



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**Identificación de mutaciones en los genes *GABRA1* y *GABRB3* de
pacientes mexicanos con encefalopatías epilépticas, a través de
secuenciación automatizada tipo Sanger.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

P R E S E N T A

CARRILLO CRUZ ISaura KARINA

ASESOR:

DR. AURELIO JARA PRADO

CO-ASESOR:

QFB. GABRIEL ARTURO LIMA VILLEDA

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

Identificación de mutaciones en los genes GABRA1 y GABRB3 de pacientes mexicanos con encefalopatías epilépticas, a través de secuenciación automatizada tipo Sanger.

Que presenta la pasante: **Isaura Karina Carrillo Cruz**

Con número de cuenta: **310090704** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Q.F.B. Gabriel Arturo Lima Villeda	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

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



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “Dr. Manuel Velazco Suarez”

La presente investigación:

“Identificación de mutaciones en los genes *GABRA1* y *GABRB3* de pacientes mexicanos con encefalopatías epilépticas, a través de secuenciación automatizada tipo Sanger.”

Se realizó en el Laboratorio de Genética, perteneciente al Departamento de Neurogenética del INNyNMVS bajo la dirección del Dr. Aurelio Jara Prado.

DEDICATORIA

A mis padres:

Por formarme tan amorosamente e inculcarme los valores que me hacen la mujer que soy ahora, por su apoyo y comprensión en cada paso dado en vida, por sus cuidados, sus consejos y los sacrificios que conllevaron esta meta alcanzada.

Gracias.

A mis hermanos:

Por su compañía y cariño, mi vida no tendría ni la mitad de dicha que soy afortunada de tener si ustedes no estuvieran en ella. Los amo.

A mi sobrino:

Por llegar y llenar mi vida de una felicidad desmedida, tu inocencia y ternura me hacen querer ser mejor persona cada día.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por bendecirme a lo largo de mi vida, por rodearme de personas buenas y por permitirme haber alcanzado esta meta.

Al Dr. Aurelio Jara Prado por darme la oportunidad de entrar a su programa de servicio social y posteriormente permitirme hacer el presente proyecto de tesis, por todo el conocimiento que me ha brindado desde entonces hasta ahora y por su paciencia a lo largo de este proceso. Al QFB. Gabriel Arturo Lima Villeda, por sus consejos, apoyo y paciencia como tutor y como amigo a lo largo de mi proyecto de tesis y de mi estadía en el servicio social. También quiero agradecerle al resto del personal del Laboratorio de Genética: Lety, Adri, George, David, Don gabino, por las enseñanzas dadas y por hacerme sentir parte del laboratorio.

A mis amigos de la universidad Viry, Andrea, Danihui y Nico, gracias por todas las aventuras que compartimos juntos, este camino no hubiera sido igual sin ustedes.

A Tavo por llegar a mi vida y llenarla de amor, por tu paciencia, dulzura, buen humor y apoyo en cada decisión buena o mala tomada en este proceso.

A mi familia, abuelos, tíos, primos, gracias por hacerme sentir amada y apoyada, soy afortunada por tener una familia tan amplia y unida como ustedes.

A mis profesores que me formaron académicamente y algunos también formándome personalmente. Gracias por todo.

A mi jurado que tan amablemente se tomaron el tiempo de revisar mi tesis y dar sus comentarios pertinentes.

A la UNAM por darme la oportunidad de formar parte de la máxima casa de estudios y darme todas las herramientas para convertirme en Lic. Bioquímica Diagnóstica.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN	11
1. MARCO TEÓRICO.....	12
1.1 Epilepsia generalidades.....	12
1.1.1 Definición.....	12
1.1.2 Diagnóstico.....	13
1.1.3 Clasificación.....	15
1.1.4 Factores de Riesgo	16
1.2 Canalopatías epilépticas.....	17
1.2.1 Tratamiento de las canalopatías epilépticas.....	19
1.3 Encefalopatías epilépticas.....	21
1.3.1 Encefalopatía mioclónica temprana	21
1.3.2 Encefalopatía epiléptica infantil temprana (síndrome de Ohtahara).....	22
1.3.3 Espasmo Infantil (Síndrome West).....	23
1.3.4 Epilepsia mioclónica grave en la infancia (síndrome de Dravet)	24
1.3.5 Crisis parciales migratorias en la infancia	24
1.3.6 Estado mioclónico en encefalopatías no progresivas	25
1.3.7 Síndrome de Lennox-Gastaut (LGS)	25
1.3.8 Síndrome de Landau-Kleffner (LKS)	26
1.3.9 Epilepsia con ondas de pico continuas durante el sueño de onda lenta (CSWS) ...	27
1.4 Importancia de la heterogeneidad genética en la epilepsia	28
1.5 Receptor GABA _A	30
1.5.1 Mutaciones en subunidades del receptor GABA _A asociados con epilepsias genéticas.....	33
1.6 <i>GABRA1</i>	35
1.6.1 Función.....	35
1.6.2 Localización	35
1.6.3 Fenotipos.....	36
1.6.4 Correlación genotipo-fenotipo.....	36
1.6.5 Variantes alélicas reportadas	37

1. 7 <i>GABRB3</i>	39
1. 7 .1 Función	39
1. 7. 2 Localización	39
1. 7. 3 Fenotipos.....	40
1. 7. 4 Variantes alélicas.....	40
2. JUSTIFICACIÓN.....	42
3. HIPÓTESIS	43
4. OBJETIVOS	43
5. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL	44
6. MATERIAL Y METODOS.	45
6. 1 Carta de consentimiento informado.	45
6. 2 Toma de muestra	45
6.3 Procedimiento	45
6.4 Lisis y extracción de DNA	45
6. 4. 1 Integridad del DNA genómico.....	46
6. 4. 2 Cuantificación de DNA genómico mediante espectrofotometría.....	46
6. 5 PCR punto final para los genes de <i>GABRA1</i> y <i>GABRB3</i>	47
6. 5. 1 Descripción de primers para los genes <i>GABRA1</i> y <i>GABRB3</i>	48
6. 5. 2 Temperaturas de alineamiento	50
6. 5. 3 Condiciones para PCR punto final de los genes <i>GABRA1</i> y <i>GABRB3</i>	53
6. 5. 4 Purificación de productos de PCR mediante corte de bandas.....	53
6. 6 Reacción de secuenciación.....	54
6. 6. 1 Mezcla de reacción para la secuenciación.....	54
6. 6. 2 Condiciones de reacción de secuenciación para los genes <i>GABRA1</i> y <i>GABRB3</i>	55
6. 6. 3 Purificación de reacción de secuenciación.	55
6. 7 Secuenciación.....	56
6. 8 Consulta de bases de datos.....	56
6. 9 Análisis de GERP++ y phyloP	56
7. RESULTADOS	57
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	71
9. CONCLUSIONES	75
10. REFERENCIAS.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Semiología en los diferentes estadios en una crisis epiléptica.....	13
Tabla 2. Distribución de crisis epilépticas.....	14
Tabla 3. Síndromes epilépticos.....	15
Tabla 4. Canalopatías epilépticas.....	19
Tabla 5. Enfoque farmacológica de las canalopatías epilépticas.....	20
Tabla 6. Genes que codifican las subunidades del receptor GABA _A	31
Tabla 7. Disfunciones del receptor GABA _A por mutaciones o variantes.....	34
Tabla 8. Volúmenes específicos para PCR punto final.....	47
Tabla 9. Primers para los exones del gen <i>GABRA1</i>	48
Tabla 10. Primers para los exones del gen <i>GABRB3</i>	49
Tabla 11. Volúmenes específicos para gradiente de temperatura.....	50
Tabla 12. Ciclos y temperaturas para el gradiente de temperatura.....	50
Tabla 13. Temperaturas de alineamiento para los exones del gen <i>GABRA1</i>	52
Tabla 14. Temperaturas de alineamiento para los exones del gen <i>GABRB3</i>	52
Tabla 15. Ciclos y temperaturas para PCR punto final para los genes <i>GABRA1</i> y <i>GABRB3</i>	53
Tabla 16. Volúmenes específicos para la reacción de secuenciación para ambos genes.....	54
Tabla 17. Ciclos y temperaturas de reacción de secuenciación para los genes <i>GABRA1</i> y <i>GABRB3</i>	55
Tabla 18. Resultados generales para variantes en el gen <i>GABRA1</i>	57
Tabla 19. Frecuencias genotípicas y alélicas de variantes encontradas para el <i>GABRA1</i>	58
Tabla 20. Resultados generales para variantes en el gen <i>GABRB3</i>	64
Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas de variantes encontradas para el gen <i>GABRB3</i>	65
Tabla 22. Scores de conservación de nucleótidos para cada variante encontrada.....	68
Tabla 23. Datos clínicos de paciente. Primera parte.....	69
Tabla 24. Datos Clínicos de paciente. Segunda parte.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nueva propuesta de clasificación de las epilepsias y los tipos de crisis.....	15
Figura 2. Patrón electroencefalográfico de brote- supresión.....	21
Figura 3. EEG Hipsarritmia.....	22
Figura 4. Patrón punta-onda lenta generalizado.....	25
Figura 5. Descargas de puntas-ondas continuas.....	26
Figura 6. Durante el sueño, descargas epileptiformes continuas.....	27
Figura 7. Cronología del descubrimiento de genes en epilepsias humanas.....	29
Figura 8. Representación de la estructura del receptor GABA _A y sitios de unión.....	31
Figura 9. Mutaciones asociadas con síndromes de epilepsia genética en subunidades del receptor GABA _A	32
Figura 10. Ubicación cromosómica del gen <i>GABRA1</i>	36
Figura 11. Ubicación cromosómica del gen <i>GABRB3</i>	39
Figura 12. Ejemplo de Gradiente de temperatura.....	51
Figura 13. Electroferograma de paciente 26 que muestra variante rs41275339 con alelo heterocíclico.....	59
Figura 14. Electroferograma de paciente 15 que muestra variante rs11296470 con alelo heterocigoto.....	59
Figura 15. Electroferograma de paciente 31 que muestra variante rs1129647 con alelo homocigoto.....	60
Figura 16. Electroferograma de paciente 24 que muestra variante rs11135172 con alelo heterocigoto.....	60
Figura 17. Electroferograma de paciente 24 que muestra variante rs2279020 con alelo heterocigoto.....	61
Figura 18. Electroferograma de paciente 24 que muestra variante rs2279020 con alelo homocigoto.....	61
Figura 19. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones para la variante rs41275339.....	62
Figura 20. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones para la variante rs1129647.....	62
Figura 21. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones para la variante rs11135172.....	63
Figura 22. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones para la Variante rs2279020.....	63
Figura 23. Electroferograma de paciente 45 que muestra variante rs201953456 con alelo heterocigoto.....	66
Figura 24. Electroferograma de paciente 24 que muestra variante rs3751582 con alelo heterocigoto.....	66
Figura 25. Electroferograma de paciente 47 que muestra mutación con variante rs3751582 con alelo Homocigoto.....	67
Figura 26. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones para la variante rs201953456.....	67
Figura 27. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones para la variante rs3751582.....	68

ABREVIATURAS

AV: Ácido valproico.

BZD: Benzodicepinas.

CAE: Epilepsia benigna de ausencias infantil.

CBZ: Carbamacepina.

CM: Crisis Mioclónica.

CPC: Crisis Parcial Compleja.

CPS: Crisis Parcial Simple.

CSWS: Epilepsia con ondas de pico continuas durante el sueño de onda lenta.

CTCG: Crisis Tónico Clónica Generalizada.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EE: Encefalopatías eplipépticas.

EEG: Electroencefalograma.

ESM: Etosuximida.

FBT: Fenobarbital.

FBM: Felbamato.

FNT: Fenitoína.

FS: Crisis febriles.

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

GBP: Gabapentina.

GEFS+: Epilepsia generalizada con crisis febriles.

IGE: Epilepsias idiopáticas generalizadas.

ILAE: Liga Internacional Contra la Epilepsia.

JME: Epilepsia mioclónica juvenil.

LGS: Síndrome de Lennox Gastaut.

LKS: Síndrome de Landau-Kleffner.

LTG: Lamotrigina.

MAF: Alelo de Menor Frecuencia.

OMS: Organización Mundial de Salud.

OXC: Oxcarbacepina.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RNA: Ácido ribonucleico.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TCG: Tónico clónica generalizada.

TPM: Topiramato.

ZNS: Zonisamida.

RESUMEN

De acuerdo a la última actualización de la ILEA en el 2017, el término actual para describir una encefalopatía epiléptica se refiere a cuando la propia actividad epiléptica contribuye a graves deficiencias cognitivas y de comportamiento por encima y más allá de lo que se podría esperar de la patología subyacente sola y están incluidas 9 epilepsias bajo este término. Estos síndromes muestran característicamente resistencia a los medicamentos antiepilépticos y la etiología para este tipo de epilepsias no es clara, ya que la herencia no sigue un patrón mendeliano clásico, y el riesgo de adquirirla sigue un patrón más bien multifactorial. Por lo tanto se debe considerar la posibilidad de que otros genes adicionales aún no identificados pudieran ser relevantes, para la comprensión de este tipo de epilepsias. Para lo cual se realizó la búsqueda de variantes en pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suarez con diagnóstico de encefalopatías epilépticas tipo Lennox Gastaut y Dravet en los genes *GABRA1* y *GABRB3*, genes que en los últimos años han sido asociados a la enfermedad.

Se encontraron las variantes rs41275339, rs1129647, rs11135172 y rs2279020 correspondientes para el gen *GABRA1*, dichas variantes ya se encontraban reportadas, por lo que se compararon los MAF obtenidos, con los ya reportados en diferentes poblaciones del mundo y no se encontraron diferencias significativas con la población mexicana sana previamente ya reportada. Para el caso del gen *GABRB3* se encontraron las variantes rs201953456 y rs3751582, de igual forma se compararon los MAF obtenidos, con los ya reportados en diferentes poblaciones del mundo, encontrando la variante rs201953456 significativamente mayor en pacientes con encefalopatías epilépticas en comparación con el resto de las poblaciones empáticas. Se revisaron las puntuaciones (scores) de GERP++ y phyloP en la página de Genome Browser y se observó que ningún fragmento donde se encuentran las variantes está altamente conservado en la evolución.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Epilepsia generalidades

La epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos más comunes y con mayor incidencia reportada anualmente en individuos de todas las edades. Según la Organización Mundial de Salud (OMS) 50 millones de personas en el mundo padecen algún tipo de epilepsia y aproximadamente el 80% de estos pacientes viven en países de bajos y medianos recursos, alrededor de tres cuartas partes de estos pacientes no reciben el tratamiento necesario, debido a que en muchos lugares del mundo los pacientes y sus familias son señalados y discriminados. Por otra parte aproximadamente solo el 70% de los casos de los pacientes que reciben el tratamiento adecuado responden a este.¹

En 2005 en el documento de la OMS titulado *Global burden of epilepsy and the need for coordinated action at the country level to address its health, social and public knowledge implications*, se hace un llamado a los estados miembros de la OMS, para que dentro de las estrategias del manejo de las enfermedades crónicas no transmisibles, se desarrollaran políticas públicas tanto nacionales como internacionales encaminadas al tratamiento integral de las personas con epilepsia, en vista al gran impacto en la salud pública mundial.²

1. 1. 1 Definición

La epilepsia es definida por la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) como una alteración del cerebro caracterizada por una predisposición duradera para generar crisis epilépticas y por sus consecuencias neurocognitivas, psicológicas y sociales. La definición de epilepsia requiere la aparición de al menos una crisis epiléptica, la cual se define como a la aparición transitoria de signos y/o síntomas provocados por una actividad neuronal anormal excesiva o simultánea en el cerebro.³

1. 1. 2 Diagnóstico

Que se diagnostique epilepsia posterior a solo una crisis epiléptica no provocada asociada a un alto riesgo de recurrencia, puede dar lugar a la decisión de iniciar o no tratamiento por parte del médico. Sin embargo una decisión terapéutica no es lo mismo que un diagnóstico.⁴

La asamblea general de la ILAE propuso un esquema diagnóstico de crisis epilépticas y epilepsia.⁵ Este esquema se divide en 5 ejes:

Eje 1: Consiste en la descripción de la semiología durante la crisis, lo cual conlleva a la revisión de la historia previa del paciente, detallando todas las manifestaciones referidas, dando énfasis al primer signo identificado, para de este modo reconocer posibles auras. Es de suma utilidad si se logra desglosar el evento en los 3 estadios posibles: precrisis, crisis y poscrisis.⁶

Tabla 1. Semiología en los diferentes estadios en una crisis epiléptica.

<i>Semiología relacionada a los diferentes estadios en una crisis epilepsia</i>	
<i>Precrisis</i>	Fiebre Altitudes Enfermedad Falta de sueño Menstruación Lesión cerebral
<i>Crisis</i>	Alucinaciones Movimientos clónicos Epigastralgia Manifestaciones motoras. Manifestaciones psíquicas Manifestaciones sensitivas motoras.
<i>Poscrisis</i>	Debilidad Parálisis de Todd Cefalea intensa

Modificado de: Palacios, et al (2016).⁷⁰

Eje 2: Se relaciona con los tipos de crisis y estímulos precipitantes para las crisis reflejas, las cuales pueden ser de tipo:

Tabla 2. Distribución de crisis epilépticas

Tipos de Crisis	
GENERALIZADAS	Ataques tónico-clónicos Crisis clónicas Sin características tónicas Con características tónicas Ataques de ausencia típicos Ataques de ausencia atípicos Ataques de ausencia mioclónicos Crisis tónicas Espasmos Ataques mioclónicos Miocolonia de párpados Sin ausencias Con ausencias Ataques atónicos mioclónicos Mioclono negativo Crisis atónicas Crisis reflejas en síndromes de crisis generalizada
FOCALES	Crisis sensoriales focales Con síntomas sensoriales elementales Con síntomas sensoriales experienciales Ataques motores focales Con signos de motor clónico elementales Con ataques motores tónicos asimétricos Con automatismos típicos Con automatismos hipercinéticos Con mioclono focal negativo Con ataques motores inhibitorios Crisis gelásticas Crisis secundariamente generalizadas Crisis reflejas en síndromes de epilepsia focal

Modificado de: Engel J (2001).⁵

Por otro lado algunos estímulos precipitantes para propiciar una crisis epiléptica, pueden ser de tipo visual como luz parpadeante o patrones repetitivos o de tipo no visual como la música, introducirse en agua muy caliente o asustar al paciente.⁶

Eje 3: Diagnóstico sindrómico que se deriva de la lista de síndromes de epilepsia, aunque no siempre es posible dar un diagnóstico sindrómico. La lista recomendada distingue entre síndromes de epilepsia y condiciones con crisis que no requieren un diagnóstico, y también identifica los síndromes que están todavía en desarrollo.

Tabla 3. Síndromes epilépticos

Síndromes epilépticos	
Epilepsias focales	Epilepsias idiopáticas de la lactante y de la infancia Epilepsias familiares (autosómicas dominantes) Epilepsias sintomáticas (o probablemente sintomáticas)
Otros tipos definidos por localización y etiologías	Epilepsias neocorticales Epilepsias generalizadas idiopáticas Epilepsias reflejas Encefalopatías epilépticas (en las que las anomalías epileptiformes pueden contribuir a una disfunción progresiva). Epilepsias mioclónicas progresivas

Adaptado de: Pozo, et al, (2001).⁷

Eje 4: Se relaciona con el origen cuando ésta se identifica. La etiología podría consistir en una enfermedad específica derivada de una clasificación de enfermedades frecuentemente asociadas con ataques epilépticos o síndromes, por un defecto genético o un sustrato patológico específico, por ejemplo para las crisis focales sintomáticas.⁶

Eje 5: Es una designación opcional con el grado de afectación de la función cerebral causado por la condición epiléptica.

1. 1. 3 Clasificación

Su clasificación ha variado durante el transcurso de los años y en su última actualización realizada por la ILAE, publicada en el 2017, nos muestra una clasificación multinivel diseñada para clasificar la epilepsia en diferentes entornos

clínicos; se describen los tipos de crisis (focal, generalizada, desconocido), los tipos de epilepsia (focal, generalizado, combinado generalizado y focal, desconocido) y los síndromes epilépticos.⁸

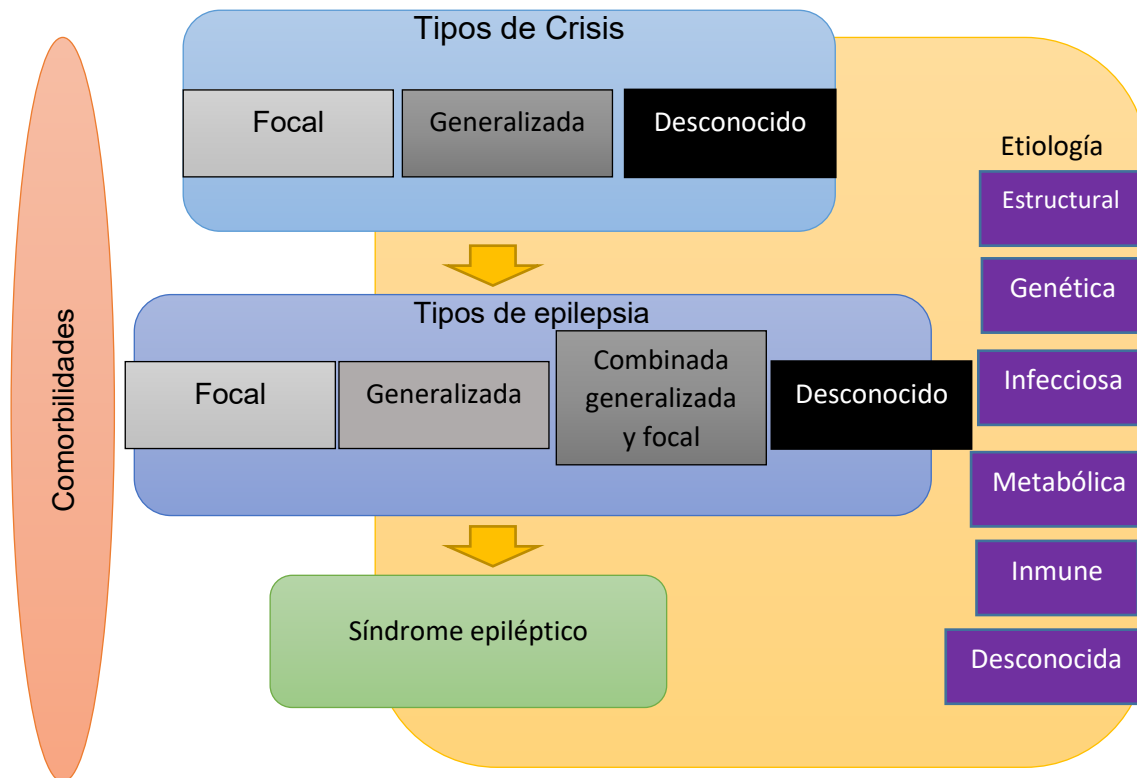


Figura 1. Nueva propuesta de clasificación de las epilepsias y los tipos de crisis. Modificado de Fisher, et al, (2017).⁸

1. 1. 4 Factores de Riesgo

De acuerdo con la OMS un factor de riesgo es cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión. Dentro de los factores de riesgo para la epilepsia se pueden encontrar cinco grupos o categorías.⁹

Los factores de riesgo para la epilepsia pueden variar según el nivel de desarrollo del país, sin embargo a continuación se describen los factores de riesgo descritos más comúnmente en estudios a nivel mundial:¹⁰

- **Factores genéticos**, como antecedentes de epilepsia en padres, abuelos, tíos, hermanos o primos.¹⁰
- **Factores prenatales de riesgo**, como la presencia de amenaza de aborto, infecciones virales, hipertensión crónica, preeclampsia o eclampsia, diabetes, presencia de crisis convulsivas durante el embarazo, *abruptio placentae*, placenta previa, exposición a Rayos X o ultrasonido (ecografías), ruptura prematura de membranas, consumo de medicamentos (hierro, vitaminas, etc.), uso de alcohol, tabaco, drogas alucinógenas, edad avanzada de la madre.¹⁰
- **Factores perinatales de riesgo**: parto no hospitalario, parto prematuro, parto postmaduro, parto inducido, presentación podálica o transversa y circulares del cordón, cesárea, forceps o vacuum, anestesia general, anestesia epidural, medicación durante el parto, parto prolongado, parto precipitado, primogenitura, embarazo múltiple, ruptura prematura de membrana, inmadurez fetal e hipoxia.¹⁰
- **Infecciones del sistema nervioso central (SNC)**: meningitis y encefalitis. Enfermedades virales de la infancia como sarampión, varicela, paperas.¹⁰
- **Traumas craneoencefálicos**, lo cuales pueden ser traumas abiertos o traumas cerrados.¹⁰

1. 2 Canalopatías epilépticas.

Desde la identificación de la fibrosis quística como la primera enfermedad asociada a un canal iónico en 1989, se inició la investigación sobre patologías de este tipo y la lista hasta ahora continua creciendo. El concepto reciente de canalopatía se refiere a los defectos en la función de los canales iónicos que llevan a alteraciones fisiológicas importantes.¹¹

Las canalopatías se producen por dos tipos de mecanismos: enfermedades autoinmunes o causas genéticas. Las enfermedades autoinmunes pueden ser

causantes de canalopatía debido a que los autoanticuerpos para las proteínas canal pueden disminuir o aumentar la función del canal como en la *miastenia gravis*.¹¹

Por otro lado, dentro de las causas genéticas se pueden encontrar 3 alteraciones posibles. Cuando la alteración se presenta en la región codificante para un canal iónico, estas mutaciones producen cadenas polipeptídicas, que no son procesadas correctamente y por lo tanto no se incorporan a la membrana plasmática, o bien, al acoplarse las subunidades y formar los canales, estos no son funcionales u otra posibilidad es que su cinética se encuentre modificada, cualquiera que sea el caso esto lleva al aumento o pérdida de la función del canal. Otra posibilidad son las mutaciones que se presentan dentro de la región promotora del gen que codifica para el canal iónico. Esto puede provocar disminución o aumento en la expresión de la proteína canal, dando lugar a la alteración en la función de la misma. La tercera posible causa genética de alteración, se encuentra en las mutaciones en los genes codificantes para las moléculas reguladoras de los canales, ya sea por defectos en su estructura o por defectos en las rutas de su producción.¹¹

La mayoría de las epilepsias genéticas, a las cuales se les conoce su base genética, son canalopatías cuyas mutaciones producen alteraciones en el potencial de membrana. Los estudios *in vitro* que se han llevado a cabo muestran hallazgos en relación a una hiperexcitabilidad que se puede producir debido a una exagerada o baja función del canal específico.¹²

Entre las epilepsias debidas a canalopatías se encuentran:

Tabla 4. Canalopatías epilépticas

Canalopatías epilépticas				
Epilepsia	Locus	Gen	Canal	Receptor
Convulsiones neonatales familiares benignas	20q13.3	<i>KCNQ2</i>	K ⁺	DV
	8q24	<i>KCNQ3</i>	K ⁺	DV
	1q23.2	<i>ATP1A2</i>	Na ⁺ /K ⁺	DV
Epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus	19q13.1	<i>SCN1B</i>	Na ⁺	DV
	2q24	<i>SCN1A</i>	Na ⁺	DV
	2q24.3	<i>SCN2A</i>	Na ⁺	DV
Epilepsia frontal nocturna autosómica dominante	20q13.2	<i>CHRNA4</i>	Na ⁺	Nicotínico
	15q24	<i>CHRNA3</i>	Na ⁺	Nicotínico
	1p21.1-q21	<i>CHRN2</i>	Na ⁺	Nicotínico
Epilepsia generalizada idiopática	6p21	<i>GABA-B 1a/b</i>	K ⁺	GABA-B
	8q24	<i>KCNQ3</i>	K ⁺	DV
	3q27.1	<i>CLCN2</i>	Cl ⁻	DV
	1p36.33	<i>GABRD</i>	Cl ⁻	GABA _A
Epilepsia mioclónica juvenil	15q14	<i>CHRNA7</i>	NA ⁺	Nicotínico
	6p12.2	<i>EFHC1</i>		Proteína de unión de Ca
Epilepsia ausencias juvenil	21q21.1	<i>GRIK1</i>	NA ⁺	KA glutamérgico
	5q34	<i>GABRG2</i>	Cl ⁻	GABA _A
	5q34	<i>GABRA1</i>	Cl ⁻	GABA _A
Síndrome de Angelman	15q11	<i>GABRB3</i>	Cl ⁻	GABA _A
Síndrome de Rasmussen	Xq25-26	<i>GRIA3</i>	Na ⁺	AMPA glutamérgico
Epilepsia del lóbulo temporal	7q31.31	<i>KCND2</i>	K ⁺	DV

Dónde: DV=Dependiente de Voltaje. Modificado de Heron, S. (2007).¹³

1. 2. 1 Tratamiento de las canalopatías epilépticas.

La investigación de las diferentes alteraciones en los genes de los canales iónicos, aparte de brindar una explicación acerca de la fisiopatología de las epilepsias y en algunos casos el fenotipo, nos brinda información valiosa al indagar sobre el

medicamento más acertado y óptimo para el tratamiento de éstas. En este sentido se ha desarrollado un amplio campo llamado farmacogenética, donde va a ser relevante conocer específicamente el genotipo de una persona para iniciar el posible tratamiento correspondiente. Un enfoque farmacológico con el conocimiento actual se muestra en la tabla 5.¹⁴

Tabla 5. Enfoque Farmacológico de las canalopatías epilépticas.

Mecanismo de acción	Antiepilépticos
Facilitación gabaérgica del canal Cl ⁻ GABA _A	FBT, BZD
Inhibición glutamérgica del canal de Na ⁺ KA ⁺	TPM
Inhibición glutamérgica del canal de Na ⁺ AMPA	FBT, TPM
Inhibición glutamérgica del canal de Ca ²⁺ NMDA	FBM
Inhibición de canales de Ca ²⁺ talámicos	AV, ESM
Inhibición de canales de Ca ²⁺ L/N/P	FBT, FNT, BZD, TPM
Activación de canales de K ⁺ dependientes de voltaje	FBM, TPM, OXC, ZNS
Inhibición de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje	FBT, FNT, CBZ, AV, BZD, LTG, GBP

Dónde: FBT: fenobarbital, BZD: benzodiazepinas, TPM: topiramato, FBM: felbamato, AV: ácido valproico, ESM: etosuximida, FNT: fenitoína, OXC: oxcarbacepina, ZNS: zonisamida, CBZ: carbamacepina, LTG: lamotrigina, GBP: gabapentina. Modificado de Carrizosa, et al, (2003).¹²

Los síndromes epilépticos considerados como canalopatías muestran característicamente resistencia a los medicamentos antiepilépticos por lo que se consideran en ellos el uso de terapias alternativas como: dieta cetogénica, inmunoterapia e incluso métodos quirúrgicos. El pronóstico está relacionado con el trastorno subyacente. La gravedad del deterioro del desarrollo varía con el tipo de epilepsia.¹⁵

1. 3 Encefalopatías epilépticas.

El término encefalopatía epiléptica define a un grupo de enfermedades en las cuales, las anormalidades epileptiformes contribuyen a un compromiso progresivo de la función cerebral (en adición al déficit previo del neurodesarrollo debido a un daño orgánico cerebral preexistente). El término "encefalopatía epiléptica" fue redefinido en la última actualización de la ILAE, refiriéndose el término actual a cuando la propia actividad epiléptica contribuye a graves deficiencias cognitivas y de comportamiento por encima y más allá de lo que se podría esperar de la patología subyacente sola. Estos deterioros se pueden ver a lo largo de un espectro de gravedad y a través de todas las epilepsias, y puede ocurrir en cualquier edad.¹⁶

La ILAE incluye un grupo de nueve epilepsias bajo este término: encefalopatía mioclónica temprana, encefalopatía epiléptica infantil temprana (síndrome de Ohtahara), espasmo Infantil (Síndrome West), epilepsia mioclónica grave en la infancia (síndrome de Dravet), crisis parciales migratorias en la infancia, estado mioclónico en encefalopatías no progresivas, síndrome de Lennox-Gastaut (LGS), síndrome de Landau-Kleffner (LKS), epilepsia con ondas de pico continuas durante el sueño de onda lenta (CSWS).¹⁵

1. 3. 1 Encefalopatía mioclónica temprana

Este síndrome se caracteriza por mioclonías erráticas, que son el tipo de crisis requerido para el diagnóstico, fragmentarias o masivas, ocasionales o casi continuas, en vigilia y en el sueño, migran de una parte del cuerpo a otra, por lo general iniciadas en el período neonatal precoz. Incluso crisis oculares versivas o vegetativas y espasmos tónicos en el período neonatal o en los primeros meses de vida, la madre reconoce con frecuencia que los mismos movimientos existían *in utero*.¹⁵ La prevalencia es desconocida, pero la encefalopatía mioclónica temprana es una enfermedad rara, con tan sólo unos 30 casos descritos hasta la fecha y una incidencia menor 1/1,000,000 nacimientos. El patrón característico del síndrome se

muestra en la figura 2, las alteraciones neurológicas son constantes: un retraso muy grave en el desarrollo de las habilidades psicomotoras, un marcada hipotonía y un estado de alerta alterado con un estado vegetativo en ocasiones. En casos excepcionales pueden presentarse también signos de neuropatía periférica. Existe alto riesgo de recurrencia familiar, aunque no existe un patrón genético constante, la mayoría de los casos la enfermedad parece ser heredada como un rasgo autosómico recesivo. No existe un tratamiento eficaz y el pronóstico es malo: los niños con la condición sobreviven en un estado vegetativo persistente o mueren en el primer o segundo año de vida.¹⁷



Figura 2. Patrón electroencefalográfico de brote- supresión. Tomado de: Lara, et al, (2016).¹⁸

1. 3. 2 Encefalopatía epiléptica infantil temprana (síndrome de Ohtahara)

Se define por un inicio muy temprano, aún en los primeros meses de vida, existen espasmos tónicos frecuentes y por el patrón de estallido supresión, tanto en la vigilia como en el sueño. Los neonatos pueden experimentar crisis parciales. El pronóstico es malo, existe retraso en el desarrollo neuro psicomotor y dificultad del control de las crisis; a menudo hay una evolución al síndrome de West entre los cuatro y seis meses de edad. Sus síntomas se presentan en los primeros tres meses y

especialmente en los primeros 10 días de vida, generalmente dentro de las primeras horas después del nacimiento.¹⁹

1. 3. 3 Espasmo Infantil (Síndrome West)

Es dependiente de la edad y está caracterizada por la tríada electroclínica de espasmos epilépticos, retardo del desarrollo psicomotor e hipsarritmia en el electroencefalograma (ver en figura 3), aunque uno de estos elementos puede estar ausente. Posee una incidencia de 1-9/100,000 nacimientos y según la Clasificación Internacional de las Epilepsias y síndromes epilépticos, el síndrome de West se clasifica de acuerdo con su etiología en sintomático y criptogénico. El término sintomático se refiere a un síndrome en el cual las crisis son el resultado de una o más lesiones estructurales cerebrales identificables, mientras que criptogénico se refiere a aquellos síndromes que sean sintomáticos, pero la causa está oculta. El pronóstico varía dependiendo de la etiología y la rapidez con la que se inicie el tratamiento. Incluso después de una respuesta inicial al tratamiento, en el 30 % de los casos se produce recurrencia en los 6 meses siguientes. Los espasmos tienden a remitir a partir de los 5 años de edad, pero se han registrado recurrencias posteriores.²⁰

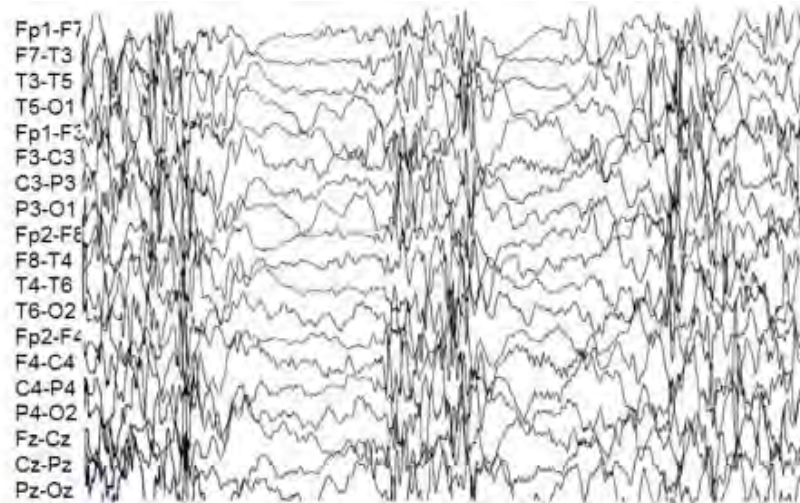


Figura 3. Hipsarritmia. Consiste en ondas lentas y puntas de voltaje elevado. Las puntas varían de un momento a otro tanto en duración como localización. Tomado de: Lara, et al, (2016).¹⁸

1. 3. 4 Epilepsia mioclónica grave en la infancia (síndrome de Dravet)

El síndrome de Dravet es una forma severa de epilepsia, de origen genético, que se inicia en la más temprana infancia, generalmente antes del primer año de edad, y se caracteriza por la presencia de diferentes tipos de crisis convulsivas, en ocasiones desencadenadas por diferentes estímulos como la fiebre. A partir de los dos años de edad se observan retrasos evidentes en el desarrollo cognitivo, así como problemas en el aprendizaje, coordinación de movimientos y en la conducta. En un 60 % de las ocasiones se acompaña de retraso mental severo. Además se asocia a otras patologías: cardiovasculares, alteraciones dentales, deformaciones de la columna vertebral, trastornos del sueño, etc., y produce una muerte prematura en alrededor del 15 % de los casos. En el adolescente y el adulto cobran mayor importancia las alteraciones del comportamiento (hiperactividad y trastornos de la atención y, con menor frecuencia, rasgos de espectro autismo) y los trastornos del sueño. El síndrome de Dravet se considera una enfermedad rara cuya incidencia es de 1/20,000 a 1/40,000 nacimientos y cuya prevalencia es del 7 % de las epilepsias en menores de 3 años. Afecta a varones y mujeres por igual y se da en todo el mundo.²¹

Existen más de 500 diferentes tipos de mutaciones descritas. Existen mutaciones en el gen *SCN1A*, localizado en el cromosoma 2, en un 70-80 % de los pacientes; dicho gen codifica la subunidad alfa 1 de los canales de sodio dependientes de voltaje. El pronóstico de la enfermedad en la adolescencia persistirán crisis TCG, además del deterioro cognitivo y motor. Los problemas de aprendizaje y otros déficits neurológicos requieren atención y apoyo.²²

1. 3. 5 Crisis parciales migratorias en la infancia

La epilepsia maligna de la lactancia con crisis focales migratorias es una encefalopatía epiléptica rara caracterizada por inicio en los primeros seis meses de vida, progresando rápidamente a crisis focales migratorias, que se convierten en carácter casi continuo. La aparición de crisis en este raro síndrome se produce en el primer año de vida, a veces ya en el período neonatal. Se caracteriza por crisis

focales frecuentes de inicio multifocal, con manifestaciones motoras o autonómicas. La sintomatología incluye desviaciones oculares y de la cabeza, crisis focales clónicas de los ojos, de la cara o extremidades, crisis tónicas focales unilaterales o bilaterales, movimientos automáticos, como de masticación y deglución, manifestaciones autonómicas como apnea, hipersalivación y enrojecimiento de la cara, así como crisis tónico-clónicas secundariamente generalizadas. Es común la regresión en el Desarrollo neuro psicomotor y en alrededor del 30% de los casos se produce la muerte en la infancia o la niñez.²³

1. 3. 6 Estado mioclónico en encefalopatías no progresivas

Este tipo de encefalopatía comienza en la infancia o en la niñez temprana, por lo general en el primer año de vida. Las crisis parciales en general inauguran el cuadro, aunque las crisis mioclónicas también pueden ocurrir desde el principio. También hay ausencias mioclónicas, mioclonías masivas y, más raramente, crisis generalizadas y hemiclónicas. El sueño promueve un aumento en la frecuencia de las descargas lo cual, en algunos casos, se asemeja a lo que ocurre en la encefalopatía epiléptica con punta onda continua durante el sueño. El electroencefalograma (EEG) ictal muestra descargas de punta-onda generalizadas o patrón de ausencias, dependiendo del tipo de crisis. El pronóstico es malo y el cuadro resulta en regresión del desarrollo neuro psicomotor y comúnmente hay retraso intelectual grave. Los episodios repetidos de estado mioclónico pueden contribuir al deterioro cognitivo.²⁴

1. 3. 7 Síndrome de Lennox-Gastaut (LGS)

Es un síndrome constituido por la tríada de los siguientes hallazgos electroclínicos: EEG interictal con Punta Onda Lenta generalizada de 1.5 a 2.5 Hz en vigilia y paroxismos generalizados de actividad rápida rítmica durante el sueño (ver en figura 4), múltiples tipos de crisis incluyendo crisis tónicas, ausencias atípicas y drop attacks y retraso en el desarrollo mental y/o alteraciones en el comportamiento. Sin embargo, no existe todavía un consenso sobre cómo llamar a la enfermedad cuando falta alguna de las tres características antes descritas. Su incidencia anual de 0.5/

100,000 nacimientos. La prevalencia es del 3 al 5% de todas las epilepsias y del 10% de todas las epilepsias en niños. Afecta más a los hombres que a las mujeres. Su edad de presentación es entre 1 y 8 años de edad, con pico máximo entre los 3 y los 5 años. Se han reportado características neuropatológicas inespecíficas de biopsias cerebrales o de estudios post mortem, que incluyen necrosis neuronal, disgenesia, alteraciones cerebelosas, pobre arborización de las espinas dendríticas, dilatación de las vesículas pre y postsinápticas y alteraciones mitocondriales. El pronóstico es malo, pero variable. Los estudios longitudinales muestran que una minoría de los afectados puede trabajar normalmente en la edad adulta y que del 47 al 76% mantendrán las características típicas (retraso intelectual, crisis refractarias) varios años después del inicio de la enfermedad y requerirán ayuda importante, como la atención domiciliaria, institucionalización.²⁵



Figura 4. Patrón punta-onda lenta generalizado. Tomado de: Lara, et al, (2016).¹⁹

1. 3. 8 Síndrome de Landau-Kleffner (LKS)

Este síndrome se caracteriza por la asociación de afasia adquirida, por lo general de tipo receptivo, y un trazado electroencefalográfico en el que se observan descargas de puntas y puntas-ondas continuas (ver figura 5), multifocales y generalizadas, que se incrementan durante el sueño. Predomina en el sexo masculino y es de rara aparición y se presenta en el 0.2 % de las epilepsias en la infancia.²⁶ Las crisis epilépticas y los trastornos de conducta son frecuentes, aunque no están presentes en todos los niños. En estos pacientes se ha observado

hipercinesia, estallidos de ira, rebeldía, manifestaciones agresivas y rasgos autistas. En algunos casos se manifiesta disfunción motora con pérdida de la destreza manual. El pronóstico es bueno por lo que respecta a las crisis, ya que son fáciles de controlar y remiten espontáneamente en la pubertad. En cuanto al lenguaje, los resultados se caracterizan por la variabilidad en la mejoría con tratamiento y en la pubertad, pero sin volver nunca al estado previo a la enfermedad.²⁷



Figura 5. Descargas de puntas-ondas continuas. Tomado de: Pozo, et al, (2005).²⁷

1. 3. 9 Epilepsia con ondas de pico continuas durante el sueño de onda lenta (CSWS)

Resulta de la asociación de varios tipos de crisis, focales y generalizadas, que se producen durante el sueño y ausencias atípicas en la vigilia. Nunca ocurren crisis tónicas. El patrón característico del EEG consiste en puntas-onda continuas y difusas durante el sueño de onda lenta, que ocupan de un 85-100% del trazado, y persistiendo en tres o más registros por un período de al menos un mes, que se puede identificar luego de que ocurran las crisis. La duración del cuadro es de meses a años. Aunque descripciones previas indicaron que ambos sexos eran igualmente afectados, recientes estudios en mayores poblaciones mostraron mayor predominio masculino, correspondiendo aproximadamente al 0.5% de todas las

epilepsias de la infancia. Aunque las crisis pueden ser refractarias por meses o años, el pronóstico a largo plazo de la epilepsia es favorable y las crisis desaparecen en todos los casos. El pronóstico favorable de las crisis es independiente de la etiología y también se observa en casos de malformaciones corticales, como en la polimicrogiria multilobar, causa frecuente del síndrome. Hay mejora en la disfunción lingüística, del retraso intelectual y de los trastornos psiquiátricos, pero es variable e individualizada.²⁸

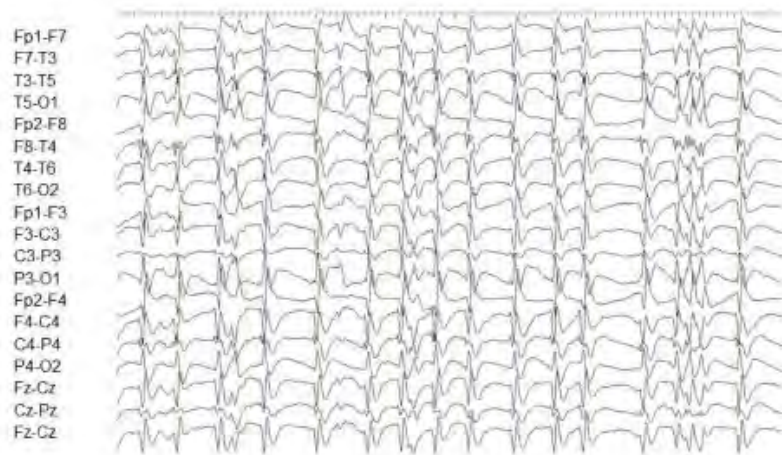


Figura 6. Durante el sueño, se presentan descargas epileptiformes continuas, bisincrónicas, en amplias áreas de ambos hemisferios cerebrales, caracterizando patrón de punta-onda continua durante el sueño lento. Tomado de: Lara, et al, (2016).¹⁹

1. 4 Importancia de la heterogeneidad genética en la epilepsia

Tener el conocimiento del papel de factores genéticos en la etiología de las epilepsias es de un carácter complejo ya que excepto en muy raras ocasiones, la herencia de la epilepsia no sigue un patrón mendeliano clásico, y el riesgo de adquirirla sigue un patrón más bien multifactorial. También resulta claro la heterogeneidad clínica de esta condición donde se conoce bien que los miembros de una misma familia con genotipos similares pueden exhibir un fenotipo diferente, como donde algunos miembros sufren de variantes parciales y otros generalizadas, crisis mioclónicas o ausencias, o convulsiones tónico-clónicas. Por ello se debe

considerar la posibilidad teórica de que otros genes adicionales aún no identificados pudieran ser relevantes, para la comprensión de la epilepsia.²⁹

La heterogeneidad genética es el resultado de mutaciones que pueden estar localizadas en loci diferentes, en el mismo o en diferentes cromosomas, pero que producen una expresión similar en el fenotipo, a este tipo se le llama heterogeneidad no alélica (heterogeneidad de locus). La heterogeneidad alélica son mutaciones dadas en diferentes sitios en los exones o intrones de un mismo gen que producen una expresión similar en el fenotipo. También está el término heterogeneidad clínica para referirse a mutaciones alélicas o no alélicas, pero que expresan fenotipos diferentes.³⁰

La identificación reciente de variantes genéticas (mutaciones puntuales, deleciones cromosómicas) en un número cada vez mayor de cuadros epilépticos definidos de forma clínica y con un alto componente hereditario está poniendo de manifiesto que muchos genes implicados en estas patologías codifican proteínas de la membrana neuronal que conforman alguna de las subunidades de un determinado canal iónico. Esta afectación sistemática en las anomalías funcionales del paso selectivo de determinado tipo de ión induciría cambios en la excitabilidad neuronal, lo que encuadra claramente con los síndromes epilépticos dentro de la consideración de canalopatías.³¹

En los últimos 10 años, se ha dado el descubrimiento de posibles genes candidatos para encefalopatías epilépticas (ver figura 7) a más de 70 genes, explicando del 20-25% de todos los casos de epilepsia severa con inicio temprano, epilepsias que de otro modo no tenían causas identificables. Algunos genes ya son conocidos tal como es el gen *SCN1A* y *GABRA1* para el síndrome de Dravet, *STXBP1* para el síndrome de Ohtahara, *SCN2A*, *DNM1* y *SCN8A* para el espasmo infantil y *KCNT1* para crisis parciales migratorias en la infancia. Nuevos genes como *GABRB3* y *DNM1* se encontraron fuertemente vinculados a la epilepsia debido a variantes de *novo* encontradas en individuos con la enfermedad.³²

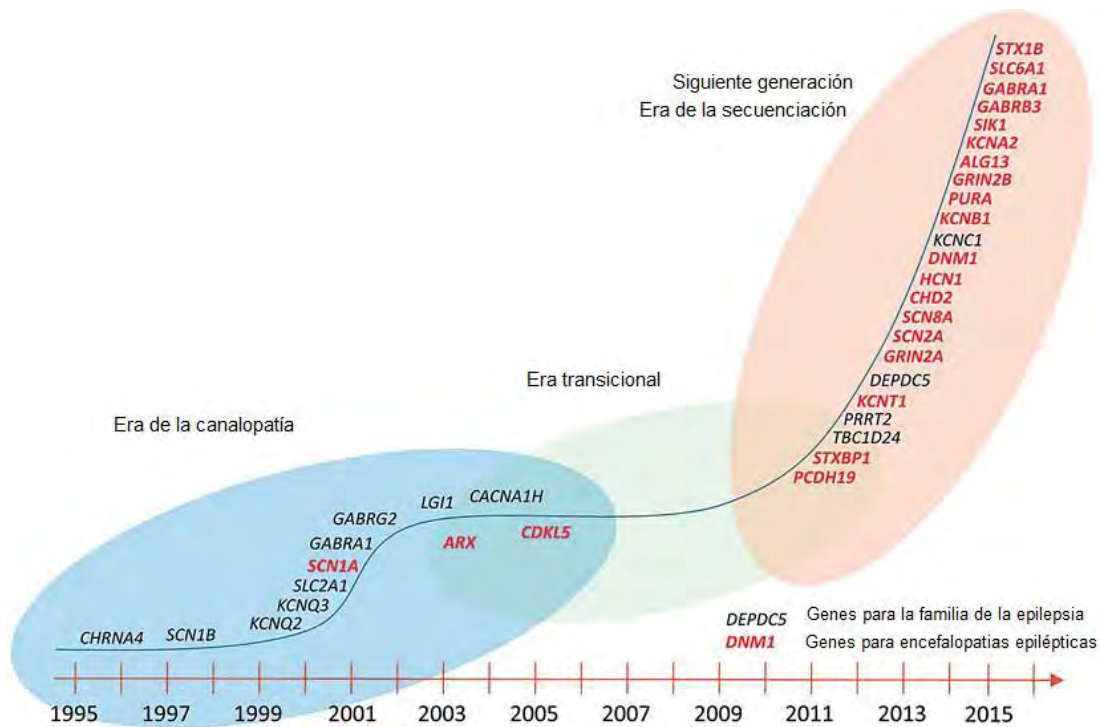


Figura 7. Cronología del descubrimiento de genes en epilepsias humanas. Modificado de: Helbig, et al, (2016).³²

1. 5 Receptor GABA_A.

Es una Glucoproteína heteropentamérica de 275 kD que da forma al ionóforo Cl⁻ y a una serie de sitios de fijación para el aminoácido no proteico GABA el cual es el principal neurotransmisor inhibitor en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos además de una serie de moléculas que regulan su actividad. Los receptores GABA_A están constituidos por cinco subunidades distintas, que, al ensamblarse, forman un poro o canal específico para Cl⁻ o HCO₃⁻: α, β, γ, δ, ε, las que a su vez presentan variantes: α (1-6), β (1-4), γ(1-4), δ1, ε1.³³

Dada la variedad de sus subunidades proteicas y sus arreglos, existe un amplio potencial para formación de un elevado número de distintos complejos moleculares. Varios estudios en sistemas de expresión indican que no todas las combinaciones de estas subunidades corresponden a GABA.³⁴ Las isoformas para un tipo de

subunidad en particular comparten un 70% de identidad en su secuencia, mientras que la identidad entre subunidades es del 20-30%.³⁵

Se han logrado identificar, los genes que codifican el receptor GABA_A, los cuales se encuentran ubicados en diferentes cromosomas.

Tabla 6: Genes que codifican las subunidades del receptor GABA_A.

Gen	Cromosoma	Subunidad
<i>GABRA2</i>	4p12	α_2
<i>GABRA4</i>	4p12	α_4
<i>GABRB1</i>	4p12	β_1
<i>GABRG1</i>	4p12	γ_1
<i>GABRA1</i>	5q34	α_1
<i>GABRA6</i>	5q34	α_6
<i>GABRB2</i>	5q34	β_2
<i>GABRG2</i>	5q34	γ_2
<i>GABRA5</i>	15q11, 2-q12	α_5
<i>GABRB3</i>	15q11, 2q12	α_3
<i>GABRG3</i>	15q11, 2-q12	γ_3

Modificado de: Renfigo, et al, (2005).³⁶

El receptor GABA_A es una estructura compleja conformada por el receptor GABAérgico, el receptor endógeno de las benzodiazepinas y como ya se mencionó el canal iónico que, como neurotransmisor inhibitorio, es un canal de cloro (Cl⁻) (ver figura 8), así como la GABA-modulina, una proteína de enlace entre las estructuras principales, es decir, entre el receptor GABA y el receptor benzodiazepínico. La GABA-modulina bloquea inicialmente a los receptores e inhibe el canal iónico de Cl⁻; cuando esta proteína deja de actuar, ambos receptores se complementan abriendo el canal del Cl⁻. Una de las hélices contiene histidina y arginina, las cuales repelen el paso de cationes por su carga positiva y favorecen el paso del Cl⁻.³⁷

Las diferentes subunidades les proveen funciones diferentes como la modulación de ligandos endógenos o de sistemas de segundos mensajeros, localización subcelular o diferencias a largo plazo en la expresión de receptores de superficie.³⁸

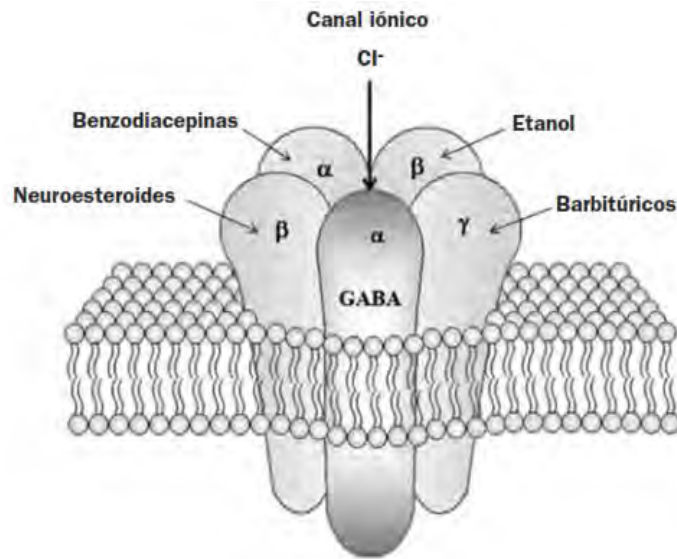


Figura 8. Representación de la estructura del receptor GABA_A y sitios de unión. Tomada de: Mendel, et al, (2011).³⁹

La activación de un receptor GABA incrementa la concentración intraneuronal de iones Cl⁻ hiperpolarizando a la neurona. En algunas regiones del SNC como el hipocampo y raíz del ganglio dorsal, o bajo ciertas circunstancias durante el desarrollo, la activación del receptor GABA puede causar una despolarización neuronal. Debido a que la concentración intracelular de iones cloro excede los niveles extracelulares, promoviendo la apertura del canal acoplado al receptor GABA_A, dado como resultado el flujo de iones y causando excitación neuronal.³⁹

El desajuste o fallo en la transmisión gabérgica genera hiperexcitabilidad, lo que, a su vez, desencadena el fenómeno epileptogénico. Las regiones cerebrales mejor definidas como focos epilépticos son principalmente la neocorteza y el hipocampo. Cabe señalar que la fisiopatología de la epilepsia tiene un fuerte determinante genético, puesto que las mutaciones puntuales, o deleciones cromosómicas capaces de alterar la expresión neuronal de alguna proteína de membrana que forme parte o sea ella misma una determinada subunidad para un canal iónico, provocarán anomalías funcionales del paso selectivo de un ion y, en consecuencia, alteraciones de la excitabilidad neuronal.⁴⁰

1. 5. 1 Mutaciones en subunidades del receptor GABA_A asociados con epilepsias genéticas

El mecanismo de acción de los actuales fármacos anticonvulsivantes, incluidas las benzodiazepinas y los barbitúricos, es mejorar la funcionalidad de los receptores GABA.⁴¹ Siguiendo la lógica de esto se han buscado variantes en diferentes genes del receptor GABA_A, incluidos *GABRA1*, *GABRB3*, *GABRD* y *GABRG2*, como se observa a continuación en la figura 9.

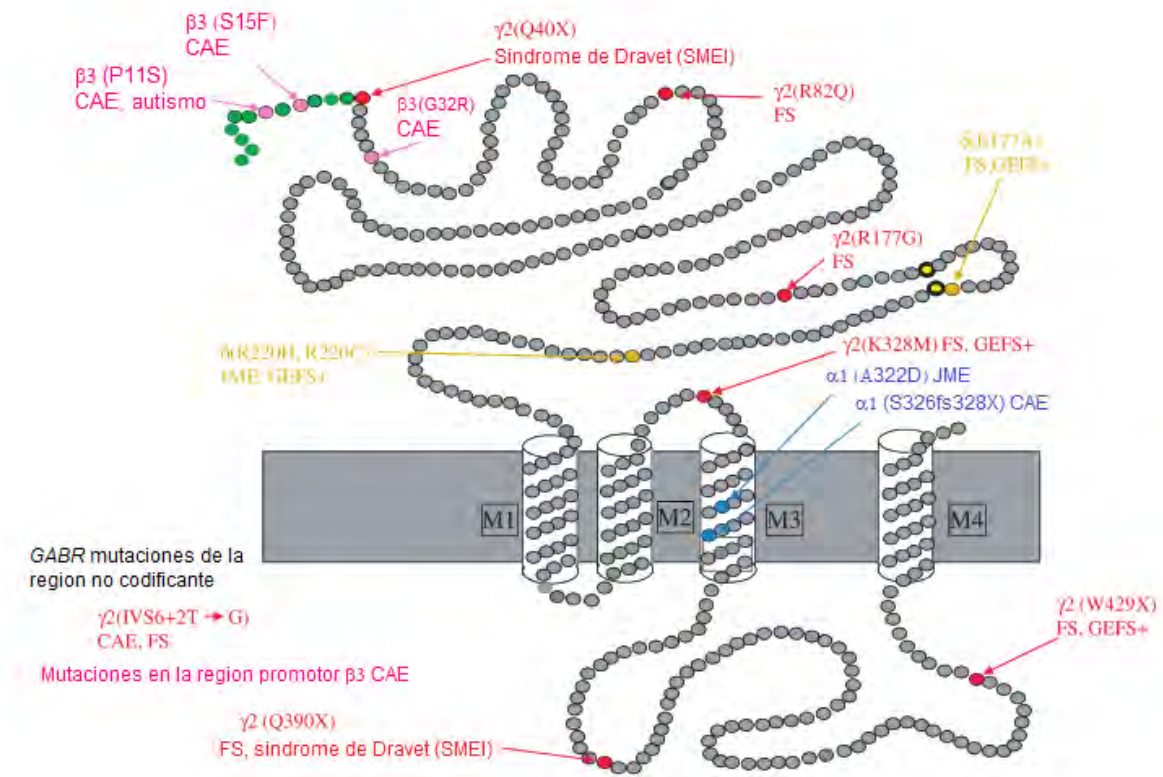


Figura 9. Mutaciones asociadas con síndromes de epilepsia genética en subunidades del receptor GABA_A. Las subunidades del receptor GABA_A se traducen como una proteína precursora cuya secuencia señal (verde) se elimina dejando una proteína madura que consiste en un gran dominio extracelular en el extremo N-terminal, cuatro dominios transmembrana (M1-M4) y un dominio citoplásmico grande. En esta figura, se describen las mutaciones de la subunidad del receptor GABA α1 (azul), β3 (rosa), γ2 (rojo) y δ (amarillo) asociadas con síndromes de epilepsia genética. Donde: CAE= epilepsia benigna de ausencia infantil; GEFS+= epilepsia generalizada con convulsiones febriles; FS= convulsiones febriles y JME= Epilepsia mioclónica juvenil. Modificado de: Macdonald, et al, (2010).⁴²

Tabla 7. Disfunciones del receptor GABA_A por mutaciones o variantes en este.

Mutación o variante Con su referencia original	Síndrome epiléptico	Disfunción en el receptor GABA_A
Mutaciones con cambio de sentido en secuencias $\gamma 2$ (p.R82Q) (Wallace <i>et al.</i> 2001) $\gamma 2$ (p.K328M) (Baulac <i>et al.</i> 2001) δ (p.E177A) (Dibbens <i>et al.</i> 2004) δ (p.R220H) (Dibbens <i>et al.</i> 2004) $\gamma 2$ (p.R177G) (Audenaert <i>et al.</i> 2006) $\alpha 1$ (p.A322D) (Cossette <i>et al.</i> 2002) $\beta 3$ (p.P11S) (Tanaka <i>et al.</i> 2008) $\beta 3$ (p.S15F) (Tanaka <i>et al.</i> 2008) $\beta 3$ (p.G32R) (Tanaka <i>et al.</i> 2008)	 CAE/FS GEFS+ GEFS+ GEFS+ FS JME CAE, autismo CAE CAE	 Oligomerización alterada, retención de RE, expresión superficial reducida, corriente reducida. Reducción de los tiempos de apertura de un solo canal, desactivación acelerada de la corriente de células enteras. Intensidad de célula completa reducida, tiempo de apertura de canal único reducido. Intensidad de célula completa reducida, tiempo de apertura de canal único reducido. Cinética de corriente de célula completa alterada. La topología mal alineada y alterada, la expresión total y superficial reducida, la corriente de células enteras reducida. Glicosilación N-ligada anormal, corriente reducida de células enteras. Glicosilación N-ligada anormal, corriente reducida de células enteras. Glicosilación N-ligada anormal, corriente reducida de células enteras.
Mutaciones sin sentido en secuencias $\gamma 2$ (p.Q390X) (Harkin <i>et al.</i> 2002) $\gamma 2$ (p.Q40X) (Hirose, 2006) $\gamma 2$ (p.Q429X) (Sun <i>et al.</i> 2008)	 GEFS+/DS DS GEFS+	 Retención de ER, reducción negativa dominante de los receptores de tipo salvaje, reducción de la corriente de células enteras. Sin estudiar, probablemente desencadena NMD. No estudiado, probablemente no afectado por NMD y, por lo tanto, produce péptido truncado.
Mutaciones en marco de lectura en secuencias $\alpha 1$ (S326fs328X) (Maljevic <i>et al.</i> 2006)	 CAE	 NMD de mRNA seguido de ERAD de proteína de subunidad.
Mutaciones en secuencias no traducidas <i>GABRG2</i> (<i>IVS6 + 2T→G</i>) (Kananura <i>et al.</i> 2002) <i>GABRB3</i> haplotype 2 (Urak <i>et al.</i> 2006)	 CAE/FS CAE	 Se predice que causará PTC en la unión del quinto y séptimo exón. Alteración de la unión del activador de transcripción N-Oct-3.

Dónde: CAE= epilepsia benigna de ausencia infantil; GEFS+= epilepsia generalizada con crisis febriles; DS= Síndrome Dravet; FS= crisis febriles; RE= retículo endoplásmico; ERAD= Degradación asociada al retículo endoplásmico; PTC= Codón de terminación prematura de la traducción; NMD= degradación de RNAm mediada por mutación terminadora. Modificado de: Macdonald, et al, (2010).⁴²

Estas mutaciones pueden causar diferentes efectos cuando se expresan en diferentes regiones del cerebro y, por lo tanto, dan forma a la red neuronal de forma diferente desde diferentes lugares. Dada la heterogeneidad fenotípica de las epilepsias que albergan diferentes mutaciones en los diferentes genes de alguna subunidad del receptor GABA_A, es probable que el origen genético o los genes modificadores también desempeñen un papel en la epileptogénesis de los síndromes epilépticos.⁴²

1. 6 GABRA1

Gen que codifica la proteína subunidad alfa-1 del receptor del ácido gamma-aminobutírico.⁴³

1. 6. 1 Función

La proteína subunidad alfa-1 está fosforilado y mantenido funcionalmente por la enzima glicolítica GAPDH, lo que sugiere un vínculo funcional entre el metabolismo regional de la glucosa cerebral y las corrientes GABAérgicas ya que el mecanismo depende de la actividad de GAPDH y ATP glucolítico producido localmente.⁴

1. 6. 2 Localización

Tamaño del gen: 4686 pb

Tamaño de la proteína: 456 aa

Ubicación molecular: pares de bases 161,847,191 a 161,899,959 en el cromosoma 5.⁴⁵

Localización cromosómica: 5q34, que es el brazo largo (q) del cromosoma 5 en la región 3 sub banda 4. (Ver figura 10)

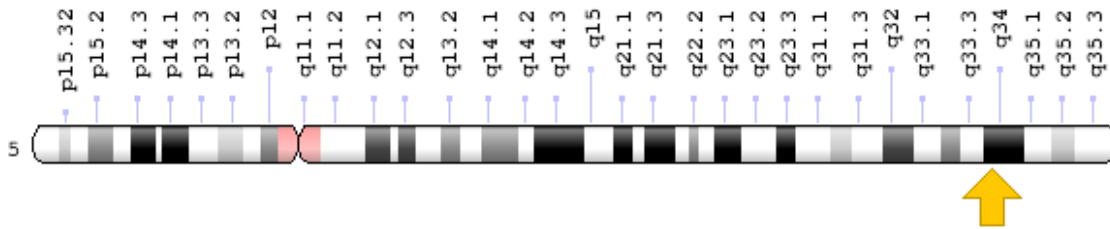


Figura 10. Ubicación cromosómica del gen *GABRA1*. Modificado de: GENETICS HOME REFERENCE⁴⁵

1. 6. 3 Fenotipos

Se observa un amplio espectro de fenotipos en pacientes con variaciones en *GABRA1*, e incluyen JME, IGE, síndrome de Dravet, EE, así como pacientes con algunas convulsiones, pero con un intelecto y desarrollo normales, y una aparente libertad de ataques. Las características compartidas en pacientes con variaciones en *GABRA1* incluyen EEG con descargas generalizadas de onda en pico, la mitad con una respuesta fotoparoxística. Los tipos de convulsiones más comunes son las convulsiones tónico-clónicas y mioclónicas.⁴⁴

1. 6. 4 Correlación genotipo-fenotipo.

Actualmente, se tienen reportados diferentes pacientes con diversas variantes de *GABRA1*, sin embargo, no ha surgido una clara correlación genotipo-fenotipo de los casos reportados. El genotipo no ha podido explicar la heterogeneidad clínica. La mayoría de las mutaciones en *GABRA1* identificadas son mutaciones con cambio de sentido y surgen de novo, mientras que solo aproximadamente un tercio sigue una herencia autosómica dominante. Curiosamente, parece haber concordancia fenotípica dentro de las familias con segregación de mutación y síntomas, que es diferente de las mutaciones *SCN1A*, en las que el fenotipo puede diferir dentro de la misma familia.⁴⁴

1. 6. 5 Variantes alélicas reportadas

Las variantes en el gen *GABRA1* reportadas con alguna susceptibilidad a una enfermedad o síndrome se enlistan a continuación:

Susceptibilidad a Epilepsia mioclónica juvenil ALA322ASP. Se demostró que la mutación p.A322D, que se produce en el dominio transmembrana M3, provoca que la proteína subunidad alfa-1 se pliegue incorrectamente y se degrade, reduciendo la expresión de superficie de los receptores GABA_A al asociarse con subunidades de tipo silvestre dentro del retículo endoplasmático y evitar que se localizaran a la superficie celular.⁴⁶

Susceptibilidad a epilepsia benigna de ausencia infantil. 1-BP DEL, 975C. Se identificó una delección de 1 pb heterocigota de *novo* (975delC) en el gen *GABRA1*, dando como resultado un cambio de marco de lectura y terminación prematura de la proteína en el codón 328 dentro del tercer dominio transmembrana. La mutación estaba ausente en 292 controles étnicamente pareados.⁴⁷

Susceptibilidad a encefalopatía epiléptica infantil de inicio temprano. GLY251SER. Identificaron una transición de *novo* heterocigota c.751G-A en el gen *GABRA1*, lo que resulta en una sustitución de gly251-a-ser (p.G251S). Los estudios de expresión funcional *in vitro* en ovocitos de *X.laevis* mostraron que la proteína mutante p.G251S causaba una reducción de 2.6 veces en la amplitud de las corrientes inducidas por GABA, así como una disminución de 5 veces en la sensibilidad de GABA. Se sugirió que las convulsiones se debían a un deterioro del funcionamiento de la inhibición de GABA en el cerebro.⁴⁸

Susceptibilidad a encefalopatía epiléptica infantil de inicio temprano. ARG112GLN. Se trata de una transición heterocigótica de c.335G-A en el gen *GABRA1*, lo que resultó en una sustitución Arg112-a-Gln (p.R112Q) en un residuo altamente conservado. Se confirmó que la mutación se produjo de *novo* en un

paciente; el DNA parental no estaba disponible del segundo paciente. Los estudios funcionales de la variante no se realizaron.⁴⁸

Susceptibilidad a encefalopatía epiléptica infantil de inicio temprano. LYS306THR. Se identificó una transversión de *novο* heterocigota c.917A-C en el gen *GABRA1*, dando como resultado una sustitución Lys306-a-Thr (p.K306T) en un residuo altamente conservado.⁴⁹

Susceptibilidad a epilepsia idiopática generalizada. 25-BP INS. Se identificó una inserción heterocigótica de 25 pb cercana al intrón 10 del gen *GABRA1*, lo que dio como resultado una reorganización compleja de la transcripción. El análisis de RT-PCR de células de pacientes mostró que esta inserción daba como resultado un defecto de empalme con retención del intrón 10, una delección del cuarto dominio transmembrana y la inserción de 18 aminoácidos y un codón de parada prematuro (Lys353delins18Ter). Los estudios funcionales mostraron que la subunidad mutante no tenía corriente en respuesta a GABA, lo que sugiere un efecto perjudicial sobre el control inhibitorio de los circuitos neuronales. Los pacientes tenían crisis tónico-clónicas generalizadas, afebriles y de inicio tardío, así como fotosensibilidad.⁴⁹

Susceptibilidad a epilepsia idiopática generalizada. ASP219ASN. Se identificó una transición heterocigótica G-a-A en el gen *GABRA1*, lo que resulta en una sustitución Asp219-a-Asn (p.D219N). La mutación no se encontró en 109 controles sanos. Los estudios de expresión *in vitro* demostraron que la proteína mutante se retuvo parcialmente en el retículo endoplásmico y que tenía disminución en la expresión aproximadamente en un 50% en la membrana plasmática. Los estudios electrofisiológicos mostraron que la mutación causaba una disminución de la amplitud de la corriente en respuesta al GABA en comparación con el tipo silvestre y que alteraba la cinética de la activación del receptor, incluida una desensibilización más rápida. Los pacientes tenían crisis febriles con o sin crisis tónico-clónicas generalizadas y ausencia.⁴⁹

1. 7 GABRB3

1. 7 .1 Función

Gen que codifica para la proteína Subunidad beta-3 del receptor de ácido gamma-aminobutírico.⁵⁰

1. 7. 2 Localización

Tamaño del gen: 5781 pb

Tamaño de la proteína: 473 aa

Localización molecular: pares de bases 26, 543, 546 a 26, 773,788 en el cromosoma 15.

Ubicación cromosómica: 15q12, que es el brazo largo (q) del cromosoma 15 en la region 1 sub banda 2.⁵¹

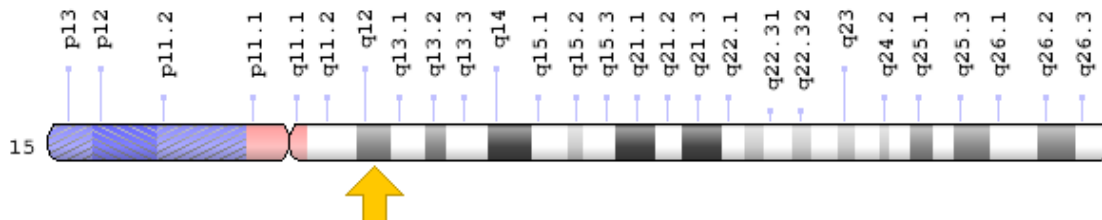


Figura 11. Ubicación cromosómica del gen *GABRB3*. Modificado de: GENETICS HOME REFERENCE.⁵¹

1. 7. 3 Fenotipos

GABRB3 se asocia con una amplia gama de fenotipos de epilepsia que van desde epilepsia generalizada con crisis febriles hasta encefalopatías epilépticas de aparición temprana severa.

1. 7. 4 Variantes alélicas

Las variantes en el gen *GABRB3* reportadas con susceptibilidad a una enfermedad o síndrome se enlistan a continuación:

ARG192HIS reclasificado variante de importancia desconocida. Esta variante, anteriormente titulada INSOMNIA, ha sido reclasificada porque su asociación con el trastorno no ha sido confirmada. Se encontró una transición G-a-A en el exón 6 del gen *GABRB3*, que dio como resultado un cambio de Arg192-a-Su (p.R192H) en la subunidad beta-3 madura, señalaron que la subunidad beta-3 había sido implicada en los procesos del sueño de forma independiente, al observar que los ratones que carecen de beta-3 pierden la respuesta hipnótica a la oleamida.⁵²

Susceptibilidad a epilepsia benigna de ausencia infantil. PRO11SER. Se identificó una transición heterocigótica 31C-T en el exón 1a del gen *GABRB3*, dando como resultado una sustitución Pro11-a-Ser (p.P11S) en el péptido señal alternativo. Un total de 3 familiares no afectados de ambas familias portaron la mutación, lo que indica una penetrancia incompleta.⁵³

Susceptibilidad a epilepsia benigna de ausencia infantil. SER15PHE. Se identificó una transición heterocigótica 44C-T en el exón 1a del gen *GABRB3*, lo que resulta en una sustitución Ser15-a-Phe (p.S15F) en el péptido señal alternativo. Las crisis de ausencia cesaron a la edad de 12 años. La mutación también estaba presente en su madre y hermanastro no afectado, indicando penetrancia incompleta. La mutación no se identificó en 630 controles.⁵³

Susceptibilidad a epilepsia benigna de ausencia infantil. GLY32ARG. Se identificó una transición 962G-A heterocigótica en el exón 2 del gen *GABRB3*, lo que resultó en una sustitución de Gly32 a Arg (p.G32R). Dos familiares adicionales con la mutación mostraron anomalías en el EEG sin crisis de ausencia, y uno tuvo una crisis febril. La mutación no fue identificada en 630 controles.⁵³

Susceptibilidad a encefalopatía epiléptica infantil de inicio temprano. ASP120ASN. Se identificó una transición heterocigota c.358G-A de *novo* (c.358G-A, NM_000814.4) en el gen *GABRB3*, lo que resulta en una sustitución Asp120-a-Asn (D120N).⁵⁴

Susceptibilidad a encefalopatía epiléptica infantil de inicio temprano. TYR182PHE. Se identificó una transversión de *novo* heterocigota c.545A-T (c.545A-T, NM_000814.4) en el gen *GABRB3*, lo que resulta en una sustitución Tyr182-a-Phe (p.Y182F).⁵³

Susceptibilidad a encefalopatía epiléptica infantil de inicio temprano. GLN249LYS. Se identificó una transversión de *novo* heterocigótica c.745C-A (c.745C-A, NM_000814.4) en el gen *GABRB3*, lo que resulta en una sustitución Gln249-a-Lys (Q249K).⁵³

Susceptibilidad a encefalopatía epiléptica infantil de inicio temprano. ALA305THR. Se identificó una transición de *novo* heterocigota c.913G-A (c.913G-A, NM_000814.4) en el gen *GABRB3*, lo que resulta en una sustitución Ala305-a-Thr (A305T).⁵³

2. JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es de los desórdenes neurológicos más comunes y con mayor incidencia reportada anualmente en individuos de todas las edades; sin embargo, el conocimiento actual sugiere que la epilepsia es clínica y genéticamente heterogénea, lo que hace difícil llevar a cabo su diagnóstico y se trate de forma certera en todos los casos reportados. Los factores heredados parecen sugerir una susceptibilidad genética, pero, con alguna excepción, por sí solos no son capaces de provocar manifestaciones clínicas ni siguen patrones de herencia mendelianos clásicos. El grado de penetrancia genética puede depender en gran medida de otros genes que, junto con los factores ambientales, pueden contribuir al desarrollo y a la progresión de la epilepsia. En el caso específico de las encefalopatías epilépticas, los pacientes no siempre llegan a tener un diagnóstico etiológico, por lo que la búsqueda de variantes en los genes *GABRA1* y *GABRB3* contribuirá con información para conocer la etiología de estos síndromes, ya que estos se han asociado a otros síndromes epilépticos. La población mexicana presenta una mezcla de razas que la hacen diferente a las demás poblaciones, por lo cual el presente estudio nos permitirá conocer las variantes y las frecuencias alélicas comunes en nuestro país, además de que las variantes en dichos genes pudieran estar participando en la etiología de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

Sí los genes *GABRA1* y *GABRB3* tienen participación en la etiología de las encefalopatías epilépticas, entonces pacientes con estas etiologías presentarán variantes que pudieran modificar la función de las proteínas de los genes mencionados.

4. OBJETIVOS

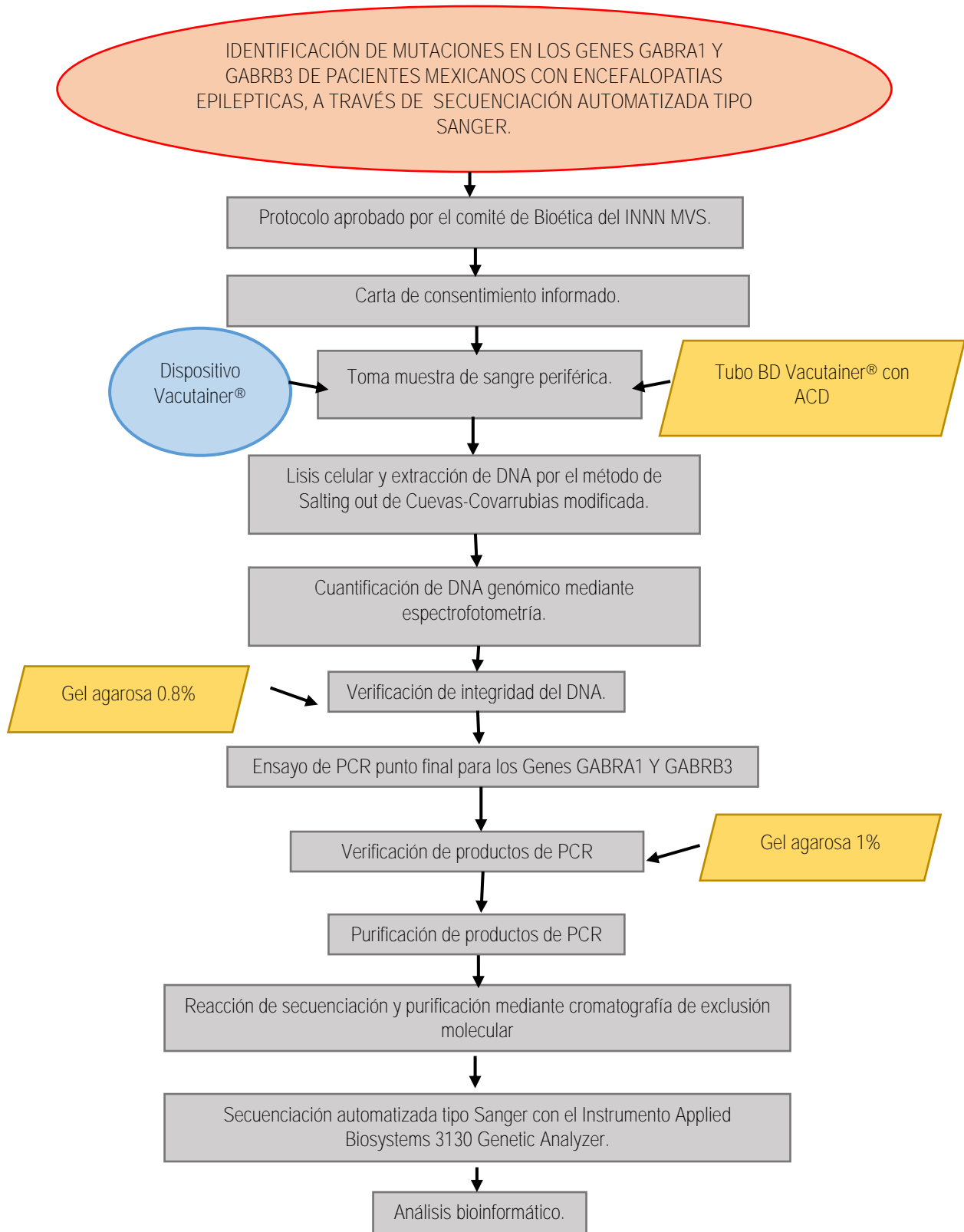
Objetivo General

Identificación de variantes en los genes *GABRA1* y *GABRB3*, a través de la secuenciación automatizada tipo Sanger, en un grupo de pacientes mexicanos con Encefalopatías epilépticas tipo Lennox Gastaut y Dravet del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez, para examinar si dichas variantes podrían corresponder a la etiología de dicha patología.

Objetivos Particulares

- Realizar la búsqueda de variantes en los exones 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 en el gen *GABRA1*.
- Realizar la búsqueda de variantes en los exones 1, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 en el gen *GABRB3*.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes encontradas en los genes *GABRA1* y *GABRB3*.
- Identificar si las variantes encontradas en los genes *GABRA1* y *GABRB3* se encuentran ya reportadas en algún otro síndrome epiléptico y encontrar una relación genotipo/fenotipo.
- Conocer las variantes comunes de pacientes mexicanos con Encefalopatías epilépticas en los genes *GABRA1* y *GABRB3*.
- Analizar las variantes encontradas con los scores de los programas de GERP++ y phyloP.

5. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y METODOS.

6. 1 Carta de consentimiento informado.

El presente protocolo fue previamente sometido a aprobación por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velazco Suárez. A todos los sujetos participantes del proyecto se les entregó una carta de consentimiento informado que posteriormente firmaron, donde en términos generales se les informa cómo y con qué fin serán utilizados los datos obtenidos de sus muestras sanguíneas.

Los sujetos incluidos en el estudio, fueron pacientes que tuvieran diagnóstico para alguna encefalopatía epiléptica y que fueran mexicanos.

6. 2 Toma de muestra

Se tomaron 3 tubos con ACD (citrato-dextrosa), de sangre periférica mediante dispositivo Vacutainer® a pacientes mexicanos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, con diagnóstico de encefalopatías epilépticas tipo Lennox y Dravet , así como a controles participantes del proyecto, las muestras recolectadas se mantuvieron en refrigeración para su posterior tratamiento.

6.3 Procedimiento

6.4 Lisis y extracción de DNA

Se llevó a cabo mediante la técnica de Cuevas-Covarrubias modificada; en esta técnica se lleva a cabo la lisis de eritrocitos realizando aproximadamente 4 lavados de la muestra sanguínea con el buffer TTS (triton-tris-sacarosa), centrifugando a 5000rpm durante 10 min hasta obtener el botón leucocitario. Una vez obtenido el botón se realizó la lisis leucocitaria agregando 570µL de NaCl 5mM y 30µL de SDS al 10%; posteriormente se aplicó salting-out con NaCl saturado. Se realizó la separación de proteínas precipitadas mediante extracción orgánica, con 600µL de

solución cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), obteniendo el DNA de la fase acuosa y precipitándolo con etanol absoluto a -20°C consecutivamente se realizaron 2 lavados con etanol al 70%. Finalmente se secó el botón obtenido de DNA por centrifugación al vacío y posterior a esto se resuspendió en agua inyectable.

6. 4. 1 Integridad del DNA genómico.

Se llevó a cabo una electroforesis horizontal de agarosa al 0.8% con buffer TBE 1x (tris base-EDTA-Ac.bórico), utilizando GelRed™ como revelador y una mezcla de Azul de bromofenol-Xileno cianol- Glicerol como buffer de carga. Después de aproximadamente 1 hora y media corriendo a 100 volts, se visualizó en el transiluminador de luz UV y se observó el nivel de degradación del DNA extraído. Una sola banda nítida de alto peso molecular sin restos de algún tipo de barrido sobre el carril nos indica baja o nula degradación de DNA.

6. 4. 2 Cuantificación de DNA genómico mediante espectrofotometría.

Fue utilizado un espectrofotómetro Genova Nano - Jenway, utilizando para calibrar como blanco $3\mu\text{L}$ de agua inyectable por aproximadamente cada 8 muestras a leer, para la medición de cada muestra se colocaron $3\mu\text{L}$ de DNA genómico en el lector realizando este paso por duplicado para sacar un promedio de los resultados obtenidos por el equipo.

El equipo da dos relaciones matemáticas de lecturas a diferentes longitudes de onda, la primera relación en mostrar es la 260/280 esto debido a que los ácidos nucleicos y las proteínas tienen absorbancia máxima en 260 y 280 nm, respectivamente. Históricamente, la proporción de estas absorbancias en estas longitudes de onda se ha utilizado como una medida de pureza tanto en ácidos nucleicos como en extracciones de proteínas. Una relación de ~ 1.8 generalmente

se considera de una pureza aceptable el DNA y una relación mayor de ~ 2.0 se considera contaminación por RNA, una relación menor >1.8 se considera contaminación por proteínas y fenoles. Por otra parte la segunda 260/230 nos da una idea de la existencia de contaminación de la muestra con algún compuesto orgánico o algunas sales. Los valores esperados de 260/230 son comúnmente en el rango de 2.0-2.2 para una muestra pura en ácidos nucleicos.

Al tener toda la información tanto de cuantificación e integridad se escogió la mejor alícuota por muestra de acuerdo a su pureza y a lo ya mencionado y se realizaron diluciones de estas a 50ng/μl.

6. 5 PCR punto final para los genes de *GABRA1* y *GABRB3*

Mezcla de reacción llevada a cabo para los exones de *GABRA1* y *GABRB3*:

Tabla 8. Volúmenes específicos para PCR punto final.

Reactivo	Volumen en μL por reacción
Master Mix	10
Primer forward (100ng/μL)	1
Primer reverse (100ng/μL)	1
DNA (50ng/μL)	2
DMSO 100%	1
H ₂ O	5
Volumen final	20

6. 5. 1 Descripción de primers para los genes *GABRA1* y *GABRB3*

Primers para exones del gen *GABRA1*

Tabla 9. Primers para los exones del gen *GABRA1*

Exón	Forward	Reverse	Tamaño del producto
3	5'ATCTAAACTGCCTCAGTC AGC3'	5'CTAAGGGAATTCAGAA AACTT3'	289pb
4	5'TCAAGTTAAGATTCAGTA GAAACC3'	5'CTATCACAGCCTTAATT TACCTC3'	301pb
5	5'TGTGGTGGTGAGATCTAA TAAG3'	5'GCATTCCAGATCAGAC CTATTT3'	336pb
6	5'AATTATGCACTGTCTGCG TTAG3'	5'CCTTCCACTTGTAGGC AATCA3'	370pb
	5'GCATAACCCTGCAATTAT GCC3'	5'GCAAGAGATCTCTAGC TATATC3'	272pb
8	5'CCTCTGGAACCATGATAT AG3'	5'GTGAGAACTCAATGAA TCATTCA3'	327pb
9	5'GTA CT CATAGTAAACCTC AGAG3'	5'GGTATGGAAGACAAGT TATGTC3'	285pb
10	5'GTATGAACTGGCATCATG TATG3'	5'GTATTGGATGGAGTAT GCAGAA3'	344pb
11	5'ATAAGGCACAGATTTAGG CTGC3'	5'GTTCTCAACGCAGTAAT TCCCA3'	493pb

Primers para exones del gen *GABRB3*.

El gen *GABRB3* posee 9 exones de los cuales solo se secuenciaron los siguientes:

Tabla 10. Primers para los exones del gen *GABRB3*

Exón	Forward	Reverse	Tamaño del producto
1	5'TAGGGGCGGGGATCCCT GCGT3'	5'GTTCTGCAGGCACCGT CGGGA3'	212pb
4	5'AATTTGGCTGGTCGTGGA GG3'	5'ATGGTGCATGGGTGTT GAATA3'	423pb
5	5'TTTAATATCTTCCCTCACC CTGTGTA3'	5'GAAAGAGGGGAAGAC ACAGAGA3'	241pb
6	5'CCAGCCTCTCGACTTTTCA 3'	5'TTATAGTCCCTTCAGG GGCA3'	402pb
7	5'TCACCCCTTTATTCGCAGA C3'	5'GCGTGACACAAGCATT GCCT3'	389pb
8	5'CCCCTTATCTCTGACTACT TAAAGC3'	5'CTGGTCCCTGCAGCTC AG3'	400pb
9	5'CCCTCCCCCTTATTTATC T3'	5'CACACACAGACACACA AGCAG3'	686pb

6. 5. 2 Temperaturas de alineamiento

Para la determinación de las temperaturas de alineación de cada producto de PCR para los genes *GABRA1* y *GABRB3* se realizaron gradientes de temperatura preparando 12 muestras de reacción, utilizando un DNA control para cada par de primers, la mezcla de reacción llevada a cabo fue la siguiente:

Tabla 11. Volúmenes específicos para gradiente de temperatura.

Reactivo	Volumen en μL por reacción
Master Mix	10
Primer forward (100ng/ μL)	1
Primer reverse (100ng/ μL)	1
DNA (50ng/ μL)	2
DMSO 100%	1
H ₂ O	5
Volumen final	20

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Tabla 12. Ciclos y temperaturas para el gradiente de temperatura.

	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5min	35 ciclos
Desnaturalización	95	30seg	
Gradiente de Tm	50-60	30seg	
Elongación	72	30seg	
Elongación final	72	7min	
Refrigeración	4	∞	

Posteriormente se observaron los 12 productos obtenidos con temperaturas diferentes en un rango de 50-60°C en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1x, utilizando GelRed™ como revelador y una mezcla de Azul de bromofenol-Xileno cianol- Glicerol como buffer de carga. Después de aproximadamente 1 hora y media corriendo a 100 volts se visualizaron los diferentes geles en el transiluminador de luz UV para elegir la temperatura ideal para cada exón, a la cual los primers amplificaron con mayor rendimiento y especificidad el producto.

Figura 12. Ejemplo de Gradiente de temperatura.

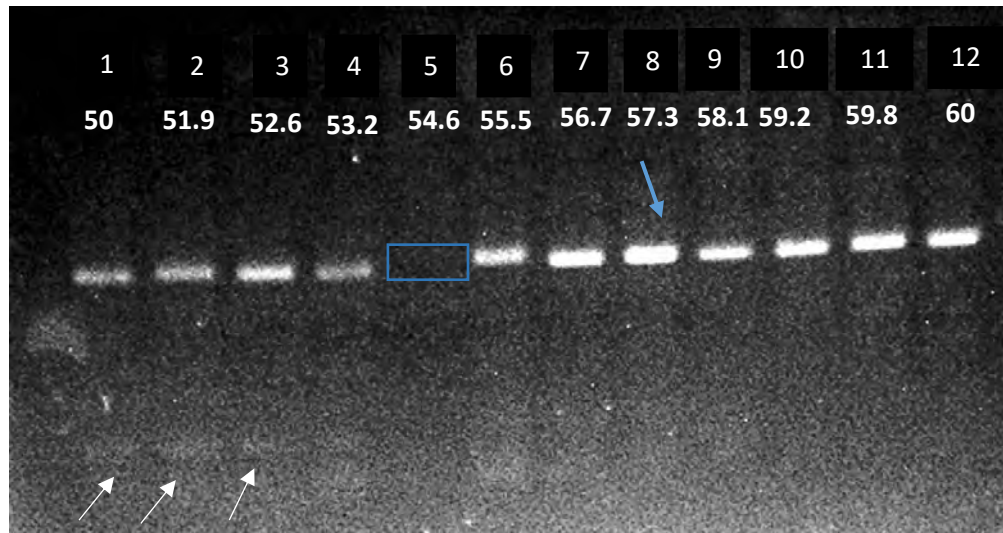


Figura 12. Producto de PCR del exón 9 para el Gen *GABRB3*, los carriles 1-3 presentan una banda extra de menor peso, lo que nos muestra un producto de PCR inespecífico, podemos observar también que a la temperatura correspondiente para el carril 5 el producto no amplificó; la temperatura escogida fue la 8 correspondiente a una temperatura de 56.3°C, debido a que la concentración de producto obtenida a esa temperatura es mayor a todas las demás y se muestra libre de algún producto inespecífico.

Tabla 13. Temperaturas de alineamiento para los exones del gen *GABRA1*.

Exón	Tm
3	50°C
4	57.3°C
5	58.9°C
6	56.9°C
7	55.5°C
8	59.3°C
9	52.4°C
10	58.9°C
11	60.8°C

Tabla 14. Temperaturas de alineamiento para los exones del gen *GABRB3*.

Exón	Tm
1	53.9°C
4	55°C
5	50°C
6	56°C
7	50°C
8	58.4°C
9	57.3°C

6. 5. 3 Condiciones para PCR punto final de los genes *GABRA1* y *GABRB3*.

Tabla 15. Ciclos y temperaturas para PCR punto final para los genes *GABRA1* y *GABRB3*.

	Temperatura °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5min	35 ciclos
Desnaturalización	95	30seg	
Tm	Temperatura específica para cada gen y exón (Ver tabla 12 y 13)	30seg	
Elongación	72	30seg	
Elongación final	72	7min	
Refrigeración	4	∞	

6. 5. 4 Purificación de productos de PCR mediante corte de bandas.

Después de revelar el gel de Agarosa al 1.5% con luz UV utilizando el Transiluminador las bandas amplificadas se cortaron y se guardaron en tubos eppendorf. El método utilizado se basa en la precipitación de la banda de DNA amplificada.

Se montó un filtro sobre un tubo eppendorf de 1.5 mL; se colocó sobre el filtro el fragmento cortado de agarosa y se centrifugó a 13500 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se desechó el filtro cuidando que no se eliminara también parte del líquido filtrado, se agregó Acetato de Sodio 3M a una proporción final de una parte de acetato por 10 partes del filtrado, agregando también dos volúmenes de etanol absoluto frío a un volumen del filtrado mezclando brevemente en el vortex e

Incubando durante 20-30 minutos a -20°C. Posterior a esto se centrifugó a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C y desechó el sobrenadante por decantación, finalmente se agregaron 100 µl de etanol al 70% frío, se centrifugó a 13500 rpm por 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y secó durante 20 minutos por centrifugación al vacío sin calor.

6. 6 Reacción de secuenciación

Para la secuenciación de los exones amplificados se utilizó *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* de *Applied Biosystems*TM, el cual está basado en electroforesis capilar de fragmentos de PCR con la incorporación de ddNTP's marcados con diferentes fluoróforos.

6. 6. 1 Mezcla de reacción para la secuenciación

La mezcla fue la misma para ambos genes.

Tabla 16. Volúmenes específicos para la reacción de secuenciación para ambos genes.

Reactivo	Volumen en µL por reacción
Producto de PCR purificado	2
BigDye	1
Buffer 5x	3.5
Primer Forward	1
H ₂ O	12.5
Volumen final	20

6. 6. 2 Condiciones de reacción de secuenciación para los genes *GABRA1* y *GABRB3*.

Tabla 17. Ciclos y temperaturas de reacción de secuenciación para los genes *GABRA1* y *GABRB3*.

	Temperatura °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	96	30''	25 ciclos
Desnaturalización	95	30''	
Tm	50	10''	
Elongación	60	4'	
Elongación final	72	1'	
Refrigeración	4	∞	

6. 6. 3 Purificación de reacción de secuenciación.

Se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular, utilizando columnas rellenas de Sephadex G-50, hidratándolas con 800µl de agua inyectable y centrifugando a 3000 rpm a 21°C por 2 min, decantando el contenido en un tubo colector, para posteriormente colocar en el centro del gel Sephadex G-50 el producto de la reacción de secuenciación, se centrifugó de igual manera a 3000 rpm a 21°C por 2 min para de esta forma recuperar fragmentos de DNA con tamaños superiores a 16pb excluyendo así impurezas de menor peso molecular. La muestra fue recuperada en un tubo eppendorf de 1.5mL y se procedió a secar sin calor por centrifugación al vacío (se cuidó que no se expusiera a la luz durante este proceso) por aproximadamente 45 min o hasta que ésta se encontró perfectamente seca.

6. 7 Secuenciación

Los productos de la reacción de secuenciación completamente secos fueron resuspendidos en 14 µL de formamida, y fueron cargados en una placa de 96 pozos, posterior a esto, se centrifugó la placa a 4000 rpm por 3 min para la eliminación de burbujas de aire y sometida a una desnaturalización a 95°C durante 5 min en el termociclador.

Las muestras fueron secuenciadas en el Instrumento *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer*.

6. 8 Consulta de bases de datos

Se consultaron las siguientes bases de datos para la búsqueda de las frecuencias alélicas de las variantes encontradas: Navegador ExAC (Beta) <http://exac.broadinstitute.org/> , Proyecto de secuenciación del exoma del NHLBI (ESP) <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> y el Navegador del genoma Ensembl 92 <https://www.ensembl.org/> .

6. 9 Análisis de GERP++ y phyloP

Se consultaron los scores de conservación de nucleótidos para cada variante encontrada dados por los algoritmos de los programas de GERP++ y phyloP para mamíferos y vertebrados. Estos fueron consultados en el navegador Genoma <https://genome.ucsc.edu/>, esta información está disponible en la versión del 2009 ensamble GRCh37/hg19.

7. RESULTADOS

Para el gen *GABRA1* se analizaron 21 pacientes con encefalopatías epilépticas tipo Lennox y Dravet. Se encontraron algunas variantes ya reportadas como polimorfismos los cuales se muestran a continuación en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados generales de las variantes encontradas en el gen *GABRA1* mediante secuenciación.

No. paciente	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
1	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
2	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
5	N	N	N	N	N	rs11135172	N	rs2279020	N
8	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
10	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
11	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
13	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
15	N	rs1129647	N	N	N	rs11135172	N	rs2279020	N
18	N	rs1129647	N	N	N	rs11135172	N	rs2279020	N
21	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
24	N	rs1129647	N	N	N	rs11135172	N	rs2279020	N
26	rs41275339	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
31	N	rs1129647	N	N	N	N	N	N	N
34	N	rs1129647	N	N	N	rs11135172	N	rs2279020	N
35	N	rs1129647	N	N	N	rs11135172	N	rs2279020	N
37	rs41275339	rs1129647	N	N	N	rs11135172	N	rs2279020	N
44	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
45	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
46	N	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
47	rs41275339	N	N	N	N	N	N	rs2279020	N
48	N	N	N	N	N	rs11135172	N	rs2279020	N
Total	3	7	0	0	0	8	0	20	0

Donde N= muestra normal es decir no se encontraron variantes al leer el electroferograma.

Tabla 19. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes encontradas para el gen *GABRA1*

Pacientes con Encefalopatías epilépticas												MAF reportadas en base de datos			
Variante	Hombres [n=16]					Mujeres [n=5]					Ambos sexos	ExAC	1000 genomas	GO-ESP	
	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas			Frecuencia alélica		MAF	Latinos	MXL	EA	AA
rs41275339	A/A [16]	A/T [0]	T/T [0]	A	T	A/A [2]	A/T [3]	T/T [0]	A	T	f(T)	f(T)	f(T)	f(T)	f(T)
	1	0	0	1	0	0.4	0.6	0	0.7	0.3	0.071	0.104	0.070	0.064	0.027
rs1129647	T/T [12]	T/C [4]	C/C [0]	T	C	T/T [2]	T/C [2]	C/C [1]	T	C	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)
	0.75	0.25	0	0.875	0.125	0.4	0.4	0.2	0.6	0.4	0.191	0.213	0.266	0.272	0.130
rs11135172	T/T [10]	T/G [6]	G/G [0]	T	G	T/T [3]	T/G [2]	G/G [0]	T	G	f(G)	f(G)	f(G)	f(G)	f(G)
	0.625	0.375	0	0.813	0.187	0.6	0.4	0	0.8	0.2	0.191	0.194	NR	0.234	0.071
rs2279020	A/A [8]	G/A [8]	G/G [0]	A	G	A/A [1]	G/A [3]	G/G [1]	A	G	f(G)	f(G)	f(G)	f(G)	f(G)
	0.5	0.5	0	0.75	0.25	0.2	0.6	0.2	0.5	0.5	0.310	0.291	0.352	0.341	0.404

Se buscaron los MAF ya reportados en diferentes poblaciones del mundo y se compararon como se puede observar en la tabla 18 para de esta manera poder observar si las frecuencias eran similares en los datos encontrados en el presente trabajo y en los ya reportados. Dónde: MAF= Alelo de menor frecuencia; MXL= Ascendencia mexicana en los Ángeles, California; EA= Euroamericanos, AA= Afroamericanos; NR= no reportado.

A continuación se muestran las variantes encontradas en los pacientes, observadas en los electroferogramas obtenidos mediante el programa Sequencing Analysis 5.3.

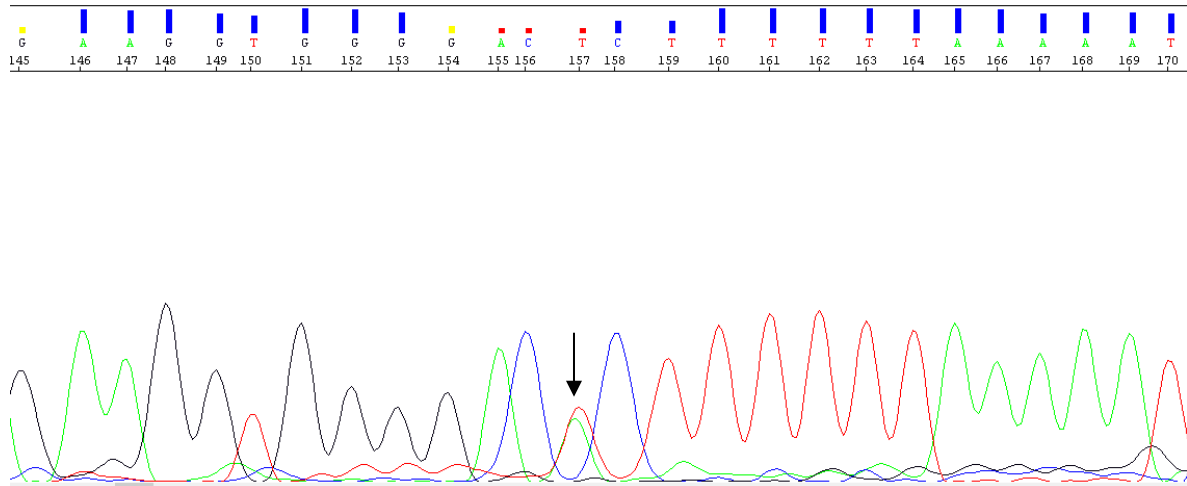


Figura 13. Electroferograma de paciente 26 que muestra variante rs41275339 con genotipo heterocigoto A/T señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

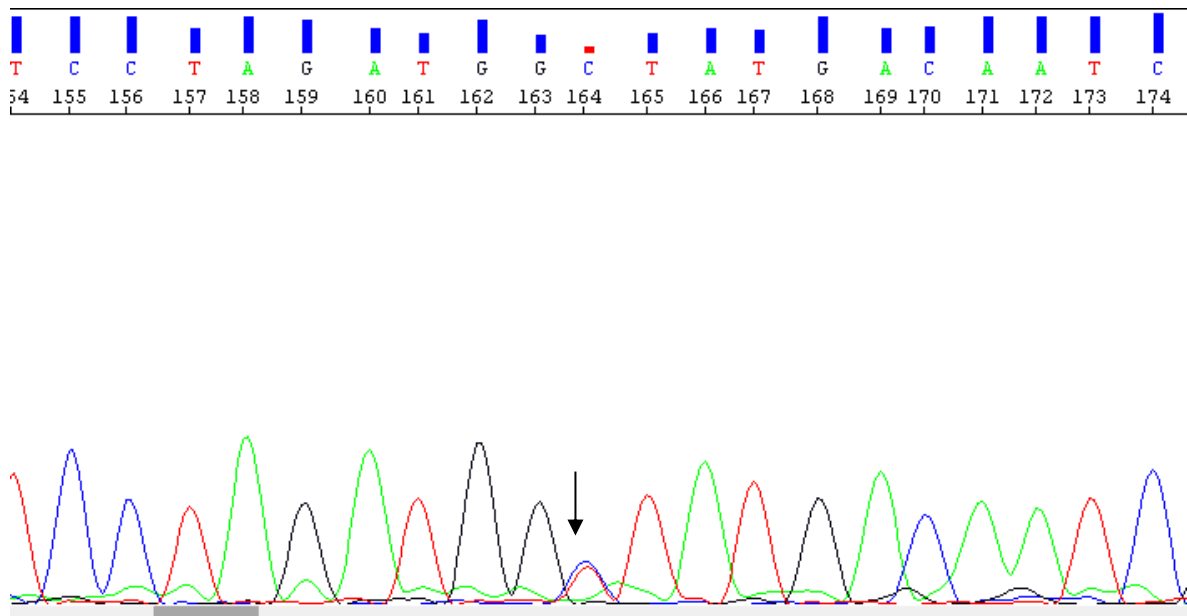


Figura 14. Electroferograma de paciente 15 que muestra variante rs11296470 con genotipo heterocigoto T/C señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

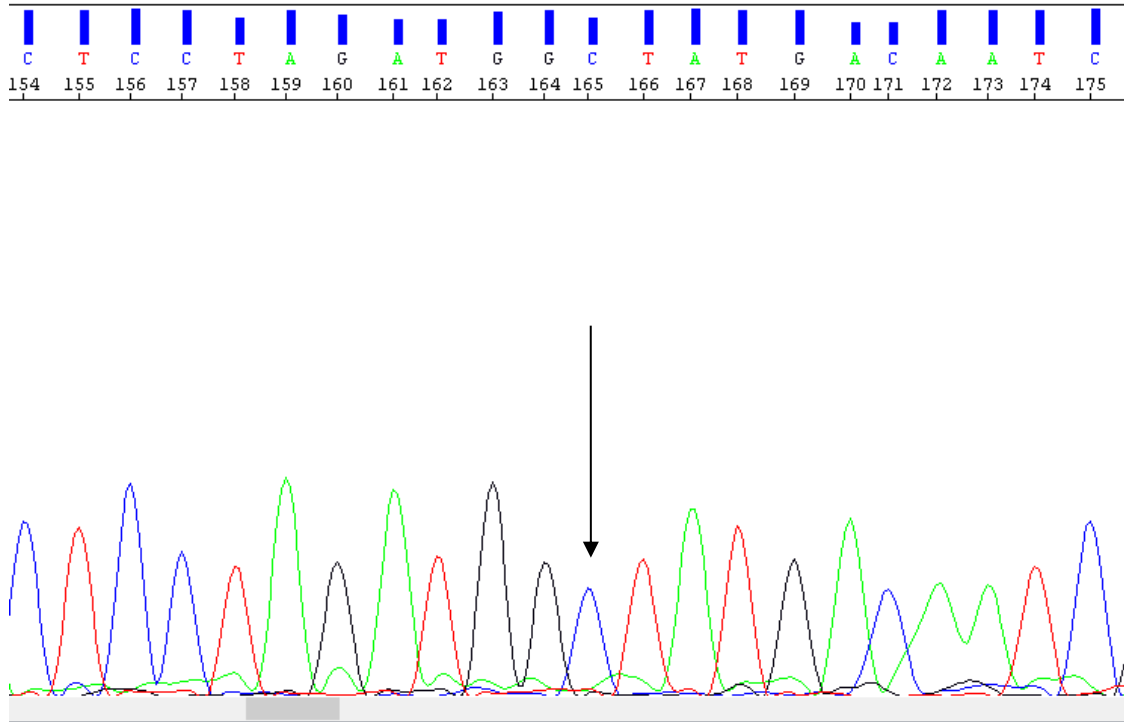


Figura 15. Electroferograma de paciente 31 que muestra variante rs1129647 con genotipo homocigoto C/C señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

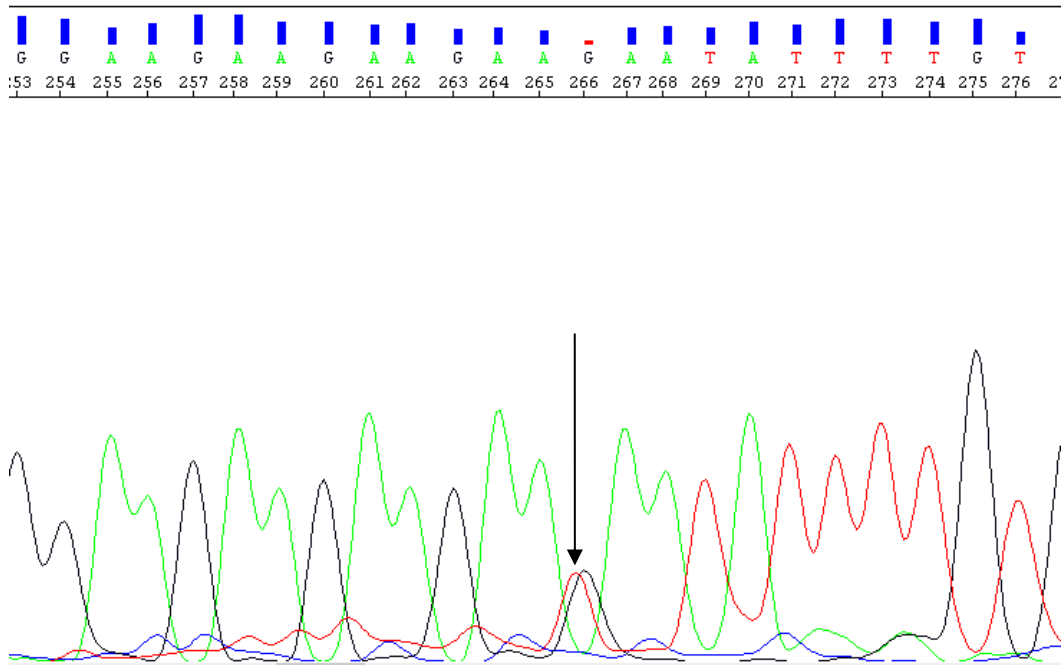


Figura 16. Electroferograma de paciente 24 que muestra variante rs11135172 con genotipo heterocigoto T/G señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

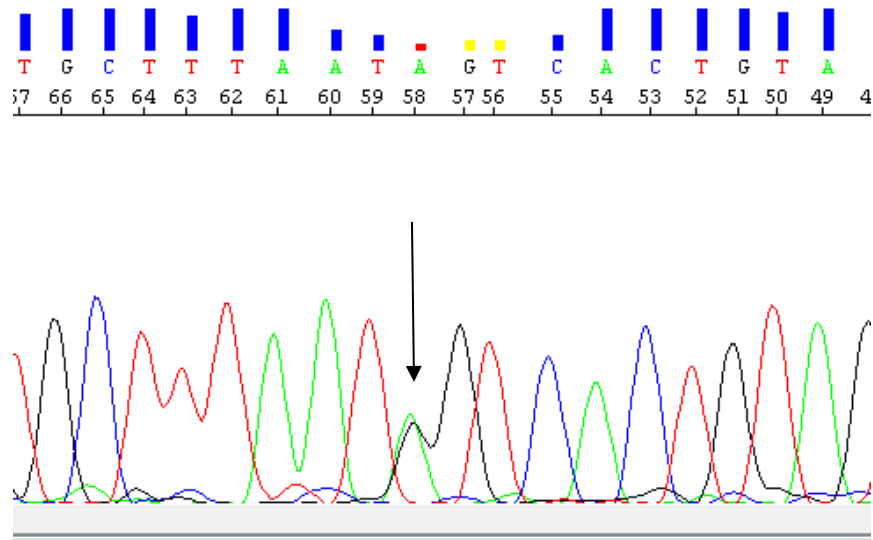


Figura 17. Electroferograma de paciente 24 que muestra variante rs2279020 con genotipo heterocigoto G/A señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

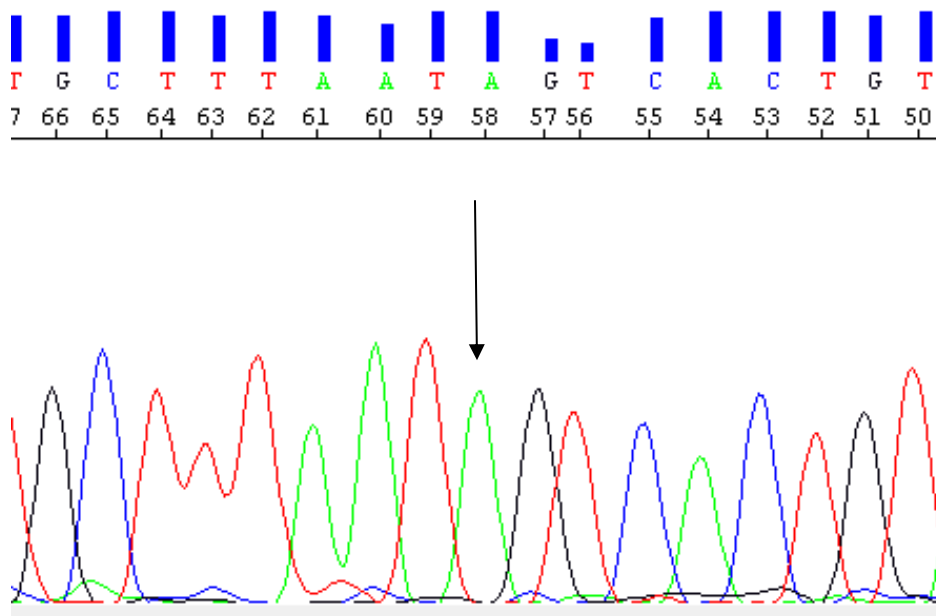


Figura 18. Electroferograma de paciente 24 que muestra variante rs2279020 con genotipo homocigoto A/A señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

A continuación se muestran gráficos de barras haciendo comparación de MAF reportados en diferentes poblaciones.

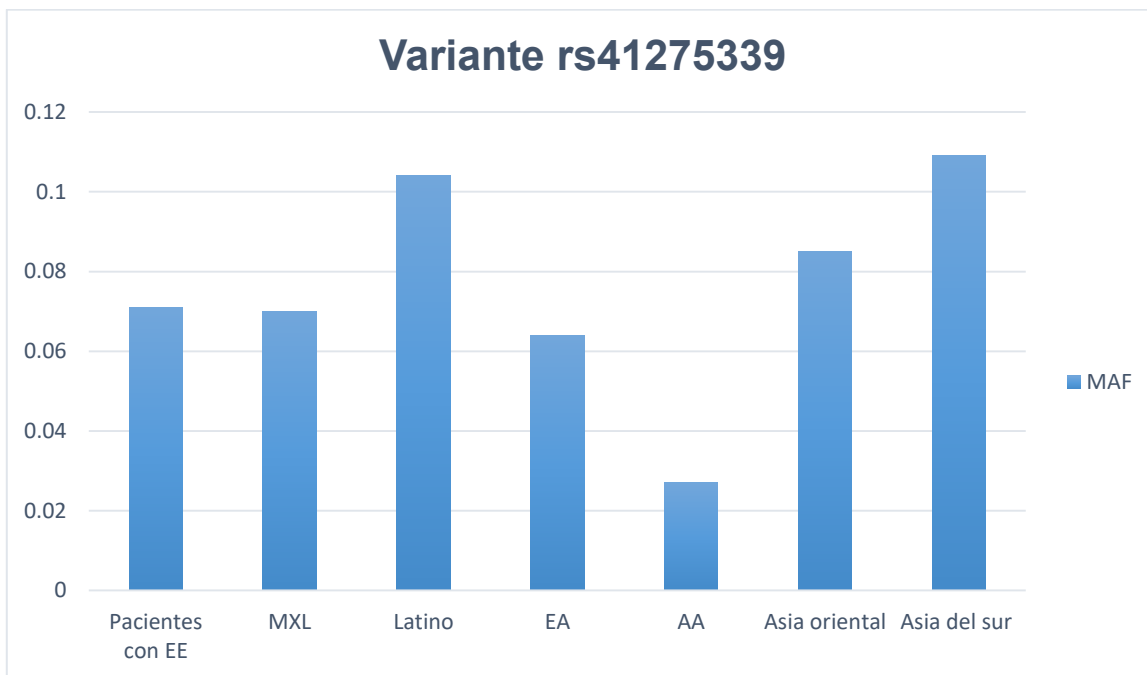


Figura 19. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones comparadas con los resultados obtenidos para la variante rs41275339 en pacientes con encefalopatías epilépticas. Dónde: MAF= Alelo de menor frecuencia; MXL= Ascendencia mexicana en los Ángeles, California; EA= Euroamericanos, AA= Afroamericanos.

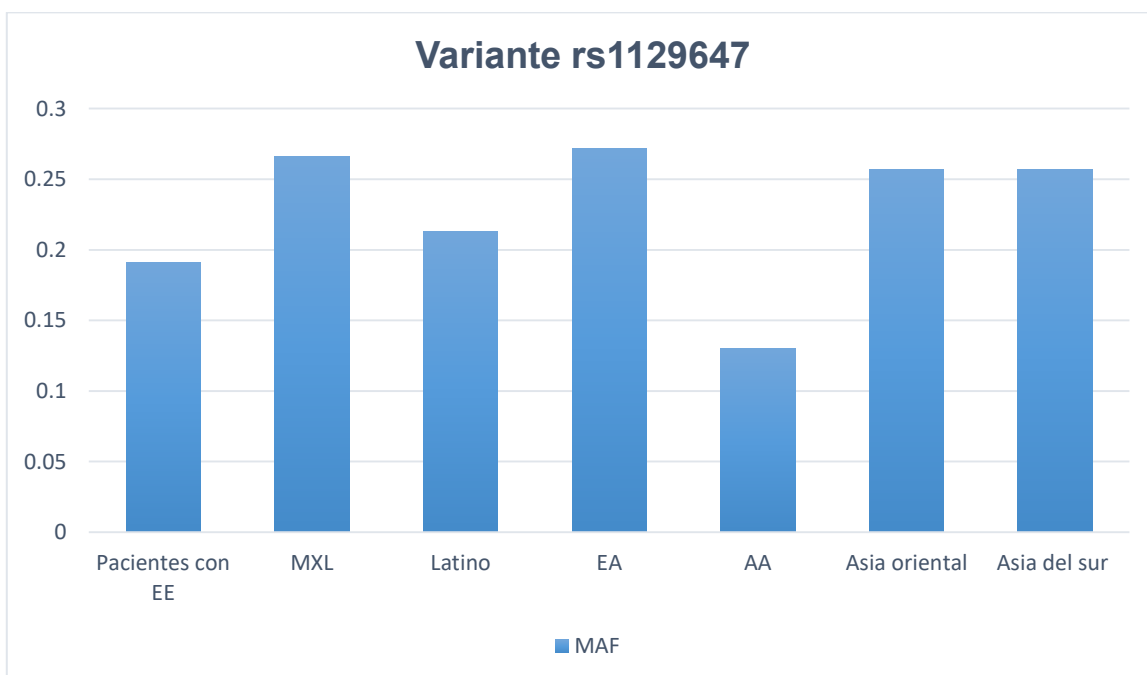


Figura 20. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones comparadas con los resultados obtenidos para la variante rs1129647 en pacientes. Dónde: MAF= Alelo de menor frecuencia; MXL= Ascendencia mexicana en los Ángeles, California; EA= Euroamericanos, AA= Afroamericanos.

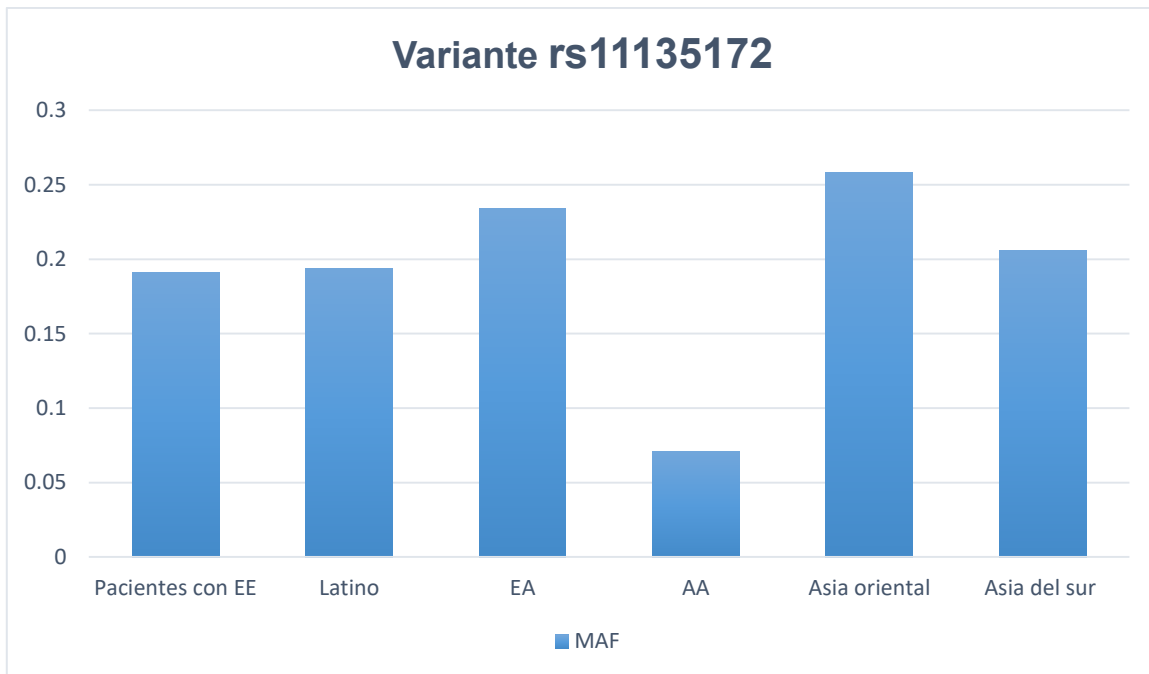


Figura 21. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones comparadas con los resultados obtenidos para la variante rs11135172 en pacientes con encefalopatías epilépticas. Dónde: MAF= Alelo de menor frecuencia; EA= Euroamericanos, AA= Afroamericanos.

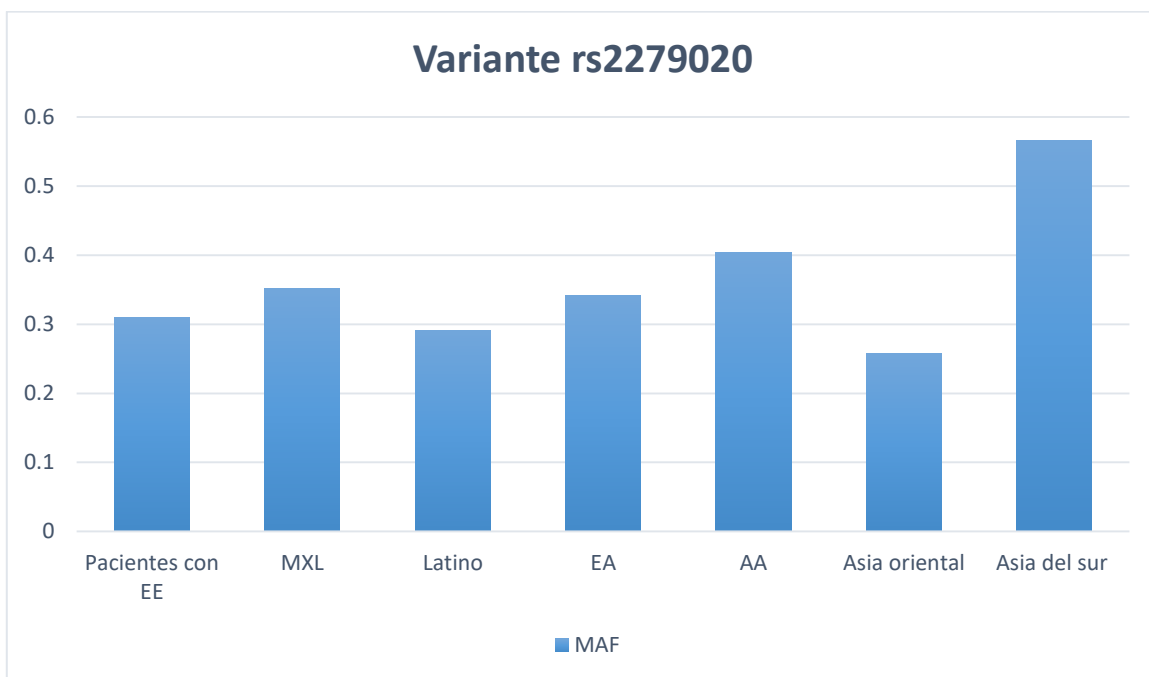


Figura 22. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones comparadas con los resultados obtenidos de la Variante rs2279020 para pacientes con encefalopatías epilépticas. Dónde: MAF= Alelo de menor frecuencia; MXL= Ascendencia mexicana en los Ángeles, California; EA= Euroamericanos, AA= Afroamericanos.

Para el gen *GABRB3* se analizaron 20 pacientes con encefalopatías epilépticas tipo Lennox Gastaut y Dravet. Se encontraron variantes ya reportadas como polimorfismos los cuales se muestran a continuación en la tabla 20.

Tabla 20. Resultados generales de las variantes encontradas en el gen *GABRB3* mediante secuenciación.

No. paciente	Exón 1	Exón 4	Exón 5	Exón 6	Exón 7	Exón 8	Exón 9
1	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	rs3751582	N
5	N	N	N	N	N	rs3751582	N
8	N	N	N	N	N	rs3751582	N
10	N	N	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N	rs3751582	N
15	N	N	N	N	N	rs3751582	N
18	N	N	N	N	N	rs3751582	N
21	N	N	N	N	N	rs3751582	N
24	N	N	N	N	N	rs3751582	N
26	N	N	N	N	N	rs3751582	N
31	N	N	N	N	N	N	N
34	N	N	N	N	N	rs3751582	N
35	N	N	N	N	N	rs3751582	N
37	N	N	N	N	N	N	N
44	N	N	N	N	N	rs3751582	N
45	N	N	rs201953456	N	N	N	N
46	N	N	N	N	N	N	N
47	N	N	N	N	N	rs3751582	N
48	N	N	N	N	N	rs3751582	N
Total	0	0	1	0	0	14	0

Donde N=muestra normal es decir no se encontraron variantes al leer el electroferograma.

Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes encontradas para el gen *GABRB3*.

Pacientes con Encefalopatías epilépticas												MAF reportadas en base de datos			
Variante	Hombres [n=15]					Mujeres [n=5]					Ambos sexos	ExAC	1000 genomes	GO-ESP	
	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas			Frecuencia alélica		MAF	Latinos	MXL	EA	AA
rs201953456	G/G [14]	G/C [1]	C/C [0]	G	C	G/G [5]	G/C [0]	C/C [0]	G	C	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)
	0.93	0.07	0	1	0	1	0	0	1	0	0.025	0.0005	0	0.0002	0
rs3751582	T/T [4]	T/C [9]	C/C [2]	T	C	T/T [2]	T/C [1]	C/C [2]	T	C	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)
	0.27	0.6	0.13	0.57	0.43	0.4	0.2	0.4	0.5	0.5	0.45	0.366	0.391	0.275	0.475

Se buscaron los MAF ya reportados en diferentes poblaciones del mundo y se compararon como se puede observar en la tabla 20 para de esta manera poder observar si las frecuencias eran similares en los datos encontrados en el presente trabajo y en los ya reportados. Dónde: MAF= Alelo de menor frecuencia; MXL= Ascendencia mexicana en los Ángeles, California; EA= Euroamericanos, AA= Afroamericanos.

A continuación se muestran las variantes encontradas en los pacientes, observadas en los electroferogramas obtenidos mediante el programa Sequencing Analysis 5.3.

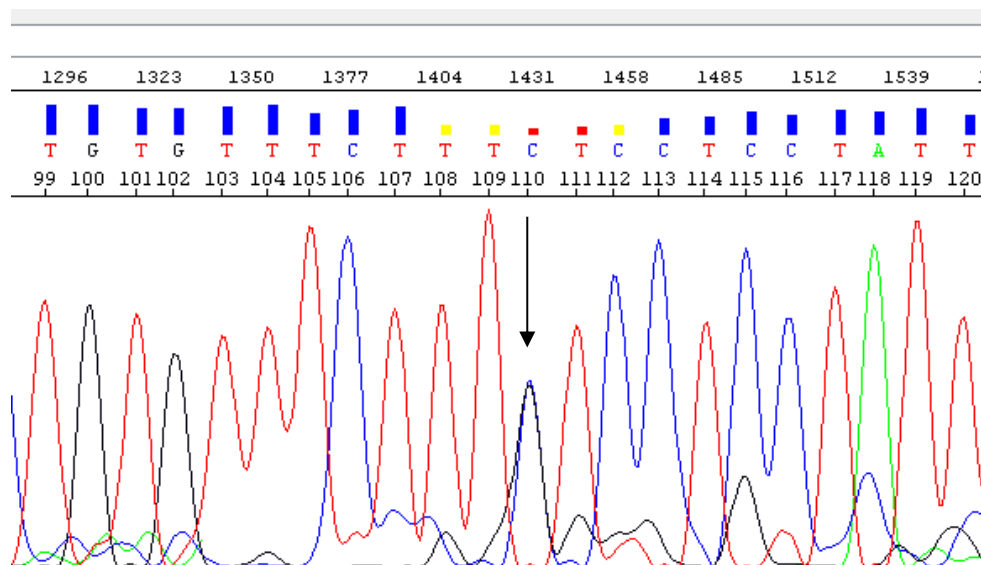


Figura 23. Electroferograma de paciente 45 que muestra la variante rs201953456 con genotipo heterocigoto G/C señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

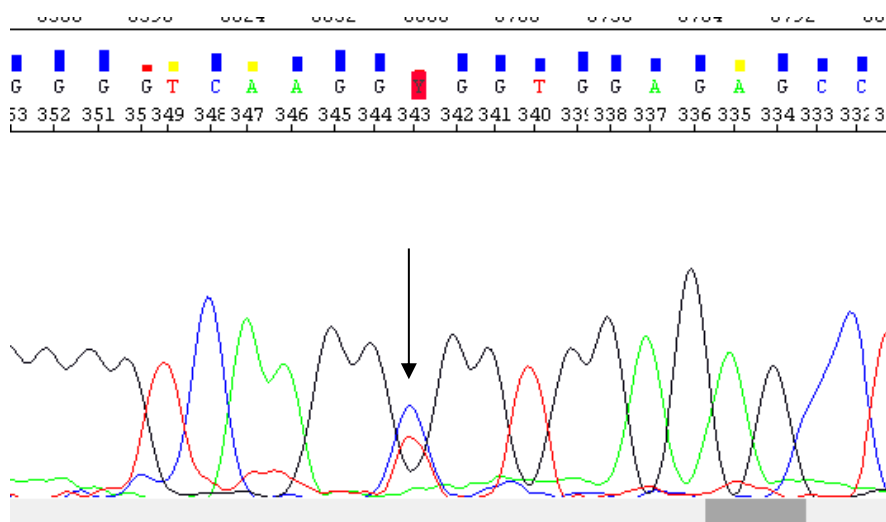


Figura 24. Electroferograma de paciente 24 que muestra la variante rs3751582 con genotipo heterocigoto T/C señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

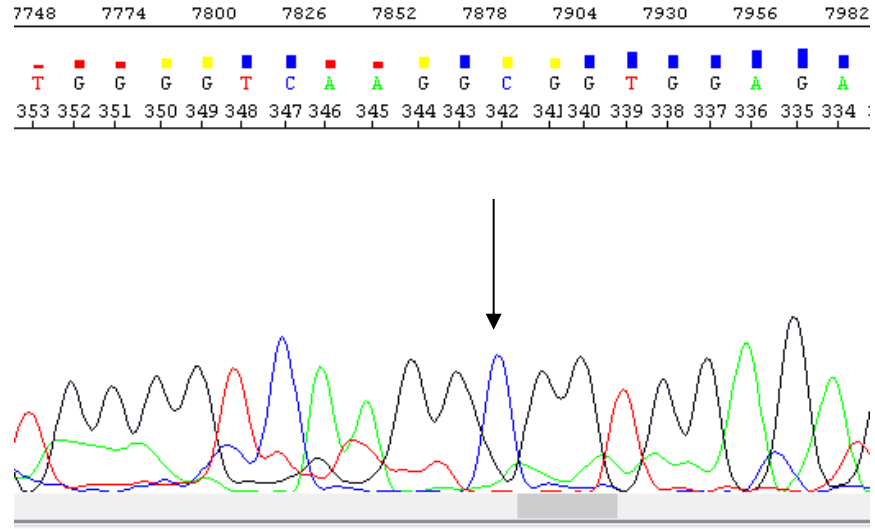


Figura 25. Electroferograma de paciente 47 que muestra con la variante rs3751582 con genotipo Homocigoto C/C señalado con la flecha. Imagen obtenida del software Sequencing Analysis 5.3.

A continuación se muestran gráficos de barras haciendo comparación de MAF reportados en diferentes poblaciones.

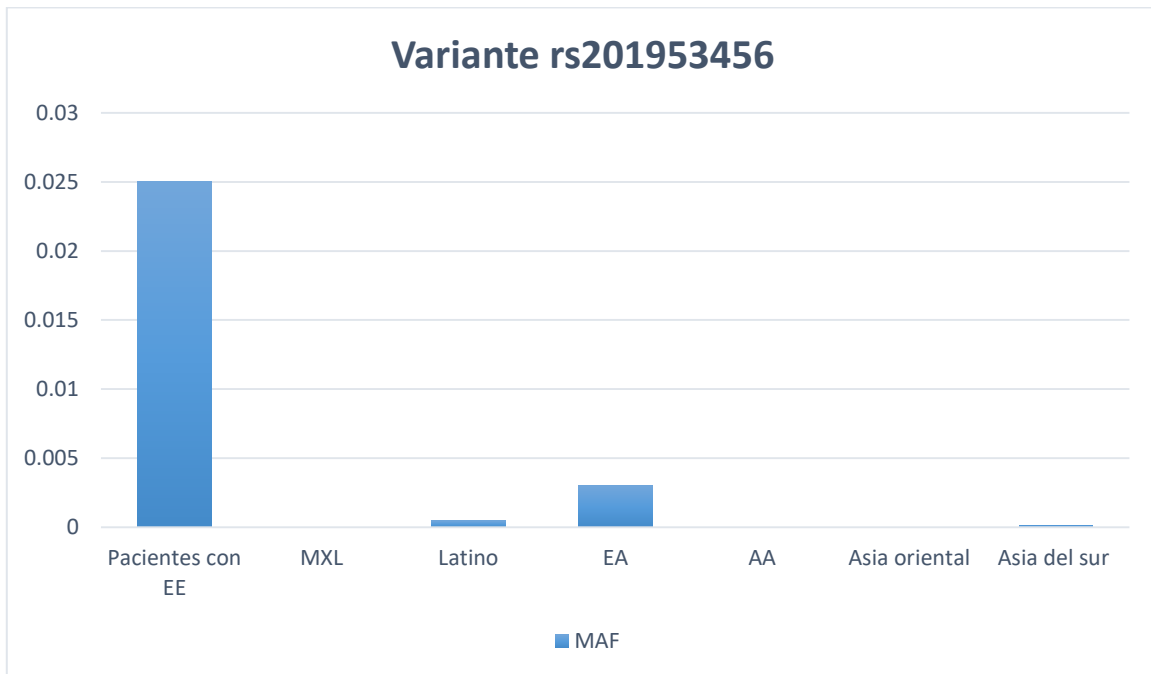


Figura 26. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones comparadas con los resultados obtenidos para la variante rs201953456 en pacientes con encefalopatías epilépticas. Dónde: MAF= Alelo de menor frecuencia; MXL= Ascendencia mexicana en los Ángeles, California; EA= Euroamericanos, AA= Afroamericanos.

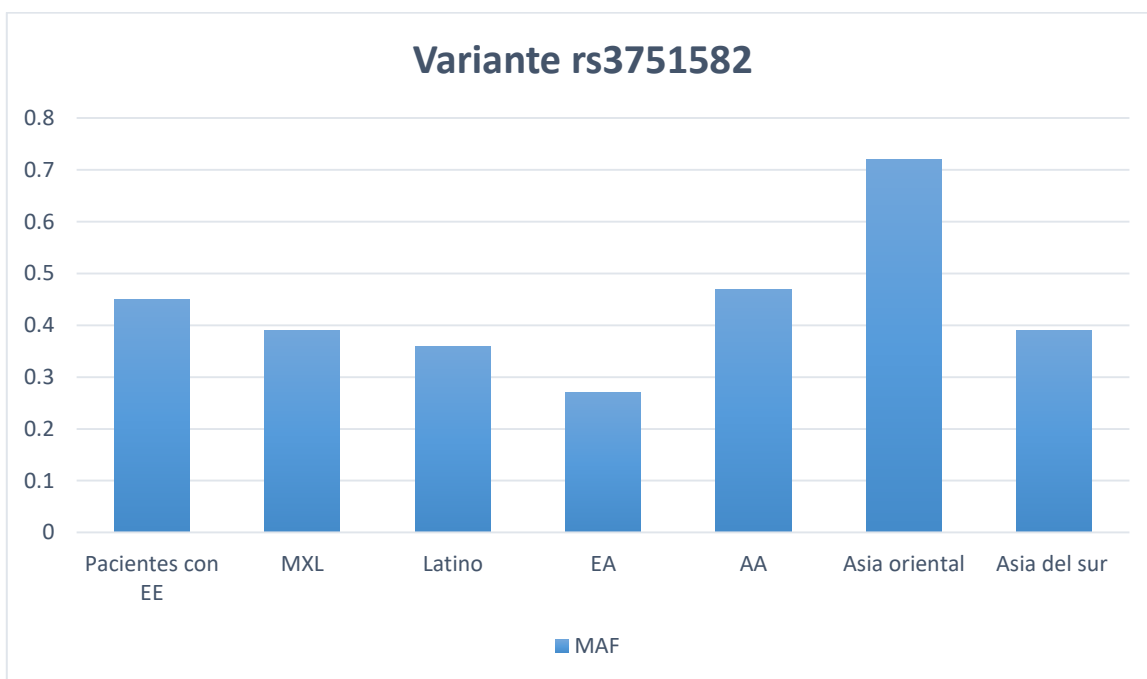


Figura 27. Frecuencias reportadas de diferentes poblaciones comparadas con los resultados obtenidos para la variante rs3751582 en pacientes con encefalopatías epilépticas. Dónde: MAF= Alelo de menor frecuencia; MXL= Ascendencia mexicana en los Ángeles, California; EA= Euroamericanos, AA= Afroamericanos.

Tabla 22. Scores de conservación de nucleótidos para cada variante encontrada

Gen	Variante	Cambio nt	Cambio aa	GERP++	phyloP mam	phyloP vert
GABRA1	rs41275339	C/T	n/a	-2.01	-0.21261	1.41226
GABRA1	rs1129647	C/T	Sinónimo Gly	0.283	0.453339	-0.908583
GABRA1	rs11135172	G/T	n/a	-1.14	-0.62771	0.0926929
GABRA1	rs2279020	A/G	n/a	-0.304	-0.68850	0.0906535
GABRB3	rs201953456	C/G	n/a	-0.456	-0.24718	0.00507874
GABRB3	rs3751582	C/T	n/a	-7.23	-2.20995	-0.0910394

Los resultados presentes en esta tabla fueron tomados de la página de Genome browser^{55, 56, 57, 58, 60}, donde mediante una base de datos se pueden revisar los scores dados por los algoritmos de los programas de GERP++ y phyloP para mamíferos y vertebrados. Dónde: nt= nucleótido; aa= aminoácido; mam= mamífero; vert= vertebrados; n/a= no correspondiente al caso.

Tabla 23. Datos clínicos de pacientes del presente estudio. Primera parte.

Paciente	Género	Edad al tomar la muestra	Edad de inicio de enfermedad	Tipo de Crisis	Antecedentes de epilepsia	EEG	Tratamiento	Variantes encontradas
1	M	31 años	9 meses con dx de sx de Dravet	CTCG	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs2279020
2	M	34 años	8 meses con dx de sx de West y posteriormente con dx de sx Lennox	CM	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs2279020, rs3751582
5	M	32 años	2 años con dx de sx Lennox	CTCG	Abuela materna y tío paterno	Anormal	Politerapia	rs11135172, rs2279020, rs3751582
8	M	37 años	6 años con dx de sx de Lennox	CTCG	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs2279020, rs3751582
10	M	20 años	2 años con dx de sx Lennox	CPS	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs2279020
11	M	36 años	15 años con dx de sx Lennox	CPC	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs2279020, rs3751582
13	M	13 años	3 días de nacido con dx de sx Lennox	CTCG	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs2279020, rs3751582
15	M	31 años	3 meses con dx de sx Lennox	CTCG	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs1129647, rs11135172, rs2279020, rs3751582
18	M	34 años	3 meses con dx de sx Lennox	CM	Abuelo materno	Anormal	Politerapia	rs1129647, rs11135172, rs2279020, rs3751582
21	M	27 años	3 años con dx de sx Lennox	CTCG	Tío materno	Anormal	Politerapia	rs2279020, rs3751582
24	F	19 años	12 años con dx de sx Lennox	CTCG	Bisabuela	Anormal	Politerapia	rs1129647, rs11135172, rs2279020, rs3751582
26	F	24 años	3 años con dx sx Lennox	CA Y CTCG	Tía materna	Anormal	Politerapia	rs41275339, rs2279020 rs3751582

Pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, los cuales firmaron una carta de conocimiento informado, donde otorgaban el permiso para la utilización de los datos clínicos en el presente trabajo. Dónde: CTCG: Crisis Tónico Clónica Generalizada, CPC: Crisis Parcial Compleja, CPS: Crisis Parcial Simple, CM: Crisis Mioclónicas. Autoría Propia.

Tabla 24. Datos clínicos de pacientes del presente estudio. Segunda parte.

Paciente	Género	Edad al tomar la muestra	Edad de inicio de enfermedad	Tipo de Crisis	Antecedentes de epilepsia	EEG	Tratamiento	Variantes encontradas
31	F	25 años	6 meses con dx de sx de Dravet y posteriormente dx de sx Lennox	CTCG	Tío materno	Anormal	Politerapia	rs1129647,
34	M	26 años	12 meses con dx de sx West y posteriormente con dx de sx de Lennox	CM	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs1129647, rs11135172, rs2279020, rs3751582
35	M	31 años	3 meses con dx de sx Lennox	CTCG	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs1129647, rs11135172, rs2279020, rs3751582
37	F	30 años	1 año 7 meses con dx de sx de Lennox	CTCG	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs41275339, rs1129647, rs11135172, rs2279020
44	M	40 años	1 mes con dx de sx de Dravet	CTCG	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs2279020, rs3751582
45	M	35 años	9 meses con dx de sx Dravet	CTCG	Tío paterno	Anormal	Politerapia	rs2279020, rs201953456
46	M	36 años	Desde el nacimiento con dx de sx Lennox	CPS	Madre Tía materna Prima materna	Anormal	Politerapia	rs2279020
47	F	27 años	14 años con dx de sx Lennox	CPC	Interrogados y Negado	Anormal	Politerapia	rs41275339, rs2279020, rs3751582
48	M	20 años	2 meses con dx de sx West Posteriormente dx de sx de Lennox	CTCG	Tía materna con crisis de ausencias	Anormal	Politerapia	rs11135172, rs2279020, rs3751582

Pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, los cuales firmaron una carta de conocimiento informado, donde otorgaban el permiso para la utilización de los datos clínicos en el presente trabajo. Dónde: CTCG: Crisis Tónico Clónica Generalizada, CPC: Crisis Parcial Compleja, CPS: Crisis Parcial Simple, CM: Crisis Mioclónicas. Autoría Propia.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la presente investigación se realizó secuenciación tipo Sanger en busca de variantes en los genes de *GABRA1* y *GABRB3* y se encontraron en total 6 variantes, 4 correspondientes en el gen *GABRA1* y 2 correspondientes en el gen *GABRB3*. Las variantes mencionadas reportadas en las tabla 18 y tabla 20 fueron consultadas en la base de datos de Ensembl^{61,62,63,64,65,66}, todas la variantes se encontraban reportadas para diferentes poblaciones. Se realizó una comparación de las MAF de las diferentes poblaciones reportadas contra la población estudiada con EE (Tabla 19 para el gen *GABRA1* y Tabla 21 para el gen *GABRB3*).

Los resultados de la comparación de las MAF para el gen *GABRA1* fueron los siguientes: la variante rs41275339 del exón 3 se trata de una variación de un solo nucleótido A/T, que no es codificante. La MAF reportada para mexicanos residentes en Los Ángeles California y el encontrado en el presente trabajo es muy similar siendo el primero de 0.070 y el segundo 0.071 respectivamente, con respecto a los Latinos su variación es ligeramente mayor con una frecuencia de 0.104 (ver figura 19), al contrario a la población afroamericana cuya frecuencia es de 0.027 considerablemente menor a la población mexicana. Por otro lado al analizar la MAF en estos pacientes con EE, la variante solo fue encontrada en mujeres sin embargo no hay información acerca de qué esto siempre ocurra, por lo que pudo deberse al azar encontrar solo mujeres dentro de nuestra muestra.

La variante rs1129647 del exón 4, variación de un solo nucleótido C/T, no hay cambio de aminoácido, dado que la variación da como resultado el mismo aminoácido glicina. La frecuencia de 0.191 para nuestros pacientes es ligeramente menor a las reportadas en diferentes poblaciones, excepto para la población afroamericana cuya frecuencia de 0.130 es menor a las demás reportadas (ver figura 20).

La variante rs11135172 del exón 8, variación de un solo nucleótido G/T, no da como resultado algún cambio de aminoácido, porque se encuentra en región no codificante. La MAF para población mexicana no había sido reportado hasta ahora

por lo que se comparó con la frecuencia reportada en latinos y resultó ser bastante similar, 0.191 y 0.194 respectivamente, siendo la población afroamericana nuevamente la de menor frecuencia con respecto a las demás (ver figura 21).

La variante rs2279020 del exón 10, es una variación de un solo nucleótido A/G no da como resultado algún cambio de aminoácido, porque se encuentra en región no codificante. La MAF de nuestros pacientes de 0.310 es ligeramente menor al reportado en población mexicana residente en los Ángeles California de 0.352, con respecto a la población de Asia oriental esta es menor con respecto a las demás (ver figura 22).

Los resultados de la comparación de MAF para el gen *GABRB3* fueron los siguientes: la variante rs201953456 del exón 5 se trata de una variación de un solo nucleótido C/G que no da como resultado algún cambio de aminoácido, porque se encuentra en región no codificante, la MAF encontrada es significativamente mayor al reportado en diferentes poblaciones (ver figura 26); sin embargo, al revisar los scores (ver tabla 22) para observar el grado de conservación de la secuencia con GERP++ y phyloP, no se encontró que la secuencia donde se da el cambio de nucleótido estuviera conservada, no obstante no se descarta que la variante pueda tener significancia en la enfermedad y posiblemente tratarse de un SNP de riesgo, al realizar sinergia junto con otras variaciones en diferentes genes. Cabe mencionar que el paciente encontrado con la variante es paciente con Síndrome de Dravet.

La variante rs3751582 del exón 8 es una variación de un solo nucleótido C/T que no da como resultado algún cambio de aminoácido, porque se encuentra en región no codificante. La MAF encontrada en nuestros pacientes de 0.45 es ligeramente mayor al de mexicanos residentes en los Ángeles California de 0.391, la frecuencia de la variante resultó ser mayor en la población de Asia Oriental, con respecto a todas las demás (ver figura 27).

Con excepción de la variante rs201953456, las frecuencias fueron similares en las poblaciones ya reportadas y en nuestros pacientes, por lo que de acuerdo a los criterios de clasificación de variantes que recomiendan la National Human Genome Research Institute (NHGRI), el American College of Medical Genetics (ACMG) y al

Laboratorio de Servicios Clínicos de Illumina (ICSL), podemos clasificar nuestras variantes según la evaluación y la concordancia de la evidencia disponible, como probablemente benigno; debido a que la frecuencia de las variantes fueron similares en nuestra población estudio como en la población general en función a la prevalencia de la enfermedad y a que la variante no se encontró conservada y / o se predice que es bien tolerada, en el presente estudio se predice el tipo de clasificación en la que podrían ser acomodadas dichas variantes de acuerdo con las pautas establecidas.^{67,68.}

A pesar de no haber encontrado una diferencia con respecto a las MAF, se prosiguió a revisar los scores de las variantes (ver tabla 22), scores que se buscaron en la página de Genome Browser^{55,56,57,58,59,60}, estos se realizaron por dos programas GERP++ y phyloP, que a grosso modo el objetivo de estos programas es que mediante un algoritmo, al alinear múltiples secuencias (Para GERP++ 33 especies de mamíferos, phyloPmam especies de mamíferos y phyloPvert especies de vertebrados) con el genoma humano, nos permite saber si un nucleótido específico de interés del genoma está significativamente conservado o no durante la evolución. De acuerdo al algoritmo usado para el programa de phyloP el score va de -14 a 3 siendo 3 una secuencia con alta conservación a lo largo de la evolución, por lo que al revisar este análisis en los nucleótidos donde se encuentran los cambios se demostró que no se trataban de nucleótidos conservados durante la evolución. De acuerdo al algoritmo de GERP++ el score va desde -12.3 a 6.17, siendo 6.17 el más conservado, por lo que al revisar los scores de nuestras variantes observamos que no se tratan de nucleótidos conservados.⁶⁹

Por otro lado al realizar el análisis de los datos clínicos, se pudieron encontrar los siguientes datos de relevancia. Son conocidos los factores de riesgo para la epilepsia; sin embargo, tras revisar los expedientes médicos se encontró que sólo el 76% de los pacientes de nuestra muestra estuvieron expuestos a algún factor de riesgo, los cuales se describen a continuación (los siguientes porcentajes son en relación con la muestra total de los pacientes): el 43% de los pacientes presenta antecedentes de epilepsia en su familia y de este 43%, el 78% es herencia por parte

de la madre, el 10% de las madres de los pacientes presentaron problemas prenatales del tipo de amenaza de aborto, el 29% de los pacientes presentó hipoxia perinatal y el total de estos pacientes comenzaron a presentar sus crisis epilépticas en los primeros meses de vida, el 5% de los pacientes presentó septicemia perinatal, el 5% presentó disgenesia cerebral y el 5 % de los pacientes presentó esclerosis mesial. Por otro lado el 24% de los pacientes que no presentaron algún factor de riesgo, pero que aun así presentan la enfermedad, no existe una explicación médica aparente para la etiología de su enfermedad por lo que es importante seguir indagando en busca de variantes en genes propuestos como candidatos para las encefalopatías epilépticas.

En su totalidad los pacientes de nuestro estudio presentan anomalías en sus electroencefalogramas, siendo las disfunciones generalizadas punta onda lenta la actividad cerebral más común entre ellos. Otro dato de relevancia es que el 100% de nuestros pacientes se encuentra en la actualidad bajo un tratamiento de politerapia para lograr controlar sus crisis epilépticas y psicóticas y el 48% de estos a lo largo de su enfermedad fueron sometidos a un tratamiento quirúrgico como la callostomía y el estimulador vagal. Cabe mencionar que el 19% de nuestros pacientes a lo largo de su enfermedad tuvo más de un diagnóstico, a pesar de la importancia de la identificación de genes causales o variantes para que se pueda hacer diagnóstico molecular, pretendiendo que sea más rápido y preciso; y en un futuro de este modo pudiera ayudar a predecir la respuesta al tratamiento o la identificación de nuevos blancos terapéuticos, en lo que se llega a esto, se debe dar a la tarea de desarrollar un método o encontrar un patrón clínico para poder diagnosticar con acierto este tipo de enfermedades ya que las pautas conocidas hasta ahora para diferenciar una encefalopatía epiléptica de otra no son del todo precisas.

9. CONCLUSIONES

Cabe a destacar que esta investigación fue pionera en la búsqueda de variantes en los genes *GABRA1* y *GABRB3* para pacientes con encefalopatías epilépticas tipo Lennox Gastaut y Dravet y de acuerdo a los objetivos planteados y los resultados obtenidos:

- Se encontraron en total 6 variantes, 4 correspondientes para el gen de *GABRA1* y dos correspondientes al gen *GABRB3* en pacientes encefalopatías epilépticas tipo Lennox Gastaut y Dravet.
- Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes encontradas y se compararon con las frecuencias ya reportadas de diferentes poblaciones del mundo, donde no se encontraron diferencias entre las frecuencias de la población mexicana ya reportadas y nuestros pacientes con encefalopatías epilépticas, con excepción de la variante rs201953456 cuya frecuencia fue mayor a todas las demás. Sin embargo al realizar búsqueda en literatura no se encontraron hallazgos de que estuviera relacionada a alguna patología y al buscar los scores dados por GERP++ y phyloP para el nucleótido donde se da el cambio, éste no se encontró conservado en la evolución.
- Se determinó que la información existente acerca de este tipo de epilepsias es carente para lograr dar a los pacientes un diagnóstico certero ya que al 19% de nuestros pacientes (en relación con nuestra muestra total) tuvieron más de un diagnóstico a lo largo de su vida y el 24% de ellos no poseen una explicación etiológica a su enfermedad, lo cual da importancia a trabajos como este que indagan en la búsqueda de variantes en genes propuestos para la identificación de la etiología de este grupo de enfermedades, que se sospecha es genética, de acuerdo a los hallazgos que se han encontrado acerca de estas enfermedades, pudiendo dar un diagnóstico molecular que sería de mayor precisión y rapidez, dando certeza al clínico para llevar a cabo el tratamiento y pronóstico adecuado según sea el caso del paciente, teniendo como fin mejorar la calidad de vida de los pacientes.

10. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de Salud. 2018. Epilepsia. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>.
2. OMS. 2015. Global burden of epilepsy and the need for coordinated action at the country level to address its health, social and public knowledge implications. Recuperado de: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/251923>
3. Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, Brodie, Hauser, A., et al. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. Vol 51. pp. 1069–1077.
4. Fisher, P., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A. et al. (2014). Definición clínica practica de epilepsia. *Epilepsia*. Vol. 55. pp. 475-482.
5. Engel, J. Jr. (2001). A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. Vol. 42. pp. 796–803.
6. Palacios, E. y Clavijo, P. C. (2016). Semiología de la crisis epiléptica: un reto clínico. *REPERT MED CIR*. Vol 25. pp. 203-209.
7. Pozo, D. L. y Pozo, A. A. (2001). Nuevo enfoque conceptual de la epilepsia. *Revista Cubana de Pediatría*. Vol. 73. pp. 224-229.
8. Fisher, R. S., Cross, J. H., D'Souza, C., French, J. A., Haut, S. R., et al. (2017). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, Vol. 58. pp 531–542.
9. Organización Mundial de Salud. Factores de Riesgo. 2018. Recuperado de: http://www.who.int/topics/risk_factors/es/.
- 10 Jiménez, I., Mora, O., Uribe, S. C., et al. (1991). Factores de riesgo en epilepsia Estudio epidemiológico de casos y controles. *Acta Medica Colombiana*. Vol 16. pp. 5-17.

11. Martínez, R. M. (2004). Los canales iónicos: la biología y patología. *Archivos de Cardiología de México*. Vol. 74. pp. S205-S210.
12. Carrizosa, M. J. y Cornejo, O. W. (2003). Canalopatías epilépticas. *IATREIA*. Vol. 16. pp. 228-239.
13. Heron, S., Scheffer, I., Berkovic, S., Dibbens, L. y Mulley, J. (2007). Channelopathies in Idiopathic Epilepsy. *Neurotherapeutics*. Vol 4. pp. 95-304.
14. Carrizosa, M. J. (2006). Revisión: Canalopatías epilépticas. *Acta Neurol Colomb* Vol. 22. pp 118-126.
15. Khan, S. y Al Baradie R. (2012). Epileptic encephalopathies: an overview. *Epilepsy Research and Treatment*. Vol. 2012. pp. 1-9.
16. Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, et al. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Official Journal of the International League Against Epilepsy*, Vol. 58. pp. 512-521.
17. Orphanet. 2006. Encefalopatía mioclónica precoz. Recuperado de: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=es&Expert=1935.
18. Lara, G. J. C. y Jerez, M. A. A. (2016). *Apuntes de Epilepsia en la infancia y adolescencia*. Ciudad de Guatemala, Guatemala: Humana Editores.
19. Yamatogi Y, Ohtahara S. (2002). Early-infantile epileptic encephalopathy with suppression-bursts, Ohtahara syndrome; its overview referring to our 16 cases. *Brain Dev*. Vol. 24 pp. 13- 23.
20. Pozo, D. A., Pozo, D. L. y Pozo, D. (2002). Síndrome de West: etiología, fisiopatología, aspectos clínicos y pronósticos. *Revista Cubana de Pediatría*. Vol. 74. pp. 151-161.
21. Castillo, M. M., Carmona, J., Martínez, P. y Aras, P. (2014). Síndrome de Dravet. *REV CLÍN MED FAM*. Vol. 7. pp. 134-136.

22. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet.* Vol 68. pp. 1327–32.
23. Mukhin KY, Kholin AA, Mironov MB, Petrukhin AS, Holthausen H (eds.). (2014). Epileptic encephalopathies and related síndromes in children. Montrouge: John Libbey. pp. 55-68.
24. Pozo, D. A., Pozo, D. L. y Pozo, D. (2001). Epilepsias mioclónicas en el niño y el adolescente. *Revista Cubana de Pediatría.* Vol. 73 pp. 186-193.
25. Bermudez, M.L. y Moreno, A.A.J. (2009). Síndrome de Lennox-Gastaut. *El Residente.* Vol. 4 pp. 56-66.
26. Kramer U, Nevo Y, Neufeld MY, Fatal A, Leitner Y, Harel S. (1998). Epidemiology of epilepsy in childhood: a cohort of 440 consecutive patients. *Pediatr Neurol.* Vol 18. pp. 46 -50.
27. Pozo, D. A., Pozo, D. L, Carrillo, V.B., Chibás, N.S. Cepero, M.LI. y Pozo, D. (2005). El síndrome de Landau-Kleffner. Presentación de dos casos. *Revista Cubana de Pediatría.* Vol. 77. pp. 1-7.
28. Ribera, D. y Rios, L. (2010). Encefalopatía epiléptica de Punta-Onda continúa durante el sueño lento. *Revista Chilena de Epilepsia.* Vol. 2. pp. 39-52.
29. Licourt, O. D., Cala, H. O., Travieso, T. A., Orraca, C. M. (2015). La heterogeneidad genética en la epilepsia: presentación de familias. *Rev. Ciencias Médicas.* Vol. 19. pp. 141-150.
30. Lantigua Cruz A. (2011). *Introducción a la Genética Médica.* La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 160-161.
31. Pal D.K, Greenberg D.A. (2002). Evaluating Genetic Heterogeneity in Complex Disorders. *Human Heredity.* Vol. 53. pp. 227–236.
32. Helbig, I., y Tayoun, A. N. (2016). Understanding Genotypes and Phenotypes in Epileptic Encephalopathies. *Molecular Syndromology,* Vol.7. pp. 172-181.

33. Flórez J. (2008). *Farmacología humana*, quinta edición, Barcelona: Elsevier Masson: 503-505.
34. Möhler H, Benke D, Benson J, Lüscher B, Rudolph, U, Fritschy, JM. (1996). *Diversity in structure, pharmacology, and regulation of GABA receptors. In: The GABA Receptors*. 1a. ed. Humana Press Inc. Totawa, New Jersey
35. Romero, C., Galindo, F., Galicia, S. y Flores, A. (2011). GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Rev Neurol. Vol 52*. pp. 665-675.
36. Renfigo A, Tapiero C, Spinel C. (2005) Receptores GABA A (ácido y aminobutírico) y su relación con la dependencia al alcohol. *Ingeniería y Ciencia. Vol. 1*. pp. 77-96.
37. Stephenson F.A. (2006). Structure and trafficking of NMDA and GABA A receptors. *Biochem Soc Trans. Vol. 34*.pp. 877-88.
38. Bollan K, King D, Robertson L et al. (2003). GABAA receptor composition is determined by distinct assembly signals within α and β subunits. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 278*. pp. 4747-4755.
39. Mendel, M. J. S., Cortijo, P. L. X., Gasca, P. E., Susan, T. P. V., Pérez, P. A. y Ramos, M. F. R. (2011). Receptor GABA_A: implicaciones farmacológicas a nivel central. *Archivos de Neurociencias. Vol. 16*. pp. 40-45.
40. Cabo de la Vega C, Villanueva-Hernández P, Prieto-Martín A. (2006) Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol. Vol. 42*. pp. 159-168
41. Rodriguez, C., Guevara, B. y Lobo, G. (2010). Mecanismo de Acción de los Fármacos Antiepilépticos. *INFORMED. Vol 12*. pp 321-326.
42. Macdonald, R. L, Kang, J. Q. y Gallagher, M. J. (2010). Mutations in GABA_A receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J Physiol. Vol. 588*. pp. 1861-1869.
43. UniProtKB. 2018. P14867 (GBRA1_HUMAN). Recuperado de <https://www.uniprot.org/uniprot/P14867>
44. OMIM. 2014. 137160 GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID RECEPTOR, ALPHA-1; GABRA1. Recuperado de: <https://www.omim.org/entry/137160#mapping>

45. GENETICS HOME REFERENCE. 2018. GABRA1 gene. Recuperado de: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GABRA1#location>

46. Ding, L., Feng, H.-J., Macdonald, R. L., Botzolakis, E. J., Hu, N., Gallagher, M. J. (2010). GABA(A) receptor alpha-1 subunit mutation A322D associated with autosomal dominant juvenile myoclonic epilepsy reduces the expression and alters the composition of wild type GABA(A) receptors. *J. Biol. Chem. Vol 285*. pp. 26390-26405

47. Maljevic, S., Krampfl, K., Cobilanschi, J., Tilgen, N., Beyer, S., Weber, Y. G., Schlesinger, F., Ursu, D., Melzer, W., Cossette, P., Bufler, J., Lerche, H., Heils, A. (2006). A mutation in the GABA-A receptor alpha-1-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann. Neurol. Vol 59*. pp. 983-987.

48. Carvill, G. L., Weckhuysen, S., McMahon, J. M., Hartmann, C., Moller, R. S., Hjalgrim, H., Cook, J., Geraghty, E., O'Roak, B. J., Petrou, S., Clarke, A., Gill, D., and 14 others.(2014). *GABRA1* and *STXBP1*: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology. Vol 82*. pp. 1245-1253.

49. Lachance-Touchette, P., Brown, P., Meloche, C., Kinirons, P., Lapointe, L., Lacasse, H., Lortie, A., Carmant, L., Bedford, F., Bowie, D., Cossette, P. (2011). Novel alpha-1 and gamma-2 GABA-A receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *Europ. J. Neurosci. Vol 34*. pp. 237-249.

50. UniProtKB. 2018. P28472 (GBRB3_HUMAN). Recuperado de: <https://www.uniprot.org/uniprot/P28472>

51. GENETICS HOME REFERENCE. 2018. GABRB3 gene. Recuperado de: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GABRB3#location>

52. Buhr, A., Bianchi, M. T., Baur, R., Courtet, P., Pignay, V., Boulenger, J. P., Gallati, S., Hinkle, D. J., Macdonald, R. L., Sigel, E. (2002). Functional characterization of the new human GABA(A) receptor mutation beta-3(R192H). *Hum. Genet.* Vol 111. pp. 154-160.

53. Tanaka M, Olsen RW, Medina MT, Schwartz E, Alonso ME, Duron RM, Castro-Ortega R, Martinez-Juarez IE, Pascual-Castroviejo E, Machado-Salas J, Silva R, Bailey JN, Bai D, Ochoa A, Jara-Prado A, Pineda G, Macdonald RL & Delgado-Escueta AV (2008). Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet.* Vol 82. pp. 1249–1261.

54. Epi4K Consortium and Epilepsy Phenome/Genome Project. (2013). De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature.* Vol 501. pp. 217-221.

55. Genome Browser. Versión del 2009 ensamble GRCh37/hg19. rs41275339. Recuperado de: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A161277899-161277899&hgid=676388381_TketVxDhxCrqACL12aBsnyEZcCpd .

56. Genome Browser. Versión del 2009 ensamble GRCh37/hg19. rs1129647. Recuperado de: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A161281245-161281245&hgid=676388381_TketVxDhxCrqACL12aBsnyEZcCpd .

57. Genome Browser. Versión del 2009 ensamble GRCh37/hg19. rs11135172. Recuperado de: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A161309502-161310002&hgid=676388381_TketVxDhxCrqACL12aBsnyEZcCpd .

58. Genome Browser. Versión del 2009 ensamble GRCh37/hg19. rs2279020.
Recuperado de: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A161322889-161322889&hgid=676388381_TketVxDhxCrqACL12aBsnyEZcCpd.
59. Genome Browser. Versión del 2009 ensamble GRCh37/hg19. rs201953456.
Recuperado de: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr15%3A26828452-26828452&hgid=676388381_TketVxDhxCrqACL12aBsnyEZcCpd.
60. Genome Browser. Versión del 2009 ensamble GRCh37/hg19. rs3751582.
Recuperado de: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr15%3A26806064-26806064&hgid=676388381_TketVxDhxCrqACL12aBsnyEZcCpd.
61. Ensembl. 2018. rs41275339. Recuperado de: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=5:161850393-161851393;v=rs41275339;vdb=variation;vf=10783617.
62. Ensembl. 2018. rs1129647. Recuperado de: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=5:161853739-161854739;v=rs1129647;vdb=variation;vf=805741.
63. Ensembl. 2018. rs11135172. Recuperado de: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=5:161882246-161883246;v=rs11135172;vdb=variation;vf=6459329.
64. Ensembl. 2018. rs2279020. Recuperado de: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=5:161895383-161896383;v=rs2279020;vdb=variation;vf=1678007.

65. Ensembl. 2018. rs201953456. Recuperado de: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=15:26582805-26583805;v=rs201953456;vdb=variation;vf=50058571.
66. Ensembl. 2018. rs3751582. Recuperado de: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=15:26560417-26561417;v=rs3751582;vdb=variation;vf=2436116.
67. MacArthur, D. G., Manolio, T. A., Dimmock, D. P., Rehm, H. L., et al. (2014). Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*. Vol 504. pp. 469-476.
68. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S. y Foster, J. (2015). Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. Vol. 17. pp. 405-424.
69. Cooper, G. Stone, E., Asimenos, G., et al. (2005). Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Research*. Vol.15. pp. 901-913.
70. Palacios, E. y Clavijo-P, C. (2016). Semiología de la crisis epiléptica: un reto clínico. *REPERT MED CIR*. Vol 25. pp 203-209.