LACTRIMS
LATIN AMERICAN COMMITTEE FOR TREATMENT AND RESEARCH IN MULTIPLE SCLEROSIS

RESOLUCIÓN N° 12
(10/11/19)

El Comité Ejecutivo de LACTRIMS resuelve aprobar la financiación y dar el aval Cientifico al Proyecto de Investigación presentado por el Dr. Miguel Angel Macias y Colaboradores : "**POLIMORFISMO RS6265 DEL GEN *BDNF* Y SU ASOCIACIÓN CON EL DETERIORO COGNITIVO EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE**.".
El mismo cuenta con informe Técnico favorable del Coordinador del Area Dr. Carlos Oehninger y del Coordinador General de Proyectos Dr. Victor Rivera.
Se solicita al Autor:1-Presentar organigrama del desarrollo del Proyecto
2-Cronograma de liberación de Fondos de Financiación,debiendo designar una Cuenta Bancaria donde girar desde la cuenta de LACTRIMS,y provisión de acuse de recibo de Recepción de los mismos.
3-Hacer constar en la redacción final el aval y financiamento de LACTRIMS.

Dr. Fernando Hamuy Diaz de Bedoya
Presidente
LACTRIMS

Dr. Gustavo Baez Valiente
Secretario General
LACTRIMS

LACTRIMS
LATIN AMERICAN COMMITTEE FOR TREATMENT AND RESEARCH IN MULTIPLE SCLEROSIS

Propuesta de trabajo colaborativa grupo LACTRIMS

POLIMORFISMO RS6265 DEL GEN *BDNF* Y SU ASOCIACIÓN CON EL DETERIORO COGNITIVO EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

Noviembre 2019

AUTOR: MIGUEL ANGEL MACIAS ISLAS

CO-AUTORES:

ADRIANA AGUAYO ARELIS

MIRIAM SALDAÑA

Índice:

Resumen…… 2

Introducción y descripción de variables……4

Justificación ……13

Pregunta de Investigación e hipótesis……..14

Objetivos ……..15

Material, Métodos y análisis estadístico……..16

Consideraciones éticas……31

Financiamiento ……35

Conflictos de interés ……36

Anexos……37

RESUMEN

Introducción

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica degenerativa del sistema nervioso central a menudo incapacitante, que suele manifestarse entre los 20 y los 40 años de edad. Su etiología es desconocida aunque las investigaciones muestran que la destrucción de la mielina puede deberse a respuestas anormales del sistema inmunológico sobre el sistema nervioso central provocando síntomas entre los que destaca el deterioro cognitivo (DC). Entre un 50 a 60% de los pacientes presentan DC con alteraciones en los procesos de memoria, aprendizaje, atención, velocidad de procesamiento de la información, habilidades viso espaciales, funcionamiento ejecutivo y lenguaje, lo que representa un impacto en el desempeño y la adaptación en su vida cotidiana.

Los tratamientos en EM consisten principalmente en terapias farmacológicas, modificadoras del curso de la enfermedad y manejo sintomático. Éstos no han demostrado ser efectivos para el tratamiento de la DC en muchos casos. Algunos

autores proponen que tanto el desarrollo del DC como la variabilidad de la respuesta al tratamiento del mismo está probablemente relacionada con factores genéticos.

Los polimorfismos son marcadores moleculares responsables de la variabilidad entre individuos de una misma especie. Tienen múltiples aplicaciones y se utilizan en el área de la medicina para detectar la susceptibilidad de un individuo a desarrollar un padecimiento o responder a un tratamiento.

Objetivo: Evaluar la asociación entre el Polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* y el Deterioro Cognitivo en pacientes con Esclerosis Múltiple.

Material y Métodos.

Tipo de estudio. Casos y controles.

Pacientes. Mestizo mexicanos con diagnóstico de Esclerosis Múltiple de acuerdo a los criterios de McDonald. Atendidos en la fundación Mexicana para la esclerosis Múltiple, A.C.

Casos. Pacientes con EM con diagnostico de DC(se considera DC cuando el paciente presenta dos o mas pruebas por debajo del percentilo 5).

Controles. Pacientes con EM sin diagnostico de DC.

Mediciones:

- Funcionamiento cognitivo, Mediante la batería neuropsicológica de screening para esclerosis múltiple.
- Polimorfismo, muestra de sangre venosa periférica para hacer la extracción de ADN. Técnica de *PCR-RFLP* (del inglés, *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment of Lenght Polymorph).*

Análisis estadístico: Se utilizará media y desviación estándar para medidas cuantitativas. Frecuencias y porcentajes para medidas cualitativas. Para comparar las variables cuantitativas entre los dos grupos de estudió se utilizará la prueba t de Student o U de Mann-Whitney (de acuerdo a la distribución de las variables), Chi

cuadrada para comparación de proporciones entre los grupos de estudio. Para establecer el riesgo que representa la presencia de un genotipo en estado homocigoto o heterocigoto del polimorfismo con la presencia del DC se calculará con OR y sus intervalos de confianza de 95%.

Recursos e infra-estructura: Se cuenta con equipo, áreas y personal calificado para las evaluaciones necesarias. Los recursos financieros para la obtención de reactivos necesarios serán solicitados al Fondo CONACYT.

1. INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad cronica auntoimnume del Sistema Nervioso Central (SNC), con mecanismos de daño que involucran inflamación, desmielinización, alteración axonal y neurodegerenación[i]. En la EM se han descrito mas de 90 signos y síntomas diferentes como visión borrosa, disfunción sensomotora, fatiga, alteraciones neuropsiquiatricas y deterioro cognitivo (DC), entre otros[ii].

La frecuencia del DC en EM es del 45 a 65%, su perfil se describe principalmente con alteraciones en los procesos de memoria, aprendizaje, atención, velocidad de procesamiento de la información, habilidades viso espaciales, funcionamiento ejecutivo y en lenguaje. Varios estudios han tratado de relacionar su presencia con respecto a los años de evolución de la enfermedad, el grado de discapacidad, el estadio evolutivo, el tipo de tratamiento inmunomodulador que recibe el paciente, la presencia de daño cerebral medido en resonancia magnética, entre otros, pero los resultado no son concluyentes.[iii],[iv]

Cuando el cerebro sufre una afectación como es en el caso de la EM, este utiliza su plasticidad cerebral (PC) para minimizar los posibles efectos provocados por los mecanismos de daño presentes en la patología, al modificar la estructura y función de sus conexiones neuronales. A la fecha se han descrito varios mecanismos

biológicos relacionados con la PC, entre ellos se encuentran los factores tróficos.

El Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) es una proteína codificada por el gen con el mismo nombre, que regula un amplio espectro de procesos de desarrollo del sistema nervioso, incluidos la supervivencia celular, el crecimiento, diferenciación y plasticidad neuronal. Actualmente existen varios estudios que relacionan el polimorfismo rs6265 del gen BDNF con DC en diferentes patologías con afectación a nivel cerebral[v]. En el caso de la EM son pocos los estudios con respecto a este polimorfismo y su relación al DC[vi] y a la fecha no hay estudios publicados en población mexicana que traten de establecer dicha relación.

MARCO TEORICO

1.- Esclerosis Múltiple.

La Esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria, crónica, desmielinizante de probable origen autoinmune del sistema nervioso central (SNC). La descripción inicial de esta enfermedad se atribuye a Jean Martin Charcot en 1868. El conocimiento de la fisiopatología y los mecanismos de daño en la actualidad muestran que además de la afectación de la mielina, se compromete la función axonal y su daño se extiende incluso a la sustancia gris[vii,viii]. Afecta aproximadamente a 2,5 millones de personas en todo el mundo. Las personas de raza blanca parecen tener mayor riesgo de desarrollar EM.[ix] Enfermedad neurológica incapacitante adquirida principalmente por adultos jóvenes. Las mujeres se ven más afectadas que los hombres, con una proporción que varía entre 1,5:1 y 2,5:1. Padecimiento de incidencia baja en la niñez que aumenta rápidamente después de la adolescencia y alcanza un pico entre 25 y 35 años para luego comenzar un decline.

La EM forma parte de las primeras cinco causas de discapacidad detrás de las lesiones traumáticas y las enfermedades reumatológicas en personas entre los 20 y 50 años de vida[x]. Enfermedad compleja de causa desconocida, los estudios marcan una predisposición genética y diversos factores ambientales como agentes

que actúan en conjunto para su desarrollo[xi,xii].

La etiología de la EM aun no es completamente conocida. Se ha demostrado que diferentes factores provocan una respuesta autoinmune mediada por linfocitos T activados, frente a diferentes antígenos del complejo mielina-oligodendrocito que, tras penetrar en el sistema nervioso inducen una cascada de fenómenos inmunológicos que desencadenan una reacción inflamatoria y desmielinizante, llevando a un daño axonal y deterioro de la conducción. A finales de la década de los noventas, Trapp demostró que las lesiones no se limitaban a la mielina, sino que producían daño axonal, lo cual explicaba la pérdida de funciones en la fase tardía de la enfermedad. Así, la EM actualmente se considera una enfermedad bifásica, es decir, de características inflamatorias y degenerativas[xiii].

2.- Clasificación formas clínicas de la Esclerosis Múltiple.

La EM se clasifica en varios subtipos basándose en el curso clínico:

- **Síndrome clínico aislado (CIS):** Reconocido como el primer síntoma de una EM[xiv].
- **Remitente-recurrente (RR):** Aproximadamente el 85% de los pacientes debutan con esta forma. Se caracteriza por cuadros agudos de síntomas neurológicos con recuperaciones.
- **Secundariamente progresiva (SP):** aparece 10-20 años después de la instalación de la forma remitente recurrente. Las remisiones se vuelven infrecuentes y por lo general son remplazadas por un empeoramiento gradual de los síntomas neurológicos a lo largo de meses a años. Suelen quedar secuelas neurológicas y se considera la progresión de las lesiones tempranas.
- **Primariamente progresiva:** sólo 15% de los pacientes con EM debutan con síntomas neurológicos progresivos y graduales sin remisiones. Generalmente los síntomas son mielopáticos[xv,xvi].

3.- Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas típicas se relacionan con la localización del foco de desmielinización e incluyen hasta 90 diferentes signos y síntomas. Entre ellos se pueden encontrar visión borrosa, disfunción sensomotora, fatiga, alteraciones neuropsiquiátricas y deterioro cognitivo (DC), entre otros[xvii,xviii]

4.- Deterioro Cognitivo en Esclerosis Múltiple.

El DC es la perdida de funciones cognitivas como la atención, memoria, lenguaje, percepción, entre otras. Con la aplicación de diferentes pruebas neuropsicológicas se puede establecer si un paciente presenta o no DC tomando en cuenta su edad, escolaridad y actividades de la vida diaria. En el caso de la esclerosis múltiple el DC en los pacientes es su mayoría es de tipo subcortical, y los procesos cognitivos que se ven afectados con mayor frecuencia son la memoria de trabajo, la memoria explícita, la atención selectiva, sostenida y dividida; la velocidad en el procesamiento de la información, el proceso de abstracción, el funcionamiento ejecutivo, la fluidez verbal y las habilidades visoespaciales[xix].

La memoria y la velocidad del procesamiento de la información son de los procesos más estudiados al ser las principales quejas de los pacientes[xx,xxi]. De manera general, la memoria explícita suele tener mayor afectación, en tanto que la memoria implícita parece más conservada[xxii]. Con respecto a la velocidad de procesamiento, entre el 40 al 60% de los casos presentan lentitud al momento de tomar una decisión, alteración que es más evidente en las fases progresivas de la enfermedad[xxiii].

Una cuarta parte de los pacientes suelen presentar alteraciones en el proceso atencional a nivel de la fijación y la alternancia de la misma[xxiv]. El funcionamiento ejecutivo puede estar afectado del 15 al 20% como consecuencia de fallas para codificar la información y planeación[xxv]. Entre el 12 y el 27% de los pacientes tienen

deficiencias en las habilidades visoespaciales y, en promedio, sólo el 10% de los pacientes presentarán un DC generalizado.

5.- Medición del Deterioro Cognitivo en Esclerosis Múltiple.

Para medir la presencia de DC en EM se dispone varias herramientas neuropsicológicas, algunos expertos prefieren utilizar baterías de pruebas específicas para esta enfermedad, mientras que para otros les resulta mejor la aplicación de pruebas para evaluar dominios cognitivos específicos. En nuestro caso utilizaremos la Batería neuropsicológica de screening en Esclerosis Múltiple (BNS-EM) al ser la herramienta clínica y de investigación mas utilizada a nivel mundial para detectar, evaluar y seguir el curso del DC en personas con EM.

Esta batería cuenta con test sensibles para la detección del DC, mismos que fueron extraídos de una batería mucho mas extensa que se aplica en por lo menos 7 horas. La BNS-EM en comparación con la batería más extensa, tiene valores de sensibilidad del 71% y especificidad del 94%. Con esta batería se mide el funcionamiento de la memoria verbal, la memoria visual, la atención sostenida y concentración, la velocidad de procesamiento de la información y la fluidez verbal (procesos comúnmente afectados en la EM), consta de cinco pruebas las cuales son:

Prueba selectiva de memoria

Prueba 7/24 del recuerdo espacial.

Prueba Auditiva Medida de Sumas Seriadas (PASAT)

Fluidez Verbal

Test Digito Símbolo.

El tiempo de aplicación es de 25 a 35 minutos pero esto puede variar debido a

las capacidades cognitivas del paciente. Se cuenta con la versión al castellano y datos normativos para la población española y se establece que un paciente presenta DC cuando tiene 2 o mas pruebas por debajo del percentilo 5. [xxvi]

6.- Tratamientos para el Deterioro Cognitivo en Esclerosis Múltiple.

Los medicamentos para tratar la EM, generalmente se clasifican en modificadores de la enfermedad y sintomáticos. Los sintomáticos son aquellos que se le dan al paciente para tratar síntomas secundarios de la enfermedad como pueden ser dolor de cabeza, malestares sensitivos, vesicales, visuales, entre otros. Los tratamientos modificadores de la enfermedad buscan transformar la historia natural de la progresión, tienen tres objetivos principales que son; reducir la frecuencia y severidad de las recaídas, disminuir la cantidad de lesiones medidas en resonancia magnética y lentificar el aumento de la discapacidad. Los medicamentos actuales tienen un cuarto objetivo que es producir la remielinización y disminuir o evitar la atrofia cerebral. A la fecha los medicamentos modificadores de la enfermedad se consideran una terapia a largo plazo cuya efectividad en su gran mayoría solo ha podido ser comprobada en la forma remitente recurrente[xxvii].

7.- Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro, polimorfismo y función cognitiva en Esclerosis Múltiple.

Los factores tróficos son un conjunto de sustancias en su mayoría de naturaleza proteica, cuya función principal es la de controlar los ciclos celulares, el mantenimiento de la supervivencia celular, y procesos de diferenciación, migración y apoptosis, entre otros. Los factores Neurotróficos (FN) también llamados neurotrofinas, se dividen en factor de crecimiento nervioso, neurotrófina 1, neurotrófina 3, neurotrófina 4 y factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)[xxviii].

El BDNF es una proteína codificada por el gen con el mismo nombre, se trata de un homodimero de 27 kDA descubierto en la década de los ochentas por Barde,

Edgar y Thoenen, que regula un amplio espectro de procesos de desarrollo del sistema nervioso, incluidos la supervivencia celular, el crecimiento, diferenciación y plasticidad neuronal-. Esta proteína es sintetizada como proBDNF en el retículo endoplasmático, al ser liberado como proBDNF en el espacio extracelular, una metaloproteasa lleva a cabo un clivaje proteolítico de su dominio pro, lo que permite su cambio de forma a BDNF maduro[xxix].

El BDNF se une a dos receptores, uno de ellos el receptor para neurotrofinas p75NTR relacionado con apoptosis celular, y el receptor TrKB o receptor quinasa relacionado tropomiosina B que activa cascadas de señalización cuyas funciones son de crecimiento, supervivencia y plasticidad neuronal[xxx]. Se describen tres funciones o caminos reconocidos para el BDNF, el primero de ellos consiste ser transportado de manera anterógrada a terminales axónicos donde su función será activar de forma cíclica a la misma neurona[xxxi], un segundo camino consiste en su liberación para ser recibido por la célula post sináptica en sus espinas dendríticas activando a la siguiente neurona, y el tercer camino involucra que el BDNF viaje hacia espinas dendríticas ayudando a la regulación de formación de receptores AMPA en la membrana plasmática, lo cual permite la conexión sináptica de nuevos axones aumentando la comunicación entre neuronas[xxxii], estos tres caminos están relacionados con el correcto funcionamiento cognitivo del cerebro[xxxiii].

La cognición por su parte, es un proceso que armónicamente conjunta la función de una serie de dominios, (lenguaje, atención, memoria, pensamiento, velocidad de procesamiento, inteligencia) que permiten una sana relación entre el individuo y su medio ambiente. El adecuado desarrollo de cualquiera de sus componentes influirá de manera positiva en las funciones cerebrales superiores, por el contrario la disfunción en cualquiera de éstos podría interferir en dicha relación.

Para que la cognición se pueda llevar a cabo, es necesaria la comunicacion entre las células del sistema nervioso central, proceso que se denomina sinapsis y cuya finalidad es la de transmitir de manera masiva los impulsos nerviosos que coordinan las funciones del organismo, en este caso los procesos cognitivos. Para

que se lleve a cabo la sinapsis se necesita de varios elementos indispensables que conforman a la neurona, entre los que destacan el soma, dendritas y axon, con esta estructura, la celula pre-sináptica es la encargada de enviar el impulso nervioso por medio del axon hacia la terminal axónica, provocando la salida de los neurotransmisores al espacio sináptico para ser recibidos en su mayoría por la ceéula post-sináptica por medio de sus dendritas y asi continuar con la sinapsis. Conforme las células se siguen comunicando entre si, se van formando redes neuronales para procesos cognitivos específicos[xxxiv]. La relacion existente entre el BDNF y la cognición, subyace en el papel que tiene el BNDF con procesos de desarrollo, maduración y plasticidad de las redes neuronales, esto debido a su participación en los procesos de diferenciación de la celula nerviosa[xxxv].

Los polimorfismos son marcadores moleculares responsables de la variabilidad entre individuos de una misma especie. Tienen múltiples aplicaciones y se utilizan en el área de la medicina para detectar la susceptibilidad de un individuo a desarrollar un padecimiento o responder a un tratamiento. El Polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 en la banda 14.1. Es una mutación de base simple con una adenina en lugar de una guanina en la posición 196 (G196A), que causa la sustitución de aminoácidos valina por metionina.

Estudios han demostrado que la presencia de la variante Met es suficiente para generar una baja producción de BDNF[xxxvi], lo que conlleva a daños estructurales y de retracción en el crecimiento de nuevas neuronas[xxxvii], en neuronas maduras, provoca la depleción de dendritas e inhibe la potenciación a largo plazo provocando así alteraciones en la comunicación y plasticidad cerebral[xxxviii],[xxxix].

En nuestro estudio nos centraremos en la plasticidad cerebral relacionada a BDNF, ya que cuando una persona sufre alguna alteración que pueda comprometer el funcionamiento normal del cerebro, diferentes factores de plasticidad cerebral comienzan a trabajar para minimizar el daño. La Organización mundial de la Salud la define como “aquella capacidad que poseen las células del sistema nervioso que le

sirve para regenerarse anatómica y funcionalmente, después de estar sujetas a influencias patológicas ambientales o del desarrollo, incluyendo traumatismos y enfermedades. Esto le permite una respuesta adaptativa a la demanda funcional"[xl].

Un mal funcionamiento de los mecanismos de neuroplasticidad se relaciona con la presentación y progresión de algunos padecimientos, en tanto que, en el caso de enfermedades neurodegenerativas el mal funcionamiento de la plasticidad se ha relacionado con el agotamiento de sus mecanismos, como es el caso de la EM[xli].

Existen estudios que han tratado de establecer la relación del BDNF con la presencia y severidad de DC en otras patologías cerebrales como en EM. En un estudio reciente del 2017 Caspell y colaboradores buscaron biomarcadores predictivos de deterioro cognitivo en pacientes con Parkinson, encontrando que aquellos pacientes que presentan el genotipo val/val se relaciona con la presencia del DC.En EM los resultados de los estudios que han intentado relacionar la presencia del polimorfismo rs6265 con el DC no son concluyentes, tal vez por la variabilidad de instrumentos que se utilizaron para medir el DC que en su mayoría fueron mediante medición de volumen cerebral, imagen de resonancia magnética funcional o pruebas neuropsicológicas no estandarizadas para la enfermedad[xlii,xliii].

En nuestro caso hemos decidido utilizar una medida fiable para detectar DC en EM como es la BNS-EM y una vez teniendo el diagnostico de DC buscar la presencia del polimorfismo, con la finalidad de tratar de establecer una causa del DC y así poder ofrecer mejores estrategias de intervención farmacológica.

2. JUSTIFICACIÓN

La EM afecta a aproximadamente 2,5 millones de personas en todo el mundo, en México su prevalencia se estima entre 13 a 22 casos por cada 100,000 habitantes. Forma parte de las primeras cinco causas de discapacidad detrás de las lesiones traumáticas y las enfermedades reumatológicas en personas entre los 20 y 50 años de vida[3].

Las manifestaciones clínicas típicas se relacionan con la localización del foco de desmielinización e incluyen hasta 90 diferentes signos y síntomas, entre ellos el DC[12]. El DC se encuentra presente en más de la mitad de las personas diagnosticadas con esta enfermedad, lo que representa un impacto en el desempeño y la adaptación en su vida cotidiana.[xliv]

La EM es una enfermedad compleja de causa desconocida, los estudios marcan una predisposición genética y diversos factores ambientales como agentes que actúan en conjunto para su desarrollo. La genética se encarga de estudiar la herencia biológica y su variabilidad, la manera en como las diferentes características de un ser vivo se transmiten, se forman y se expresan entre generaciones. A partir de la genética se puede explicar como un ser vivo hereda de otro, sus características fisiológicas, morfológicas, químicas y hasta conductuales, tomando en cuenta las condiciones ambientales[5].

Actualmente se conocen varios aspectos de la enfermedad que se relacionan a factores genéticos, como por ejemplo la susceptibilidad a desarrollar EM o la respuesta a tratamiento por parte de los pacientes, [xlv],[xlvi] pero aun se desconoce la relación entre la genética y la presencia de DC. De hecho son pocos los estudios que tratan de correlacionar factores genéticos con la aparición, curso y severidad del DC en EM.[xlvii]

La finalidad de encontrar posibles factores de riesgo a presentar DC, es la de tratar de establecer alternativas eficaces en su tratamiento y mejor pronóstico,

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuál es la asociación entre entre el Polimorfismo rs6265 del gen BDNF y el Deterioro Cognitivo en pacientes con Esclerosis Múltiple.?

4. HIPÓTESIS

Hipótesis alterna

El Polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* se asocia con la presencia de la disfunción cognitiva en pacientes con Esclerosis Múltiple.

Hipótesis nula

El Polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* no se asocia con la presencia de la disfunción cognitiva en pacientes con Esclerosis Múltiple.

5. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Evaluar la asociación entre el Polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* y el Deterioro Cognitivo en pacientes con Esclerosis Múltiple.

Objetivos Específicos

1. Identificar el rendimiento cognitivo del paciente con EM.
2. Identificar la presencia del polimorfismo en pacientes con EM.
3. Determinar la asociación de la presencia del polimorfismo con cada uno de los procesos cognitivos evaluados.
4. Analizar el rendimiento cognitivo de los pacientes que presentan el polimorfismo en relación a su tratamiento inmunomodulador.
5. Establecer el riesgo que representa la presencia de un genotipo en estado homocigoto o heterocigoto del polimorfismo con la presencia del DC

6. MATERIAL Y METODOS.

Tipo de estudio: Casos y controles.

Población: Pacientes Mestizo mexicanos con diagnóstico de Esclerosis Múltiple de acuerdo a los criterios de McDonald. Atendidos en la fundación Mexicana para la esclerosis Múltiple, A.C.

Casos: Pacientes EM. Con Diagnóstico de Deterioro Cognitivo cuando el paciente presenta 2 ó más pruebas por debajo del percentilo 5

Controles: Pacientes EM. Sin Diagnóstico de Deterioro cuando el paciente no presenta 2 ó más pruebas por debajo del percentilo 5

Técnica de Muestreo.

No probabilístico.

Criterios de inclusión

- Dx. EM acorde a los Criterios de Mc Donald.
- Mayor de 18 años.
- Mestizo Mexicano.
- Firma Consentimiento Informado

Criterios de Exclusión

- Déficit Visual Severo.
- Déficit Auditivo Severo.
- Abuso de sustancias psicotrópicas.
- Fecha última recaída menor a 30 días
- Fecha último tratamiento de cortico esteroides, menor 30 días.

Criterios de eliminación

- Retiro Consentimiento Informado.
- Muestra Degradadas que no permiten realizar el análisis del polimorfismo

Variables.

Se estudiaran:

Categoría sociodemográficas.

Edad.

Escolaridad.

Genero.

Categoría características clínicas de esclerosis múltiple.

Años de evolución de la enfermedad.

Nivel de discapacidad.

Numero de recaídas por año y localización.

Tipo de tratamiento inmunomodulador.

Categoría Cognición.

Ausencia Deterioro cognitivo.

Presencia de Deterioro cognitivo (leve y severo)

Categoría Polimorfismo rs6265 del gen *BDNF*

Presencia

Ausencia.

Instrumentos, Técnicas.

Se aplicaran:

A) Historia Clínica. Para la obtención de las variables sociodemográficas y

variables de la enfermedad. (Anexo 1)

B) Batería Neuropsicológica de Screening en Esclerosis Múltiple (BNS-EM). Para medir el funcionamiento cognitivo de los pacientes. (Anexo 2)

La BNS-EM, fue realizada en 1991 por Stephen Rao y colaboradores. Para nuestro estudio utilizaremos la versión en español y para la clasificación de presencia y ausencia de DC se utilizará el método usado por investigadores mexicanos, el cual se describió en la sección de variables. Herramienta clínica y de investigación útil para identificar disfunción cognitiva en sujetos con EM. Consta de 377 preguntas. Sus valores de sensibilidad y especificidad son de 71 y 94%[xlviii],[xlix].

Con esta batería se pueden obtener valores de atención sostenida mediante la prueba de PASAT, aprendizaje verbal con la prueba selectiva de memoria, aprendizaje viso-espacial con la prueba 7/24 de recuerdo espacial y fluidez verbal con la prueba de generación de lista de palabras. Tiene un tiempo de aplicación de 25 a 35 minutos y en el cuadro numero 1 se muestra el orden de administración de las 5 pruebas así como su tiempo aproximado de aplicación.

Cuadro 1.

Orden de Administración de las pruebas.	
Pruebas	**Tiempo de Administración.**
Prueba Selectiva de Memoria (PSM)	8 minutos.
Prueba 7/24 del recuerdo espacial	6 minutos
Prueba de Fluidez Verbal	4 minutos
PASAT	10 minutos
PSM recuerdo diferido	1 minuto
7/24 Recuerdo diferido	1 minuto

Prueba digito símbolo	5 minutos Total 35 minutos

A continuación se describe cada una de las pruebas.

Prueba selectiva de memoria

Es una lista de 12 palabras que el sujeto tendrá que repetir en 6 intentos. Valora memoria verbal y distingue entre el corto y largo plazo. También examina la consistencia de recuperación de la memoria a largo plazo. En el cuadro 2 muestra las puntuaciones de la prueba por cada uno de sus apartados (memoria largo plazo de almacenamiento MLP-A, memoria largo plazo de recuperación MLP-R y test selectivo de memoria TSM DIF

Cuadro 2.

	Mínimo Posible	Máximo Posible	Promedio	DS
MLP-A	0	72	43.6	13.8
MLP-R	0	72	31.1	14.5
TSM DIF	0	12	8.2	2.6

Prueba 7/24 del recuerdo espacial.

Desarrollado en el año de 1968 por Barbizet y Cany, es modificado por Rao y col en el año de 1984 para su aplicación en la EM. Con esta prueba se obtienen mediciones de aprendizaje viso espacial, y memoria diferida en este caso visual. Cuenta diferentes versiones para su aplicación. Por otro lado, ya que se trata de una

prueba que requiere de motricidad fina y ésta suele ser una alteración en pacientes con EM, en algunas ocasiones será necesario realizar pequeñas modificaciones para su aplicación que no intervendrán en la puntuación final de la prueba. En el cuadro número 3 se muestran las puntuaciones de la prueba para cada uno de sus apartados.

Cuadro 3.

	Mínimo Posible	Máximo Posible	Promedio	DS
7/24 respuestas correctas	0	35	28.1	6.4
7/24 recuerdo inmediato	0	7	5.3	2.0
7/24 diferido	0	7	5.2	2.0
7/24 SET II	0	7		

Prueba Auditiva Medida de Sumas Seriadas (PASAT)

Esta prueba evalúa la memoria de trabajo y la velocidad del procesamiento de la información auditiva, así como la habilidad de cálculo matemático. Refleja la flexibilidad cognitiva de los sujetos y en ella se valora la velocidad de la información.

La prueba requiere del uso de un reproductor de disco compacto y una grabación con la secuencia de estímulo de un dígito. Esta secuencia es administrada a la persona evaluada en diferentes intervalos de tiempo (3 y 2 segundos). En el cuadro numero 4 se muestran las puntuaciones de la prueba para cada uno de sus apartados.

Cuadro 4

	Mínimo Posible	Máximo Posible	Promedio	DS
PASAT 3 SEG	0	60	38.9	13.0
PASAT 2 SEG	0	60	30.0	12.7

Fluidez Verbal

Esta prueba mide la velocidad de lenguaje, para llevarla a cabo, el examinador dice una letra del abecedario y el sujeto trata de decir el mayor número de palabras posibles que inicien con esa letra. Para la forma A se utilizan las letras F, A y S; para la forma B, se utilizan las letras P, R y M. En el cuadro numero 5 se muestran las puntuaciones de la prueba para cada uno de sus apartados.

Cuadro 5.

	Mínimo Posible	Máximo Posible	Media	DS
FV	0	No tiene	35.5	11.9

Prueba dígito símbolo

Esta prueba de valoración y concentración a través del seguimiento visual. En ella se utiliza un formato que contiene 9 símbolos, cada uno de ellos con un número diferente. El sujeto debe decir oralmente el número que corresponde a cada símbolo, en forma consecutiva. En cuadro numero 6 se muestran las puntuaciones

para esta prueba.

Cuadro 6.

	Mínimo Posible	Máximo Posible	Media	DS
PDS	0	125	50.1	10.9

C) Toma, Recolección y procesamiento de las muestras de sangre venosa periférica.

A continuación se describe el protocolo.

1) Identificar y rotular los tubos donde se recolectará la muestra (tubos con

EDTA, tapón morado).

2) Obtener 10 mL de sangre venosa periférica por veno-punción con el uso de vacutainer o jeringa.

3) Agitar suavemente el tubo con la sangre invirtiéndolo al menos 3 veces.

4) Dejar los tubos con las muestra recolectadas sobre la gradilla por 30 minutos.

5) Refrigerar a una temperatura entre 2-8 °C.

La extracción de ADN es una etapa previa para todo análisis genético, el método de extracción de ADN se basa en una serie de pasos básicos:

1) Disrupción celular (consiste en la ruptura de la bicapa lipídica de las membranas celulares por tratamientos con detergentes o agentes quelantes los cuales secuestran cationes ocasionando una desestabilización de la membrana)

2) Eliminación de proteínas el cual consiste en eliminar cualquier proteína o residuo de las mismas del extracto mediante precipitación de con sales a diferentes concentraciones

3) Concentración del ADN el cual se lleva a cabo mediante precipitación de alcoholes

4) Lavados los cuales ayudan a eliminar los restos de pudiesen quedar en el ADN

5) Re-suspensión a base de agua o de EDTA.

6) Es importante tomar en cuenta que se debe realizar una previa estandarización dependiendo de las condiciones y recursos con las que cuente el laboratorio, y de ser necesario realizar modificaciones dependiendo de las muestras con las que se estén trabajando.

D) PCR = Reacción en cadena de la polimerasa y RFLP´S=Polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción.

A continuación se describe la técnica a utilizar.

- Extracción y purificación el ADN
- Amplificar ADN usando PCR
- Corte con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes.
- Fragmentos de restricción: Separar mediante electroforesis en geles de agarosa.
- Esto nos proporciona
- Un patrón de bandas único para nuestro ADN en particular
- Nos permite distinguir entre homocigotos de los heterocigotos

- **Sustitución de aminoácidos:** (PCR) usando cebadores directos

Directos 5´-ACTCTGGAGAGCGTGAATGG-3´
Inverso 5´- CTACTGAGCATCACCCTGGA-3´

- **Inicio de la amplificación** a 95 ◦ C durante 5 min
- Alineamiento a 60 ◦ C durante 30 s.
- Extensión a 72 ◦ C durante 1 minuto
- Seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 ◦ C durante 1 min.
- Una etapa de extensión final de 10 min. a 72 ◦ C .
- **Digestión** con la enzima de restricción Eco72I
- **Electroforesis en gel de agarosa** al 3,0%.
- El alelo A (Met66) se identificara como una banda sin cortar de 171 pares de bases (pb)

El alelo G (Val66) por dos bandas de corte, 99 y 72 pb de largo.

Procedimientos.

A continuación se enumeran los pasos a seguir para llevar a cabo la investigación.

1. Invitación al paciente con EM a participar en la investigación.

2. Explicación de la investigación, riesgos y beneficios.
3. Explicación y firma del consentimiento informado.
4. Exploración neurológica. es llevada a cabo por un neurólogo experto en la materia.
5. Elaboración de la historia clínica y Exploración neuropsicológica.
6. A partir de la exploración neuropsicológica se formaran dos grupos. Grupo de pacientes con DC y grupo de pacientes sin DC. (Bajo los criterios explicados en la operacionalización de variables, apartado Deterioro Cognitivo).
7. Toma de sangre periférica para determinación de Polimorfismo val66met.
8. Procesamiento de las muestras.
9. Análisis de datos.

Tamaño de Muestra.

El tamaño de muestra se determinó mediante la fórmula para comparación entre dos proporciones con el paquete estadístico Epi info. V.7 con base en la frecuencia de daño cognitivo en pacientes con Esclerosis Múltiple[48].

Donde :

- n= tamaño de muestra
- K= constante
- p1= Frecuencia de daño cognitivo en casos (40%).
- p2= Frecuencia de daño cognitivo en controles.

- q1= 1-p1
- q2= 1-p2
- Confianza de 95%: a= 0.05

Resultado: 31 pacientes por grupo.

Operacionalización de Variables.

Variables intervinientes

Categoría	Variable	Indicador	Escala	Instrumento
Sociodemográfico	Edad	Años	Cuantitativa	Historia clínica
	Sexo	Masculino Femenino	Cualitativa	Historia clínica
	Escolaridad	Años	Cuantitativa	Historia clínica

Características clínicas de esclerosis múltiple.	Años de Evolución	Años.	Cuantitativa.	Historia clínica
	Discapacidad	Puntuación de 0 a 10	Cuantitativa.	EDSS
	Recaídas	Numero por año Localización.	Cuantitativa. Cualitativa	Historia clínica
	Tratamientos	Tipo Duración	Cualitativa. Cuantitativa.	Historia clínica

Variable dependiente: Disfunción Cognitiva.

Categoría	Variable	Indicador	Escala	Instrumento

Cognición	Daño Cognitivo	**Sin DC** cuando el paciente no presenta 2 ó más pruebas por debajo del percentilo 5 **Con DC** cuando el paciente presenta 2 ó más pruebas por debajo del percentilo 5 **Normal** de 0 a 2 puntuaciones por de la prueba por debajo de una DS. **DC Leve** de 3 a 5 puntuaciones por de la prueba por debajo de una DS **DC Severa** 6 o mas puntuaciones por de la prueba por debajo de una DS	Cualitativa.	Batería Neuropsicológica de screening de RAO

*DC Deterioro Cognitivo.

*DS Desviación estándar.

Variable Independiente: Polimorfismo rs6265 del gen *BDNF*

Categoría	Variable	Indicador	Escala	Instrumento

Polimorfismo	rs6265 del gen *BDNF*	Presencia Ausencia.	Cualitativa.	Extracción PCR RFLP´S. Enzimas de restricción. O PCR en tiempo real.

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

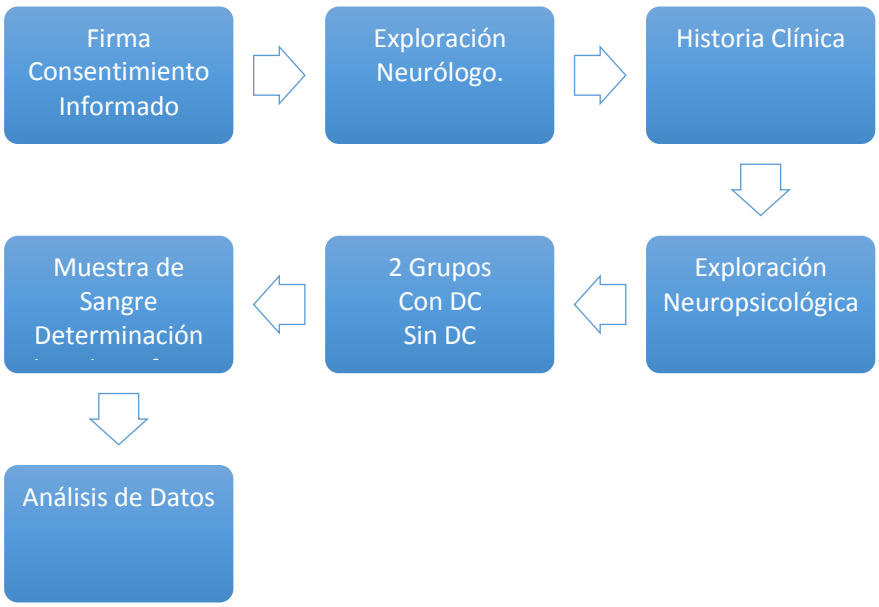
RFLP´S=Polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción

Análisis estadístico

a) Se utilizara media y desviación estándar para medidas cuantitativas.

b) Frecuencias y porcentajes para medidas cualitativas.
c) Se aplicará una prueba de normalidad Shapiro-Wilk para determinar si los valores siguen una distribución normal.
d) Para comparar las variables cuantitativas entre los dos grupos de estudió se utilizará la prueba t de Student o U de Mann-Whitney (de acuerdo a la distribución de las variables).
e) Chi cuadrada para comparación de proporciones entre los grupos de estudio.
f) Chi cuadrada o prueba Exacta e Fisher (de acuerdo a la distribución de las variables) para evaluar la asociación entre la presencia de polimorfismo y el DC
g) Para establecer el riesgo que representa la presencia de un genotipo en estado homocigoto o heterocigoto del polimorfismo con la presencia del DC se calculará con OR y sus intervalos de confianza de 95%.
h) Programa estadístico SPSS versión 22.

Diagrama de Flujo.



Consideraciones Éticas

El presente proyecto será sometido a su aprobación ante el Comité Local de Investigación y Ética en Salud del Centro Universitario Ciencias de la Salud(CUCS)

de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal.

La presente investigación cumple con:

Principios éticos para investigación medica en seres humanos estipulados en la Declaración de Helsinki, 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013

Declaración de Taipei sobre las Bases de Datos de Salud y los Biobancos Adoptada por la 53a Asamblea General de la AMM, Washington DC, EE.UU., octubre 2002 Y revisada por la 67ª Asamblea General de la AMM, Taipei, Taiwán, octubre 2016

En cumplimiento con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Estudio Categoría II. Investigación con riesgo mínimo. (Capitulo 1, Articulo 17). Amerita consentimiento bajo información. (Capitulo 1, Artículos 14, 20, 21, 22 y 24).

CONSENTIMIENTO INFORMADO (Anexo 3)

El consentimiento informado facilita al participante de la investigación la información adecuada de forma oral como escrita. Se obtiene la firma del participantes antes de la realización de cualquier procedimiento del estudio. El contenido y el proceso para obtener el formato de consentimiento se debe acoplar a los requerimientos regulatorios aplicables.

El investigador o la persona designada por el investigador, informara por completo al participante sobre todos los aspectos del estudio. Se explicara a los participantes del propósito del estudio en un lenguaje claro, además de comentarles que su participación en todo momento será voluntaria y que puede en cualquier momento suspender su participación.

Se les notificará sobre los principales procedimientos utilizados para garantizar el anonimato de los participantes. Después de haber recibido la información pertinente sobre el propósito u los riesgos del estudio y de haber tenido el suficiente tiempo

para considerar su colaboración, el participantes debe firmar su consentimiento por escrito firmado y fechado. También se debe recabar la firma y fecha de dos testigos y de la persona que proporcione la información. El participantes recibirá una copia y el original se archivara en su expediente clínico correspondiente.

Una vez obtenida las respectivas firmas es que se considera al sujeto como participantes de la investigación. El sujeto se considera como enrolado en el estudio cuando firma su consentimiento informado. No se debe llenar ningún formato ni realizar ningún procedimiento del estudio antes de obtener el consentimiento por escrito.

Confidencialidad de los participantes:

En todo momento se mantendrá la confidencialidad de los participantes, toda aquella persona que tenga acceso a la información, esta obligada a abstenerse de divulgar la identidad del participantes o cualquier información personal.

Consideraciones de bioseguridad

Se seguirán las siguientes especificaciones.

- **Norma Oficial Mexicana NOM-052- SEMARNAT- 2005**, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- **Norma Oficial Mexicana NOM-054- SEMARNAT- 1993,** Que establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o mas residuos considerados como peligrosos por la norma oficial mexicana nom-052-ecol-

1993**.**

- **Norma Oficial Mexicana NOM-087- ECOL- SSA1- 2002,** Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Recursos.

Financiamiento.

Se competirá por apoyo a través de la convocatoria que emite el Comité Latinoamericano para el Tratamiento y la Investigación de la Esclerosis Múltiple (LACTRIMS) para complementar el costo financiero de la investigación para la cual ya contamos con el 50% del gasto proyectado y desglosamos a continuación lo faltante:

1: Reactivos de laboratorio para la determinación del polimorfismo de BDNF = 50mil pesos mexicanos equivalentes a 2200 USD

2: Pago de material de papelería, toners, y resto de consumibles. 5mil pesos mexicanos equivalentes a 300 USD.

TOTAL : REQUERIDO PARA COMPLETAR LA INVESTIGACION 2500.00 USD

El autor se compromete a transparentar de forma total el uso de los recursos de acuerdo a la normativa de LACTRIMS en el caso que se nos otorguen.

Productos esperados

Se espera que el proyecto genere:

Productos tanto para el conocimiento científico como en beneficio de los pacientes.

Presentación de los resultados de este proyecto serán enviados a Congresos nacionales e internacionales para su presentación en cartel y plataforma.

Escritura del articulo para ser enviados a publicación a una revista indizada.

Fortalecimiento de una línea de investigación relacionada a Esclerosis Múltiple

Formación grupo de trabajo consolidado para dicha línea de investigación.

Los reactivos pueden ser utilizados para procesar muestras de pacientes de al menos otros 3 grupos de 30 pacientes de diferentes países latinoamericanos. Al momento tenemos solicitud de apoyo por Colombia, Chile y Perú.

Conflictos de interés

El autor declara formar parte del comité científico de LACTRIMS en el área de disfunción cognitiva. Por lo anterior el proyecto deberá ser evaluado por la sección de MARCADORES BIOLÓGICOS.

7. ANEXOS.

Anexo 1. Historia Clínica.

Historia Clínica Paciente con Esclerosis Múltiple.

Genero
Masc. Fem.
Nombre

Edad

Estado Civil

Fecha de Nacimiento
__ __ / __ __ __ / __ __ __ __

Años de Escolaridad

Ocupación.

Lateralidad	
Diestro	Zurdo

Dirección.	

Teléfono

LACTRIMS
LATIN AMERICAN COMMITTEE FOR TREATMENT AND RESEARCH IN MULTIPLE SCLEROSIS

Celular	

Tipo EM
RR SP PP

Edad primeros síntomas	

Edad Diagnostico EM	

Tiempo desde Dx hasta Hoy	

Historia de Tratamientos.			
Tratamiento	**Duración**	**Razón Cambio**	**Seguimiento**
Interferón 6 millones	Inicio __ __/__ __ __ __ Fin __ __ / __ __ __ __		Peor. Igual. Mejor.
Interferón 8 millones	Inicio __ __/__ __ __ __ Fin __ __ / __ __ __ __		Peor. Igual. Mejor.
Interferón 12 millones	Inicio __ __/__ __ __ __ Fin __ __ / __ __ __ __		Peor. Igual. Mejor.
Acetato de Glatiramer	Inicio __ __/__ __ __ __ Fin __ __ / __ __ __ __		Peor. Igual. Mejor.

Otro.	Inicio __ __/__ __ __ __ Fin __ __ / __ __ __ __		Peor. Igual. Mejor.

Fecha de Evaluación.
__ __ / __ __ __ / __ __ __ __

Examinado Por:

EDSS	**Puntuación**
Piramidal.	
Cerebelar.	
Tronco Cefálico.	
Sensorial.	
Intestinal/Vesical.	
Visual.	
Cerebral.	
Otros.	
Total	

Recaídas			
Fecha	**Afectación**	**Tipo y duración de Tratamiento**	**Recuperación. SI o NO y Tiempo**

Medicación Concomitante.	**Dosis** **Fecha Inicio** **Fecha Fin**

Enfermedades Concomitantes.	

Otros:

ANEXO 2

Batería Neuropsicológica de Screening en Esclerosis Múltiple (BNS-EM).
TEST SELECTIVO DE MEMORIA (TSM)

Forma A

1	2	3	4	5	6	MD
Casa	Casa	Casa	Casa	Casa	Casa	
Rio	Rio	Rio	Rio	Rio	Rio	
Silencio	Silencio	Silencio	Silencio	Silencio	Silencio	
Libro	Libro	Libro	Libro	Libro	Libro	
Carne	Carne	Carne	Carne	Carne	Carne	

Roca	**Roca**	**Roca**	**Roca**	**Roca**	**Roca**	
Vida	**Vida**	**Vida**	**Vida**	**Vida**	**Vida**	
Orilla	**Orilla**	**Orilla**	**Orilla**	**Orilla**	**Orilla**	
Placer	**Placer**	**Placer**	**Placer**	**Placer**	**Placer**	
Ventana	**Ventana**	**Ventana**	**Ventana**	**Ventana**	**Ventana**	
Lago	**Lago**	**Lago**	**Lago**	**Lago**	**Lago**	
Concepto	**Concepto**	**Concepto**	**Concepto**	**Concepto**	**Concepto**	
Total Memoria Diferida						

	1	2	3	4	5	6	TOTAL
MLP-A							
MLP-R							
INTRUSION							

TEST DE MEMORIA ESPACIAL

Nombre: _____ **Tel:** _____
Edad: _____ **Fecha de nac.** / / **Sexo:** _____

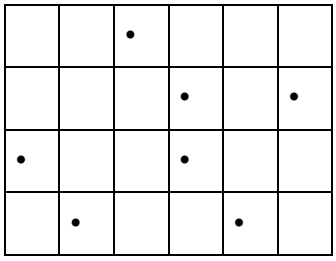
Aplicó: _____ **Fecha de aplicación:** / / _____

Forma A - B

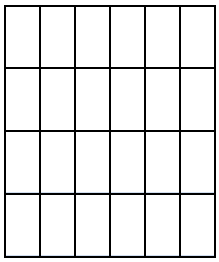
Forma A – I

•				•	
		•		•	
	•				•
			•		

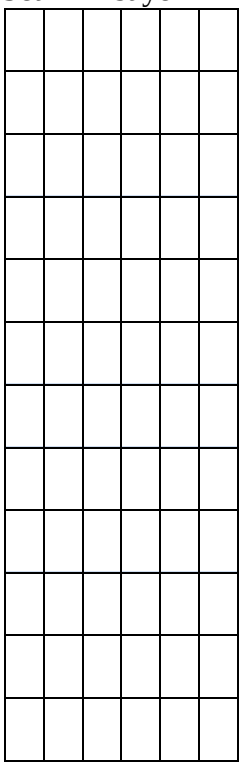
Forma A –II



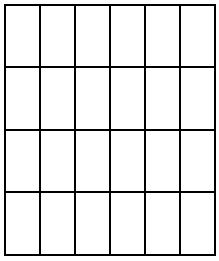
(Forma A-II son distractoras)



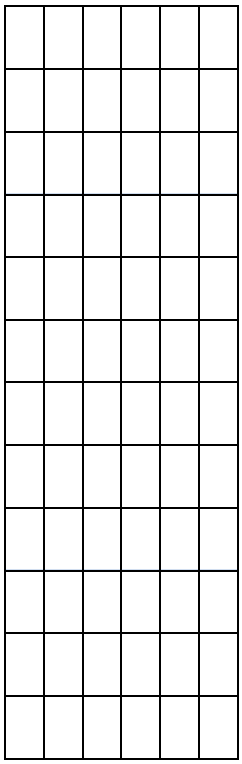
Set I- Ensayo 1 E2 E3 E4



C= I= C= I= C= I= C= I=



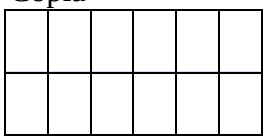
E5 Set II Recuerdo inmediato Set I R. D. Set I



C= I= C= I= C= I= C= I=

R. Correctas 1-5 Ensayos (AI o BI)		R. Correctas R. Inmediato (AI o BI)	
R. Correctas Ensayo Set II (AII o BII)		R. Correctas R. Mediato (AI o BI)	

Copia



C=

PASAT

Prueba de adiciones seriadas por audición espaciada.

Forma A

Práctica:

9+1 10	3 4	5 8	2 7	6 8	4 10	9 13	7 16	1 8	4 5

1+4 5	8 12	1 9	5 6	1 6	3 4	7 10	2 9	6 8	9 15
4 13	7 11	3 10	5 8	3 8	6 9	8 14	2 10	5 7	1 6
5 6	4 9	6 10	3 9	8 11	1 9	7 8	4 11	9 13	3 12
7 10	2 9	6 8	9 15	5 14	2 7	4 6	8 12	3 11	1 4
8 9	5 13	7 12	1 8	8 9	2 10	4 6	9 13	7 16	9 16

3 12	1 4	5 6	7 12	4 11	8 12	1 9	3 4	8 11	2 10

Total de respuestas correctas		Total de NR (no respuestas)	
Total R. Correctas en la 1ª. Mitad		Total de R incorrectas	
Total R. Correctas en la 2ª. Mitad		Respuestas tardias	

Pasat – 2 segundos

Práctica:

3+8 11	2 10	7 9	9 16	1 10	8 9	5 13	2 7	6 8	4 10

4+3 7	7 10	2 9	5 7	1 6	8 9	6 14	9 15	1 10	7 8
9 16	4 13	6 10	3 9	5 8	8 13	1 9	6 7	2 8	7 9
5 12	9 14	4 13	5 9	2 7	6 8	4 10	8 12	3 11	5 8
9 14	7 16	4 11	2 6	8 10	5 13	2 7	1 3	6 7	4 10
7 11	3 10	5 8	9 14	6 15	4 10	5 9	3 8	9 12	4 13
1 5	8 9	3 11	1 4	6 7	8 14	5 13	4 9	2 6	6 8

Total de respuestas correctas		Total de NR (no respuestas)	
Total R. Correctas en la 1ª. Mitad		Total de R incorrectas	
Total R. Correctas en la 2ª. Mitad		Respuestas tardías	

FLUENCIA VERBAL

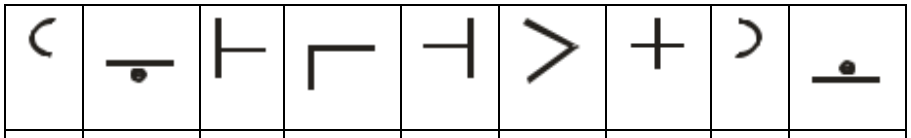
	FORMA A F	FORMA B P	FORMA A A	FORMA B R	FORMA A S	FORMA B M
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

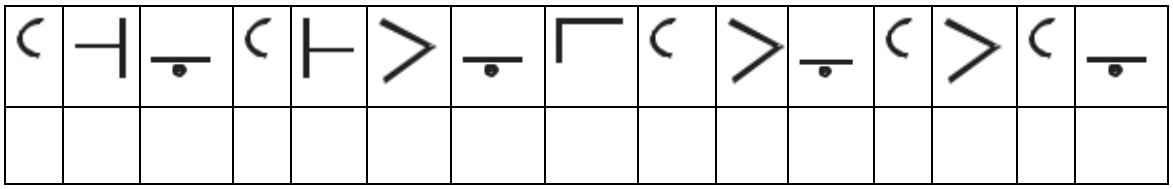
13			
14			
15			
16			
17			

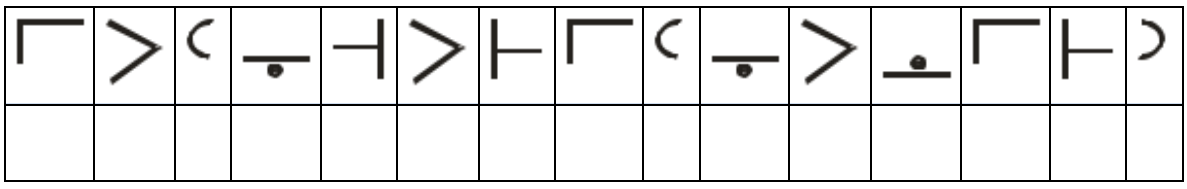
R. Correctas			
R. Incorrectas			
Intrusiones			
Perseveraciones			

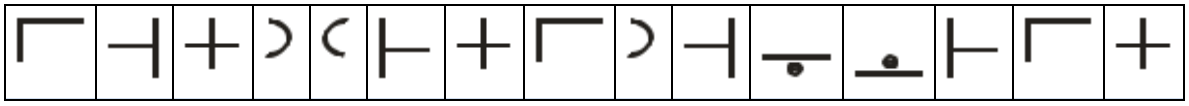
Total =

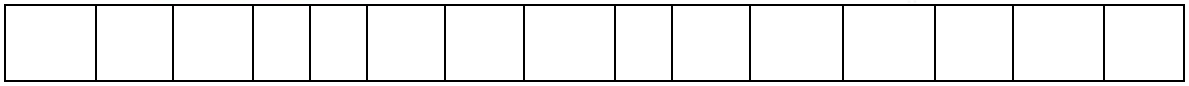
TEST DIGITO SIMBOLO.

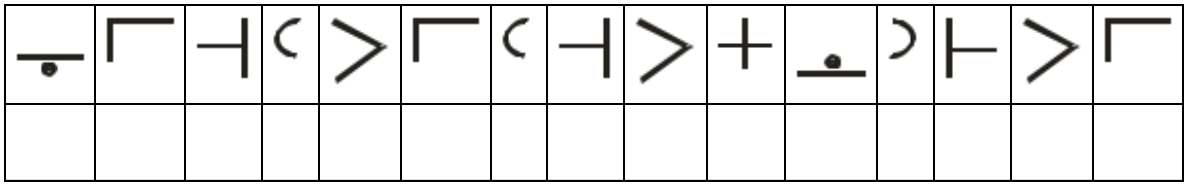
								
1	2	3	4	5	6	7	8	9

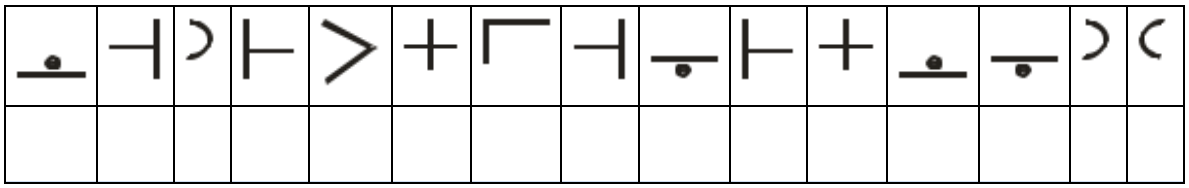












ANEXO 3
CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE TERAPEUTICA EXPERIMENTAL Y CLINICA(INTEC)
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**:**

Guadalajara, Jalisco **Fecha: ___/___/____**

ANEXO III. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Investigación: "POLIMORFISMO RS6265 DEL GEN *BDNF* Y SU ASOCIACIÓN CON EL DETERIORO COGNITIVO EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE".

INTRODUCCION:

Se solicita su participación para un proyecto consistente en encontrar la asociación entre la presencia del polimorfismo RS6265 del gen *BDNF* y su asociación con el

deterioro cognitivo presente en algunos casos de pacientes con diagnostico de Esclerosis Múltiple.

OBJETIVO DEL PROYECTO:

Evaluar la asociación entre el Polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* y el Deterioro Cognitivo en pacientes con Esclerosis Múltiple.

JUSTIFICACION:

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica degenerativa del sistema nervioso central a menudo incapacitante, que suele manifestarse entre los 20 y los 40 años de edad. Su etiología es desconocida aunque las investigaciones muestran que la destrucción de la mielina puede deberse a respuestas anormales del sistema inmunológico sobre el sistema nervioso central provocando síntomas entre los que destaca el deterioro cognitivo (DC). Entre un 50 a 60% de los pacientes presentan DC con alteraciones en los procesos de memoria, aprendizaje, atención, velocidad de procesamiento de la información, habilidades viso espaciales, funcionamiento ejecutivo y lenguaje, lo que representa un impacto en el desempeño y la adaptación en su vida cotidiana.

La EM es una enfermedad compleja de causa desconocida, los estudios marcan una predisposición genética y diversos factores ambientales como agentes que actúan en conjunto para su desarrollo. La genética se encarga de estudiar la herencia biológica y su variabilidad, la manera en como las diferentes características de un ser vivo se transmiten, se forman y se expresan entre generaciones.

Los polimorfismos son marcadores moleculares responsables de la variabilidad entre individuos de una misma especie. Tienen múltiples aplicaciones y se utilizan en el área de la medicina para detectar la susceptibilidad de un individuo a desarrollar un padecimiento o responder a un tratamiento.

Actualmente se conocen varios aspectos de la enfermedad que se relacionan a factores genéticos, como por ejemplo la susceptibilidad a desarrollar EM o la respuesta a tratamiento por parte de los pacientes, pero aun se desconoce la

relación entre la genética y la presencia de DC. De hecho son pocos los estudios que tratan de correlacionar factores genéticos con la aparición, curso y severidad del DC en EM.

La finalidad de encontrar posibles factores de riesgo a presentar DC, es la de tratar de establecer alternativas eficaces en su tratamiento y mejor pronóstico.
Las muestras que usted dona con este Consentimiento Informado serán congeladas y conservadas para su uso en el futuro con fines de investigación.

PROCEDIMIENTOS:

La investigación se llevará a cabo mediante diversos procedimientos en los que se incluye la toma de una muestra de sangre (en cantidad de una a tres cucharadas) para extracción del ADN para estudio de sus genes y su posible relación con el desarrollo y características particulares de la enfermedad. Se le pide que otorgue su consentimiento para poder utilizar sus muestras en investigación, con el fin de mejorar el conocimiento de la Esclerosis Múltiple.

Adicionalmente se realizarán una entrevista, una exploración neurológica y la aplicación de cuestionarios con el fin de conocer su perfil cognitivo. Los resultados de estas valoraciones igualmente serán tratados con estricta confidencialidad y utilizados para fines científicos.

POSIBLES RIESGOS:

- **Toma de muestra de Sangre:** la punción para la extracción de sangre puede causar molestia transitoria, dolor local, hematoma, hinchazón, aturdimiento, mareos y rara vez desmayo, así como una infección en la zona de la extracción, mismos que por lo general son transitorios y no requieren tratamiento.

BENEFICIOS:

- Recibir una valoración de su estado neurológico y perfil cognitivo de forma gratuita.
- La posibilidad de ser invitado a participar en ensayos futuros que puedan mejorar su condición de salud o su calidad de vida.
- La información que se obtenga de este estudio puede contribuir al desarrollo de

mejores alternativas de intervención que pueden mejorar la calidad de vida de personas con Esclerosis Múltiple o enfermedades relacionadas con la misma.

- Este estudio no brindará compensación económica alguna.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Su participación en el proyecto de investigación mencionado es totalmente voluntaria. Si firma el Consentimiento Informado confirmará que desea participar. Si decide retirar su consentimiento, su muestra será destruida y no se utilizará más. Su no participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su asistencia médica presente o futura.

Consentimiento Informado.

A través de la presente hago las siguientes declaraciones:

1. Que fui invitado(a) a realizarme una evaluación que incluye una valoración neurológica y neuropsicológica.
2. Que fui invitado a realizarme una extracción de sangre mediante procedimiento de punción venosa.
3. Que la evaluación y el procedimiento supra citado será realizado en las instalaciones del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, UDG, en Guadalajara, Jal. Por el Dr. en C. _____, así como otros investigadores. SIN COSTO ALGUNO PARA MI PERSONA.
4. Que otorgo mi consentimiento plenamente informado para que los resultados obtenidos sean utilizados por el grupo de investigación para ser publicados o presentados en congresos siempre y cuando se respete la confidencialidad de mi persona y no se mencione mi nombre por ningún motivo.
5. Que recibiré los resultados por escrito de mi evaluación neuropsicológica y neurológica de forma totalmente confidencial y gratuita independientemente de si otorgo o no mi consentimiento para el punto 3.
6. Entiendo que el procedimiento para la toma de muestras sanguíneas representa solo molestias locales, es por ello que:

Por favor coloque una “X” en el enunciado que se apega mas a su decisión.

	No autoriza que se tome la muestra y realice la evaluación.

	Si autorizo que se tome la muestra y realice la evaluación y se haga uso de los resultados solo para este estudio, razón por la cual una vez analizada la muestra esta será destruida.
	Si autorizo que se tome la muestra, realice la evaluación y se haga uso de los resultados para este estudio y estudios futuros, por lo cual la muestra y la evaluación serán resguardados el tiempo que sea necesario.

Por lo anterior, doy mi consentimiento para participar en el estudio.

Otorga el consentimiento_____

Nombre_____ Fecha_____

Representante Legal _____

Nombre _____

Fecha_____

Testigo 1_____

Nombre _____

Fecha_____

Testigo 2_____

Nombre _____

Fecha_____

Investigador Responsable_____

Nombre _____

Fecha_____

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y otorga su consentimiento para realizar las pruebas genéticas en los términos antes explicados, por favor firme a continuación en sentido afirmativo:

……...

(paciente/padre o madre del paciente/custodio legal del paciente (nombre, dos apellidos, firma y fecha)

Dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse con:

_____

_____

_____

_____

8.REFERENCIAS

[1]Zhou L, Trapp D, Miller H. Demyelination in the Central Nervous System Mediated by an Anti-Oligodendrocyte Antibody. J. Neurosci. 1998; 54:158–168.

[1] Dehghan-Nayeri N, Khakbazan Z, Ghafoori F, Nabavi SM. Sexual dysfunction levels in iranian women suffering from multiple sclerosis. Mult Scler Relat Disord. 2017 Feb;12:49-53.

[1] Kimura Y, Sato N, Ota M, Maikusa N, Maekawa T, Sone D, Enokizono M, Sugiyama A, Imabayashi E, Matsuda H, Okamoto T, Yamamura T, Sugimoto H. A structural MRI study of cholinergic pathways and cognition in multiple sclerosis.eNeurologicalSci. 2017; 1(8):11-16.

[1] Benedict RHB, DeLuca J, Enzinger C, Geurts JJG, Krupp LB, Rao SM. Neuropsychology of Multiple Sclerosis: Looking Back and Moving Forward. J Int Neuropsychol Soc. 2017;23(9-10):832-842.

[1] Zhang C, Gu X, Wang Q, Li M, Deng W, Guo W, Zhao L, Ma X, Li T. [Association of Val66Met polymorphism of brain-derived neurotrophic factor gene with cognitive impairment and clinical symptoms in first episode schizophrenia]. Zhonghua Yi XueYi Chuan Xue Za Zhi. 2017;34(4):592-596.

[1] Fera F, Passamonti L, Cerasa A, Gioia MC, Liguori M, Manna I, Valentino P, Quattrone A. The BDNF Val66Met polymorphism has opposite effects on memory circuits of multiple sclerosis patients and controls. PLoS One. 2013;8(4):e61063.

[1] Klaver R, De Vries HE, Schenk GJ, Geurts JJ. Grey matter damage in multiple sclerosis: a pathology perspective. Prion. 2013;7(1):66-75.

[1] Porras-Betancourt M, Nuñez-Orozco L, Placencia-Alvarez N, Quiñones-Aguilar S, Sauri-Suarez S. Esclerosis múltiple. Rev Mex Neuroci. 2007; 8 (1): 57-66.

[1] Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. Semin Neurol. 2016;36(2):103-14.

[1] Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. N Engl J Med. 2018;378(2):169-180.

[1] Hojati Z. Molecular Genetic and Epigenetic Basis of Multiple Sclerosis. Adv Exp Med Biol. 2017;958:65-90.

[1] Stevenson EV , Alexander JS , Yun JW , Becker F , Gonzalez-Toledo E . Chapter 16 – Mechanisms of blood–brain barrier disintegration in the pathophysiology of multiple sclerosis . In: Minagar A (ed). Multiple sclerosis . London: Academic Press,

2016 ; 393 – 413 .

[1] José Sá M. Physiopathology of symptoms and signs in multiple sclerosis. Arq Neuropsiquiatr. 2012; 70(9):733-740**.**

[1] Fernández O, Cuevas C, Arcega R, Núñez-Orozco L, Carrasco-Vargas H, Ordoñez-Boschetti L, et al. Esclerosis múltiple: situación actual y tendencias futuras. Revista Mexicana de Neurociencia. 2016; 17(6): 1-132

[1] Vasconcelos CC, Aurenção JC, Thuler LC, Camargo S, Alvarenga MP, Alvarenga RM. Prognostic factors associated with long-term disability and secondary progression in patients with Multiple Sclerosis. Mult Scler Relat Disord. 2016 Jul;8:27-34.

[1] Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology. 2014;83(3):278-86.

[1] Severijns D, Zijdewind I, Dalgas U, Lamers I, Lismont C, Feys P. TheAssessment of Motor Fatigability in Persons With Multiple Sclerosis: A SystematicReview. Neurorehabil Neural Repair. 2017;31(5):413-431.

[1] Murphy R, O'Donoghue S, Counihan T, McDonald C, Calabresi PA, Ahmed MA, Kaplin A, Hallahan B. Neuropsychiatric syndromes of multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2017.

[1] Matias-Guiu JA, Cortés-Martínez A, Valles-Salgado M, Oreja-Guevara C, Pytel V, Montero P, Moreno-Ramos T, Matias-Guiu J. Functional Components of Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis: A Cross-Sectional investigation. Front Neurol. 2017; 28:8-643.

[1] Covey TJ, Shucard JL, Shucard DW. Event-related brain potential indices of cognitive function and brain resource reallocation during working memory in patients with Multiple Sclerosis. Clin Neurophysiol. 2017;128(4):604-621.

[1] Baltruschat SA, Ventura-Campos N, Cruz-Gómez TJ, Belenguer A, Forn C. Gray matter atrophy is associated with functional connectivity reorganization during the Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT) execution in Multiple Sclerosis (MS). J Neuroradiol. 2015;42(3):141-149.

[1] Wishart H, Sharpe D. Neuropsychological aspects of multiple sclerosis: A quantitative review. Neuropsychology. 1997; 3: 357-366.

[1] DeLuca J, Chelune GJ, Tulsky DS, Lengenfelder J, Chiaravalloti ND. Is speed of processing or working memory the primary information processing deficit in multiple sclerosis? Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology. 2004; 26: 550-62.

[1] Camp SJ, Stevenson VL, Thompson AJ, et. al. Cognitive function in primary

progressive and transitional progressive Multiple Sclerosis. Brain. 1999; 122: 1341-1348.

[1] Rao SM, Leo GJ, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. Neurology. 1991; 41: 685-691.

[1] Sepulcre J, Vanotti S, Hernández R, Sandoval G, Caceres F, Garcea O, Villoslada P. Cognitive impairment in patients with multiple sclerosis using the Brief Repeatable Battery-Neuropsychology test. Multiple Sclerosis. 2006; 12: 187-195.

[1] Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease . Clin Med (Lond). 2017;17(6):530-536

[1] Connor B., Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. Brain Res. Rev. 1998;27:1–39.

[1] Barde YA, Edgar D and Thoenen H. Purificación of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO J. 1982;1:549-553.

[1] Aurikko JP, Ruotolo BT, Grossmann JG, Moncrieffe MC, Stephens E, Leppanen VM, Robinson CV, Saarma M, Bradshaw RA, Blundell TL. Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. J Biol Chem. 2005; 280:33453–33460.

[1] Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. Nature. 1997; 389:856–860.

[1] Kaneko M, Xie Y, An JJ, Stryker MP, Xu B. Dendritic BDNF synthesis is required for late-phase spine maturation and recovery of cortical responses following sensory deprivation. 2012; J Neurosci 32:4790–4802

[1] Govindarajan A, Israely I, Huang SY, Tonegawa S. The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. Neuron. 2011; 69:132–146

[1] Fries P. A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. Trends Cogn Sci. 2005; 9:474–480

[1] Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A, Dobrossy MD, Dunnett SB, Berardi N, Brambilla R. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. Neurobiol Dis. 2009; 33:358–368

[1] Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. J Neurosci. 2004 5;24(18):4401-11.

[1] Anastasia A, Deinhardt K, Chao MV, Will NE, IrmadyK, Lee FS, et al. Val66Met Polymorphism of BDNF Alters Prodomain Structure to Induce Neuronal Growth Cone Retraction. Nature Communications. 2013; 4- 2490.

[1] Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A,Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory andhippocampal function. Cell. 2003;112(2):257-69.

[1] Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Lume M, Matsumoto T, Hara T, Yamawaki S,Takahashi M, Shiosaka S, Itami C, Uegaki K, Saarma M, Kojima M. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(23):E3067-74.

[1] Neuroplasticity and repair in the central nervous system. Implications for health care. WHO Offset Publ. 1983;73:1-56.

[1] Thoenen H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. Prog. Brain Res. 2000;128:183–191.

[1] Prokopova B, Hlavacova N, Vlcek M, Penesova A, Grunnerova L, Garafova A,Turcani P, Kollar B, Jezova D. Early cognitive impairment along with decreased stress-induced BDNF in male and female patients with newly diagnosed multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2017; 302:34-40

[1] Cerasa A, Tongiorgi E, Fera F, Gioia MC, Valentino P, Liguori M, Manna I, Zito G, Passamonti L, Nisticò R, Quattrone A. The effects of BDNF Val66Met polymorphism on brain function in controls and patients with multiple sclerosis: an imaging genetic study. Behav Brain Res. 201o; 207(2):377-86

[1] Amato M, Zipoli V, Portaccio E. Multiple sclerosis-related cognitive changes: A review of cross-sectional and longitudinal studies. J Neurol Sci. 2006; 245: 41-6.

[1] O'Gorman C, Lucas R, Taylor B. Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms. Int J Mol Sci. 2012;13(9):11718-52.

[1] Parnell GP, Booth DR. The Multiple Sclerosis (MS) Genetic Risk Factors Indicate both Acquired and Innate Immune Cell Subsets Contribute to MS Pathogenesis and

Identify Novel Therapeutic Opportunities. Front Immunol. 2017;18:8-425.

[1] Guenter W, Jabłońska J, Bieliński M, Borkowska A. Neuroimaging and genetic correlates of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. Psychiatr Pol.2015;49(5):897-910.

[1] Cáceres F, Vanotti S, Rao S; RECONEM Workgroup. Epidemiological characteristics of cognitive impairment of multiple sclerosis patients in a Latin American country. J Clin Exp Neuropsychol. 2011;33(10):1094-8.

[1] Macías-Islas MÁ, Aguayo-Arelis A, Rábago Barajas BV, Velázquez Quintana M, Martínez-Tapia ME, Arango-Lasprilla JC. Deterioro cognitivo en pacientes con esclerosis múltiple del occidente de México. Revista Mexicana de Neurociencia. 2016; 16(3), 3-12.

Ref: POLIMORFISMO RS6265 DEL GEN *BDNF* Y SU ASOCIACIÓN CON EL DETERIORO COGNITIVO EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE. Noviembre 2019 - AUTOR: MIGUEL ANGEL MACIAS ISLAS - CO-AUTORES: ADRIANA AGUAYO ARELIS, MIRIAM SALDAÑA

Felicitaciones por el proyecto de investigación de referencia, y estoy a la disposición para apoyar al equipo investigador.
El deterioro cognitivo en la EM es un síntoma invisible de indudable importancia en la EM y el estudio de su eventual fisiopatogenia y su probable influencia genética ayudará notablemente a su comprensión y tratamiento.
Los resultados obtenidos podrán ser utilizados como marcadores biológicos de agresividad, y se podrán caracterizar grupos de riesgo de sufrir deterioro cognitivo.
Quedo a las órdenes y envío mis más cordiales saludos desde Uruguay, Carlos Oehninger

Estimados todos:

Miguel Ángel tuvo la cortesía de mostrarme con antelación su propuesta y protocolo para mi opinión y crítica. Como un comentario y punto de vista personal veo este estudio como una contribución latinoamericana de alto alcance y como un verdadero estudio traslacional de la molécula a la clínica, situación muy especial sino única proveniente de nuestro medio. El hecho que se les haya informado que el estudio está ya substancialmente subsidiado me parece otro gesto más de honestidad científica y administrativa de los investigadores.

Les deseo un gran mes de noviembre a todos en compañía de sus crecientes familias.

Victor M. Rivera, M.D., FAAN
Distinguished Emeritus Professor of Neurology
Founding Director of the Maxine Mesinger MS Clinic

.