 33. Corrida electroforética de extracción de ARN de voluntarios con epilepsia (C040 hasta C080). Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30 min.

Tabla 21. Concentraciones de ARN medidas por fluorometría. A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.

Muestra	Concentración ARN Qubit (ng/mL)	Concentración ARN (ng/μL)	Muestra	Concentración ARN Qubit (ng/mL)	Concentración ARN (ng/μL)
E002-A	610.0	40.67	C001-A	590.0	59.00
E002-B	298.0	19.87	C001-B	590.0	59.00
E003-A	650.0	43.33	C002-A	580.0	58.00
E003-B	690.0	46.00	C002-B	462.0	46.20
E004-A	680.0	45.33	C003-A	510.0	51.00
E004-B	730.0	48.67	C003-B	610.0	61.00
E005-A	700.0	46.67	C004-A	680.0	68.00
E005-B	820.0	54.67	C004-B	600.0	60.00
E007-A	690.0	46.00	C005-A	560.0	56.00
E007-B	580.0	38.67	C005-B	600.0	60.00
E008-A	414.0	27.60	C006-A	434.0	43.40
E008-B	800.0	53.33	C006-B	442.0	44.20
E009-A	900.0	60.00	C007-A	464.0	46.40
E009-B	850.0	56.67	C007-B	600.0	60.00
E010-A	1000.0	66.67	C008-A	421.0	42.10
E010-B	1000.0	66.67	C008-B	520.0	52.00
E011-A	810.0	54.00	C009-A	418.0	41.80
E011-B	670.0	44.67	C009-B	500.0	50.00
E012-A	910.0	60.67	C010-A	479.0	47.90
E012-B	930.0	62.00	C010-B	441.0	44.10
E013-A	1000.0	66.67	C011-A	650.0	65.00
E013-B	1000.0	66.67	C011-B	710.0	71.00
E015-A	346.0	23.07	C012-A	700.0	70.00
E015-B	810.0	54.00	C012-B	600.0	60.00
E016-A	630.0	42.00	C013-A	660.0	66.00
E016-B	433.0	28.87	C013-B	610.0	61.00
E017-A	445.0	29.67	C014-A	486.0	48.60
E017-B	500.0	33.33	C014-B	456.0	45.60
E019-A	760.0	50.67	C015-A	720.0	72.00
E019-B	690.0	46.00	C015-B	520.0	52.00
E022-A	69.8	4.65	C016-A	451.0	45.10
E022-B	423.0	28.20	C016-B	406.0	40.60
E023-A	690.0	46.00	C017-A	780.0	78.00
E023-B	870.0	58.00	C017-B	720.0	72.00
E024-A	710.0	47.33	C018-A	620.0	62.00
E024-B	590.0	39.33	C018-B	630.0	63.00
E025-A	560.0	56.00	C019-A	520.0	52.00
E025-B	600.0	60.00	C019-B	600.0	60.00
E026-A	620.0	62.00	C020-A	550.0	55.00

E026-B	560.0	56.00	C020-B	468.0	46.80
E028-A	590.0	59.00	C021-A	510.0	51.00
E028-B	670.0	67.00	C021-B	640.0	64.00
E029-A	570.0	57.00	C022-A	590.0	59.00
E029-B	590.0	59.00	C022-B	580.0	58.00
E030-A	560.0	56.00	C023-A	690.0	69.00
E030-B	680.0	68.00	C023-B	199.0	19.90
E031-A	451.0	45.10	C024-A	200.0	20.00
E031-B	510.0	51.00	C024-B	690.0	69.00
E032-A	486.0	48.60	C025-A	580.0	58.00
E032-B	837.0	83.70	C025-B	610.0	61.00
E033-A	491.0	49.10	C026-A	450.0	45.00
E033-B	414.0	41.40	C026-B	510.0	51.00
E034-A	439.0	43.90	C027-A	465.0	46.50
E034-B	540.0	54.00	C027-B	481.0	48.10
E035-A	710.0	71.00	C028-A	216.0	21.60
E035-B	800.0	80.00	C028-B	136.0	13.60
E036-A	338.0	33.80	C029-A	590.0	59.00
E036-B	331.0	33.10	C029-B	570.0	57.00
E037-A	484.0	48.40	C030-A	320.0	32.00
E037-B	580.0	58.00	C030-B	350.0	35.00
E039-A	570.0	57.00	C031-A	339.0	33.90
E039-B	465.0	46.50	C031-B	660.0	66.00
E040-A	285.0	28.50	C032-A	830.0	83.00
E040-B	228.0	22.80	C032-B	660.0	66.00
E041-A	580.0	58.00	C033-A	387.0	38.70
E041-B	570.0	57.00	C033-B	291.0	29.10
E042-A	630.0	63.00	C034-A	355.0	35.50
E042-B	610.0	61.00	C034-B	394.0	39.40
E043-A	475.0	47.50	C035-A	384.0	38.40
E043-B	340.0	34.00	C035-B	360.0	36.00
E045-A	334.0	33.40	C036-A	550.0	55.00
E045-B	357.0	35.70	C036-B	530.0	53.00
E046-A	590.0	59.00	C037-A	570.0	57.00
E046-B	473.0	47.30	C037-B	600.0	60.00
E047-A	344.0	34.40	C038-A	600.0	60.00
E047-B	314.0	31.40	C038-B	560.0	56.00
E050-A	63.7	6.37	C039-A	580.0	58.00
E050-B	181.0	18.10	C039-B	444.0	44.40
E052-A	520.0	52.00	C040-A	229.0	22.90
E052-B	590.0	59.00	C040-B	199.0	19.90
E053-A	316.0	31.60	C041-A	580.0	58.00
E053-B	282.0	28.20	C041-B	590.0	59.00
E054-A	430.0	43.00	C042-A	369.0	36.90

E054-B	307.0	30.70	C042-B	288.0	28.80
E055-A	337.0	33.70	C043-A	455.0	45.50
E055-B	444.0	44.40	C043-B	530.0	53.00
E056-A	423.0	42.30	C044-A	238.0	23.80
E056-B	443.0	44.30	C044-B	287.0	28.70
E057-A	269.0	26.90	C045-A	303.0	30.30
E057-B	314.0	31.40	C045-B	485.0	48.50
E058-A	520.0	52.00	C046-A	194.0	19.40
E058-B	590.0	59.00	C046-B	237.0	23.70
E059-A	442.0	44.20	C047-A	510.0	51.00
E059-B	550.0	55.00	C047-B	496.0	49.60
E060-A	520.0	52.00	C048-A	427.0	42.70
E060-B	570.0	57.00	C048-B	500.0	50.00
E061-A	392.0	39.20	C049-A	540.0	54.00
E061-B	352.0	35.20	C049-B	560.0	56.00
E062-A	650.0	65.00	C050-A	510.0	51.00
E062-B	159.0	15.90	C050-B	510.0	51.00
E064-A	498.0	49.80	C051-A	520.0	52.00
E064-B	483.0	48.30	C051-B	473.0	47.30
E067-A	302.0	30.20	C052-A	280.0	28.00
E067-B	310.0	31.00	C052-B	305.0	30.50
E068-A	570.0	57.00	C053-A	780.0	78.00
E068-B	580.0	58.00	C053-B	790.0	79.00
E069-A	475.0	47.50	C054-A	550.0	55.00
E069-B	560.0	56.00	C054-B	540.0	54.00
E070-A	510.0	51.00	C055-A	482.0	48.20
E070-B	610.0	61.00	C055-B	458.0	45.80
E071-A	510.0	51.00	C056-A	550.0	55.00
E071-B	500.0	50.00	C056-B	620.0	62.00
E072-A	530.0	53.00	C057-A	510.0	51.00
E072-B	467.0	46.70	C057-B	570.0	57.00
E073-A	580.0	58.00	C058-A	476.0	47.60
E073-B	510.0	51.00	C058-B	399.0	39.90
E074-A	250.0	25.00	C059-A	491.0	49.10
E074-B	129.0	12.90	C059-B	510.0	51.00
E075-A	428.0	42.80	C060-A	520.0	52.00
E075-B	432.0	43.20	C060-B	510.0	51.00
E077-A	510.0	51.00	C061-A	352.0	35.20
E077-B	540.0	54.00	C061-B	348.0	34.80
E078-A	670.0	67.00	C062-A	640.0	64.00
E078-B	720.0	72.00	C062-B	750.0	75.00
E080-A	455.0	45.50	C063-A	690.0	69.00
E080-B	433.0	43.30	C063-B	790.0	79.00
E081-A	491.0	49.10	C064-A	640.0	64.00

E081-B	496.0	49.60	C064-B	730.0	73.00
E082-A	408.0	40.80	C065-A	620.0	62.00
E082-B	459.0	45.90	C065-B	510.0	51.00
E083-A	630.0	63.00	C066-A	412.0	41.20
E083-B	630.0	63.00	C066-B	311.0	31.10
			C067-A	489.0	48.90
			C067-B	520.0	52.00
			C068-A	345.0	34.50
			C068-B	550.0	55.00
			C069-A	479.0	47.90
			C069-B	510.0	51.00
			C070-A	393.0	39.30
			C070-B	316.0	31.60
			C071-A	257.0	25.70
			C071-B	48.9	4.89
			C072-A	483.0	48.30
			C072-B	369.0	36.90
			C073-A	391.0	39.10
			C073-B	460.0	46.00
			C074-A	520.0	52.00
			C074-B	590.0	59.00
			C075-A	730.0	73.00
			C075-B	750.0	75.00
			C076-A	630.0	63.00
			C076-B	550.0	55.00
			C077-A	420.0	42.00
			C077-B	367.0	36.70
			C078-A	690.0	69.00
			C078-B	550.0	55.00
			C079-A	740.0	74.00
			C079-B	690.0	69.00
			C080-A	750.0	75.00
			C080-B	720.0	72.00

Tabla 22. Concentraciones de ADNc medidas por fluorometría. A la izquierda, muestras de voluntarios con epilepsia. A la derecha, muestras de voluntarios control.

Muestra	Concentración ADNc Qubit (ng/mL)	Concentración ADNc (ng/μL)	Muestra	Concentración ADNc Qubit (ng/mL)	Concentración ADNc (ng/μL)
E002	15.87	3.17	C001	12.72	2.54
E003	5.70	1.14	C002	40.46	8.09
E004	6.53	1.31	C003	18.33	3.67
E005	10.41	2.08	C004	29.40	5.88
E007	8.77	1.75	C005	7.01	1.40
E008	9.18	1.84	C006	11.67	2.33
E009	9.95	1.99	C007	22.65	4.53
E010	13.19	2.64	C008	13.20	2.64
E011	11.24	2.25	C009	19.83	3.97
E012	9.65	1.93	C010	35.01	7.00
E013	11.11	2.22	C011	41.59	8.32
E015	4.90	0.98	C012	35.12	7.02
E016	5.80	1.16	C013	20.28	4.06
E017	4.22	0.84	C014	13.47	2.69
E019	6.75	1.35	C015	30.83	6.17
E022	7.85	1.57	C016	45.99	9.20
E023	11.45	2.29	C017	15.15	3.03
E024	14.02	2.80	C018	26.39	5.28
E025	12.32	2.46	C019	21.82	4.36
E026	9.09	1.82	C020	22.55	4.51
E028	8.57	1.71	C021	6.84	1.37
E029	13.55	2.71	C022	43.86	8.77
E030	14.90	2.98	C023	11.39	2.28
E031	15.34	3.07	C024	22.54	4.51
E032	3.84	0.77	C025	29.11	5.82
E033	14.91	2.98	C026	18.62	3.72
E034	14.25	2.85	C027	20.28	4.06
E035	13.69	2.74	C028	20.04	4.01
E036	3.93	0.79	C029	23.30	4.66
E037	5.88	1.18	C030	9.47	1.89
E039	6.73	1.35	C031	15.30	3.06
E040	9.23	1.85	C032	19.40	3.88
E041	9.23	1.85	C033	7.90	1.58
E042	7.51	1.50	C034	10.30	2.06
E043	12.21	2.44	C035	8.72	1.74
E045	13.49	2.70	C036	11.10	2.22
E046	12.14	2.43	C037	11.00	2.20
E047	13.79	2.76	C038	12.30	2.46
E050	5.59	1.12	C039	10.40	2.08

E052	13.27	2.65	C040	6.78	1.36
E053	11.67	2.33	C041	6.22	1.24
E054	4.08	0.82	C042	8.60	1.72
E055	6.47	1.29	C043	10.40	2.08
E056	9.35	1.87	C044	7.31	1.46
E057	12.76	2.55	C045	8.52	1.70
E058	4.75	0.95	C046	5.70	1.14
E059	9.65	1.93	C047	11.80	2.36
E060	7.43	1.49	C048	9.47	1.89
E061	10.20	2.04	C049	11.70	2.34
E062	14.20	2.84	C050	14.40	2.88
E064	9.01	1.80	C051	25.40	5.08
E067	6.17	1.23	C052	13.50	2.70
E068	8.35	1.67	C053	76.80	15.36
E069	10.70	2.14	C054	9.35	1.87
E070	11.40	2.28	C055	9.06	1.81
E071	7.97	1.59	C056	34.60	6.92
E072	11.80	2.36	C057	22.20	4.44
E073	9.58	1.92	C058	9.61	1.92
E074	5.23	1.05	C059	11.20	2.24
E075	8.30	1.66	C060	10.00	2.00
E077	8.85	1.77	C061	7.69	1.54
E078	8.60	1.72	C062	10.60	2.12
E080	10.20	2.04	C063	13.90	2.78
E081	10.80	2.16	C064	16.20	3.24
E082	8.68	1.74	C065	12.80	2.56
E083	17.00	3.40	C066	10.20	2.04
			C067	10.50	2.10
			C068	12.20	2.44
			C069	11.70	2.34
			C070	9.99	2.00
			C071	6.25	1.25
			C072	11.10	2.22
			C073	9.45	1.89
			C074	13.40	2.68
			C075	11.50	2.30
			C076	11.80	2.36
			C077	7.10	1.42
			C078	14.00	2.80
			C079	28.10	5.62
			C080	15.60	3.12

Tabla 23. Valores de expresión relativa de voluntarios con epilepsia farmacorrespondedores (GRUPO A).

Muestra	Ct MDR1	Promedio Ct MDR1 ± DS	Tm MDR1	Promedio Tm MDR1 ± DS	Ct GAPDH	Tm GAPDH	Expresión relativa
E003-A	25.19	24.96 ±	80.20	79.75 ±	20.45	83.00	4.048
E003-B	24.73	0.325	79.30	0.636			
E004-A	24.55	24.25 ±	80.40	80.35 ±	21.67	83.70	15.425
E004-B	23.95	0.424	80.30	0.071			
E005-A	25.20	25.21 ±	78.70	79.30 ±	21.45	83.10	6.808
E005-B	25.22	0.014	79.90	0.849			
E009-A	24.24	24.60 ±	79.80	79.65 ±	20.27	83.00	4.586
E009-B	24.96	0.509	79.50	0.212			
E010-A	25.92	26.23 ±	80.10	79.85 ±	20.85	83.30	2.223
E010-B	26.53	0.431	79.60	0.354			
E011-A	24.49	24.88 ±	79.70	79.65 ±	21.19	83.10	7.171
E011-B	25.26	0.544	79.60	0.071			
E012-A	24.64	25.11 ±	79.90	79.85 ±	21.32	82.90	6.668
E012-B	25.58	0.665	79.80	0.071			
E013-A	24.43	24.97 ±	79.90	79.90 ±	20.72	82.90	4.847
E013-B	25.51	0.764	79.90	0.000			
E015-A	29.21	28.26 ±	80.40	80.20 ±	23.13	82.80	2.643
E015-B	27.30	1.351	80.00	0.283			
E017-A	28.08	28.33 ±	79.80	79.80 ±	23.04	83.00	2.357
E017-B	28.58	0.354	79.80	0.000			
E024-A	24.62	24.76 ±	80.30	80.35 ±	21.69	84.00	11.021
E024-B	24.89	0.191	80.40	0.071			
E025-A	25.10	25.09 ±	80.30	80.25 ±	24.19	83.20	49.597
E025-B	25.07	0.021	80.20	0.071			
E026-A	25.90	25.88 ±	80.00	80.10 ±	24.06	82.90	26.213
E026-B	25.85	0.035	80.20	0.141			
E028-A	25.30	25.30 ±	80.30	80.35 ±	24.07	83.00	39.320
E028-B	25.30	0.000	80.40	0.071			
E029-A	26.49	26.45 ±	80.40	80.35 ±	23.55	83.20	12.356
E029-B	26.41	0.057	80.30	0.071			
E031-A	26.21	26.21 ±	80.20	80.10 ±	24.48	83.10	27.803
E031-B	26.21	0.000	80.00	0.141			
E032-A	27.20	27.26 ±	79.90	80.00 ±	24.19	83.30	10.983
E032-B	27.32	0.085	80.10	0.141			
E033-A	26.45	26.52 ±	80.00	79.95 ±	24.31	83.10	20.004
E033-B	26.58	0.092	79.90	0.071			
E034-A	26.44	26.43 ±	80.00	80.00 ±	24.15	83.00	18.990
E034-B	26.42	0.014	80.00	0.000			

E036-A	27.16	27.19 ±	79.80	79.95 ±	25.43	83.30	27.231
E036-B	27.22	0.042	80.10	0.212			
E037-A	25.65	25.77 ±	79.60	79.50 ±	24.06	83.30	28.191
E037-B	25.89	0.170	79.40	0.141			
E043-A	29.18	28.86 ±	79.50	79.40 ±	23.92	83.30	3.005
E043-B	28.54	0.453	79.30	0.141			
E045-A	26.93	27.23 ±	79.40	79.40 ±	25.60	83.30	29.902
E045-B	27.52	0.417	79.40	0.000			
E046-A	25.95	25.96 ±	79.90	79.90 ±	24.46	83.20	32.722
E046-B	25.96	0.007	79.90	0.000			
E047-A	26.43	26.54 ±	79.50	79.45 ±	24.61	83.20	24.288
E047-B	26.64	0.148	79.40	0.071			
E050-A	28.11	28.04 ±	79.30	79.45 ±	26.18	82.90	25.496
E050-B	27.96	0.106	79.60	0.212			
E053-A	29.57	29.51 ±	79.80	79.90 ±	22.02	82.60	0.513
E053-B	29.45	0.085	80.00	0.141			
E054-A	27.65	27.77 ±	80.00	79.95 ±	21.37	83.00	1.092
E054-B	27.89	0.170	79.90	0.071			
E056-A	26.39	26.33 ±	80.00	79.90 ±	21.72	83.20	3.790
E056-B	26.26	0.092	79.80	0.141			
E057-A	27.38	27.57 ±	79.70	79.55 ±	21.95	83.10	1.875
E057-B	27.76	0.269	79.40	0.212			
E058-A	26.84	26.67 ±	79.70	79.80 ±	21.79	83.20	3.143
E058-B	26.49	0.247	79.90	0.141			
E059-A	27.10	27.00 ±	80.00	79.95 ±	21.59	83.20	2.169
E059-B	26.90	0.141	79.90	0.071			
E062-A	25.11	25.06 ±	80.90	80.85 ±	19.11	83.50	1.497
E062-B	25.00	0.078	80.80	0.071			
E064-A	25.51	25.61 ±	80.70	80.65 ±	17.73	83.90	0.393
E064-B	25.70	0.134	80.60	0.071			
E067-A	25.25	25.15 ±	80.40	80.45 ±	17.85	84.00	0.587
E067-B	25.04	0.148	80.50	0.071			
E068-A	25.41	25.50 ±	80.70	80.75 ±	17.82	83.90	0.450
E068-B	25.59	0.127	80.80	0.071			
E069-A	26.17	26.11 ±	80.80	80.80 ±	18.52	83.90	0.479
E069-B	26.05	0.085	80.80	0.000			
E070-A	25.81	26.08 ±	80.70	80.65 ±	18.39	83.90	0.448
E070-B	26.34	0.375	80.60	0.071			
E071-A	24.99	25.02 ±	80.60	80.55 ±	17.52	83.90	0.510
E071-B	25.05	0.042	80.50	0.071			
E075-A	25.61	25.67 ±	80.40	80.40 ±	18.74	83.90	0.756
E075-B	25.73	0.085	80.40	0.000			
E077-A	26.01	25.98 ±	80.60	80.55 ±	17.72	83.80	0.301
E077-B	25.95	0.042	80.50	0.071			

E080-A	26.31	26.18 ±	80.70	80.70 ±	18.88	84.00	0.587
E080-B	26.04	0.191	80.70	0.000			
E083-A	27.70	27.64 ±	80.60	80.50 ±	19.26	84.10	0.278
E083-B	27.57	0.092	80.40	0.141			



Tabla 24. Valores de expresión relativa de voluntarios con epilepsia farmacorresistentes (GRUPO B).

Muestra	Ct MDR1	Promedio Ct MDR1 ± DS	Tm MDR1	Promedio Tm MDR1 ± DS	Ct GAPDH	Tm GAPDH	Expresión relativa
E002-A	27.03	27.07 ±	79.90	79.70 ±	22.14	82.70	3.036
E002-B	27.10	0.049	79.50	0.283			
E007-A	24.67	25.72 ±	79.90	79.85 ±	21.53	82.90	5.071
E007-B	26.76	1.478	79.80	0.071			
E008-A	26.13	26.25 ±	79.20	79.05 ±	22.36	82.30	6.243
E008-B	26.36	0.163	78.90	0.212			
E016-A	25.75	26.20 ±	79.50	79.50 ±	21.52	83.00	3.598
E016-B	26.65	0.636	79.50	0.000			
E019-A	23.82	23.80 ±	79.70	79.65 ±	21.80	83.10	23.058
E019-B	23.78	0.028	79.60	0.071			
E022-B	25.03	25.09 ±	80.00	80.10 ±	21.24	83.50	6.396
E022-B	25.15	0.085	80.20	0.141			
E023-A	24.91	24.91 ±	80.40	80.40 ±	20.80	83.80	5.360
E023-B	24.90	0.007	80.40	0.000			
E030-A	25.57	25.58 ±	80.40	80.40 ±	24.48	83.10	43.177
E030-B	25.58	0.007	80.40	0.000			
E035-A	26.21	26.21 ±	79.90	79.85 ±	23.44	83.10	13.568
E035-B	26.20	0.007	79.80	0.071			
E039-A	26.27	26.23 ±	79.90	79.85 ±	24.75	83.00	33.064
E039-B	26.19	0.057	79.80	0.071			
E040-A	26.74	26.76 ±	79.70	79.70 ±	25.45	83.10	37.199
E040-B	26.78	0.028	79.70	0.000			
E041-A	26.69	27.19 ±	79.60	79.55 ±	23.96	83.40	9.830
E041-B	27.69	0.707	79.50	0.071			
E042-A	26.32	26.34 ±	79.50	79.65 ±	23.91	83.40	17.174
E042-B	26.35	0.021	79.80	0.212			
E052-A	26.58	26.54 ±	80.30	80.20 ±	21.24	83.20	2.349
E052-B	26.49	0.064	80.10	0.141			
E055-A	27.79	27.68 ±	80.00	80.05 ±	21.68	83.10	1.446
E055-B	27.56	0.163	80.10	0.071			
E060-A	25.48	26.07 ±	80.80	80.70 ±	18.02	83.90	0.348
E060-B	26.66	0.834	80.60	0.141			
E061-A	26.72	26.64 ±	80.50	80.60 ±	18.88	83.60	0.425
E061-B	26.56	0.113	80.70	0.141			
E072-A	26.40	26.49 ±	80.50	80.65 ±	18.25	83.80	0.305
E072-B	26.58	0.127	80.80	0.212			
E073-A	25.33	25.49 ±	80.30	80.25 ±	17.64	84.00	0.401
E073-B	25.64	0.219	80.20	0.071			

E074-A	25.99	26.17 ±	80.30	80.35 ±	17.36	83.90	0.206
E074-B	26.34	0.247	80.40	0.071			
E078-A	25.65	25.73 ±	80.20	80.30	18.07	84.20	0.456
E078-B	25.81	0.113	80.40	±0.141			
E081-A	26.01	25.81 ±	80.60	80.50 ±	18.87	84.10	0.754
E081-B	25.60	0.290	80.40	0.141			
E082-A	25.98	25.70 ±	80.60	80.70 ±	18.28	84.40	0.540
E082-B	25.41	0.403	80.80	0.141			



Tabla 25. Valores de expresión relativa de voluntarios control (GRUPO C).

Muestra	Ct MDR1	Promedio Ct MDR1 ± DS	Tm MDR1	Promedio Tm MDR1 ± DS	Ct GAPDH	Tm GAPDH	Expresión relativa
C001-A	26.38	26.05 ±	80.00	79.90 ±	20.17	83.10	1.566
C001-B	25.72	0.467	79.80	0.141			
C002-A	25.76	25.68 ±	79.90	79.95 ±	20.37	82.80	2.333
C002-B	25.59	0.120	80.00	0.071			
C003-A	26.46	26.16 ±	80.10	80.00 ±	20.53	82.70	1.862
C003-B	25.86	0.424	79.90	0.141			
C004-A	25.88	26.05 ±	80.00	80.05 ±	20.24	82.90	1.650
C004-B	26.21	0.233	80.10	0.071			
C005-A	25.10	25.03 ±	80.00	79.90 ±	20.76	83.00	4.781
C005-B	24.96	0.099	79.80	0.141			
C006-A	25.64	25.72 ±	80.00	80.15 ±	20.28	83.10	2.132
C006-B	25.79	0.106	80.30	0.212			
C007-A	24.90	25.11 ±	79.80	79.65 ±	20.49	83.10	3.764
C007-B	25.31	0.290	79.50	0.212			
C008-A	26.10	26.05 ±	79.50	79.65 ±	21.06	83.00	2.902
C008-B	26.00	0.071	79.80	0.212			
C009-A	25.16	25.30 ±	80.00	79.95 ±	20.53	83.00	3.392
C009-B	25.43	0.191	79.90	0.071			
C010-A	27.15	26.89 ±	80.00	80.00 ±	21.04	82.80	1.605
C010-B	26.62	0.375	80.00	0.000			
C011-A	24.46	25.24 ±	79.70	79.60 ±	20.63	82.80	3.790
C011-B	26.01	1.096	79.50	0.141			
C012-A	25.76	25.84 ±	79.80	79.90 ±	20.70	83.20	2.625
C012-B	25.91	0.106	80.00	0.141			
C013-A	26.63	27.39 ±	80.00	79.90 ±	21.00	83.00	1.100
C013-B	28.15	1.075	79.80	0.141			
C014-A	25.61	25.53 ±	79.40	79.50 ±	21.31	82.60	4.966
C014-B	25.44	0.120	79.60	0.141			
C015-A	26.58	26.53 ±	80.00	79.95 ±	20.25	82.00	1.187
C015-B	26.48	0.071	79.90	0.071			
C016-A	26.57	26.83 ±	79.90	79.90 ±	19.64	82.50	0.634
C016-B	27.08	0.361	79.90	0.000			
C017-A	25.92	26.27 ±	79.30	79.45 ±	20.13	82.80	1.308
C017-B	26.62	0.495	79.60	0.212			
C018-A	25.33	25.45 ±	80.20	80.15 ±	22.34	83.30	10.720
C018-B	25.56	0.163	80.10	0.071			
C019-A	25.33	25.34 ±	80.40	80.45 ±	22.40	83.00	12.019
C019-B	25.35	0.014	80.50	0.071			
C020-A	24.65	24.84 ±	80.30	80.30 ±	22.16	83.00	14.392
C020-B	25.03	0.269	80.30	0.000			

C021-A	25.82	25.74 ±	80.40	80.45 ±	22.28	83.20	8.410
C021-B	25.65	0.120	80.50	0.071			
C022-A	25.82	25.73 ±	80.30	80.25 ±	21.70	83.30	5.646
C022-B	25.64	0.127	80.20	0.071			
C023-A	24.82	24.90 ±	80.50	80.55 ±	22.70	83.30	20.073
C023-B	24.98	0.113	80.60	0.071			
C024-A	26.59	26.24 ±	80.30	80.15 ±	23.20	83.10	11.214
C024-B	25.89	0.495	80.00	0.212			
C025-A	25.36	25.66 ±	79.70	79.60 ±	19.88	83.30	1.684
C025-B	25.95	0.417	79.50	0.141			
C026-A	25.68	25.29 ±	79.00	79.10 ±	21.18	83.80	5.341
C026-B	24.90	0.552	79.20	0.141			
C027-A	24.58	24.38 ±	79.40	79.25 ±	20.72	82.90	7.322
C027-B	24.17	0.290	79.10	0.212			
C028-A	28.17	28.18 ±	79.50	79.55 ±	22.43	82.90	1.714
C028-B	28.19	0.014	79.60	0.071			
C029-A	27.09	27.41 ±	81.20	81.25 ±	19.59	83.70	0.408
C029-B	27.73	0.453	81.30	0.071			
C030-A	25.58	25.57 ±	81.20	81.25 ±	18.17	83.40	0.546
C030-B	25.56	0.014	81.30	0.071			
C031-A	25.76	25.61 ±	81.30	81.25 ±	18.85	83.40	0.854
C031-B	25.45	0.219	81.20	0.071			
C032-A	26.83	26.79 ±	81.30	81.35 ±	18.84	83.60	0.374
C032-B	26.74	0.064	81.40	0.071			
C033-A	25.15	25.19 ±	81.30	81.25 ±	18.15	83.90	0.701
C033-B	25.23	0.057	81.20	0.071			
C034-A	25.35	25.18 ±	81.20	81.20 ±	18.35	83.70	0.811
C034-B	25.01	0.240	81.20	0.000			
C035-A	26.50	26.36 ±	81.00	80.90 ±	18.15	83.80	0.311
C035-B	26.22	0.198	80.80	0.141			
C036-A	25.91	26.20 ±	80.90	81.00 ±	18.60	83.90	0.477
C036-B	26.48	0.403	81.10	0.141			
C037-A	25.31	25.29 ±	81.20	81.05 ±	17.95	83.70	0.571
C037-B	25.26	0.035	80.90	0.212			
C038-A	24.87	25.02 ±	81.00	81.05 ±	18.29	83.50	0.869
C038-B	25.17	0.212	81.10	0.071			
C039-A	25.84	25.89 ±	80.90	80.85 ±	18.63	83.60	0.604
C039-B	25.93	0.064	80.80	0.071			
C040-A	26.04	26.01 ±	80.90	81.00 ±	17.79	83.90	0.309
C040-B	25.98	0.042	81.10	0.141			
C041-A	24.82	24.89 ±	81.00	80.95 ±	17.54	83.60	0.565
C041-B	24.96	0.099	80.90	0.071			
C042-A	24.91	24.97 ±	80.90	81.00 ±	17.60	83.30	0.558
C042-B	25.03	0.085	81.10	0.141			

C043-A	26.35	26.42 ±	80.30	80.15 ±	18.13	83.30	0.295
C043-B	26.49	0.099	80.00	0.212			
C044-A	25.22	25.38 ±	81.10	81.15 ±	18.01	83.50	0.559
C044-B	25.53	0.219	81.20	0.071			
C045-A	24.72	24.69 ±	81.10	81.05 ±	17.91	83.70	0.842
C045-B	24.65	0.049	81.00	0.071			
C046-A	26.99	26.88 ±	81.10	81.10 ±	18.38	83.60	0.256
C046-B	26.76	0.163	81.10	0.000			
C047-A	24.79	24.67 ±	81.00	80.85 ±	18.05	83.70	0.941
C047-B	24.54	0.177	80.70	0.212			
C048-A	25.11	25.16 ±	80.60	80.70 ±	18.18	83.80	0.733
C048-B	25.20	0.064	80.80	0.141			
C049-A	24.79	24.90 ±	80.70	80.65 ±	18.48	83.70	1.081
C049-B	25.00	0.148	80.60	0.071			
C050-A	25.49	25.51 ±	80.90	80.95 ±	18.59	83.50	0.764
C050-B	25.52	0.021	81.00	0.071			
C051-A	26.22	26.27 ±	80.90	80.80 ±	19.07	83.60	0.629
C051-B	26.31	0.064	80.70	0.141			
C052-A	26.33	26.44 ±	80.90	80.95 ±	18.57	83.90	0.396
C052-B	26.54	0.148	81.00	0.071			
C053-A	27.30	27.30 ±	80.70	80.55 ±	18.77	83.80	0.250
C053-B	27.30	0.000	80.40	0.212			
C054-A	26.24	26.26 ±	80.50	80.60 ±	18.15	83.50	0.334
C054-B	26.28	0.028	80.70	0.141			
C055-A	26.30	26.22 ±	80.70	80.65 ±	18.36	83.40	0.398
C055-B	26.13	0.120	80.60	0.071			
C056-A	29.06	29.05 ±	80.80	80.85 ±	19.39	83.80	0.114
C056-B	29.03	0.021	80.90	0.071			
C057-A	28.5	28.71 ±	81.10	81.05 ±	20.1	83.90	0.237
C057-B	28.91	0.290	81.00	0.071			
C058-A	27.49	27.45 ±	80.90	81.00 ±	19.3	83.40	0.326
C058-B	27.4	0.064	81.10	0.141			
C059-A	27.25	27.20 ±	81.20	81.20 ±	19.25	83.40	0.373
C059-B	27.15	0.071	81.20	0.000			
C060-A	25.65	25.62 ±	81.10	81.15 ±	18.23	83.80	0.552
C060-B	25.58	0.049	81.20	0.071			
C061-A	25.81	25.84 ±	81.00	80.95 ±	18.7	83.90	0.654
C061-B	25.87	0.042	80.90	0.071			
C062-A	27.46	27.30 ±	80.90	81.00 ±	19.16	83.80	0.328
C062-B	27.13	0.233	81.10	0.141			
C063-A	27.3	27.14 ±	80.60	80.50 ±	18.82	83.90	0.290
C063-B	26.97	0.233	80.40	0.141			
C064-A	27.54	27.31 ±	80.60	80.70 ±	19.71	84.10	0.477
C064-B	27.07	0.332	80.80	0.141			

C065-A	26.54	26.34 ±	81.00	80.95 ±	19.01	83.90	0.575
C065-B	26.13	0.290	80.90	0.071			
C066-A	25.29	25.39 ±	80.60	80.65 ±	18.75	83.70	0.928
C066-B	25.48	0.134	80.70	0.071			
C067-A	25.62	25.63 ±	80.90	80.85 ±	18.61	83.80	0.713
C067-B	25.63	0.007	80.80	0.071			
C068-A	26.23	26.20 ±	80.90	81.00 ±	18.95	84.20	0.608
C068-B	26.16	0.049	81.10	0.141			
C069-A	25.98	26.23 ±	80.70	80.55 ±	19.63	84.00	0.951
C069-B	26.48	0.354	80.40	0.0212			
C070-A	26.38	26.31 ±	80.40	80.45 ±	19.19	83.80	0.665
C070-B	26.23	0.106	80.50	0.071			
C071-A	24.85	25.07 ±	80.50	80.50 ±	18.12	83.70	0.746
C071-B	25.29	0.311	80.50	0.000			
C072-A	26.43	26.32 ±	80.60	80.70 ±	18.82	84.00	0.510
C072-B	26.21	0.156	80.80	0.141			
C073-A	26.7	26.62 ±	80.60	80.55 ±	18.82	84.20	0.415
C073-B	26.53	0.120	80.50	0.071			
C074-A	25.45	25.47 ±	80.50	80.70 ±	19.19	84.10	1.191
C074-B	25.48	0.021	80.90	0.283			
C075-A	27.24	27.07 ±	80.90	80.85 ±	19.31	83.60	0.425
C075-B	26.9	0.240	80.80	0.071			
C076-A	27.09	26.97 ±	81.10	81.15 ±	20.07	83.40	0.772
C076-B	26.85	0.170	81.20	0.071			
C077-A	25.62	25.69 ±	81.10	81.05 ±	18.74	83.40	0.749
C077-B	25.75	0.092	81.00	0.071			
C078-A	26.94	26.82 ±	81.20	81.25 ±	19.47	83.60	0.565
C078-B	26.7	0.170	81.30	0.071			
C079-A	28.96	29.06 ±	80.80	80.65 ±	20.99	83.70	0.343
C079-B	29.16	0.141	80.50	0.212			
C080-A	27.74	27.78 ±	80.30	80.40 ±	20.49	83.70	0.591
C080-B	27.81	0.049	80.50	0.141			

ANEXO 3. Prueba ANOVA y Tukey para análisis de varianza en expresión del gen MDR1, en relación a la enfermedad epilepsia.

Tabla 26. Tabla ANOVA para Expresión por Grupo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2392.27	1	2392.27	29.91	0.0000
Intra grupos	11517.9	144	79.9853		
Total (Corr.)	13910.2	145			

Tabla 27. Pruebas de Múltiples Rangos para Expresión por Grupo.
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Grupo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C	80	2.12083	X
E	66	10.2541	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
C - E	*	-8.13327	2.93954

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 4. Prueba ANOVA y Tukey para análisis de varianza en expresión del gen MDR1, en relación a la resistencia a fármacos antiepilépticos.

Tabla 28. Tabla ANOVA para Expresión por Grupo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	31.8315	1	31.8315	0.19	0.6613
Intra grupos	10511.7	64	164.246		
Total (Corr.)	10543.6	65			

Tabla 29. Pruebas de Múltiples Rangos para Expresión por Grupo.
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Grupo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
B	23	9.30452	X
A	43	10.762	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B		1.45748	6.61392

* indica una diferencia significativa.