



ORIGINAL

Variantes del gen *ABCB1* como factores de riesgo y factores moduladores de la edad de inicio en pacientes mexicanos con enfermedad desmielinizante



J.L. Guerrero Camacho^a, T. Corona Vázquez^b, J.J. Flores Rivera^b, A. Ochoa Morales^a, L. Martínez Ruano^a, I. Torres Ramírez de Arellano^a, D.J. Dávila Ortiz de Montellano^a y A. Jara Prado^{a,*}

^a Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Ciudad de México, México

^b Laboratorio Clínico de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Ciudad de México, México

Recibido el 30 de enero de 2020; aceptado el 5 de mayo de 2020

Accesible en línea el 8 de septiembre de 2020

PALABRAS CLAVE

Enfermedad desmielinizante;
Esclerosis múltiple;
Análisis de asociación;
Análisis de haplotipos;
Gen *ABCB1*;
Glicoproteína P

Resumen

Introducción: Las variantes *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1* alteran la función de la glicoproteína P y el transporte de sustancias endógenas y exógenas en la barrera hematoencefálica; además, actúan como factores de susceptibilidad para algunas enfermedades neurodegenerativas.

El objetivo del estudio fue determinar la asociación de polimorfismos *ABCB1* (*C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*), sus haplotipos y sus combinaciones de genotipos con la enfermedad desmielinizante.

Método: Se genotipificó a 199 pacientes con enfermedad desmielinizante y a 200 controles mestizos mexicanos mediante PCR-RFLP y secuenciación Sanger para comparar las frecuencias de alelos, genotipos, haplotipos y combinaciones de genotipos entre pacientes y controles. El análisis estadístico se realizó con regresión logística y χ^2 de Pearson al 95% de confianza; se calculó la OR y se evaluó la asociación con enfermedad desmielinizante.

Resultados: Los haplotipos *TTT* y *CGC* fueron los más frecuentes en pacientes y controles. El alelo *G2677* (OR = 1,79; IC 95%: 1,12-2,86; $p = 0,015$) muestra asociación con enfermedad desmielinizante, así como los genotipos *GG2677* (OR = 2,72; IC 95% = 1,11-6,68; $p = 0,025$) y *CC3435* (OR = 1,82; IC 95%: 1,15-2,90; $p = 0,010$) y su combinación *GG2677/CC3435* (OR = 2,02; IC 95%: 1,17-3,48; $p = 0,010$) y el haplotipo *CAT* (OR = 0,21; IC 95%: 0,05-0,66; $p = 0,001$).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aurelijara@yahoo.com.mx (A. Jara Prado).

<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.05.013>

0213-4853/© 2020 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Demyelinating disease;
Multiple sclerosis;
Association analysis;
Haplotype analysis;
ABCB1 gene;
P-glycoprotein

Los portadores *TTTTTT* presentaron la edad de inicio más temprana ($23,0 \pm 7,7$ vs. $31,6 \pm 10,7$; $p = 0,0001$).

Conclusiones: La combinación de genotipos *GG2677/CC3435* está asociada al desarrollo de enfermedad desmielinizante en esta muestra, principalmente en el sexo masculino, en el cual puede darse acumulación tóxica de sustratos de glicoproteína P.

En este estudio, la edad de inicio de la enfermedad desmielinizante podría ser modulada diferencialmente entre sexos por el alelo *G2677* del gen *ABCB1*.

© 2020 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

***ABCB1* gene variants as risk factors and modulators of age of onset of demyelinating disease in Mexican patients**

Abstract

Introduction: The C1236T, G2677T/A, and C3435T variants of the *ABCB1* gene alter the functioning of P-glycoprotein and the transport of endogenous and exogenous substances across the blood-brain barrier, and act as risk factors for some neurodegenerative diseases.

This study aimed to determine the association between demyelinating disease and the C1236T, G2677T/A, and C3435T variants of *ABCB1* and its haplotypes and combinations of genotypes.

Methods: Polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) and Sanger sequencing were used to genotype 199 patients with demyelinating disease and 200 controls, all Mexicans of mixed race; frequencies of alleles, genotypes, haplotypes, and genotype combinations were compared between patients and controls. We conducted a logistic regression analysis and calculated chi-square values and 95% confidence intervals (CI); odds ratios (OR) were calculated to evaluate the association with demyelinating disease.

Results: The *TTT* and *CGC* haplotypes were most frequent in both patients and controls. The *G2677* allele was associated with demyelinating disease (OR: 1.79; 95% CI: 1.12-2.86; $P = .015$), as were the genotypes *GG2677* (OR: 2.72; 95% CI: 1.11-6.68; $P = .025$) and *CC3435* (OR: 1.82; 95% CI: 1.15-2.90; $P = .010$), the combination *GG2677/CC3435* (OR: 2.02; 95% CI: 1.17-3.48; $P = .010$), and the *CAT* haplotype (OR: 0.21; 95% CI: 0.05-0.66; $P = .001$).

TTTTTT carriers presented the earliest age of onset (23.0 ± 7.7 years, vs. 31.6 ± 10.7 ; $P = .0001$).

Conclusions: The *GG2677/CC3435* genotype combination is associated with demyelinating disease in this sample, particularly among men, who may present toxic accumulation of P-glycoprotein substrates.

In our study, the *G2677* allele of *ABCB1* may differentially modulate age of onset of demyelinating disease in men and women.

© 2020 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La glicoproteína P (Gp-P) es una proteína transportadora de la barrera hematoencefálica (BHE) que extrae sustancias endógenas (péptidos, aminoácidos, hormonas esteroides, lípidos y fosfolípidos, entre otros) y exógenas (xenobióticos, incluyendo fármacos) del sistema nervioso central (SNC) hacia la sangre, manteniendo la homeostasis cerebral^{1,2}.

La Gp-P es codificada por el gen *ABCB1* (locus 7q21.12), el cual contiene variantes genéticas que potencialmente pueden alterar la función de Gp-P³; 3 resultan de especial interés por su gran variación interindividual e interétnica: *C1236T* (rs1128503), *G2677T/A* (rs2032582) y *C3435T* (rs1045642), cuyo haplotipo *CGC* (1236/2677/3435) es más

frecuente en caucásicos y africanos, mientras que el haplotipo *TTT* es el más frecuente en asiáticos³⁻⁶. De manera normal, Gp-P pierde gradualmente funcionalidad con la edad, lo que predispone a distintas enfermedades⁷, hecho que se acentúa en personas portadoras de una Gp-P con ciertos genotipos.

ABCB1 se expresa en gran variedad de células inmunitarias como monocitos, células dendríticas, linfocitos T y B (incluyendo células astrogiales y microgliales); Gp-P participa como mediadora del flujo de esteroides, prostaglandinas y citocinas en astrocitos reactivos implicados en la formación de lesiones y el proceso inflamatorio durante la esclerosis múltiple, lo que indica que tiene función inmunomoduladora^{8,9}, pero se desconoce cómo ejerce su acción durante la respuesta inmune.

Tabla 1 Datos clínicos y demográficos de la muestra

Variables	Pacientes		
	Mujer	Hombre	Total
Casos de enfermedad desmielinizante	139	60	199
Edad inicio	31,0 ± 10,9	29,7 ± 10,2	30,6 ± 10,7
Casos de esclerosis múltiple	64	40	104
Edad inicio	30,3 ± 10,8	28,7 ± 10,5	28,3 ± 9,9
EDSS inicial	3,2 ± 1,9	3,6 ± 2,2	3,3 ± 2,1
EDSS final	3,9 ± 2,6	4,3 ± 2,6	4,0 ± 2,6
Índice de progresión	0,62 ± 0,7	0,71 ± 0,8	0,66 ± 0,8
Años de evolución	8,9 ± 5,9	8,2 ± 4,7	8,6 ± 5,5
Casos de neuromielitis óptica	38	5	43
Edad de inicio	31,7 ± 12,5	32,0 ± 10,6	31,7 ± 12,3
Casos de neuritis óptica	28	9	37
Edad de inicio	33,4 ± 9,4	27,6 ± 7,8	31,9 ± 9,3
Casos síndrome clínico aislado	9	6	15
Edad de inicio	25,7 ± 7,7	38,3 ± 9,2	30,7 ± 10,3

Esclerosis múltiple: casos de EM remitente recurrente, EM secundaria progresiva y EM primaria progresiva.

El estrés oxidativo e inflamatorio puede alterar las uniones estrechas de la BHE, como probablemente sea el caso en varias enfermedades neurodegenerativas¹⁰. La alteración en la expresión y función de Gp-P en la BHE puede contribuir a la patogenia de los trastornos neuroinflamatorios, como en la esclerosis múltiple^{8,9}.

Diversas variantes de *ABCB1* se han asociado a diferentes enfermedades que implican eventos inflamatorios, como epilepsia¹¹, cáncer¹², enfermedades neurodegenerativas⁷ (Alzheimer¹³, Creutzfeldt Jakob¹⁴, Parkinson¹⁵ y otras⁷) y algunos padecimientos autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, cirrosis hepática, trombocitopenia autoinmune y artritis reumatoide, en las que condicionan resistencia a agentes antineoplásicos, antidepresivos o inmunosupresores¹⁶.

Las enfermedades que afectan a la mielina sana, generalmente por defectos metabólicos que condicionan su destrucción, se denominan enfermedades desmielinizantes (ED). La esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria desmielinizante, neurodegenerativa, crónica y multifactorial del SNC, en la que factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en la susceptibilidad: esta es la ED más frecuente, seguida de la neuromielitis óptica y de la neuritis óptica, entre otras, donde la esclerosis múltiple es causa importante de discapacidad en adultos jóvenes¹⁷.

La esclerosis múltiple es más frecuente en mujeres, aunque los hombres afectados suelen desarrollar cuadros más graves de la enfermedad^{18,19}; en poblaciones asiáticas, además de la alta prevalencia en mujeres, se han observado diferencias en la respuesta al tratamiento asociadas a los genotipos de *ABCB1*^{16,20}.

El objetivo de este estudio fue determinar la asociación y participación de las variantes *ABCB1* (*C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T*), sus haplotipos y sus combinaciones de genotipos en las enfermedades desmielinizantes.

Material y métodos

Se estudió a 199 pacientes con ED no relacionados (tabla 1), que incluían 104 casos de esclerosis múltiple (remitente recurrente, secundaria progresiva y primaria progresiva), 43 de neuromielitis óptica, 37 de neuritis óptica y 15 de síndrome clínico aislado, atendidos en la Clínica de Enfermedades Desmielinizantes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez de Ciudad de México (México). No se incluyeron los antecedentes familiares de enfermedad desmielinizante.

También se estudió a 200 sujetos controles, sin datos clínicos de enfermedad neurológica o autoinmune y sin antecedentes familiares de enfermedad desmielinizante (129 mujeres y 71 hombres) con edad promedio de 31,0 ± 10,3 años del banco de ADN del Instituto Manuel Velasco Suárez.

El protocolo fue aprobado por el Comité Científico y el Comité de Ética en Investigación del Instituto. Pacientes y controles eran descendientes de padres y abuelos mexicanos. Previo consentimiento informado, se tomó muestra sanguínea para extracción de ADN mediante método estándar.

La genotipificación de *C1236T* y *C3435T* se llevó a cabo mediante PCR-RFLP de acuerdo con Cascorbi et al.²¹. La variante *G2677T/A* fue genotipificada mediante secuenciación Sanger usando un analizador genético ABI Prism 3130 y oligonucleótidos diseñados por Cascorbi et al., empleando ABI Prism BigDye Terminator® v3.1 (Applied Biosystems, EE. UU.).

Los haplotipos y las combinaciones de genotipos se conformaron de acuerdo con reportes previos, siguiendo la secuencia de las variantes en el ADN codificante (1236/2677/3435)^{22,23}, con el que se obtuvieron 54 combinaciones de genotipos.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.) y el SNPstats para el análisis de haplotipos²⁴. Las frecuencias genotípicas y

alélicas en el grupo control estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg. La estadística paramétrica se hizo mediante la prueba t de Student y la no paramétrica por regresión logística y χ^2 para determinar diferencias entre grupos, y se calculó la OR al 95% de confianza para determinar la asociación con ED.

Adicionalmente, se obtuvo información clínica de los casos de esclerosis múltiple, como edad de inicio desde el primer síntoma compatible con la enfermedad; puntuaciones de EDSS²⁵ inicial, reportado en la primera consulta, y EDSS final, que corresponde al reportado al momento de la toma de sangre para extracción de ADN, y años de evolución, desde el primer síntoma hasta la obtención de muestra, para calcular la tasa media de progresión anualizada o índice de progresión (IP=EDSS final/años de evolución). Se agruparon las formas clínicas de esclerosis múltiple en un solo grupo para evitar la disminución del poder estadístico. Se analizó esta información respecto a genotipos, combinaciones de genotipos y haplotipos *ABCB1* mediante modelos de regresión lineal y prueba t de Student, considerando una p significativa menor de 0,05.

Resultados

Se presentan los datos clínicos y demográficos (tabla 1), las frecuencias genotípicas y alélicas, así como el análisis de asociación de las variantes *ABCB1* en pacientes con ED y controles (tabla 2), modelos de regresión logística para genotipos y alelos *ABCB1* (tabla 3), el análisis de asociación entre casos y controles portadores y no portadores de combinaciones de genotipos *ABCB1* (tabla 4), el análisis de asociación para haplotipos entre casos y controles (tabla 5) y modelos de regresión lineal entre portadores y no portadores de variantes *ABCB1* respecto a la edad de inicio de una ED (tabla 6).

Genotipos y alelos

La variante *C1236T* no presentó diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas entre pacientes y controles (tabla 2).

La distribución heterogénea de la variante *G2677T/A* (tabla 2) resulta en mayor frecuencia del alelo *G2677* en pacientes, asociado como factor de riesgo para ED en ambos sexos, en la que el genotipo *GG2677* presentó asociación en hombres y *GT2677* se asoció en mujeres. El genotipo *TT2677* y el alelo *A2677* estuvieron asociados a protección contra ED.

La variante *C3435T* presentó un genotipo *CC3435* significativamente más frecuente en pacientes de ambos sexos, pero los hombres tuvieron mayor riesgo de tener ED. El alelo *C3435* se asoció como factor de riesgo para hombres, mientras que el alelo *T3435* protege a ambos sexos.

La tabla 3 presenta los modelos finales de regresión logística para alelos y genotipos de las variantes *ABCB1* en estudio. La primera parte muestra el análisis de los alelos que se fueron excluyendo hasta que quedó solo el alelo *G2677*, asociado a riesgo de desarrollo de ED (OR=2,07), y el alelo *T3435*, asociado a protección (OR=0,57), su significación se pierde al excluir del análisis el alelo *C3435*.

La segunda parte de la tabla se refiere a los genotipos que se fueron excluyendo hasta obtener el modelo final, que corresponde al genotipo *GT2677*, asociado a riesgo de ED (OR=1,95), y al *CT3435*, asociado a protección (OR=0,51).

Combinaciones de genotipos

Se identificaron 32 de 54 combinaciones de genotipos posibles. La más frecuente en pacientes y controles fue *CTGTCT* (P 51, 25,6%; C 47, 23,5%) seguida por *TTTTTT* (P 24, 12,1%; C 29, 14,5%) y *CCGGCC* (P 24, 12,1%; C 15, 7,5%), sin diferencia entre grupos.

La combinación *CTGGCC* (P 12, 6%; C 7, 3,5%) fue más frecuente en pacientes masculinos (4, 6,7%), sin presencia en controles (0%), sin diferencia entre mujeres (P 8, 5,8%; C 7, 5,4%). El cálculo del riesgo incluyó a los portadores de genotipos *GG2677* y *CC3435* [*CTGGCC*, *CCGGCC* (P 0, C 0) y *TTGGCC* (P 7, 3,5%; C 2, 1%)], combinación denominada «*GGCC*», que fue asociada a riesgo de ED (OR=2,02), principalmente en hombres (OR=3,65) (tabla 4).

La combinación de genotipos *CTGTTT* (P 12, 6%; C 6, 3%) tuvo frecuencias similares entre hombres (P 1, 1,7%; C 1, 1,4%) y mayor frecuencia en mujeres (P 11, 7,9%; C 5, 3,9%), por lo que agrupamos a los portadores de combinaciones similares [*CTGTTT*, *CCGTTT* (P 0, C 0) y *TTGTTT* (P 7, 3,5%; C 3, 1,5%)] que incluyen a sujetos portadores de genotipos *GT2677* y *TT3435*, para obtener la combinación «*GTTT*», que resultó asociada a riesgo de ED en mujeres (OR=2,67) (tabla 4).

La combinación *TTTTCT* (P 2, 1%, C 12, 6%) protege a las mujeres contra ED (OR=0,11) debido a que incluye el genotipo *TT2677* y el alelo *T3435*, que confieren protección; así mismo, la combinación *CCGACT* (P 1, 0,5%; C 8, 4%) protege a ambos sexos (OR=0,12) por contener los alelos de protección *A2677* y *T3435* (tabla 4).

Las demás combinaciones de genotipos presentaron frecuencias similares entre pacientes y controles.

Haplotipos

La tabla 5 muestra los 12 haplotipos identificados en pacientes y controles: *TTT* es el más frecuente en ambos grupos (36,6 y 38,5%, respectivamente), seguido de *CGC* (32,7% y 26,1%, respectivamente). El haplotipo *CAT* está asociado a ED como factor de protección en ambos sexos. Los haplotipos *CTC*, *CTT*, *TAC* y *TAT* presentaron frecuencias inferiores al 1% en ambos grupos.

Edad de inicio

Los parámetros clínicos evaluados en los pacientes varían dependiendo de las variantes genéticas que presente cada sujeto y son diferentes entre sexos. Las diferencias encontradas se observan en la tabla 6, en la que se muestra un efecto modulador de la edad de inicio en pacientes con ED portadores de alguna variante *ABCB1*.

La variante *C1236T* presentó un efecto de retraso en la edad de inicio de 3,2 años cuando está presente el genotipo heterocigoto *CT1236* respecto a los no portadores.

Tabla 2 Análisis de asociación de genotipos y alelos de las variantes *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* del gen *ABCB1* en pacientes con ED y controles mexicanos

Variante	Controles						Pacientes						Análisis de		
	Mujer		Hombre		Total		Mujer		Hombre		Total		asociación		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	OR	IC 95%	p
C1236T															
CC	21	16,3	15	21,1	36	18,0	27	19,4	10	16,7	37	18,6	1,04	0,63-1,73	0,898
CT	63	48,8	26	36,6	89	44,5	64	46,0	29	48,3	93	46,7	1,09	0,74-1,62	0,688
TT	45	34,9	30	42,3	75	37,5	48	34,5	21	35,0	69	34,7	0,88	0,59-1,33	0,603
Total	129	100	71	100	200	100	139	100	60	100	199	100			
C	105	40,7	56	39,4	161	40,2	118	42,4	49	40,8	167	41,9	1,13	0,75-1,70	0,603
T	153	59,3	86	60,6	239	59,8	160	57,6	71	59,2	231	58,1	0,96	0,58-1,60	0,878
G2677T/A															
GG	35	27,1	9	12,7	44	22,0	39	28,1	17	28,3	56	28,1	2,72	1,11-6,68	0,025
GT	50	38,8	35	49,3	85	42,5	70	50,4	31	51,7	101	50,8	2,11	1,29-3,45	0,003
GA	8	6,2	5	7,0	13	6,5	5	3,6	0	0,0	5	2,5	0,37	0,13-1,06	0,089
TT	28	21,7	19	26,8	47	23,5	20	14,4	10	16,7	30	15,1	0,58	0,35-0,96	0,033
TA	8	6,2	3	4,2	11	5,5	5	3,6	1	1,7	6	3,0	0,53	0,19-1,47	0,322
AA	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0	1	1,7	1	0,5			
Total	129	100	71	100	200	100	139	100	60	100	199	100			
G	128	49,6	58	40,8	178	46,5	153	55,0	65	54,1	218	54,7	1,79	1,12-2,86	0,015
T	114	44,2	76	53,5	190	47,5	115	41,4	52	43,4	167	42,0	0,90	0,59-1,38	0,663
A	16	6,2	8	5,6	24	6,0	10	3,6	3	2,5	13	3,3	0,47	0,23-0,97	0,037
C3435T															
CC	31	24,0	8	11,3	39	19,5	42	30,2	19	31,7 ^a	61	30,7 ^b	^a 3,65 ^b 1,82	1,46-9,11 1,15-2,91	0,004 0,010
CT	69	53,5	43	60,6	112	56,0	63	45,3	29	48,3	92	46,2	0,68	0,45-1,00	0,051
TT	29	22,5	20	28,2	49	24,5	34	24,5	12	20,0	46	23,1	0,93	0,58-1,47	0,745
Total	129	100	71	100	200	100	139	100	60	100	199	100			
C	131	50,7	59	41,6	190	47,5	147	52,8	67	55,8	214	53,8	1,77	1,09-2,91	0,022
T	127	49,2	83	58,4	210	52,5	171	47,2	53	44,2	184	46,2	0,27	0,11-0,68	0,004

Tabla 3 Modelos de regresión logística entre las variantes del gen *ABCB1*

Modelo final para alelos

	B	Error estándar	Wald	gl	p	Exp(B)	IC 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
<i>G2677</i>	0,727	0,282	6,663	1	0,010	2,069	1,191	3,592
<i>C3435</i> ^a	−0,536	0,287	3,491	1	0,062	0,585	0,334	1,027
<i>T3435</i>	−0,559	0,247	5,135	1	0,023	0,572	0,353	0,927
Constante	0,380	0,535	0,505	1	0,477	1,462		

Modelo final para genotipos

	B	Error estándar	Wald	gl	p	Exp(B)	IC 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
<i>GT2677</i>	0,670	0,230	8,496	1	0,004	1,954	1,245	3,065
<i>CT3435</i>	−0,678	0,229	8,730	1	0,003	0,508	0,324	0,796
Constante	−0,101	0,361	0,078	1	0,780	0,904		

^a Necesario para conservar la significación de *G2677* y *T3435*.

Tabla 4 Análisis de asociación de combinaciones de genotipos de las variantes *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T ABCB1* en pacientes con ED y controles mexicanos

Combinación	Mujeres				Hombres				Análisis de asociación		
	Caso		Control		Caso		Control		OR	IC 95%	p
1236/2677/3435	n	%	n	%	n	%	n	%			
GGCC					13	21,7	5	7,0	3,65	1,22-10,94	0,015
GGCC	30	21,6	19	14,7	13	21,7	5	7,0	2,02	1,17-3,48	0,010
GTTT	16	11,5	6	4,7	3	5,0	3	4,2	2,67	1,01-7,04	0,041
TTTTCT	1	0,7	8	6,2					0,11	0,01-0,89	0,016
TTTTCT	1	0,7	8	6,2	1	1,7	4	5,6	0,16	0,03-0,72	0,011
CCGACT	1	0,7	4	3,1	0	0,0	4	5,6	0,12	0,01-0,98	0,037

Tabla 5 Análisis de asociación de haplotipos de las variantes *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T ABCB1* en pacientes con ED y controles mexicanos

Haplotipo	rs1128503	rs2032582	rs1045642	Pacientes (n = 199)		Controles (n = 200)		Análisis de asociación		
	<i>C1236T</i>	<i>G2677T/A</i>	<i>C3435T</i>	n	%	n	%	OR	IC 95%	p
1	T	T	T	73	36,6	77	38,5	1		
2	C	G	C	65	32,7	52	26,1	0,72	0,51-1,04	0,078
3	T	G	C	27	13,4	20	9,9	0,71	0,44-1,15	0,170
4	C	G	T	11	5,6	14	7,2	1,12	0,58-2,14	0,740
5	T	T	C	9	4,5	15	7,6	1,60	0,81-3,13	0,170
6	T	G	T	6	3,1	7	3,3	1,00	0,39-2,56	1,000
7	C	A	C	5	2,8	4	2,1	0,79	0,30-2,04	0,620
8	C	A	T	0	0	7	3,5	0,21	0,07-0,62	0,003
9 ^a	C	T	C	0	0,2	3	1,4	0,93 ^a	0,25-3,44	0,910
10 ^a	C	T	T	1	0,7	0	0			
11 ^a	T	A	C	0	0,2	1	0,4			
12 ^a	T	A	T	1	0,2	NA	NA			

IC: intervalo de confianza; NA: no aplicable.

^a Haplotipos raros con frecuencia menor del 1%.

El alelo *G2677* también retrasa la edad de inicio por 6,3 años, pero, en mujeres, el efecto de retraso es más pronunciado: prácticamente 10 años. Este alelo conserva su efecto modulador al combinarse con el alelo *T2677* en mujeres heterocigotas *GT2677*, por 4,6 años respecto a las no portadoras.

La presencia de la variante heterocigota *CT3435* modula prácticamente la misma cantidad de años de retraso que el genotipo *CT1236* (3,1 años).

La combinación heterocigota de las 3 variantes analizadas (*CTGTCT*) retrasa el desarrollo de una ED hasta 5,4 años respecto a los portadores de cualquier otra combinación de genotipos, cuya media es de $29,2 \pm 10,6$ años.

La combinación *TTTTTT*, por otro lado, anticipa la edad de inicio 8,6 años respecto a los no portadores.

Las mujeres portadoras de la combinación *CCGGCT* presentaron edad de inicio promedio de 42,4 años: 11,8 años más tarde que el resto de las mujeres.

En el sexo masculino, el modelo de regresión lineal prácticamente no arrojó diferencias significativas para la edad de inicio, salvo para un individuo portador de la combinación *TTTTCT*, que empezó a los 62 años, con diferencia de 32,7 años respecto a los demás.

Índice de progresión

El índice de progresión presentó asociación con el alelo *G2677* entre portadores y no portadores ($0,72 \pm 0,9$ vs. $0,44 \pm 0,3$; $p = 0,029$); también con la combinación de genotipos *CCGGCC* entre hombres y mujeres ($0,90 \pm 0,5$ vs. $0,27 \pm 0,3$; $p = 0,043$) y con el haplotipo *CGC* en hombres portadores respecto a los no portadores ($1,01 \pm 1,1$ vs. $0,41 \pm 0,3$; $p = 0,043$).

Discusión

Diversos estudios han proporcionado suficiente evidencia para demostrar que la combinación de las variantes *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* juega un papel clave en la modificación de la expresión de *ABCB1* y que la función de Gp-P¹⁶ está asociada al desarrollo de enfermedades²³ y, por lo tanto, influye en la respuesta a la terapia con sustratos de Gp-P¹⁶.

La expresión de Gp-P vascular en la BHE disminuye en lesiones de esclerosis múltiple: su desaparición coincide con la presencia de infiltrados perivasculares formados

Tabla 6 Modelo de regresión lineal entre variantes *ABCB1* y edad de inicio de EM

Variables 1236/2677/3435	N (199)	Media $\pm$ DE	CNE		IC al 95% para B		CE Beta	t	p
			B	Error estándar	Límite inferior	Límite superior			
<i>CT1236</i>	94	32,3 $\pm$ 9,8	-3,246	1,503	-6,21	-0,28	-0,152	-2,160	0,032
Complemento	105	29,1 $\pm$ 11,3	35,587	2,419	30,82	40,36			
<i>G2677</i>	163	31,8 $\pm$ 10,5	-6,299	1,903	-10,05	-2,55	-0,229	-3,311	0,001
Complemento	36	25,5 $\pm$ 10,1	38,084	2,373	33,41	42,76			
<i>CT3435</i>	93	32,3 $\pm$ 10,8	-3,062	1,506	-6,03	-0,09	-0,143	-2,033	0,043
Complemento	106	29,2 $\pm$ 10,5	35,320	2,431	30,53	40,11			
<i>CTGTCT</i>	52	34,6 $\pm$ 10,0	-5,399	1,687	-8,73	-2,07	-0,222	-3,200	0,002
Complemento	147	29,2 $\pm$ 10,6	40,015	3,027	34,04	45,98			
<i>TTTTTT</i>	24	23,0 $\pm$ 7,7	8,612	2,254	4,17	13,06	0,262	3,821	0,000
Complemento	175	31,6 $\pm$ 10,7	14,430	4,300	5,95	22,91			
Mujeres									
<i>G2677</i>	115	32,8 $\pm$ 11,0	-9,974	2,263	-14,45	-5,50	-0,351	-4,408	0,000
Complemento	24	22,8 $\pm$ 5,3	42,748	2,804	37,20	48,29			
<i>GT2677</i>	71	33,2 $\pm$ 10,1	-4,558	1,810	-8,14	-0,98	-0,210	-2,518	0,013
Complemento	68	28,7 $\pm$ 11,2	37,798	2,850	32,16	43,43			
<i>CCGGCT</i>	5	42,4 $\pm$ 18,8	-11,830	4,885	-21,49	-2,17	-0,202	-2,421	0,017
Complemento	134	30,6 $\pm$ 10,4	54,230	9,639	35,17	73,29			
Hombres									
<i>TTTTCT</i>	1	62,0	-32,797	9,486	-51,78	-13,81	-0,413	-3,458	0,001
Complemento	59	29,2 $\pm$ 9,4	94,797	18,852	57,06	132,53			

CE: coeficientes estandarizados; CNE: coeficientes no estandarizados.

por linfocitos⁹. Esta función disminuida de Gp-P durante la neuroinflamación puede alterar la homeostasis cerebral y agravar la progresión de la enfermedad a través de la exposición de células del SNC vulnerables a compuestos perjudiciales^{8,9}.

Las diferentes combinaciones de genotipos de riesgo encontradas en este estudio («GGCC» y «GTTT») indican que Gp-P funciona de manera diferente en ambos sexos, lo que apoya la teoría de que las proteínas transportadoras se expresan diferencialmente entre sexos y tienen contribución importante en la distribución de fármacos y en el desarrollo de toxicidad²⁶. Se sabe que la variante G2677T/A produce un cambio de aminoácido (Ala893Ser/Thr) donde Ser893 y Thr893 son susceptibles de fosforilación y glicosilación, pero no Ala893, que altera la conformación estructural, el plegamiento adecuado, la degradación proteica, el tráfico, la localización y la función de Gp-P^{26,27}, mientras que las variantes C1236T y C3435T generan cambios conformacionales en el ARNm que conducen a inestabilidad y alteran la vida media de Gp-P^{3,6}. Esto influye en el metabolismo y eliminación de sustancias tóxicas o cancerígenas, ya que ocasiona el acúmulo intracelular de metabolitos, causa daño celular, altera la apoptosis y provoca defectos en la respuesta inmune o el desarrollo de cáncer¹².

En este estudio, el genotipo GT2677 codifica el fenotipo Ala/Ser893, en el que solo habría riesgo cuando se exprese G para traducir Ala893, pero no cuando se exprese T para traducir Ser893, lo que implica mejor funcionamiento de Gp-P en mujeres. Por el contrario, el genotipo GG2677 en hombres produce el fenotipo Ala/Ala893, de modo que la estructura y función de Gp-P permanece siempre alterada, lo que finalmente se traduce en mayor riesgo de complicaciones por la enfermedad y deficiencia en la función de Gp-P. Los resultados encontrados referentes al índice de progresión apoyan esta idea, ya que los hombres portadores del alelo G2677, combinación de genotipos CCGGCC y haplotipo CGC, tuvieron los cuadros más graves de la enfermedad.

Complementando lo anterior, se ha visto que la combinación de G2677T/A y C3435T induce liberación variable de citocinas dependiente de sus genotipos¹, lo que también influye en el proceso inflamatorio y en la gravedad de los pacientes con ED.

El buen o mal pronóstico de las ED depende del sexo, considerado factor de riesgo para desarrollar esclerosis múltiple en mujeres¹⁸, y la edad de inicio, variable entre sexos con influencia sobre las características y evolución de la enfermedad^{18,28-30}.

Las hormonas sexuales pueden desempeñar un papel modulador sobre los circuitos de inflamación, neurodegeneración y reparación neuronal que intervienen en la esclerosis múltiple^{18,19}. Estrógenos y progesterona pueden elevar los niveles de Gp-P y actuar como sustratos de ella³¹, mientras que la testosterona inhibe la Gp-P³², vuelve más vulnerables los oligodendrocitos al daño excitotóxico¹⁹; en mujeres con esclerosis múltiple, el nivel de testosterona es menor durante la exacerbación de la enfermedad, no así en hombres¹⁹. De ahí que el sexo femenino sea considerado factor de buen pronóstico, pues con frecuencia las mujeres desarrollan cuadros menos agresivos de esclerosis múltiple. Por el contrario, los hombres con esta enfermedad tienden a presentar sintomatología más grave, por lo que el sexo

masculino está asociado con peor pronóstico¹⁹. Nuestros resultados complementan estas investigaciones, ya que las variantes *ABCB1* estratifican a ambos sexos, de modo que los hombres y mujeres portadores de genotipos de riesgo pueden presentar mayores complicaciones en cuanto a síntomas de la enfermedad y respuesta a tratamientos, mientras que los portadores de genotipos protectores en ambos sexos pueden tener mejor recuperación y respuesta al tratamiento. Esto refleja que la función de Gp-P y su interacción con hormonas sexuales también dependen de los genotipos *ABCB1*. Este estudio señala, además, que la edad de inicio también depende de las variantes *ABCB1* y confirma la importancia de las variantes sexo-específicas de proteínas transportadoras en el estudio de las ED^{29,33}.

Estos hallazgos podrían ser útiles en el tratamiento de la enfermedad, ya que una terapia aplicada tardíamente suele ser menos efectiva que su aplicación temprana y, en el caso de las ED, un tratamiento precoz suele incluso retrasar la conversión de síndrome clínico aislado a esclerosis múltiple³⁴.

Los factores de riesgo encontrados en este estudio (G2677, GG2677, CC3435, GGCC y GTTT) han sido considerados como factores predictivos en el inicio de cáncer y enfermedades autoinmunes en poblaciones de China, Japón y España, entre otras^{12,23,35-37}, por lo que podrían emplearse como marcadores predictivos de ED en pacientes mexicanos. Las frecuencias alélicas y genotípicas de este estudio fueron similares a las de reportes previos en población mexicana clínicamente sana³⁸ y similares también a población china, japonesa y rusa^{3,5,16,35,39}.

Los genotipos GG2677 y CC3435 favorecen el transporte lento de sustratos de Gp-P en sujetos asiáticos y caucásicos-españoles^{4,5,16,22,37,40}, lo que implica un transporte lento de sustancias endógenas y exógenas que sean sustratos de Gp-P, como reportaron Cotte et al., en pacientes con esclerosis múltiple tratados con mitoxantrona⁴⁰. Esto señala que los pacientes portadores de estos genotipos podrían tener acúmulo tóxico de sustratos endógenos o exógenos, y podrían responder en forma similar a poblaciones asiáticas a los fármacos que sean sustratos de Gp-P. Las combinaciones de genotipos también se han asociado con las propiedades farmacocinéticas de fármacos que son sustratos de Gp-P en poblaciones asiáticas^{5,22,37}.

La similitud entre mexicanos y asiáticos se confirmó con la identificación de los haplotipos TTT, CGC y TGC en pacientes y controles (tabla 5)^{5,16,22} con frecuencias diferentes a las reportadas en caucásicos y africanos⁴⁻⁶. Incluso en población china con enfermedad autoinmune se reportó que el haplotipo TTT es más común que TAT, y que CAC es más frecuente que CTC¹⁶, igual que en esta muestra de población mexicana (tabla 5).

Varios estudios han reportado la importancia de analizar las combinaciones de genotipos *ABCB1*, lo que sería de gran valor para predecir la actividad de Gp-P^{6,22}, la farmacocinética²², la respuesta a tratamientos^{1,16,22,40} y la asociación a enfermedades. Nuestros resultados son congruentes con tales hallazgos, por lo que pensamos que la Gp-P está involucrada y comparte mecanismos fisiológicos y patológicos de las ED con otros trastornos autoinmunes¹⁰, en los que, probablemente, dentro del SNC existe un ambiente lo suficientemente tóxico para degenerar el

sistema, aunque se necesitan más estudios. Es probable que las variantes *ABCB1* de riesgo estén presentes en pacientes en quienes la ED puede ser el resultado del acúmulo de sustancias durante años⁷, lo que finalmente puede dañar a las células portadoras de Gp-P deficiente, al estresar y debilitar las células de la BHE¹⁰ y favorecer la respuesta inmune en un intento por restaurar estos daños³⁰.

La mayor frecuencia de variantes de riesgo identificada en pacientes con ED indica que la función de Gp-P en el SNC depende de la combinación de variantes *ABCB1*, y la genotipificación temprana puede contribuir a que los pacientes reciban el tratamiento adecuado a sus genotipos *ABCB1* para mejorar su estado de salud.

Así mismo, estos hallazgos toman mayor relevancia, ya que son la base para desarrollar protocolos encaminados a identificar sujetos en riesgo de ED, biomarcadores que ayuden a un diagnóstico oportuno y certero y, al correlacionarlos con la evolución y respuesta a los medicamentos modificadores de la enfermedad, personalizar el tratamiento y llevar la investigación básica a la práctica clínica con mejores modelos de diagnóstico y tratamiento de las ED.

Conclusiones

En este estudio, las combinaciones de genotipos *GGCC* en hombres y *GTTT* en mujeres pueden mostrar asociación con el desarrollo de ED, cuyos portadores podrían tener acumulación tóxica de sustratos de Gp-P.

El haplotipo *TTT* en la muestra tiene mayor frecuencia y es similar a poblaciones asiáticas.

La edad de inicio en ED podría ser modulada diferencialmente entre sexos por el alelo *G2677* del gen *ABCB1*.

Financiación

La presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público, sector comercial o entidades sin ánimo de lucro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Pawlik A, Baskiewicz-Masiuk M, Machalinski B, Kurzawski M, Gawronska-Szklarz B. Involvement of C3435T and G2677T multi-drug resistance gene polymorphisms in release of cytokines from peripheral blood mononuclear cells treated with methotrexate and dexamethasone. *Eur J Pharmacol*. 2005;528:27–36.
- Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, et al. Very important pharmacogene summary: *ABCB1* (MDR1 P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21:152–61.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75:13–33.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70:189–99.
- Xu P, Jiang ZP, Zhang BK, Tu JY, Li HD. Impact of MDR1 haplotypes derived from C1236T G2677T/A and C3435T on the pharmacokinetics of single-dose oral digoxin in healthy Chinese volunteers. *Pharmacology*. 2008;82:221–7.
- Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (*ABCB1*) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794:860–71.
- Bartels AL, Kortekaas R, Bart J, Willemsen AT, de Klerk OL, de Vries JJ, et al. Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: A possible role in progressive neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 2009;30:1818–24.
- Kooij G, Backer R, Koning JJ, Reijerkerk A, van Horssen J, et al. P-glycoprotein acts as an immunomodulator during neuroinflammation. *PLoS One*. 2009;4:e8212.
- Kooij G, Mizee MR, van Horssen J, Reijerkerk A, Witte ME, Drexhage JA, et al. Adenosine triphosphate-binding cassette transporters mediate chemokine (C-C motif) ligand 2 secretion from reactive astrocytes: Relevance to multiple sclerosis pathogenesis. *Brain*. 2011;134(Pt 2):555–70.
- Miller DS. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31:246–54.
- Kwan P, Wong V, Ng PW, Lui CH, Sin NC, Poon WS, et al. Gene-wide tagging study of association between *ABCB1* polymorphisms and multidrug resistance in epilepsy in Han Chinese. *Pharmacogenomics*. 2009;10:723–32.
- Gutierrez-Rubio SA, Quintero-Ramos A, Duran-Cardenas A, Franco-Topete RA, Castro-Cervantes JM, et al. 1236C/T and 3435C/T polymorphisms of the *ABCB1* gene in Mexican breast cancer patients. *Genet Mol Res*. 2015;14:1250–9.
- Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W, et al. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics*. 2002;12:535–41.
- Vogelgesang S, Glatzel M, Walker LC, Kroemer HK, Aguzzi A, Warzok RW. Cerebrovascular P-glycoprotein expression is decreased in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol*. 2006;111:436–43.
- Vautier S, Fernandez C. *ABCB1*: The role in Parkinson's disease and pharmacokinetics of antiparkinsonian drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009;5:1349–58.
- Xuan M, Li H, Fu R, Yang Y, Zhang D, Zhang X, et al. Association of *ABCB1* gene polymorphisms and haplotypes with therapeutic efficacy of glucocorticoids in Chinese patients with immune thrombocytopenia. *Hum Immunol*. 2014;75:317–21.
- Bermejo V, Blasco Q, Sánchez L, García M. Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. Concepto, clasificación y epidemiología. *Medicine*. 2011;10:5065–8.
- Tintoré M, Arrambide G. Early onset multiple sclerosis: The role of gender. *J Neurol Sci*. 2009;286:31–4.
- Tomassini V, Pozzilli C. Sex hormone s, brain damage and clinical course of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2009;286:35–9.
- Huang D. Challenges in randomized controlled trials and emerging multiple sclerosis therapeutics. *Neurosci Bull*. 2015;31:745–54.
- Cascorbi I, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:169–74.
- Kim KA, Park PW, Park JY. Effect of *ABCB1* (MDR1) haplotypes derived from G2677T/C3435T on the pharmacokinetics of amlodipine in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;63:53–8.

23. Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, Kamory E, Csokay B, Andrikovics H, et al. Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res.* 2008;32:1214–20.
24. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006;22:1928–9.
25. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33:1444–52.
26. Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: Function and regulation. *Pharmacol Rev.* 2010;62:1–96.
27. Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obayama K, Kim G, et al. Quantitative structure-activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry.* 2007;46:7678–93.
28. Álvarez Pinzón AM. Neuromielitis óptica. *Patología, diagnóstico y tratamiento en el siglo XXI. Rev Salud Bosque.* 2012;2:35–45.
29. Cossburn M, Ingram G, Hirst C, Ben-Shlomo Y, Pickersgill TP, Robertson NP. Age at onset as a determinant of presenting phenotype and initial relapse recovery in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2012;18:45–54.
30. Fernández O, Martín R, Rovira A, Llufríu S, Vidal-Jordana A, Fernández-Sánchez VE, et al. Biomarkers in multiple sclerosis: An update for 2014. *Rev Neurol.* 2014;58:553–70.
31. Coles LD, Lee IJ, Voulalas PJ, Eddington ND. Estradiol and progesterone-mediated regulation of P-gp in P-gp overexpressing cells (NCI-ADR-RES) and placental cells (JAR). *Mol Pharm.* 2009;6:1816–25.
32. Cui YJ, Cheng X, Weaver YM, Klaassen CD. Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (*Mdr1a*, *Mdr1b*, *Mdr2*) in mice. *Drug Metab Dispos.* 2009;37:203–10.
33. Sundar PD, Feingold E, Minster RL, De Kosky ST, Kamboh MI. Gender specific association of ATP-binding cassette transporter 1 (*ABCA1*) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2007;28:856–62.
34. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol.* 2012;11:157–69.
35. Osuga T, Sakaeda T, Nakamura T, Yamada T, Koyama T, Tamura T, et al. MDR1 C3435T polymorphism is predictive of later onset of ulcerative colitis in Japanese. *Biol Pharm Bull.* 2006;29:324–9.
36. Urcelay E, Mendoza JL, Martín MC, Mas A, Martínez A, Taxonera C, et al. MDR1 gene: Susceptibility in Spanish Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:33–7.
37. Yang QF, Chen BL, Zhang QS, Zhu ZH, Hu B, He Y, et al. Contribution of MDR1 gene polymorphisms on IBD predisposition and response to glucocorticoids in IBD in a Chinese population. *J Dig Dis.* 2015;16:22–30.
38. Ortega-Vázquez A, Dorado P, Fricke-Galindo I, Jung-Cook H, Monroy-Jaramillo N, Martínez-Juárez IE, et al. CYP2C9, CYP2C19 ABCB1 genetic polymorphisms and phenytoin plasma concentrations in Mexican-mestizo patients with epilepsy. *Pharmacogenomics J.* 2016;16:286–92.
39. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1 NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;59:303–12.
40. Cotte S, von Ahsen N, Kruse N, Huber B, Winkelmann A, Zettl UK, et al. ABC-transporter gene-polymorphisms are potential pharmacogenetic markers for mitoxantrone response in multiple sclerosis. *Brain.* 2009;132(Pt 9):2517–30.