



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Trabajo de grado:

**ANÁLISIS DE LOS PERFILES GENÓMICOS DE PACIENTES
COLOMBIANOS CON EPILEPSIA REFRACTARIA**

Presentado por:

SILVIA JULIANA MARADEI ANAYA, MD.

Para optar por el título de:

MAGÍSTER EN GENÉTICA HUMANA

Dirigido por:

HARVY MAURICIO VELASCO PARRA, MD.

Esp. Genética Médica, MSc. Ciencias Biológicas.

Marzo de 2017

Bogotá, Colombia

ANÁLISIS DE LOS PERFILES GENÓMICOS DE PACIENTES COLOMBIANOS CON EPILEPSIA REFRACTARIA

Opta por el título de Posgrado:

Silvia Juliana Maradei, MD., Estudiante de la Maestría en Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia.

Dirige el proyecto:

Harvy Mauricio Velasco, MD. Esp. Genética Médica. Coordinador de la Maestría en Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia. Docente adscrito al Departamento de Morfología de la Universidad Nacional de Colombia. Genetista en Hospital Militar Central. Genetista en Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt.

Coinvestigadores:

Álvaro Izquierdo Bello, MD., Esp. Neurología Pediátrica. Director del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Neuropediatra en Hospital de la Misericordia.

Eugenia Espinosa, MD., Esp. Neurología Pediátrica. Jefe del Servicio de Neurología Pediátrica y Médico Neuropediatra en Hospital Militar Central. Neuropediatra en Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt.

Instituciones que apoyan:

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Hospital Militar Central, Bogotá.

Hospital de la Misericordia, Bogotá.

Tabla De Contenido

Agradecimientos	4
Abreviaturas	5
1. Resumen	8
2. Marco Conceptual	10
3. Planteamiento Del Problema	34
4. Justificación	37
5. Objetivos	39
6. Metodología	40
7. Resultados	62
8. Discusión	91
9. Conclusiones	138
Limitaciones	142
Consideraciones Éticas	144
Fuente De Financiación	145
Bibliografía	146

Agradecimientos

A mi familia, por ayudarme a ser quien soy y depositar su confianza en mí. Este logro es para ustedes. Especialmente le dedico este trabajo a mi madre y a mi nona Doris, a ella siempre la llevaré en mi corazón y sin ella nada de lo que he logrado hasta hoy habría sido posible.

Al doctor Harvy Mauricio Velasco Parra, director y gestor de este trabajo, por su orientación, paciencia, y el apoyo que me ha brindado, desde el último año de carrera universitaria y durante los semestres en que cursé este posgrado. En cada paso del camino hacia delante tendré presente cada una de sus enseñanzas.

A Diana Alexandra Ramírez y Mireya Sarmiento, a quienes este posgrado me regaló como amigas.

A los doctores Eugenia Espinosa y Álvaro Izquierdo Bello, neuropediatras, por su colaboración como co-investigadores de este trabajo.

A los pacientes y sus padres por haber participado en este estudio. Siempre serán ellos lo más importante en nuestras investigaciones.

A todas las personas que de una u otra manera tuvieron algo que ver con este trabajo o con mi proceso de formación en la maestría.

Y a Gerardo Muñeton, por creer en mí cuando yo misma no lo hacía, acompañarme, ser mi roca y apoyarme durante este reto que parecía lejano y ahora culmina.

Abreviaturas

Ácido Desoxirribonucleico.....	DNA
Ácido Gamma Amino Butírico.....	GABA
Ácido Ribonucleico.....	RNA
Ácido Ribonucleico Mensajero	mRNA
Amplificación de sondas Dependiente de Ligamiento.....	MLPA
Años de Vida Ajustados a Discapacidad.....	DALYs
Carbamazepina	CBZ
Carbamazepina-10,11-epóxido	CBZE
Carbamazepina-10,11-trans dihidrodiol	CBZD
Cariotipo espectral.....	SKY
Colegio Americano de Genética Médica.....	ACMG
Complejo de Golgi	CG
Convulsiones Neonatales e Infantiles Benignas Familiares.....	BFIS
Electroencefalograma	EEG
Epilepsia Autosómica Dominante con Afectación Auditiva.....	ADPEAF
Epilepsia de Picos y Ondas Continuas durante el Sueño	CSWS
Epilepsia del Lóbulo Temporal	MTLE
Epilepsia Mioclónica Progresiva	PME
Epilepsia Parcial Idiopática con Afectación Auditiva.....	IPEAF
Epilepsia Refractaria.....	ER
Estudios de Asociación del Genoma Completo	GWAS

Factor de Crecimiento Transformante Beta.....	TGFβ
Fármacos Antiepilépticos.....	FAE
Frecuencia Alélica Menor	MAF
Hibridación genómica comparativa.....	CGH
Hibridación genómica comparativa por Microarreglos.....	aCGH
Hibridación In Situ Fluorescente.....	FISH
Hormona adrenocorticotropa	ACTH
Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina.....	GDI
Liga Internacional Contra la Epilepsia.....	ILAE
Microarray Gene Expression Data.....	MGED
Microarreglos para genotipificación.....	aCGH/SNP
Minimum Information About a Microarray Experiment.....	MIAME
N-metil D-aspartato.....	NMDA
Online Mendelian Inheritance in Men	OMIM
Óxido de indio.....	ITO
Paraplegia Espástica Autosómica Dominante Tipo 9	SPG9
Pérdidas de Heterocigosidad.....	LOH
Polietilenglicol	PEG
Polimorfismos de nucleótido único.....	SNP
Proteína de homeodominios atípicos con extensiones en bucle de tres aminoácidos	TALE
Proteínas receptores de proteínas de fijación	SNARE
Proteínas segundo mensajero homólogas de MAD.....	SMAD
Puntuación del Logaritmo de Probabilidades	LOD
Reacción en cadena de la polimerasa.....	PCR

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.....	RTPCR
Recombinación no alélica entre cromosomas homólogos	NAHR
Retardo Mental.....	RM
Resonancia Nuclear Magnética	RNM
Retículo Endoplasmático	RE
Secuenciación de Siguiete Generación	NGS
Test de APGAR	APGAR
Unidad de cuidados intensivos neonatal	UCIN
Variantes de nucleótido único.....	SNV
Variantes en el número de copias.....	CNV

1. Resumen

La Epilepsia Refractaria (ER) se ha asociado a aberraciones genómicas, y en varios estudios científicos a partir de la aplicación de tecnologías moleculares como los microarreglos se han demostrado *hotspots* de alteraciones cromosómicas en pacientes con esta condición.

Este trabajo plantea una metodología piloto para la detección de variantes del número de copias del DNA genómico en pacientes colombianos con ER para esclarecer elementos de la arquitectura genética de esta condición, mediante el estudio de microarreglos de genotipificación (aCGH/SNP).

Logramos demostrar en el 15% de los casos analizados que existen rearrreglos genómicos que podrían estar asociados con la refractariedad a los tratamientos farmacológicos: Una duplicación en 22q11.1 y una delección 19q13.11-q13.12 en uno de los pacientes, una delección homocigota en 1p36 y una duplicación 18p11.31 en otro, y en el tercer paciente una delección de la región cromosómica Xq28. Consideramos que los genes comprometidos por las CNV detectadas son con mayor probabilidad modificadores del fenotipo epiléptico, bien sea por acción directa o por su asociación con otros genes en múltiples redes biológicas, a las cuales intentamos aproximarnos. Además, todos los pacientes estudiados son portadores del alelo C (CC) para el SNP rs10517402 localizado en el gen *EPHX1*, que se relaciona con necesidad de menores dosis de determinados fármacos para el control de las crisis epilépticas.

Dado que la tecnología de microarreglos se presta como método de tamización genómica para detectar tanto anomalías estructurales como SNVs/SNPs relacionados con enfermedad, por relativa baja en sus costos en los últimos años propiciada por el aumento en su uso, y según nuestros resultados, proponemos al *array* CGH como estudio de primera línea en pacientes con ER idiopáticas, tanto para la aproximación diagnóstica como para el análisis del impacto terapéutico.

Se requiere además que el conocimiento derivado de este tipo de trabajos pueda aplicarse en estudios de carácter funcional, en lo que como grupo de investigación queremos ser pioneros.

2. Marco Conceptual

La Organización Mundial de la Salud define la epilepsia como un trastorno cerebral crónico caracterizado por la predisposición a presentar crisis epilépticas recurrentes de etiología diversa, y a todos los fenómenos clínicos y psicosociales que se relacionan. Es de anotar que una crisis epiléptica se define como un evento neurológico autolimitado consecuencia de la descarga anormal neuronal, con manifestaciones clínicas variables [1].

Epidemiología

La epilepsia es una patología frecuente que afecta aproximadamente 50 millones de personas en todo el mundo [2]. Es más común en niños o en personas mayores de 60 años de edad y en individuos con trastornos del desarrollo o el aprendizaje; es controversial si los varones son ligeramente más propensos a desarrollar epilepsia que las mujeres. Se cree que unos 200 desordenes genéticos pueden incluir como síntoma manifestaciones epilépticas y hasta en un 30% de los pacientes se encuentran antecedentes familiares de la condición [2].

En el Reino Unido, se estima que 1 de cada 50 personas tendrá un diagnóstico de epilepsia en algún momento en su vida [3]. En los Estados Unidos, un 3% de los habitantes tendrá este diagnóstico antes de los 80 años de edad. Allí, se reportan

200.000 nuevos casos de epilepsia cada año, siendo entre 75.000 y 100.000 niños menores de 5 años de edad [4].

En Latinoamérica, se ha reportado una prevalencia general de 17 por cada 1.000 habitantes [5]. Colombia es el tercer país latinoamericano con mayor prevalencia de epilepsia, con un máximo de 33,1 por cada 1.000 habitantes, superado por Guatemala y México [5].

En Colombia se han hecho varios estudios sobre la epidemiología de la epilepsia, encontrándose una alta variabilidad interregional. El estudio neuroepidemiológico nacional EPINEURO [6] incluyó pacientes en 5 zonas del país: Bogotá, Valle, Antioquia, Santander y la Costa Atlántica, pertenecientes tanto a población rural como a urbana. El muestreo total reunía 8.910 personas, de las cuales, después de una evaluación inicial, 130 fueron seleccionadas como casos (posibles epilépticos) para ser evaluados por un neurólogo especializado. De ellas, 101 recibieron diagnóstico de epilepsia, en tanto 29 fueron diagnosticados con crisis febriles, pseudocrisis, síncope, y otros diagnósticos diferenciales de la epilepsia. El último estudio epidemiológico realizado en Colombia reporta una prevalencia de 11 por cada 1.000 habitantes [7]. La Liga Central Contra la Epilepsia de Bogotá había reportado previamente que de las consultas de primera vez el 53% se diagnosticaban como crisis focales, el 40% como crisis generalizadas y hasta un 6% quedaban como indeterminadas [8]. Utilizando diferentes estrategias, el grupo de Roselli D *et al.* [9] publicó recientemente un artículo en el que hablan sobre la

carga de la enfermedad epiléptica en Colombia, representada en DALYs (Disability Adjusted Life Years), para el año 2012. Se encontró que la epilepsia es la causa del 0.88% de todas las muertes en Colombia. Un total de 5.25 DALYs por cada 1.000 años-por-persona se pierden debido a la epilepsia en Colombia, de los cuales el 75% corresponden a mortalidad prematura, con un mayor impacto en la población masculina que en la femenina (6.12 vs. 4.41 DALYs). Adicionalmente, se reporta que más del 40% de las crisis se presentan por primera vez antes de los 15 años, de forma similar a lo reportado en la literatura internacional [6] y que, aunque la prevalencia de epilepsia en Colombia parece ir disminuyendo con el tiempo, se encuentra todavía al menos dos veces mayor que la prevalencia reportada en países desarrollados.

Etiología

La epilepsia es un trastorno multifactorial. Internacionalmente se acepta que puede tener causas genéticas, metabólicas, estructurales, o indeterminadas. Se han descrito tres factores genéticos que se asocian con la predisposición a presentar crisis epilépticas [10]:

- Variaciones interindividuales en genes/*loci* de susceptibilidad.
- Trastornos monogénicos con epilepsia como síntoma cardinal (por ejemplo esclerosis tuberosa).
- Disfunción genética de la excitabilidad cerebral y la sincronía neuronal.

Las lesiones cerebrales adquiridas también producen susceptibilidad a presentar crisis epilépticas: las displasias del desarrollo cortical, la esclerosis del hipocampo, tumores, lesiones postraumáticas, ataques cerebrovasculares, infecciones y estados tóxicos o metabólicos [11].

Las crisis epilépticas se originan por una alteración entre la actividad inhibitoria y excitatoria de las neuronas cerebrales, en la que característicamente hay una descarga eléctrica hipersincrónica (más aumentada que lo normal). Este desequilibrio en la actividad neuronal se manifiesta con diferente semiología dependiendo del foco epileptogénico, es decir, del lugar del cerebro en donde se haya dado la alteración de los mecanismos reguladores de las descargas [12]. Así, cuando el foco epileptogénico afecta la corteza homuncular para el miembro superior, es probable que la primera manifestación de la crisis sea una actividad motora desorganizada de esa extremidad. En el caso de las crisis generalizadas, se cree que las manifestaciones clínicas se deben al compromiso hipotalámico, del diencefalo e incluso del tronco cerebral [12].

En las epilepsias adquiridas, por ejemplo las postraumáticas, se ha encontrado evidencia de que la pérdida neuronal induce a una reorganización del tejido nervioso que es aberrante, alterando los mecanismos de las sinapsis entre las neuronas que permanecen y aumentando la transmisión excitatoria [11].

La fisiopatología de las crisis focales es distinta a la de las crisis generalizadas: aunque la excitabilidad celular está incrementada en ambas, los mecanismos de sincronización de las neuronas difieren. Las crisis de inicio focal se caracterizan por una descarga epileptiforme interictal (durante la crisis) de un conglomerado pequeño de neuronas de la corteza cerebral, causada por una despolarización prolongada dependiente de calcio, seguida de una hiperpolarización. Estas descargas no necesariamente conducen a crisis y solo se produce epilepsia (propensión a presentar crisis recurrentes) cuando existe una alteración permanente de los mecanismos que las regulan [11]:

- a. Disminución/ausencia de la inhibición de los receptores gabaminérgicos [11].
- b. Activación defectuosa de los receptores GABA (Ácido Gama Amino Butírico) [11].
- c. Disregulación del calcio intracelular [11,13,14].
- d. Activación aumentada de los receptores NMDA (N-metil D-aspartato) [11,15, 16].
- e. Hipersincronización neuronal por interacciones no sinápticas [17,18].
- f. Alteraciones del circuito tálamo-cortical [11,19,20].

Clasificación

La International League Against Epilepsy (ILAE – Liga Internacional contra la Epilepsia) propuso la primera clasificación de las epilepsias hacia 1970 [21,22] basada en el tipo de crisis relacionadas, las características en el electroencefalograma (EEG), la etiología y la edad de manifestación. Sin embargo,

existía entonces gran variabilidad entre los criterios que cada neurólogo utilizaba para definir cada una de las variables, por lo que se hizo necesario redefinirlas: en 1981 se propuso clasificar las crisis epilépticas como focales (parciales) o generalizadas [23]. Se subdividió a las crisis focales como simples, aquellas que no comprometían el estado de conciencia, o complejas, aquellas en que sí había compromiso. Se propuso que las crisis focales podían tener generalización secundaria y que algunos tipos de crisis no podían ser clasificadas. Esta clasificación fue complementada en el año de 1985 [24] con la publicación de la *Propuesta de Clasificación de Epilepsias y Síndromes Epilépticos*. En 1989 la comisión de terminología de la ILAE introdujo los términos idiopático, criptogénico y sintomático para orientar el diagnóstico y facilitar el manejo de las epilepsias [25].

En la década de los 90's se hicieron varios intentos para mejorar la clasificación de las epilepsias, iniciando con el de Lüders *et al.* [26]. En el año de 1997, la ILAE crea un Grupo Central (Task Force – Core Group) en su comisión de terminología, encargado de la revisión de la clasificación de 1981 aún vigente y la propuesta de una nueva clasificación para las epilepsias y los síndromes epilépticos. Se creó inicialmente el enfoque para la clasificación de acuerdo con 5 ejes principales [10]: El eje 1 hace referencia a la descripción detallada de las crisis epilépticas; el eje 2 hace referencia al tipo de crisis según la localización cerebral por EEG y neuroimágenes; el eje 3 en el que se establece el diagnóstico a partir de la lista de síndromes previamente aceptados como epileptogénicos; el eje 4 que hace referencia a la etiología de las crisis; el eje 5, que define el compromiso del paciente

y revisa su calidad de vida. A partir de él, se propuso en 2010 una serie de modificaciones para la clasificación vigente [27,28] (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de las epilepsias - 2010 (ILAE).

Clasificación de las epilepsias				
Primarias			Secundarias	
<i>Metabólicas / Estructurales</i>	<i>Genéticas</i>	<i>De causa desconocida</i>	<i>Seculares</i>	<i>Enfermedades</i>
Simples Focales Generalizadas Complejas Focales Generalizadas			Focales	Focales Generalizadas

La nueva clasificación redefine la crisis generalizada: *“aquella que se origina en algún punto dentro de las redes neuronales distribuidas bilateralmente y se difunde rápidamente”*, en estructuras corticales y subcorticales y que pueden no afectar a la totalidad de la corteza cerebral [29]. Así, las crisis focales serían todas aquellas que pueden originarse en la zona cortical o subcortical *“dentro de las redes neuronales limitadas a un hemisferio cerebral”* [29]. También elimina los tres subtipos etiológicos propuestos y los sustituye por [27]:

- Epilepsias genéticas, causadas por un defecto genético identificable, es decir, asociadas a un síndrome o enfermedad en el que las crisis constituyen el síntoma cardinal.

- Epilepsias de causa estructural o metabólica cuando hay un trastorno estructural o metabólico definido que se ha asociado con el aumento del riesgo de presentar crisis convulsivas recurrentes.
- Epilepsias de causa desconocida.

Adicionalmente, la Comisión de Clasificación y Terminología de la ILAE propone como nuevo criterio de clasificación al grado de especificidad para asociarse a un síndrome [27,30]:

- Los síndromes electroclínicos son el tipo de epilepsias con mayor especificidad sindrómica, es decir, aquellos que por sus características clínicas, signos y síntomas definen fácilmente un síndrome distintivo.
- Las constelaciones son los síndromes epilépticos que siguen en especificidad, que pueden asociarse a lesiones específicas u otras causas que los hacen reconocibles.
- Las epilepsias de causa estructural o metabólica que no tienen un patrón electroclínico característico serían el siguiente grupo.
- Las epilepsias de causa desconocida tendrían la menor especificidad sindrómica. Según la comisión de terminología de la ILAE, en este grupo 'poco específico' se incluye más de la tercera parte de todas las epilepsias.

Al revisar cuidadosamente el documento publicado en 2010 por la ILAE [27] no se propone realmente ninguna clasificación nueva para las epilepsias: la comisión de

terminología de la ILAE parece considerar que la organización de los síndromes epilépticos no debe ser rígida sino flexible, “*para reflejar que comprendemos la complejidad de la neurobiología*” y recomienda organizar los distintos tipos de epilepsia según los criterios útiles para cada paciente y cada escenario. Sin embargo, hay que reconocer el esfuerzo de los miembros de la comisión de terminología de la ILAE por mantener el interés por las epilepsias. Este documento ha recibido fuertes críticas, quizás más que las primeras clasificaciones y sus dicotomías, siendo para algunos autores [28,31,32,33] nada más que un reporte del trabajo de varios años de la comisión de terminología, pero que no puede ser utilizado como guía real en la práctica clínica de manera comprehensiva ni universal.

Recientemente, al inicio del año 2016, la ILAE presentó una clasificación operacional nueva (revisada) de las epilepsias y algunos términos que se utilizan para definirlos. Las modificaciones en esta nueva clasificación incluyen la petición de hacer uniforme en el lenguaje médico que el término ‘parcial’ se cambie por ‘focal’, que se reconozca cómo clasificar una crisis epiléptica que no fue presenciada, que se eliminen términos de confusión como eran ‘discognitivo’, ‘parcial simple o compleja’, ‘secundariamente generalizada’, entre otros, y reconocer como tipos de epilepsia a las crisis focales tónicas, clónicas, atónicas, mioclónicas y a los espasmos epilépticos (espasmos infantiles), a la luz del nuevo conocimiento clínico y la evidencia científica [1].

Tratamiento

Los Fármacos Antiepilépticos (FAE) constituyen el manejo inicial para la mayoría de pacientes con epilepsia [34,35].

Los FAE *clásicos* o *tradicionales* presentan algunos problemas en la práctica, pues hasta hace unos 30 años no era bien entendido su metabolismo e interacciones y frecuentemente presentaban efectos adversos que disminuían tanto la adherencia como la tolerabilidad de los pacientes hacia el fármaco [35]. A partir de 1990 empiezan a incluirse, como FAE *nuevos*, drogas con menores efectos adversos reportados, con mejor tolerabilidad, mayor adherencia de los pacientes a los tratamientos, más estudiados, con rutas metabólicas menos complejas, pero con una eficacia similar a la de los FAE clásicos [34,35].

El término 'Epilepsia Refractaria' hace referencia, en general, a crisis convulsivas recurrentes no controlables con la medicación antiepiléptica. Su definición precisa ha sido controvertida [36,37,38] y diferentes sociedades médico-científicas han propuesto cambios en el diagnóstico de farmacorresistencia acordes con los nuevos conocimientos y FAE disponibles.

Epilepsia Refractaria

Desde cualquier punto de vista, es importantísimo empezar a definir la refractariedad como un concepto dinámico: cuando calificamos a un paciente como farmacorresistente, asumimos que será improbable controlar sus crisis con nuevos cambios de medicación y habrá que buscar otras opciones, a las que el paciente podría o no responder de manera adecuada; adicionalmente, se puede responder muy bien al inicio de un tratamiento farmacológico novedoso, pero expresar fenotipos de refractariedad a medida que transcurre el tiempo [39]. El diagnóstico de refractariedad es además observador dependiente: no todos los neurólogos utilizan los mismos criterios para su definición, a pesar de los múltiples intentos de diferentes sociedades científicas por unificarlos.

La ILAE propone cuatro criterios básicos para enfocar el diagnóstico [27]:

- a. Que con certeza el paciente sufra de epilepsia, excluyendo episodios paroxísticos de otra naturaleza (por ejemplo, los espasmos del sollozo en edades muy tempranas o episodios sincopales de etiología a determinar en pacientes mayores).
- b. El número de FAE fallidos. Si a un paciente con epilepsia se han prescrito dos esquemas antiepilépticos diferentes (monoterapias o combinaciones de FAE) de forma consecutiva y aún no logra el control de las

crisis, es de esperar que los cambios posteriores tengan una muy baja probabilidad de éxito [34]. Lo anterior responde a la descripción clásica que dice que aproximadamente un 40% de los pacientes se controlarán con la prescripción de un solo FAE, un 11% adicional necesitarán el cambio por un segundo esquema, y solo un 5% más podría lograr el cese de las crisis con la adición de un tercer FAE o la combinación de dos esquemas [39].

c. La frecuencia de presentación de las crisis, que se refiere no solo al número de crisis en un período de tiempo determinado, sino al impacto de esas crisis en la calidad de vida del paciente.

d. La duración de las crisis, el criterio más difícil de establecer y unificar en su uso. ¿Cuánto tiempo debemos esperar para considerar como refractario a un paciente con crisis no controladas, si la respuesta al tratamiento es dinámica? Hay que tener en cuenta que la refractariedad puede tener un curso de recurrencia/remisión/recurrencia/remisión o no modificarse con el tiempo ni la medicación.

En general, la ILAE define la ER como aquella en la que se ha producido el fallo del tratamiento con dos esquemas antiepilépticos (bien en monoterapia o en combinación) indicados según el tipo de epilepsia y adecuadamente tolerados como para esperar que se debería alcanzar una remisión mantenida [27].

La ILAE considera que un paciente está respondiendo al manejo cuando lleva controlado al menos tres veces el periodo de tiempo más largo que ha estado sin crisis en el último año antes de la nueva intervención o durante 12 meses (cualquiera que sea el período más prolongado) [34]. Para entender mejor la definición anterior: Si un paciente tiene una crisis cada 8 meses, tendría que permanecer al menos 2 años sin crisis para considerar que está respondiendo al nuevo tratamiento. Por otra parte, un paciente que tiene una crisis semanal debería estar al menos 12 meses sin crisis para considerar que ha respondido a la nueva intervención, dado que este es 'el período de tiempo más largo' según el criterio mencionado previamente. Si en los casos anteriores se llegara a presentar recurrencia de las crisis antes de cumplir el tiempo establecido, se consideraría falla del tratamiento. Aquellos pacientes que no puedan clasificarse de acuerdo con alguno de los criterios (frecuencia, duración o número de FAE fallidos) caben en los términos 'indefinido' e 'indeterminado', a la espera de que cumplan o no los criterios y se modifique su diagnóstico [27].

Estudios han sugerido que factores neurobiológicos propios de un individuo pueden estar relacionados con la severidad del cuadro epiléptico y la respuesta a FAE [40,41]: Neuroinflamación, aumento constitutivo de la transmisión sináptica excitatoria, cambios en la inhibición por ciertos neurotransmisores, muerte celular neuronal por diferentes causas, y patrones aberrantes de inervación dependientes de un crecimiento axonal anormal (Figura 1). Todos ellos se creen directa o indirectamente influenciados por genes cuyo patrón de expresión es muy

característico en el tejido epiléptico farmacoresistente, diferente al patrón en otras patologías cerebrales, por ejemplo en tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer [42]. La expresión de dichos genes puede verse alterada por diferentes mecanismos, y se ha descrito que la variación en el número de copias de la región del genoma que los contiene o polimorfismos de riesgo o severidad parecen tener una gran carga de patogenicidad, y si tenemos en cuenta que muchas formas de epilepsia tienen una arquitectura genética susceptible de estudio [43,44], se podría concluir que alteraciones en uno o varios genes podrían relacionarse con el mecanismo causante no solo de las crisis convulsivas sino de fenotipos como la refractariedad a FAE. Entender todos estos mecanismos que pueden llevar a epileptogénesis o a resistencia a medicamentos crea oportunidades para descubrir y desarrollar nuevos blancos terapéuticos más eficientes.

Epilepsia Refractaria en niños

La epilepsia en América Latina tiene una distribución bimodal, siendo mayor en las dos primeras décadas de la vida y luego a partir de la sexta década [45]. A pesar de que en estos pacientes la mortalidad es hasta 2 veces mayor que en la población general, los niños en quienes se inician manejos tempranos y adecuados tienen buen pronóstico y, al igual que en los adultos, entre un 65 a 70% de ellos logran el control de las crisis después de al menos un año de tratamiento antiepiléptico con monoterapia, quedando un 30 a 35% que desarrolla ER y puede requerir cirugía [45]. En Colombia el comportamiento de la refractariedad en niños es similar a lo reportado en la literatura internacional, según los datos epidemiológicos

proporcionados por el estudio epidemiológico neurológico nacional EPINEURO y la Liga Central contra la Epilepsia [6,8].

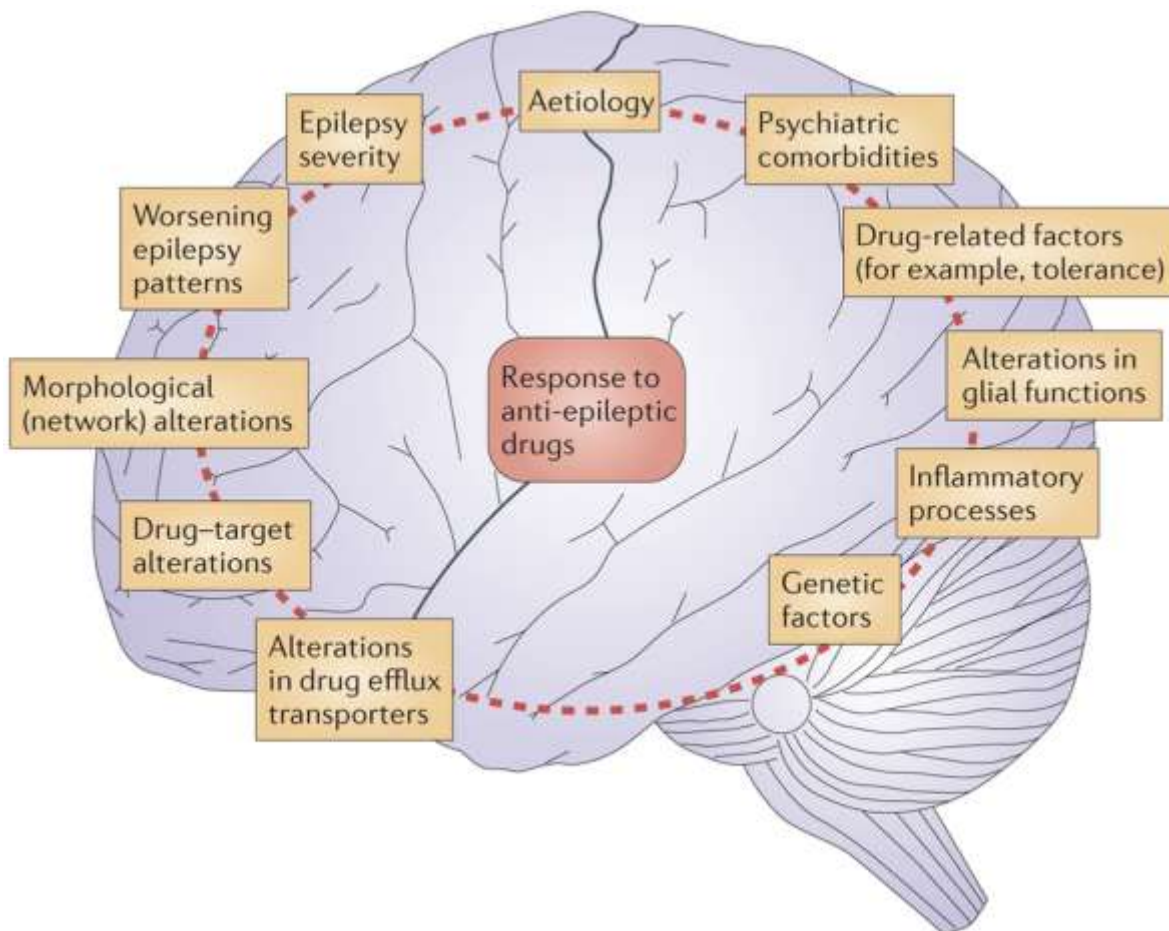


Figura 1. Mecanismos presuntamente involucrados en la respuesta a fármacos en epilepsias.

* Tomada de Löscher W. *et al.* [215].

Trastornos genómicos

Las enfermedades genéticas que reconocemos tradicionalmente son las monogénicas o mendelianas, las cromosomopatías, las enfermedades mitocondriales, o bien las patologías de etiología multifactorial. Recientemente, el advenimiento de técnicas de biología molecular de última generación ha permitido encontrar variación genómica relacionada con enfermedad, fuera de los mecanismos causales descritos y que no coinciden específicamente con los patrones de herencia clásicos [46].

A finales de la década de los 90' se acuñó el término de 'Trastorno Genómico' para definir los fenotipos no causados por mutaciones puntuales sino por rearrreglos cromosómicos o de fragmentos más pequeños de DNA que resultaban en inestabilidad de la arquitectura genómica [47].

En efecto, la variación estructural puede producir CNV implicadas en enfermedades de herencia mendeliana e incluso de herencia compleja como son la obesidad y algunos trastornos neurobiológicos, y en enfermedades de aparición esporádica [48]. El fenotipo dependerá del tipo de rearrreglo y los genes comprometidos, por diferentes mecanismos como son efectos de dosis génica, disrupción génica, alteraciones espaciales no toleradas (*hairpins*, estructuras cruciformes), o por desenmascaramiento de regiones de homocigosidad o alelos recesivos [49].

Los rearrreglos causales de trastornos genómicos surgen predominantemente durante

eventos de recombinación no alélica entre cromosomas homólogos (NAHR), aunque otros mecanismos moleculares también han sido descritos [46]. Actualmente, los trastornos genómicos y los eventos NAHR se consideran una de las principales causas de múltiples enfermedades humanas [46,50], puesto que se ha descrito incluso que varios trastornos mendelianos se originan en rearrreglos cromosómicos.

Microarreglos para el estudio de Trastornos Genómicos

En 1923 se consiguió por primera vez observar simultáneamente todos los cromosomas de un núcleo celular humano. Pero fue hasta 1956 que la revista *Hereditas* publicaba que investigadores habían demostrado que la dotación genética humana es de 46 cromosomas [51]. Desde entonces, la práctica de la citogenética ha sido testigo de numerosas innovaciones: técnicas de bandeo cromosómico, hibridación in situ fluorescente (FISH), el cariotipo espectral (SKY), y la hibridación genómica comparativa (CGH), ahora realizada por medio de tecnología de microarreglos (aCGH) y acoplada recientemente al análisis de variantes de nucleótido único (SNV) y polimorfismos de nucleótido único (SNP) para configurar el aCGH/SNP.

El aCGH/SNP se trata de un método que ofrece un análisis genómico completo a una mucha mayor resolución, que permite identificar regiones del genoma con ganancia y pérdida de material genético (deleciones, duplicaciones, variaciones en el número de copias de cromosomas completos o regiones específicas) que pueden estar asociadas con múltiples enfermedades tanto en pacientes pediátricos como adultos, e información específica sobre

SNV/SNP con muy buen cubrimiento.

Para procesar un aCGH/SNP primero se extrae el DNA genómico del paciente de interés, que posteriormente será marcado y mezclado en un chip de microarreglos con muestras de referencia (controles) como complementos cromosómicos diploides o muestras para pareamiento de sexo, y con las sondas propias del microarreglo que se hibridarán con las regiones específicas del genoma completo con las que tienen complementariedad, con una alta densidad, para identificar ganancias o pérdidas tan pequeñas como de entre 5 a 10 Kb en las regiones *target* (las de mayor interés o los conocidos *Hot Spots*) y de 300 a 500 Kb en otras áreas del genoma, en los arreglos tradicionales. Los resultados son analizados mediante la comparación de diferentes intensidad de fluorescencia que se emiten tras la hibridación del DNA del paciente y las sondas Vs. los especímenes de referencia y las sondas, mediante *softwares* específicos y tratamientos bioinformáticos que permiten, tras analizar a la luz de lo reportado en regiones variables pertenecientes a la población general, determinar las aberraciones numéricas que son significantes. Es frecuente que, tanto para diagnóstico como para investigación, cualquier cambio clínicamente relevante en el número de copias de una región de DNA sea además confirmado a través de otro método (por ejemplo FISH), o que se analicen muestras de DNA de los padres del paciente para definir si un cambio es heredado o *de novo* y facilitar su significado, es decir, el análisis de su posible patogenicidad [52].

Los primeros chips para microarreglos utilizaban una tecnología conocida como 'printing', en la que las sondas eran suavemente colocadas en una placa de vidrio. La síntesis *in situ*

permitía que los oligonucleótidos se ensamblaran uno a uno, base por base, en la superficie del chip. Sin embargo, las sondas que se podían construir de esta forma permitían coberturas de fragmentos genómicos cortos, de entre 20 y 50 kb, por lo que rápidamente estos métodos se reemplazaron por microarreglos de mayor densidad. Inicialmente, los *Bead Arrays* constaban de una placa en cuyos pozos se localizaban de forma aleatoria múltiples copias de los mismos tipos de sondas sobre matrices en forma de perla (microesferas), y de allí su nombre. Utilizando fibra óptica y tecnología de rápida lectura de señal se logró optimizar la construcción y el posterior análisis informático de los chips [53]. Los microarreglos con tecnología *bead* son muy populares para genotipificación y secuenciación de DNA [52].

También se encuentran disponibles en el mercado microarreglos electrónicos que se utilizan hasta ahora para análisis de expresión, bien sea transcriptómica o proteómica. Cada chip de microarreglo se compone en este caso por aproximadamente 100 sitios de microelectrodo en donde el volumen de muestra será distribuido valiéndose de las propiedades eléctricas de los fragmentos de ácido nucleico o proteínas que permiten, con el soporte de procesos químicos, la hibridación de las regiones *target* con las sondas complementarias (solo ocurre hibridación en los sitios eléctricamente activos) [52,53].

Un método de tecnologías intermedias entre los anteriormente mencionados es el microarreglo de suspensión, en el que en microesferas en solución se realiza la captura de los fragmentos de interés en el DNA de la muestra por hibridación directa y competitiva [54]. Decimos que es intermedia a las anteriores porque su matriz de silicona tiene una cubierta adicional metálica que actúa como electrodo primario, y que en asociación con un segundo

electrodo hecho a partir de fibra de vidrio y óxido de indio (ITO) crea una corriente eléctrica a través de la placa, para permitir la difusión de la muestra por electroforesis. Se utiliza primordialmente para detección de polimorfismos en sistemas multiplex a partir de anticuerpos, por marcaje con diferentes fluorocromos (658 a 712 nm de emisión de luz infraroja) que en distintas concentraciones demostrarán firmas espectrales propias [54].

En general, el estudio de aCGH de baja/mediana resolución es utilizado como un screening primario a fin de permitir diagnosticar personas con rasgos dismórficos inexplicados, defectos del nacimiento, retrasos mentales y del desarrollo inexplicados, anomalías múltiples congénitas, autismo o presencia de un desbalance genómico. Puede ser en otros casos complementario o reemplazo de un examen de FISH, o confirmatorio en casos de encontrar desbalances numéricos o estructurales en cariotipos en los que se desea establecer la carga genética [52,54,55].

Diagnóstico molecular en epilepsia y otras enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurológicas, particularmente las neurodegenerativas y aquellas de herencia compleja, han representado siempre un reto diagnóstico a nivel molecular, considerando que, por ejemplo, hasta un 40% de todas las epilepsias se estiman de origen genético.

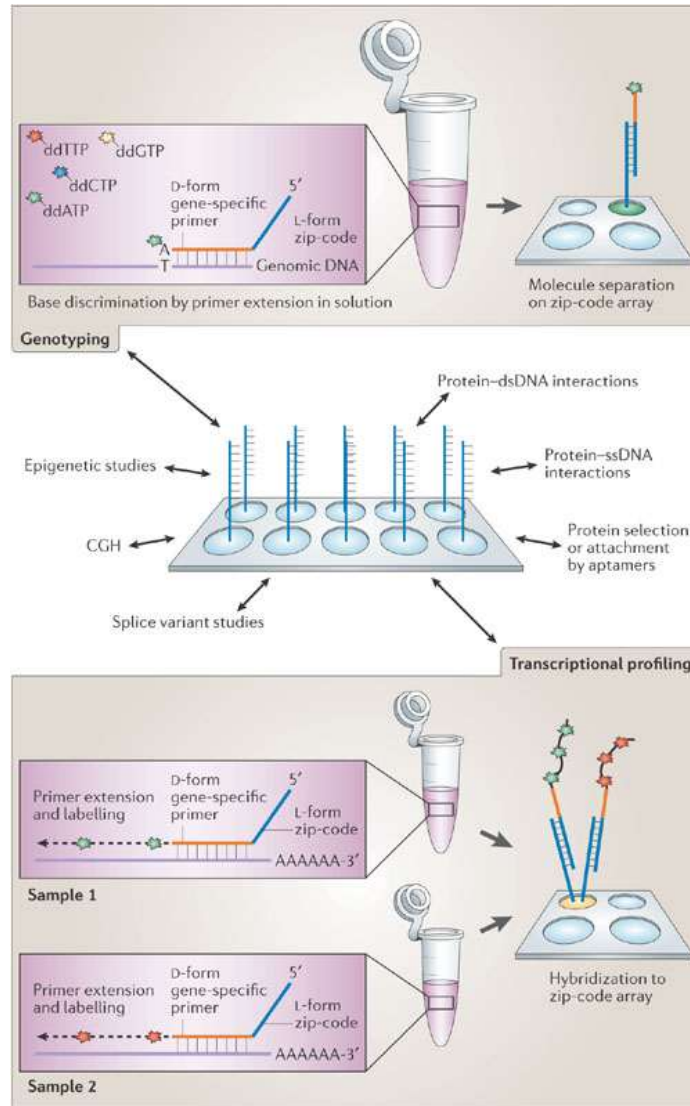


Figura 2. Esquema del procedimiento general que sigue un experimento de microarreglos.

En el centro, se observa una placa (Chip) que contiene diferentes sondas oligonucleotídicas sintéticas que van a permitir la hibridación del ácido nucleico extraído y preparado a partir de la muestra probando. Este chip puede tener una matriz sólida o de solución homogénea en la que ocurrirán las reacciones de hibridación, los posteriores lavados, la emisión de fluorescencias, y que según el diseño del experimento permitirá que diferentes tipos de análisis o análisis de múltiples muestras sean llevados a cabo de forma simultánea. En esta gráfica, se mencionan alrededor del esquema de la placa las aplicaciones más importantes de este tipo de experimentos. En el panel superior e inferior se deja ver con poco detalle los dos más grandes tipos de microarreglos: Genotipificación (panel superior) y Expresión (panel inferior).

* Tomada y modificada de Hoheisel JD. [55].

Entre los años 2010 a 2014 diferentes investigadores han empleado plataformas de aCGH/SNP (Affimetrix, Illumina, Nimblegen, Roche) para la colección de datos genómicos y el análisis posterior, y han encontrado alteraciones genómicas aberrantes (Variantes en el número de copias – CNV, Polimorfismos de nucleótido único - SNP), los cuales pueden tener un papel relevante para el entendimiento fenotipo-patológico de la enfermedad, sin embargo, ninguno de estos estudios ha sido realizado en iberoamerica y ninguno de ellos se ha planeado en poblacion pediátrica.

Desde la introducción del FISH se pudieron detectar anomalías subteloméricas hasta en el 5% de los pacientes con retardo mental (RM) 'idiopático' y alguna malformación, y ahora con el uso de aCGH/SNP se detectan estas anomalías al menos en un 10% de los pacientes con RM *sin* ninguna malformación, lo que significa que en efecto se ha ampliado el horizonte del diagnóstico etiológico con esta tecnología [56].

Cooper *et al.* compararon los resultados de estudios de aCGH/SNP en 15.767 niños con alteraciones intelectuales (incluido autismo y epilepsia) y defectos congénitos Vs. 8.329 adultos sanos, encontrando que regiones genómicas de hasta 400 Kb difieren entre ellos de forma estadísticamente significativa, lo que representa un riesgo de más de 20 veces en los pacientes de padecer RM [57]. Ahora, el aCGH/SNP ofrece una gran ventaja que consiste en que puede realizarse a padres e hijos simultáneamente, con el fin de saber de forma más ágil si la entidad se hereda.

De acuerdo a las recomendaciones del *Colegio Americano de Genética Médica (ACMG)*, en su publicación *Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities*, el estudio personalizado de aCGH/SNP se recomienda para [56,58]:

- Pacientes con múltiples anomalías que no sugieran un síndrome genético específico.
- Autismo.
- Paciente con retraso en el crecimiento, del lenguaje después de realizar otras técnicas como el FISH.
- Enfermedades complejas en que se sospeche trastorno genómico como causa.

Sin embargo, no todas las características de la técnica de microarreglos garantizan un diagnóstico de certeza, es decir que como toda prueba diagnóstica está sujeta a errores de sobre y subestimación, por lo que sus resultados se deben analizar con reserva [56,58].

Figura 3. Recomendaciones actuales para el estudio genético en epilepsias. El estudio de

pacientes con epilepsia a partir de aCGH se ha recomendado en casos en que se sospecha un trastorno genómico de base, en individuos que además tienen como comorbilidad otros fenotipos neurológicos como RM, rasgos autistas u otros trastornos del comportamiento, o en pacientes con dismorfismo.

* Tabla tomada sin modificación del texto de Berkovic S. *et al.* [59].

Table 1 Genetic testing in patients with epilepsy			
Genetic test	Detects	Indication	Consequence
Current relevance			
CGH array ^{42,43}	Copy number variation	Epilepsies with (comorbid) intellectual disability, autism or dysmorphic features	Counselling
Karyotyping ^{112,113}	Large-scale chromosomal abnormality	Suspected ring chromosome 20	Diagnosis
Gene panel ^{49,65}	Known mutations in (typically) 20–25 genes	Epileptic encephalopathies	Diagnosis
HLA typing ¹⁰⁹	Risk allele associated with hypersensitivity to carbamazepine	Probable Han Chinese or South Asian ethnic origin	AED choice
SCN1A ^{54,55}	Mutations in sodium channel type 1α	Dravet syndrome	Diagnosis AED choice
SLC2A1 ^{103–106}	Mutations in GLUT1	GLUT1 encephalopathy Early-onset childhood absence epilepsy Paroxysmal exertional dyskinesia	Ketogenic diet Diagnosis
PCDH19 ^{61,92}	Mutations in protocadherin 19	Female patients with clustered focal seizures (onset under 3 years of age) and often with intellectual disability	Counselling
Probable future relevance			
GRIN2A ^{73–75}	Mutations in NMDA receptor subunit ε1	Landau–Kleffner syndrome Epilepsy–aphasia spectrum disorders	Counselling
DEPDC5 ^{69,70}	Mutations in DEP domain-containing 5	Familial focal epilepsy with variable foci Most common mutation in focal epilepsy	Counselling
KCNT1 ^{76,77}	Mutations in potassium channel, subfamily T, member 1	Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy Epilepsy in infancy with migrating focal seizures	Counselling
Seven widely available genetic tests have important management consequences that every neurologist should know about, and another three are likely to become of clinical importance soon. Abbreviations: AED, antiepileptic drug; CGH, comparative genomic hybridization; GLUT1, glucose transporter protein type 1; HLA, human leukocyte antigen; NMDA, N-methyl-D-aspartate receptor.			

3. Planteamiento del problema

En Colombia, el comportamiento epidemiológico de la epilepsia es semejante al presentado en países en vía de desarrollo (11.3 afectados por cada 1000 habitantes) pero mayor al observado en países industrializados [7]. Se estima que aproximadamente el 40% del total de afectados continua padeciendo crisis a pesar de un tratamiento farmacológico dirigido al tipo de epilepsia que padezca el paciente y elegido según las directrices de las guías de manejo nacionales e internacionales, lo que incrementa los gastos públicos relacionados con el control de la enfermedad dados por el aumento en los costos de medicación por paciente (más medicamentos para controlar las crisis representan un mayor costo), la discapacidad en términos de ausentismo laboral o escolar según la edad del paciente, la morbilidad, e incluso la mortalidad por otras causas como el suicidio [6,7,8]. *Ad portas* de un nuevo modelo de atención en salud, se hace necesario proponer metodologías de diagnóstico y que permitan el enfoque del tratamiento farmacológico individualizado en pacientes con ER, para contribuir a la disminución de estas cargas.

Es así que diferentes estudios han sugerido que existen factores neurobiológicos propios de cada paciente pero que pueden ser comunes entre varios y que pueden estar relacionados tanto con la severidad del cuadro epiléptico como con la respuesta a FAE [40,41], como lo son fenómenos de neuroinflamación, el aumento constitutivo de la transmisión sináptica excitatoria, cambios en la inhibición por ciertos neurotransmisores, muerte celular neuronal por diferentes causas, y patrones aberrantes de inervación dependientes de un crecimiento axonal anormal. Todos estos factores neurobiológicos están directa o indirectamente

influenciados por genes que participan en vías de señalización y que tienen un patrón de expresión muy característico en el tejido epiléptico farmacoresistente, diferente al patrón que se encuentra para otras patologías cerebrales, por ejemplo en tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer [42]. La expresión de dichos genes puede verse alterada por diferentes mecanismos, pero se ha descrito ya que las aberraciones cromosómicas en regiones que los contienen, cambios en el número de copias del gen en el genoma o polimorfismos de riesgo o severidad parecen tener una gran carga de patogenicidad, y si tenemos además en cuenta que muchas formas de epilepsia tienen una arquitectura genética que es susceptible de estudio [43,44], se sugiere que las alteraciones en uno o varios genes podrían relacionarse con el mecanismo causante no solo de las crisis convulsivas sino de fenotipos de la epilepsia, como la refractariedad a medicamentos. Para evaluar dichas alteraciones genómicas contamos actualmente con un amplio arsenal de estudios moleculares que permiten, con muy buena resolución y elevadas tasas de sensibilidad y especificidad, detectar aberraciones cromosómicas que no son visibles a la citogenética convencional, esto es principalmente microdeleciones y microduplicaciones en genes o regiones cromosómicas, o SNVs/SNPs que pueden asociarse a diferentes eventos de enfermedad [60]. En la actualidad, la tecnología más utilizada para el estudio de variación en el número de copias génicas y otro tipo de anomalías submicroscópicas es el estudio de microarreglos, similares a los chips de computador, que permiten el análisis simultáneo de varias regiones de un genoma, con lo cual se acortan los tiempos de respuesta y los costos que implica el análisis no de uno sino varias secuencias del DNA [61]. También promisorio es el uso de las técnicas de Secuenciación de Siguiete Generación (NGS) para el diagnóstico más acertado de la etiología de la epilepsia, más que para el estudio de sus

fenotipos propios. Cabe anotar que tanto los microarreglos como las técnicas de secuenciación de siguiente generación se han vuelto cada vez más asequibles por la baja en los precios en el mercado y su uso masivo para diagnóstico e investigación.

Dicho todo lo anterior, surge en el grupo de investigación el siguiente interrogante: ¿Es posible proponer a los microarreglos, aCGH o aCGH/SNP, como estudios de primera línea para detectar rearrreglos genómicos y SNPs relacionados con epileptogénesis en los pacientes que padecen fenotipos de mayor severidad y, en etapas posteriores, evaluar el papel de esos rearrreglos encontrados en farmacoresistencia mediante la proposición de redes de interacción génica, que permitan a futuro explicar mejor por qué un paciente responde bien o mal a determinado tratamiento, y dirigir un manejo farmacológico individualizado según sus características genéticas, como se hace en la actualidad para otras patologías como diferentes tipos de cáncer?.

4. Justificación

Ni en Colombia ni en Latinoamérica se cuenta con datos genómicos relacionados con epilepsia y sus fenotipos de severidad. De hecho, es limitada también la evidencia de caracterización clínica de las subpoblaciones con ER en los países hispanohablantes. Es allí donde cobra importancia ampliar el estudio clínico y molecular en nuestra población, pues conocerla nos permitirá sin duda ofrecerle mejores opciones de diagnóstico, tratamiento, seguimiento y asesoramiento del pronóstico.

Dado el auge de la tecnología de microarreglos como método de tamización genómica, la relativa baja en sus costos en los últimos años propiciada por el aumento en su uso, y la necesidad de explorar los perfiles genéticos de la epilepsia y la farmacorresistencia en nuestro medio, se considera interesante plantear a esta metodología como el piloto para la aproximación diagnóstica – y en el futuro terapéutica – de los pacientes a estudio. La metodología de análisis de datos por microarreglos más utilizada es hasta ahora el microarreglo de expresión, que analiza parte de o todo el transcriptoma de un organismo. Sin embargo, en este estudio utilizaremos al aCGH/SNP puesto que permite detectar específicamente a los trastornos genómicos de los que existe ya evidencia de posible patogenicidad relacionada con fenotipos epileptiformes: deleciones, duplicaciones, microdeleciones, microduplicaciones, y como *plus* la identificación de SNV/SNP y pérdidas de heterocigosidad (LOH).

El trabajo de McMahon *et al.* es el primero identificado en la literatura científica en proponer al aCGH como método para la detección de trastornos genómicos asociados a ER [62], describiendo en 2 de 20 pacientes analizados rearrreglos cromosómicos posiblemente asociados con este padecimiento. Posteriormente aparecer un par de artículos más en la literatura que no solo evalúan pacientes con ER sino con otros fenotipos neurológicos [63,64], y hacia 2012 nuevamente un grupo de investigación utiliza a los aCGH para el estudio diagnóstico de pacientes con ER [65]. En varios de estos estudios pudimos identificar vacíos metodológicos entre los que cuenta una 'deficiencia' en la especificidad para selección o exclusión de los pacientes a estudiar, y con esta propuesta esperamos superar esas dificultades para mejorar el alcance diagnóstico de las técnicas moleculares que se pretenden aplicar.

Al finalizar este trabajo, tendremos una descripción genética de una muestra poblacional con ER que nos permitirá analizar el papel potencial de los rearrreglos genómicos y los SNPs detectados en el fenotipo de farmacoresistencia, a partir de la proposición de redes de interacción génica, con el fin de optar por mejorar los perfiles de diagnóstico y tratamiento de nuestros pacientes.

5. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Detectar y analizar la presencia de rearrreglos genómicos en un grupo de pacientes con ER provenientes de la consulta de neuropediatría de tres centros de referencia (Hospital de la Misericordia, Hospital Militar Central e Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia) a partir de una metodología basada en aCGH/SNP.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Detectar, por medio de aCGH/SNP, la presencia de rearrreglos genómicos en pacientes Colombianos con ER.
- II. Determinar la frecuencia de CNV en el grupo de pacientes en estudio.
- III. Determinar la frecuencia de SNP incluidos en la plataforma de aCGH/SNP en el grupo de pacientes en estudio.
- IV. Describir el cuadro clínico de los pacientes en los que se encuentran los rearrreglos genómicos y compararlos con cuadros reportados en la literatura.
- V. Establecer el origen de los rearrreglos genómicos como *de novo* o hereditarios.
- VI. Analizar el papel potencial de los rearrreglos genómicos y los SNPs encontrados en el fenotipo de Farmacorresistencia mediante la proposición de redes de interacción génica.

6. Metodología

Diseño del estudio y tamaño muestral

Tipo y diseño general del estudio:

Se realizó un estudio descriptivo y analítico de corte transversal.

Población Objetivo:

Pacientes pediátricos con diagnóstico de ER de acuerdo con los criterios de la ILAE.

Población Fuente:

Pacientes atendidos por los servicios de Neuropediatría, Pediatría y Genética del Hospital de la Misericordia, el Hospital Militar Central, y el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, con diagnóstico ER de acuerdo con los criterios de la ILAE que cumplan los criterios de inclusión mencionados adelante.

Población Elegible:

Pacientes atendidos por los servicios de Neuropediatría, Pediatría y Genética del Hospital de la Misericordia, el Hospital Militar Central, y el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, con diagnóstico ER de acuerdo con los criterios de la ILAE que cumplan los criterios de inclusión mencionados adelante, y que deseen participar del estudio de investigación, previa firma de consentimiento informado.

Selección y tamaño de muestra:

El tamaño muestral se eligió de forma no probabilística por conveniencia, según la cantidad de pacientes que durante el tiempo contemplado en el estudio fueron valorados en los servicios involucrados, cumplieron con los criterios de inclusión, exclusión, y firmaron consentimiento informado y asentimiento de participación.

Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión de casos

Paciente farmacorresistente

- Paciente con diagnóstico de epilepsia confirmada clínicamente por video telemetría y / o EEG.
- Paciente con una o más crisis por mes a pesar de haber recibido adecuadamente y con dosis plena diaria 2 o más FAE de primera línea para el tipo de epilepsia o síndrome epiléptico.
- Falta de eficacia de dos FAE en monoterapia y/o una combinación de ellos (politerapia), pese a recibir una dosis terapéutica y cumpliendo las indicaciones de manejo.
- Pacientes que fueron sometidos a cirugía de epilepsia no lesional, que cumplieron previamente criterios de refractariedad.
- Pacientes con epilepsia farmacorresistente entre los 2 y 16 años de edad.
- Diagnóstico de epilepsia no estructural ni metabólica.
- RNM cerebral normal o con hallazgos que no expliquen el fenotipo epiléptico.
- Disponibilidad de ambos progenitores en caso de requerirse estudio genético a ellos.

Exclusión de casos

- Pacientes inadecuadamente diagnosticados (eventos paroxísticos no epilépticos) o tratados (pseudoresistentes), es decir, con selección inapropiada del FAE para su

epilepsia o síndrome epiléptico, pobre adherencia al tratamiento o diagnóstico erróneo de epilepsia, según criterio de neuropediatría.

- Paciente con alta sospecha / confirmación de diagnóstico de error innato del metabolismo (por ejemplo aminoacidopatías, leucodistrofias, enfermedades de depósito lisosomal, acidemias orgánicas, defectos de la vía de la beta oxidación), según criterio de neuropediatría y/o genética.
- Pacientes con alta sospecha / diagnóstico de enfermedad degenerativa o progresiva del sistema nervioso (por ejemplo enfermedad mitocondrial y síndromes neurocutáneos) según criterio de neuropediatría y/o genética.
- Paciente con síndrome epiléptico asociado a síndrome dismorfológico establecido (por ejemplo Síndrome de Miller Dieker).
- Pacientes con concomitancia de enfermedades crónicas como autoinmunidad, diabetes o cáncer.
- Pacientes con disgenesia cortical cerebral.
- Pacientes con antecedente / sospecha de sufrimiento fetal agudo documentado suficiente para considerar noxa hipóxica perinatal, según criterio de pediatría y/o neuropediatría.
- Antecedente de prematurez extrema o temprana.

Cabe mencionar que a partir de la población de dos estudios previos realizados por este mismo grupo de investigadores, *Evaluación del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 (MDR1) en pacientes con Epilepsia Refractaria en tres centros de referencia nacional en Colombia* y *Detection of subtelomeric rearengements due to MLPA in paediatric patients with*

refractory epilepsy in Colombia: the role of the CHL1 gene in pharmacoresistance, se reinterrogó el diagnóstico de los pacientes para determinar quiénes de ellos podrían ser incluidos en este nuevo proyecto, ya que desde ese momento (2009 – 2011) hasta ahora, era posible que muchos de ellos ya tengan diagnóstico etiológico o, dado el carácter dinámico de la refractariedad, tuvieran ya buena respuesta al tratamiento [66,67]. Nuestro grupo custodiaba los DNA de los pacientes que se decidió participarían en esta nueva investigación, luego se solicitó ante el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, el Hospital Militar Central y el Hospital de la Misericordia, el respectivo visto bueno de nuestro protocolo para analizar dichas muestras, previa aceptación de los tutores legales de los pacientes, asentimiento del paciente, y firma de consentimiento informado actualizado.

Los pacientes incluidos *de novo* en este proyecto fueron provenientes de la consulta de neuropediatría, pediatría o genética del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, el Hospital de la Misericordia o el Hospital Militar Central, en la que se les entrevistó para consecución de datos clínicos que permitieran definir si cumplían criterios para el enrolamiento en el trabajo de investigación, y una vez seleccionados en una nueva consulta se procedió a firmar el consentimiento informado, el asentimiento del paciente cuando fue necesario, y la toma de muestra de sangre de entre 3 y 5 cms por punción de vena periférica. Dichas muestras se recolectaron en tubos tapa lila para posterior transporte al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia según los protocolos establecidos por el Laboratorio No. 3 adscrito a la Maestría en Genética Humana, en donde se realizó la extracción del DNA.

FASE PREANALÍTICA

Previa firma de consentimiento informado y asentimiento (Anexo 1), se procedió a digitar la información clínica y paraclínica de cada paciente en el instrumento de recolección de información en un formato previamente diseñado y estandarizado de uso exclusivo del estudio (Anexo 2). La entrevista verbal y el examen físico estuvieron a cargo de un médico genetista, neuropediatra, pediatra, o estudiante de la Maestría en Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Una vez completado el formato, la persona responsable lo debió revisar para verificar que estaba completo y que no se consignaron datos contradictorios y luego lo entregó al coordinador del estudio. Este último hizo las posteriores revisiones de los diferentes formatos de los distintos pacientes para una vez se consideraron correctos fueran entregados a la estudiante de posgrado responsable para su entrada en la base de datos computarizada.

Todos los datos del estudio se digitaron por duplicado en dos bases de datos a fin de detectar errores de digitación que pudieran luego ser corregidos usando como referencia lo registrado en los formatos del estudio. Luego de la corrección de errores de digitación se procedió con el chequeo de consistencia interna de los datos, en el que los errores detectados fueron corregidos volviendo a las fuentes originales, es decir los formatos de recolección de información. Posteriormente, se guardaron las bases de datos resultantes en medio magnético y en línea.

Se definieron como variables clínicas a analizar las siguientes:

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES	N	(%)
DEMOGRÁFICAS			
Edad	2 a 10 años		
	10 a 18 años		
Sexo	Femenino		
	Masculino		
Edad al diagnóstico	Periodo neonatal		
	Edad pre-escolar		
	Edad escolar		
DE LA EPILEPSIA			
Tipo de epilepsia	Focal		
	Generalizada		
Frecuencia intercrisis	< 1 día		
	2 a 7 días		
	> 7 días		
No. Actual de FAE	< 2		
	3 a 5		
	> 5		
ANTECEDENTES			
Consanguinidad parental	Sí		
	No		
Hipoxia perinatal	Sí		
	No		
Retardo global del desarrollo / RM	Sí		
	No		

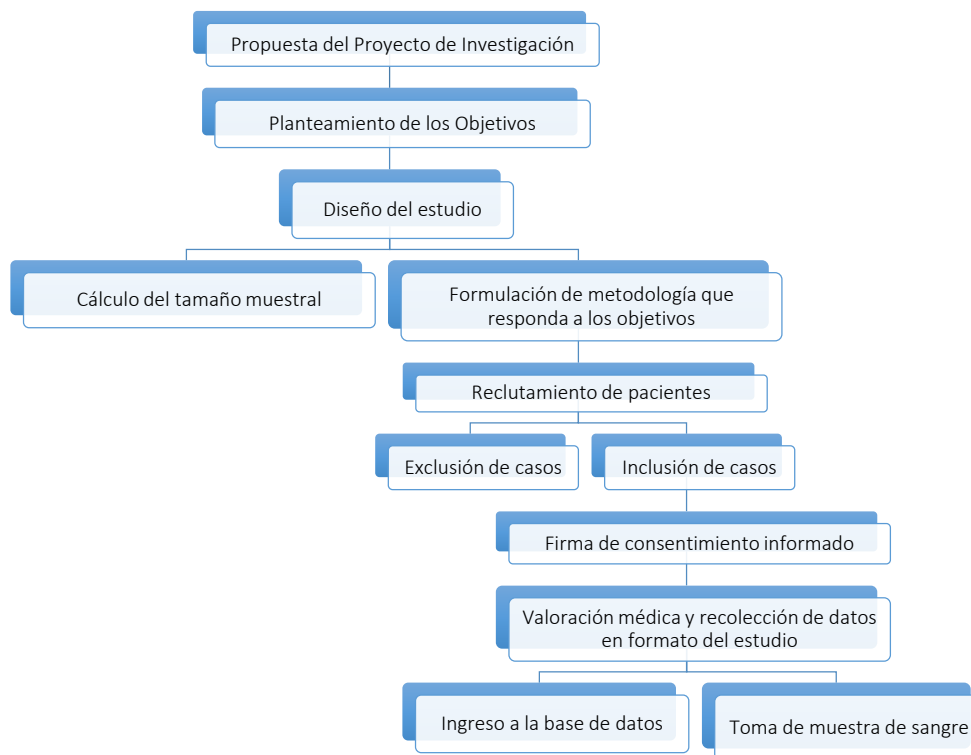
Antec. Familiar de epilepsia	Sí		
	No		
Cirugía para epilepsia	Sí		
	No		
PARACLÍNICOS			
EEG / Telemetría	Normal		
	Anormal		
RNM cerebral	Normal		
	Anormal		
Estudio metabólico	Normal		
	Anormal		
ESTUDIO MOLECULAR	Tipo de hallazgo	N	(%)
HALLAZGO			
Número de copias normal			
Número de copias anormal	Delección homocigota		
	Delección		
	Ganancia		
	Ganancia de alto número de copias		
SNP	Relacionados con fenotipo		
	No relacionados		
ORIGEN PARENTAL	N	(%)	
Herencia materna			
Herencia paterna			
<i>De novo</i>			

A continuación se describe cuál fue la caracterización de las variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	OPERATIVIDAD	NATURALEZA	ESCALA DE MEDICIÓN
Edad	Edad en años actualmente	Años	Cuantitativa	Razón
Sexo	Características de los genitales externos	1. Masculino 2. Femenino	Cualitativa	Nominal
Edad al diagnóstico	Edad en años en el momento del diagnóstico de ER	Años	Cuantitativa	Razón
Tipo de epilepsia	Tipo de epilepsia según la clasificación general de la ILAE	1. Focal 2. Generalizada	Cualitativa	Nominal
Frecuencia intercrisis	Cada cuánto presenta el paciente crisis convulsivas	< 1 día 2 a 7 días > 7 días	Cuantitativa	Discreta
No. Actual de FAE	Número de FAE que consume el paciente para intentar control de las crisis	< 2 3 a 5 > 5	Cuantitativa	Discreta
Antecedente familiar de epilepsia	Antecedente familiar en primer grado consanguinidad de Epilepsia	Si No	Cualitativa	Nominal
Consanguinidad parental	Antecedentes de Consanguinidad parental	1. Si 2. No	Cualitativa	Nominal
Hipoxia perinatal	Antecedentes de Hipoxia perinatal	1. Si 2. No	Cualitativa	Razón
Retardo global del desarrollo / RM	Retardo global del desarrollo / RM relacionado con el inicio de crisis y su mal control	1. Si 2. No	Cualitativa	Nominal
Cirugía para epilepsia	Paciente ha requerido cirugía cerebral u otra para control de crisis	1. Si 2. No	Cualitativa	Nominal
Imágenes (RNM cerebral simple)	Hallazgos descritos en la Resonancia Cerebral que se relacionen con enfermedades causales de Epilepsia	1. Normal (Sin hallazgos sugestivos de patología de base) 2. Anormal	Cualitativa	Nominal
EEG / telemetría	Hallazgos en EEG / Telemetría que confirmen epilepsia	1. Normal 2. Anormal	Cualitativa	Nominal
Estudio metabólico	Hallazgos en estudios paraclínicos adicionales (Por ejemplo en Tandem Mass para enf. Metabólicas, Gases arteriales, Lactato, Piruvato, Rel. Lactato puivato..) que se relacionen con enfermedades causales de Epilepsia	1. Normal 2. Anormal	Cualitativa	Nominal
Resultado en los microarreglos genómicos	Reporte del estudio molecular a los pacientes	1. Número de copias normal 2. Número de copias anormal: - Deleción homocigota - Deleción - Ganancia - Ganancia de alto número de copias 3. SNP: - Relacionados - No relacionados	Cualitativa	Nominal
Herencia parental	Esta variable describe si la anomalía en el paciente se encuentra De novo, o es heredada de alguno de los padres	1. Herencia Materna 2. Herencia Paterna 3. De novo	Cualitativa	Nominal

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa STATA 9.1 (<http://www.stata.com/stata-news/statanews.20.3.pdf>) o en Excel for Mac OS. V. 2011.

Figura 4. Esquema metodológico preanalítico.



FASE ANALÍTICA

Extracción de DNA de pacientes

Como se mencionó, en estudios previos de Velasco *et al.* se tomaron muestras de sangre venosa de pacientes con ER [66,67]. El DNA genómico de cada paciente extraído a partir de dichas muestras es aun custodiado por nosotros, y previa firma de consentimiento informado

de los pacientes seleccionados para este estudio se decidió utilizar ese mismo DNA para evitar al paciente un nuevo procedimiento de extracción.

Los pacientes incluidos que no formaban parte del estudio anterior se llevaron a toma programada de muestra de sangre venosa por punción según los protocolos establecidos por el Laboratorio No. 3 del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, para la posterior extracción de DNA genómico por medio del Kit QIAmp DNA Blood Mini Kit de la casa comercial Qiagen. Se confirmó la calidad del DNA almacenado o extraído por cuantificación de su concentración en un Qubit, de forma que cumpliera con los estándares requeridos para el procesamiento de los microarreglos.

Corrida de muestras en tecnología de microarreglos genómicos

Para dar cumplimiento a los primeros tres objetivos específicos, es decir, detectar la presencia de rearrreglos genómicos en los pacientes y determinar la frecuencia de estos (ya sean deleciones o duplicaciones) y de SNV / SNP, aquellas muestras de DNA con concentración mínima de 50 ng/ul en un volumen de 150 ul fueron envasadas en vial o criovial de cierre hermético y refrigeradas o congeladas hasta que fueron enviadas en atención con las normas de bioseguridad nacionales para transporte de muestras a 1) el Laboratorio Intelligene en los Estados Unidos o 2) los laboratorios de MacroGen Inc. en Corea, en los que serían procesados los microarreglos.

Análisis inicial de los datos

El método de aCGH/SNP se basa en el análisis cuantitativo que evalúa diferencias regionales de fluorescencia, a lo largo de los cromosomas, identificando regiones anormales del genoma. Cada región incluida en los microarreglos está representada por 3 o 4 clones, y es estudiada en duplicado.

Las muestras de los pacientes estudiados son procesadas para extracción de DNA y luego mezcladas con una muestra control de DNA de un individuo normal, directamente en el chip de hibridación, por lo que no se requiere de un grupo control en la investigación. La combinación de ambas muestras en cantidades equimolares es previamente marcada con fluorocromos que permiten su detección posterior. Estas muestras son luego hibridadas en el microarreglo, que contiene los clones de interés que han sido adheridos a la superficie del vidrio mediante un proceso de siliconización.

Luego de la hibridación y lavado, la detección de la señal fluorescente es efectuada por un escáner automático, el BeadXpress (Illumina), lector de microarreglos para genotipificación utilizando la tecnología GoldenGate de Illumina adaptado al sistema Veracode, que permite el análisis múltiple de mutaciones simples (SNV/SNP) y CNV de hasta 96 muestras por corrida, y que está conectado a un computador que recibe los datos de las fluorescencias y obtiene las imágenes correspondientes que puedan ser leídas y analizadas en un software específico, que para el caso de nuestra plataforma es el GenomeStudio de Illumina Corporation.

El análisis de imágenes proporciona los datos de expresión de cada fragmento genómico en cada muestra y genera una matriz de expresión, que tiene como filas a los fragmentos genómicos analizados y como columnas a las diferentes muestras en la corrida. Inicialmente, esta matriz posee los datos primarios, o *raw data*, que posteriormente van a ser normalizados y preprocesados. A esta primera etapa se le denomina análisis inicial de los datos.

Infinium® Human OmniExpress 24 v 1.2 BeadChip

La plataforma que se utilizó para la corrida de los chips es la denominada Human OmniExpress - 24 (Illumina Corporation), que contiene poco más de 715.000 marcadores aCGH y 392.197 marcadores para SNP. Se trata de un BeadArray de alta densidad, que consta de perlas de sílica de aproximadamente 3 micras que se ensamblan en micropozos en las placas del microarreglo en uno de dos sustratos: bolsillos de fibra óptica o láminas planas de sílica. Al azar localizadas, las perlas guardan entre ellas distancias aproximadas de 5.7 micras. Cada perla se cubre de cientos de miles de copias de un oligonucleótido específico que captura secuencias de ácidos nucleicos o proteínas en los ensayos. Illumina provee el software para la genotipificación a partir de los datos obtenidos de cada ensayo de microarreglos, la plataforma GenCall del Genome Studio Software. Este algoritmo hace clústers, llamadas de genotipos y asigna scores de confianza para todos los datos proporcionados en los *data sets*, y luego los normaliza.

El procedimiento de laboratorio para el experimento de montaje, reacción y lectura de los chips del microarreglo siguió en general los siguientes pasos:

Figura 5. Esquema técnico para la ejecución del Microarreglo Genómico.

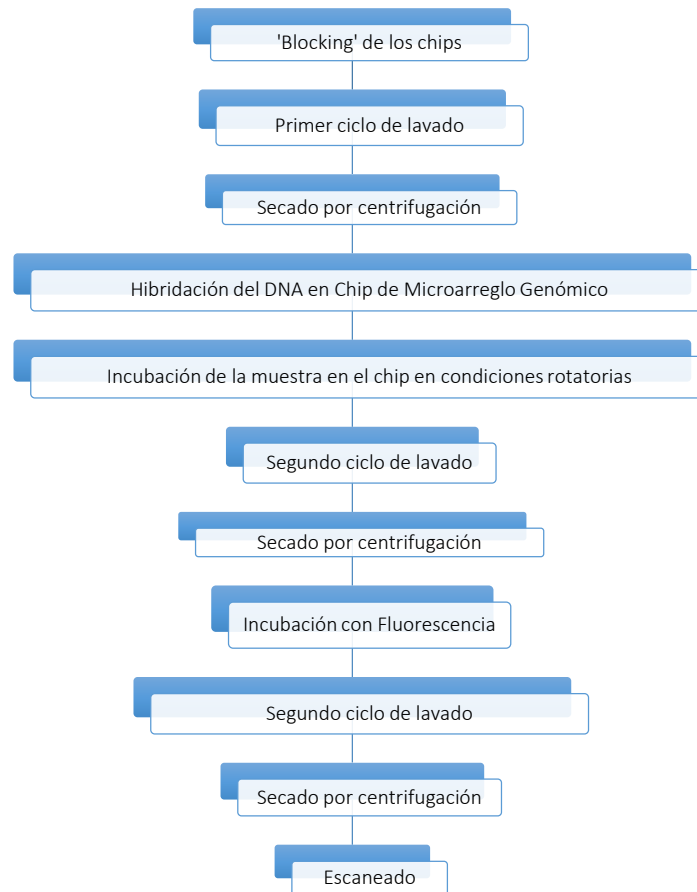
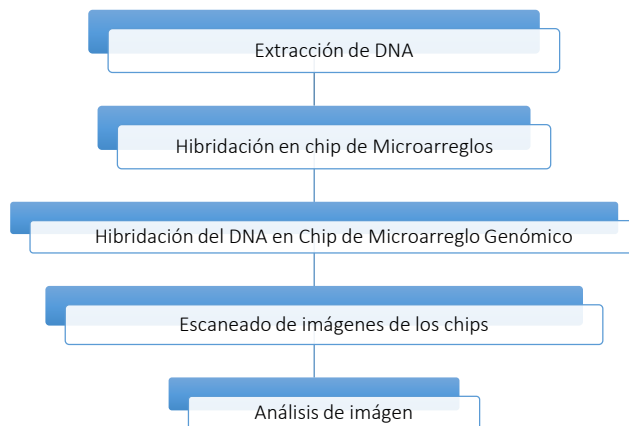


Figura 6. Esquema metodológico analítico.



FASE POSTANALÍTICA

La lectura de cada chip genera imágenes en forma de matrices de puntos o píxeles, con un rango de valores de intensidades de fluorescencia que se calculan a partir de la señal correspondiente que fue captada por el escáner y reproducida por el software. Al finalizar la detección de señales de fluorescencia, se obtuvo mediante el software específico (GenomeStudio) una lista de todas las alteraciones en el número de copias (CNV / SNV / SNP) que fueron encontrados en cada paciente: un archivo nos proporcionó el dato sobre las pérdidas en el material genético (denominado genéricamente como Red) y otro archivo la información sobre ganancias (denominado genéricamente como Grn), y por separado se obtienen los archivos con los datos sobre Pérdidas de la Heterocigosidad (LOH) y SNP.

La tecnología y la preparación experimental pueden introducir artefactos en la medida de la expresión genética, debidos a la fluorescencia, por distinta eficiencia de las etiquetas

fluorescentes, por variaciones en el rendimiento del escáner de fluorescencia, debidos a la impresión, en la densidad de impresión, superficies irregulares, debidos al experimento biológico, por diferencias en la pureza o calidad de las muestras biológicas o por diferencias en la manipulación de las muestras biológicas. Se realizó por lo tanto un *preprocesamiento* para eliminar estas variaciones sistemáticas en los datos preservando la variación biológica real, en cuatro pasos principales:

- *Cuantificación de la imagen:*

Revisión inicial mediante representaciones gráficas cuyo principal objetivo fue detectar errores de *ruido* en el microarreglo:

Scatterplots: Diagramas de dispersión que muestran la correlación de los niveles de expresión entre dos muestras.

MA plots: Evolución de los scatterplots que muestran los ratios de correlación.

Histogramas: Diagramas de distribución de los niveles de expresión en cada muestra del experimento.

Boxplots: Otro modo de mostrar la distribución de los niveles de expresión a lo largo de las muestras.

- *Exploración de los datos:*

Mediante métodos estadísticos se analizaron las matrices almacenadas en los archivos para cada muestra para:

- *Corrección del fondo, normalización y sumarización:*

Background Correction (Corrección del fondo): Permitió minimizar los efectos que los errores en la hibridación que afectan la señal obtenida del escaneo de cada pozo del chip.

Normalización: Permitió ajustar la intensidad de señal eliminando posibles errores causados por factores técnicos y biológicos.

Sumarización: Permitió determinar a partir de la calidad de la intensidad de señal de cada región genómica qué tanta región existía en la muestra (variación en número de copias específicamente). Se utilizó el método *fRMA*.

- *Determinación de la calidad:*

Para facilitar el análisis de los datos se verificó durante todo el tratamiento estadístico los estándares internacionales establecidos por la Sociedad MGED (Microarray Gene Expression Data), conocidos por las siglas MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment), modificándoles en atención a que en nuestro estudio no utilizamos microarreglos de expresión sino microarreglos genómicos. Tuvimos en cuenta los siguientes seis elementos críticos:

1. Contar con los datos crudos para cada hibridación y mantenerlos en formatos de fácil lectura por diferentes Softwares (CEL, GPR files). Estos datos se encuentran en custodia de nuestro grupo y de los laboratorios que realizaron la corrida de los microarreglos.

2. Los datos finales normalizados y las matrices de expresión (*normalised*) deben permitir la formulación de conclusiones respecto al experimento. La estudiante responsable cuenta con estos datos normalizados.
3. Los datos incluidos en el texto final del estudio deben contar con la información completa sobre el experimento, incluyendo cada aspecto técnico por irrelevante que parezca. Se guardará como suplemento a este trabajo la información técnica provista por los laboratorios en caso de ser requerida.
4. El diseño del experimento debe ser claro y se deben especificar en el texto final cuáles datos corresponden a qué cosa: cuáles son datos biológicos de las muestras, cuáles corresponden a controles, cuáles a réplicas ya sean técnicas o biológicas, etc. Estas especificaciones se dejarán claras tanto en la metodología como en los resultados presentados en este trabajo.
5. Se deben hacer suficientes anotaciones de cualquier tipo a los resultados del microarreglo: identificadores genéticos, coordinadas genómicas, secuencias oligonucleotídicas, referencias comerciales del microarreglo. Se cuenta con esta información en los datos revisados por la estudiante responsable.
6. Se debe especificar tanto el protocolo del laboratorio que procesa los microarreglos como el protocolo de procesamiento de datos (metodología estadística). Esto ya se realizó en el apartado metodológico.

Una vez preprocesados, se procederá con los análisis específicos sobre los datos de los microarreglos por medio de métodos de estadística inferencial y descriptiva.

En cuanto a métodos de estadística inferencial, se utilizaron *umbrales de expresión*, que consisten en realizar el ratio de expresión entre la condición experimental que correspondería a la muestra de un paciente y el control (interno en el microarreglo), y tomar las regiones genómicas con un ratio mayor o menor que un umbral como aquellas de interés, siendo aquellas con ratios mayores que el umbral posiblemente ganancias, y aquellas con ratios menores posiblemente pérdidas de material genético. No es posible determinar la significancia estadística de su expresión diferencial dado que se trata de un microarreglo genómico.

Para en análisis específico de SNP, se utilizó el método de estadística descriptiva denominado Clustering, que agrupa los elementos genómicos según las distancias entre ellos, típicamente la distancia euclídea, representando mediante dendrogramas o diagramas de dispersión los diferentes grupos encontrados.

Una vez se tuvieron resultados preliminares de esta sección metodológica que ya se describió, se procedió a comparar la información con lo reportado previamente en bases de datos y literatura científica para cada región cromosómica afectada, según lo planteado en los objetivos:

Para la determinación de CNV / SNV / SNP y su frecuencia en población general y en poblaciones de individuos con alguna condición genética se empleó el repositorio DGV (Database of Genomic Variants; <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), la información consignada en el repositorio DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans with Ensembl Resources; <http://decipher.sanger.ac.uk/>) y los datos consignados en las bases de datos ClinVar y otras del National Center for Biotechnology Information de los Estados Unidos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Se obtuvo entonces un primer acercamiento de cuáles regiones cromosómicas y genes podrían estar realmente implicados con los fenotipos que estudiamos, en este caso con refractariedad a tratamientos farmacológicos en pacientes con epilepsia, a partir de la identificación de cuáles CNV / SNV / SNP ya han sido asociados a epilepsia o a otros fenotipos neurológicos y del estudio y comprensión de las vías moleculares en que participarían los genes involucrados en los rearrreglos. Además, se utilizó la información en artículos científicos y en las bases de datos para complementar el objetivo específico número cuatro, que es describir el cuadro clínico de los pacientes en los que se encuentran los rearrreglos genómicos y compararlos con cuadros reportados en la literatura.

Determinación del origen parental de los rearrreglos

Una vez que un rearrreglo se consideró patogénico, se procedió a contactar nuevamente a los padres de los pacientes afectados para, previa firma de consentimiento informado, tomar a ellos una muestra de sangre venosa para extracción de DNA genómico y procesamiento

de aCGH/SNP, para determinar en los progenitores la presencia o ausencia del rearrreglo encontrado y confirmar si se trata de una variante *de novo*, o de herencia paterna o materna. Esto se hace con el fin de darle más valor a su patogenicidad ya sea como posible causa del fenotipo epiléptico del paciente o para lograr relacionarlo no como causa sino como modificador de la respuesta a FAE. Lo anterior, dado que si el rearrreglo es *de novo* es más probable que se relacione como causal, pero si es heredado y los padres son sanos, es más probable que se relacione con un fenotipo propio de la epilepsia.

Para determinar si los padres son portadores, se decidió utilizar también la tecnología de microarreglos para hacer lo más uniforme posible el estudio.

Propuesta de vías moleculares relacionadas con Farmacorresistencia

El análisis genético de un individuo brinda información sobre la relación entre el genotipo y el fenotipo, para mejorar con el entendimiento de esas relaciones la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. En este estudio, valiéndonos de las tecnologías que utiliza la biología de sistemas, se hizo una búsqueda de interacciones entre los genes involucrados en los rearrreglos encontrados en nuestros pacientes y que puedan relacionarse con farmacorresistencia en epilepsia.

Se analizaron inicialmente las regiones genómicas consideradas como patogénicas para evaluar qué genes están presentes en ellas, y luego a partir de los datos consignados en los repositorios de ontología génica y en la literatura, se evaluó el potencial de esos genes para

estar involucrados en epilepsia y en resistencia a FAE. Se interrogará a los sistemas biológicos de manera sistemática para proponer cómo esos genes o las vías moleculares en que participan se intersectan para generar un fenotipo de refractariedad a FAE, en repositorios como *REACTOME* (<http://reactome.org>) o *STRING* (<http://string-db.org>).

Figura 7. Esquema metodológico posanalítico.

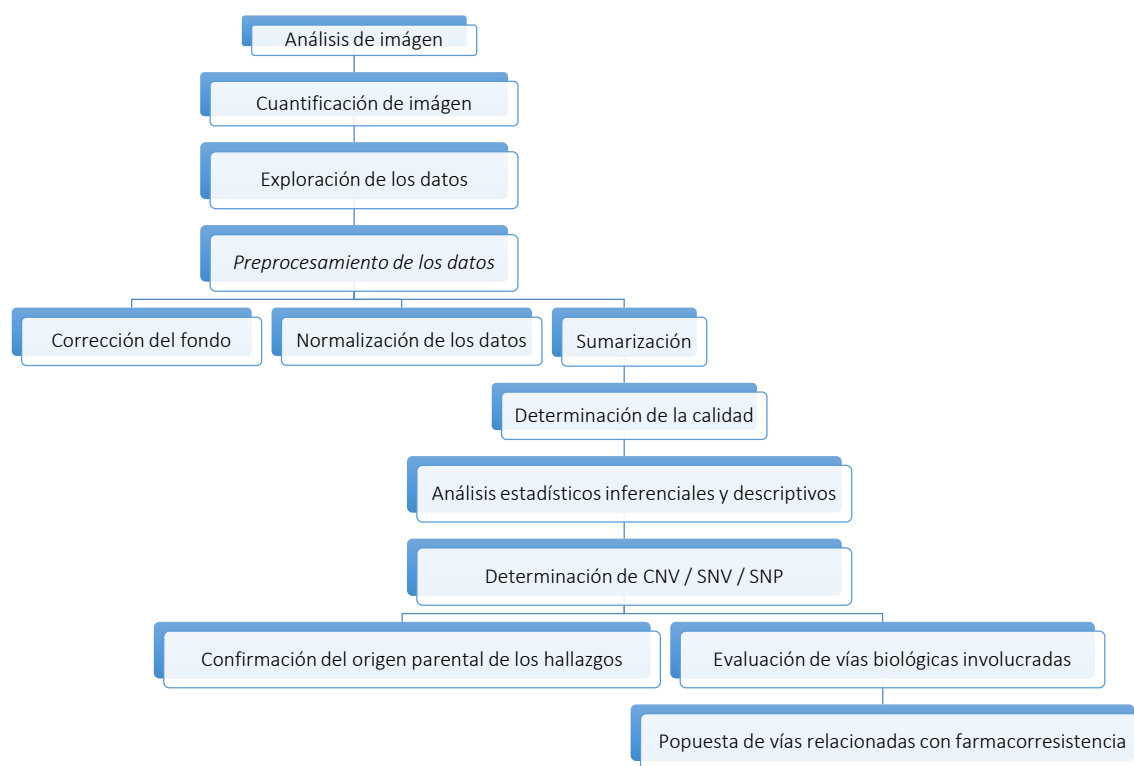
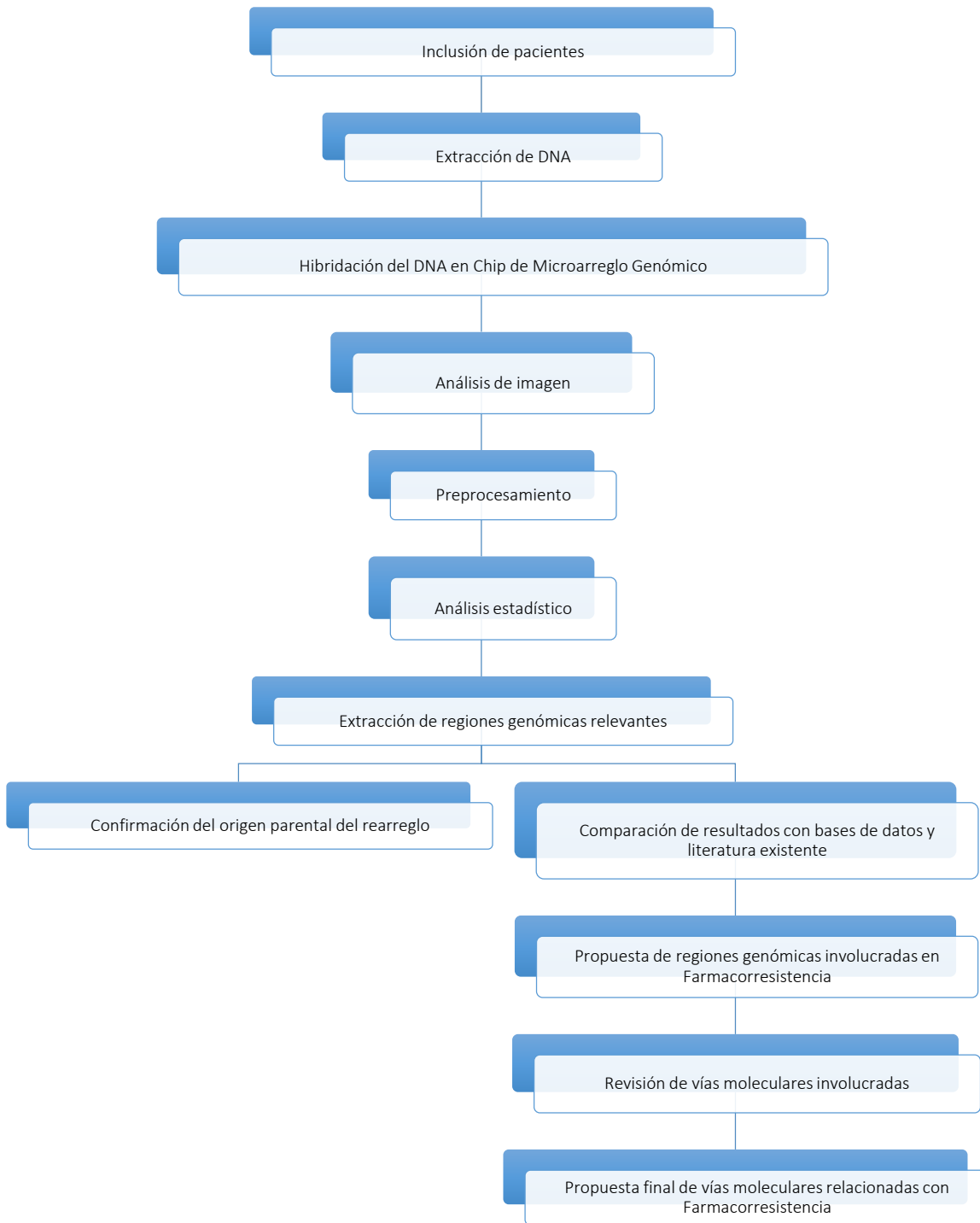


Figura 8. Esquema metodológico general.



7. Resultados

Población estudiada

19 pacientes diagnosticados con ER de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión fueron incluidos en el estudio. Se realizó extracción del DNA genómico, y las muestras fueron enviadas al extranjero para procesamiento de aCGH/SNP. Los resultados del procesamiento técnico fueron recibidos por nosotros para análisis bioinformático. Un resumen de las características de los pacientes se describen en la Tabla 2. En el Anexo 3 se presenta de forma más detallada la descripción clínica.

Tabla 2. *Características clínicas y paraclínicas de los pacientes estudiados.*

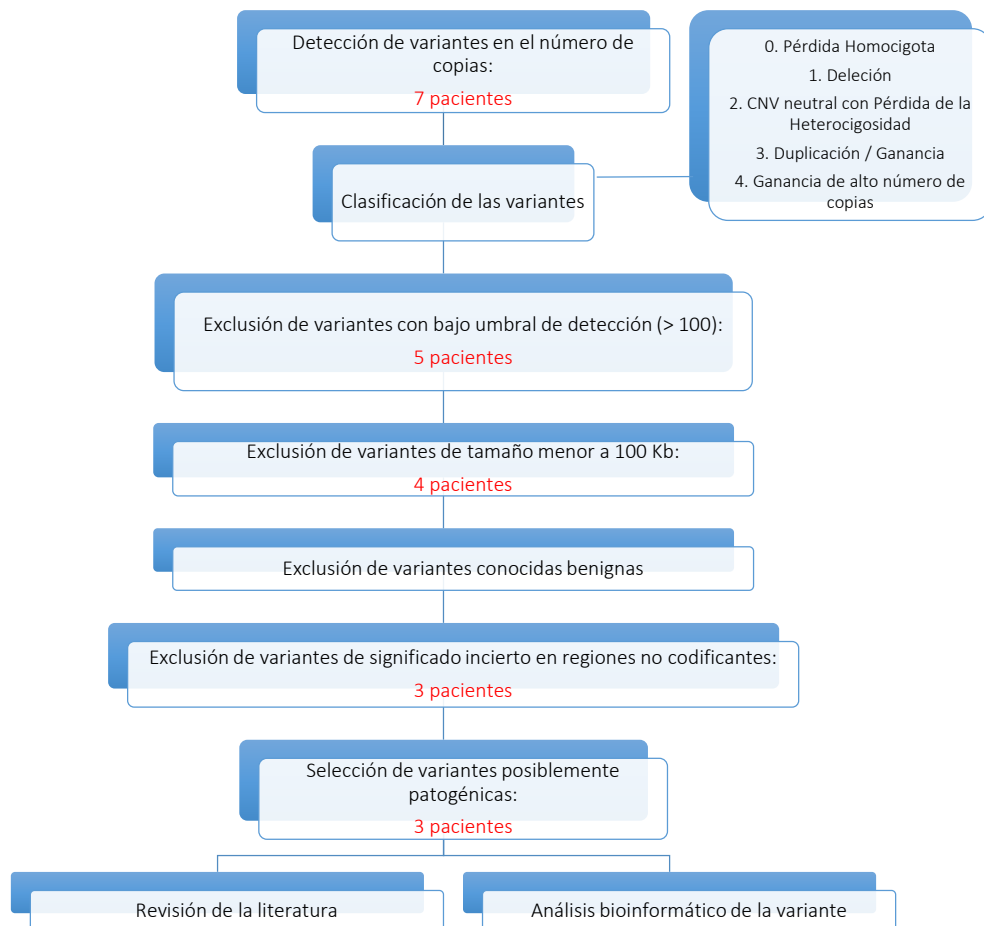
<i>Características</i>	<i>Pacientes</i>	<i>N</i>	<i>(%)</i>
<i>Demográficas</i>			
Edad	2 a 10 años	11	57,89
	10 a 18 años	8	42,410
Sexo	Femenino	10	52,63
	Masculino	9	42,410
Edad al diagnóstico	Primer año	4	21,05
	Edad pre-escolar	6	31,57
	Edad escolar	2	10,52
	Incierta	7	36,84
<i>De la Epilepsia</i>			
Tipo de epilepsia	Focal	6	31,57
	Generalizada	13	68,42
Frecuencia intercrisis	< 1 día	2	10,52

	Otra	17	89,47
No. actual de FAE	< 2	2	10,52
	3 a 5	12	63,15
	> 5	5	26,31
Antecedentes			
Consanguinidad parental	Sí	0	0
	No	19	100
Hipoxia perinatal	Sí	1	5,26
	No	18	94,74
Retardo global del desarrollo / RM	Sí	11	57,89
	No	8	42,1
Antec. Familiar de Epilepsia	Sí	0	0
	No	19	100
Cirugía para epilepsia	Sí	4	21,05
	No	15	78,9
Paraclínicos			
EEG / Telemetría	Normal	0	0
	Anormal	19	100
RNM cerebral	Normal (Sin hallazgos para considerar Epilepsia Lesional)	19	100
	Anormal	0	0
Estudio metabólico	Normal	19	100
	Anormal	0	0

Resultados del Microarreglo Genómico

Se detectaron variantes en el número de copias en 7 de los 19 pacientes estudiados, es decir en un 35% de los pacientes. Sin embargo, tras un juicioso análisis bioinformático y clínico se excluyeron aquellas variantes que no fueron consideradas patológicas.

Figura 9. Esquema de selección de CNV posiblemente patológicas.



En cuanto al proceso de selección de variantes, antes del análisis bioinformático se realizó una verificación de la calidad técnica del experimento, en cuanto a que los datos obtenidos a partir de los microarreglos se curaron según con un estándar internacional establecido por la Sociedad MGED (Microarray Gene Expression Data), conocido por las siglas MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment), que posee tablas estructuradas para determinar la calidad de las condiciones experimentales. Dado que en este estudio se trabajó con aCGH/SNP y no con microarreglos de expresión, se ajustaron los parámetros a este tipo de metodología. En un primer paso, se excluyeron del análisis todos aquellos resultados cuyos intervalos de confianza para el *base calling* representados como *CNV Confidence* se encontraran fuera de los límites sugeridos internacionalmente (Superiores al 100X, con Phred scores calculados sobre 30). Además, se excluyeron de los análisis todas las variantes en número de copias cuyo tamaño fuese menor de 100 Kb, por considerarlas más probablemente benignas, según reportes en la literatura científica y el conocimiento bioinformático actual.

Con resultados preliminares curados, se procedió a comparar nuestra información con lo reportado previamente en bases de datos y literatura científica para cada región cromosómica afectada, buscando seleccionar variantes con alta significancia clínica.

De acuerdo con lo planteado por Buysse *et al.* en 2009, siempre que se desee evaluar la significancia clínica de hallazgos de variantes en número de copias detectados a partir de tecnologías de citogenética molecular, particularmente microarreglos, los investigadores se deberían trazar un árbol de decisiones, esto es, el diagrama de flujo que se va a seguir para

seleccionar o descartar variantes como patogénicas, benignas, o de significancia clínica desconocida. En su artículo publicado en el *European Journal of Medical Genetics*, proponen tres niveles básicos para este árbol [68]: 1. Identificar cuáles de las variantes reportadas por el microarreglos ya se reconocen como causales de fenotipo y si en el contexto del paciente corresponden en efecto a variantes patogénicas, 2. Excluir las variantes comunes, para lo que se deben utilizar los datos consignados en diferentes bases de datos, y 3. Determinar el modo de herencia de aquellas variantes que finalmente si se consideren patogénicas, puesto que si son de novo es más probable su carácter dañino.

Más recientemente, Hollenbeck *et al.* utilizaron en su estudio publicado en la revista *Genetics in Medicine* una estrategia similar: Seleccionaron inicialmente variantes de número de copias no recurrentes, y a ellas las estudiaron en bases de datos para evaluar su frecuencia y excluir variantes comunes, la significancia clínica y excluir a las ya reconocidas como benignas o incluir a las ya reconocidas como patogénicas, y determinaron el contenido génico en las variantes en caso de no ser concluyentes las evaluaciones anteriores para definir si se incluían o no como variantes patogénicas o probablemente patogénicas [69].

Finalmente, solo en 3 de los 19 pacientes analizados, es decir, un 15,78%, se detectaron variantes en el número de copias genómicas posiblemente relacionadas con su enfermedad. Se revisaron las características de las CNV seleccionadas en las bases de datos dbVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar>) y Database of Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

Tabla 3.1. Frecuencia de CNV posiblemente patogénicas detectadas en los pacientes analizados.

Hallazgo Molecular	N (Pacientes)	(%)
Microarreglo Considerado Normal	16	84,21
Microarreglo con CNV posiblemente patogénica	3	15,78

Tabla 3.2. Variantes en el Número de Copias, SNP y LOH relacionados con el fenotipo detectados en los pacientes estudiados.

Se recuerda que en tres pacientes se detectaron CNV patogénicas, pero dos de ellos tenían 2 cada uno, por esto en la siguiente tabla se reportan 5 CNV en total.

En cuanto a los SNP, 19 de 19 pacientes genotipificados presentaron alelo C (CC) para el SNP rs10517402 localizado en el gen EPHX1, cuyo alelo más común en población americana y anglosajona es el T, siendo esta la única asociación encontrada con el fenotipo de refractariedad a los medicamentos en los casos estudiados.

No se detectaron regiones ni porcentajes relevantes con homocigosidad (Pérdida de la heterocigosidad – LOH).

Hallazgo Molecular	N (Pacientes)	% del total de CNV
Delección homocigota	1	20,00
Delección	2	40,00
Duplicación	2	40,00
Ganancia de alto número de copias (> 3)	0	0,00
SNP relacionados con fenotipo <i>rs10517402 Alelo CC</i>	19	NA
LOH relacionadas con fenotipo	0	0,00

En el paciente ER13 se detectó una pérdida heterocigota de material genético en el brazo largo del cromosoma 19, en la región 19q13.11-q13.12, descrita como una deleción de 5063 kb (5 Mb), y una ganancia en el brazo largo del cromosoma 22, en la región 22q11.1, descrita como una duplicación de 1342 kb (1.3 Mb). Son los rearrreglos de mayor tamaño detectados en los pacientes analizados. Se trata de un paciente masculino de 13 años de edad con diagnóstico de Epilepsia focal sintomática, quien cursa posterior al inicio de crisis con retardo global del desarrollo con predominio de retardo del lenguaje. Tiene importante antecedente patológico de retardo del crecimiento intrauterino. Al examen físico llamó la atención perímetro cefálico en percentiles límitrofes inferiores para la edad, con ligera micrognatia y nariz llamativa, además de hipospadias. Se revisa la historia clínica y se trata de un paciente a quien se sospechó incluso Síndrome de Smith Lemli Opitz, pero estudio metabólico para 7-dehidrocolesterol es normal. Se encuentra en seguimiento por genética y neuropediatría, y pertenece a la cohorte de pacientes en los que nuestro grupo ha estudiado previamente rearrreglos cromosómicos subtelo méricos por MLPA (Amplificación de Sondas dependiente de Ligamiento) obteniendo un resultado considerado como normal.

Figura 10. Deleción 19q13.11-q13.12 en el paciente ER13.

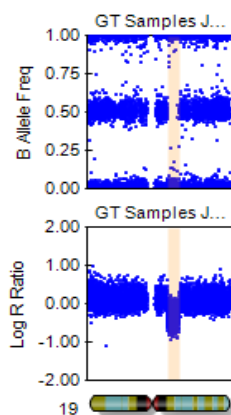
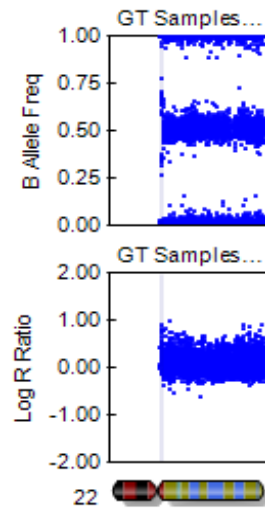


Figura 11. Duplicación 22q11.1 en el paciente ER13.

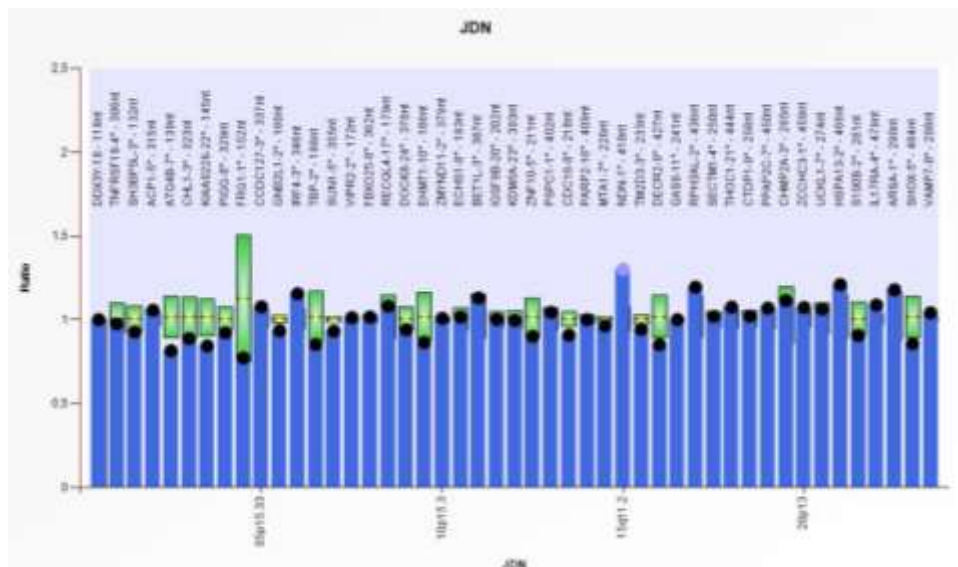


No es de sorprender que en el paciente ER13 no se lograra detección de las CNV aquí reportadas mediante la metodología de MLPA, puesto que las dos regiones afectadas en el paciente tienen localización pericentromérica y no subtelomérica.

En el paciente ER14 se detectó una microdelección homocigota en la región cromosómica 1p36 de tamaño de 129 kb, asociada a una ganancia de material genético en el brazo corto del cromosoma 18, en la región cromosómica 18p11.31, descrita como una microduplicación de 143 kb.

Figura 12. Esquema del análisis cromosómico por MLPA al paciente ER13 para el estudio de investigación por Maradei SJ. et al. [67].

La región cromosómica 15q11.2 que impresiona duplicada no supera el umbral (1.5) para considerar amplificación en el material genético.



Se trata de un paciente de sexo Masculino, actualmente tiene 8 años de edad, y fue diagnosticado a los 6 meses. Padece crisis epilépticas tipo ausencia aproximadamente 2 por semana, que manejan con Ácido valproico 4 cm cada 8 horas, pero ha requerido previas hospitalizaciones por estado epiléptico. Fruto de la tercera gestación de madre G3P3A0C0M0V3, al parecer embarazo gemelar pero hacia los 4 meses en ecografía obstétrica de alto riesgo se reporta como monoamniótico y monocoriónico con único feto vivo. Embarazo controlado y deseado, sin exposición a mutágenos, pero con complicaciones hemorrágicas en varias ocasiones y amenazas de aborto en primer trimestre, por lo que requirió múltiples hospitalizaciones y manejo farmacológico con Geslutin (progestágenos).

Parto vaginal a las 35 semanas de edad gestacional, no instrumentado, sin complicaciones. Recién nacido vivo de 2670 gr de peso, madre no recuerda la talla, por historia clínica PC de 36 cms y tamización para hipotiroidismo congénito normal. Al nacer fue llevado a UCIN donde permaneció 8 días por sepsis neonatal secundaria al parecer a infección urinaria, cursando además con hipoglicemia e hipocalcemia. Tomaron tomografía computarizada cerebral referida como normal. Luego llevado a Unidad de Cuidados Intermedios de donde fue dado de alta con recomendaciones generales. Desde el primer mes de vida y hasta el inicio de crisis logró el sostén cefálico y sedestación con apoyo, pero posteriormente inicia con hipotonía severa y retardo del desarrollo, con hitos descritos por la madre así: Sostén cefálico definitivo a los 12 meses, gateo y sedente sin apoyo a los 2 años, marcha sin apoyo a los 3 años, control de esfínteres a los 5 años, y refiere que por enuresis actualmente utiliza pañal nocturno. Tiene además estreñimiento crónico en manejo con PEG. En la revisión de paraclínicos, hallazgos imagenológicos de hipoplasia del cuerpo calloso y heterotopia nodular segmentaria, con última RNM de agosto 26 de 2010 se observa además dilatación asimétrica de cavidades con disminución del volumen de sustancia blanca periventricular, y quiste interhemisférico. No se considera a estas alteraciones como causas de epilepsia lesional, aunque en reportes por parte de radiología siempre han referido que son secundarias a noxa hipóxica perinatal. Tiene electroencefalograma del 03 julio de 2009 que reporta trazado anormal en sueño espontáneo dado por mala modulación del ritmo de fondo y lentificación difusa. Es importante referir que el paciente tiene estudio de cariotipo de alta resolución y cariotipo para fragilidades 46,XY normales, y estudios metabólicos sin alteraciones.

Figura 13. Delección homocigota de la región 1p36 en el paciente ER14.

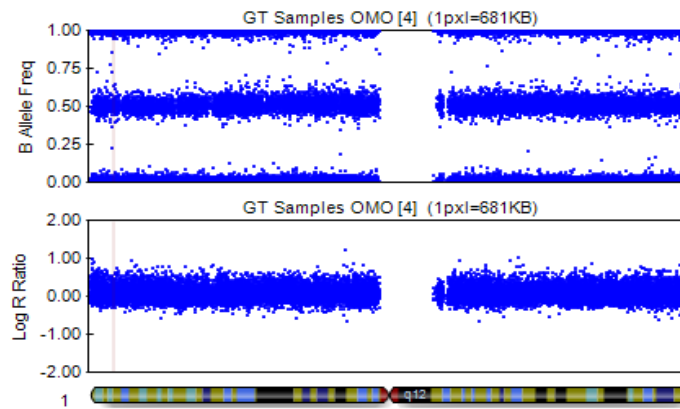
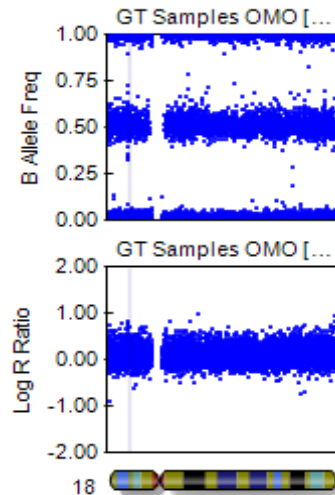


Figura 14. Duplicación 18p11.31 en el paciente ER14.



En el paciente ER16 se detectó una delección de la región cromosómica Xq28. Se trata de una paciente de sexo Femenino que actualmente tiene 5 años de edad. El diagnóstico de ER es reciente. Específicamente, padece de Síndrome de West, considerado una encefalopatía epiléptica. Se encuentra en manejo farmacológico con vigabatrina y ácido

valproico a dosis tope para el peso, y requiere intermitentemente de aplicación intrahospitalaria de pulsos de ACTH. Última crisis convulsiva menos de 1 mes antes del último control por neuropediatría, es decir aproximadamente 2 meses previos a la toma de la muestra. La madre refiere embarazo normal, deseado y controlado, que concluye en parto vaginal eutócico a término, sin complicaciones perinatales o en la edad neonatal. Recuerda sonrisa social a los 2 meses, que sostén cefálico estuvo dentro de lo esperado, pero logró asumir la posición sedente sin apoyo apenas a los 24 meses, gatear a los 30 meses, y aun no logra bipedestación ni marcha sin apoyo. Actualmente dice solo 2 palabras, y se encuentra escolarizada en Institución de Educación Especial. En la revisión de paraclínicos, hallazgos imagenológicos sin evidencia de causas de epilepsia lesional, y trazados electroencefalográficos anormales, además de estudios metabólicos sin alteraciones. No hay reporte en historia clínica de cariotipo, y madre no recuerda realización de este estudio.

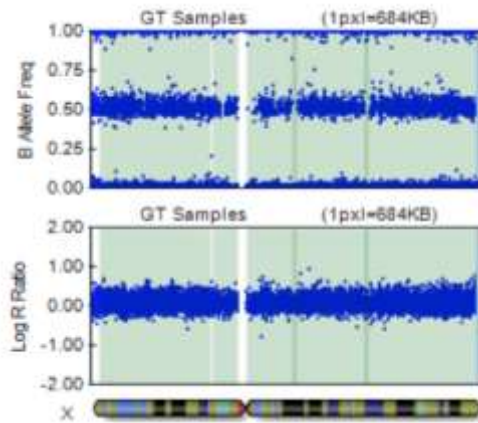
En la discusión se presentarán los estudios en que se describen clínicamente otros pacientes con epilepsia con CNV reportadas como patogénicas, encontrados tras la búsqueda sistemática de la literatura.

Hasta el momento en que se da por concluido este trabajo de grado, no fue posible la demostración del origen parental de los rearrreglos genómicos encontrados en nuestros pacientes, dado que por el alza en los precios de los microarreglos frente a lo contemplado al inicio del proyecto (secundaria al alza en el precio del dólar) no fue posible realizar las pruebas genéticas a los padres de los pacientes afectados. Sin embargo, este proyecto concursó en la Convocatoria para Proyectos de Investigación 2016-2017 del Hospital Militar

Central, una de las instituciones en que se llevó a cabo, y obtuvo recientemente financiación que permitirá terminar el desarrollo de los objetivos planteados y la ampliación del tamaño de muestra para nutrir los resultados, con fecha de cierre del proyecto estimada para 2018.

Figura 15. Delección Xq28 en la paciente ER16.

Nótese que al tratarse de paciente de sexo femenino el software de análisis supone pérdida de la heterocigosidad sobre ambos cromosomas X.



En la Tabla 4 se describen las variantes en número de copias encontradas en los pacientes descritos anteriormente.

Tabla 4. CNV detectadas en los pacientes estudiados.

Paciente	SampleID	Región Cromosómica	Tamaño de la CNV (Kb)	Valor
ER 13	JDN	19q13.11-q13.12	5063	1
ER 13	JDN	22q11.1	1342	3
ER 14	OMO	1p36	129	0
ER 14	OMO	18p11.31	143	3

ER 16	IOIR1 [6]	Xq28	293	1
-------	-----------	------	-----	---

Valores: 0 es Delección homocigota; 1 es pérdida; 2 es pérdida de la heterocigosidad; 3 es ganancia; 4 es ganancia de alto número de copias (amplificación de 4 o más copias).

Encontramos en la literatura que las variantes seleccionadas en nuestros pacientes ya han sido reportadas por algunos autores (y en las diferentes bases de datos consultadas) como relacionadas con el fenotipo epiléptico y se recogen los estudios más significativos en la Tabla 5. En cuanto a su potencial implicación en el fenotipo de refractariedad a los tratamientos farmacológicos, en la discusión se comentará en detalle.

Por otra parte, se obtuvo a partir de los datos bibliográficos información sobre los genes comprometidos por los diferentes rearrreglos que podrían relacionarse con epilepsia y/o respuesta al tratamiento farmacológico, los cuales se recogen en la Tabla 6. Lo que concierne específicamente al fenotipo de refractariedad a los tratamientos farmacológicos se comentará en detalle en la discusión.

Tabla 5. Resumen de los artículos más relevantes en los que se asocia a las CNV detectadas en nuestros pacientes con fenotipos de epilepsia.

<i>Variante detectada</i>	<i>Año</i>	<i>N</i>	<i>Fenotipo relacionado</i>
Del 1p36			
Bahi - Buisson et al. [70]	2008	91	Epilepsia de diferentes tipos
Li et al. [71]	2008	8	Convulsiones Neonatales e Infantiles Benignas Familiares (BFIS)
Saito et al. [72]	2011	1	Epilepsia Focal
Paciorkowsky et al. [73]	2011	7	Espasmos Infantiles
Kanabar et al. [74]	2012	4	Epilepsia Focal

Shimada et al. [75,76]	2015	86	RM - Crisis convulsivas - Dismorfismo facial
Zhang et al. [77]	2015	3	ER
Addis et al. [78]	2016	144	Epilepsias de tipo Ausencias
18p11.31			
Maurer-Morelli et al. [79]	2012	14	Epilepsia del Lóbulo Temporal (MTLE)
Del 19q13.11-q13.12			
Bisulli et al. [80]	2014	11	Epilepsia Parcial Autosómica dominante con Alteraciones Auditivas
Wang et al. [81]	2015	23	ER
Hintze et al. [82]	2016	1	RM - Crisis convulsivas - Dismorfismo facial
22q11.2			
Piccione et al. [83]	2011	1	Epilepsia Mioclónica Juvenil
Valvo et al. [84]	2012	1	Epilepsia de Picos y Ondas continuas durante el sueño (CSWS)
Del Xq28			
Singh et al. [85]	2009	1	Síndrome de Barth
Hino-Fukuyo et al. [86]	2015	18	Síndrome de West
Boutry-Kryza et al. [87]	2015	73	Espasmos Infantiles

Tabla 6. Genes comprometidos en las CNV detectadas que podrían relacionarse con los fenotipos epileptógeno y de refractariedad a los tratamientos en los pacientes estudiados.

Región Cromosómica	Genes (potencialmente) relacionados con epilepsia
1p36	<i>GABRD – KCNAB2 - KLHL17 - PEX10</i>
18p11.31	Sin evidencia científica suficiente
19q13.11-q13.12	> 10 genes posiblemente relacionados – <i>LGI4</i>
22q11.1	<i>RAB36</i>
Xq28	<i>TMLHE</i>

Por medio de herramientas bioinformáticas se realizó una aproximación a redes biológicas a partir de los genes que se encuentran en la literatura como posiblemente asociados con epilepsia, a partir de los datos consignados en el repositorio STRING, que permite

seleccionar el origen de la evidencia que soporta la interacción proteica, bien sea por Minería de datos (Textmining), Experimentos (Experiments), Datos en repositorios (Databases), Co-expresión, Vecindad de los genes codificantes (Neighborhood), Fusiones entre genes (Gene Fusions, o Co-ocurrencia. Además, permite seleccionar el Score de interacción deseado, que puede ser muy alto, alto, medio o bajo, y preferiblemente deben seleccionarse alto o muy alto de forma que la supuesta interacción sea más confiable. Así mismo, selecciona el número de nodos que se desea visualizar en dos planos, la interacción primaria o la interacción secundaria (más indirecta), para lo cual se recomienda visualizar no más de 10 nodos en la primera línea y no más de 5 nodos en la segunda.

Figura 16. Esquema para proposición de redes de interacción génica / proteica en el repositorio STRING (<http://string-db.org/>).

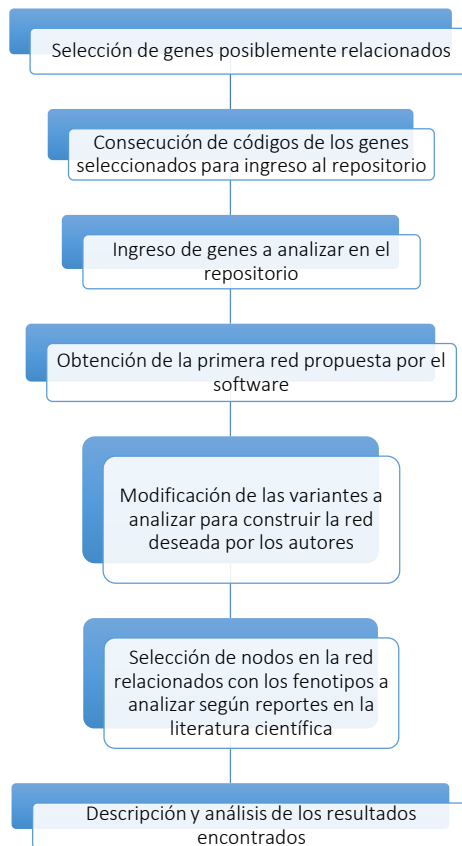


Figura 17. Formato de ingreso a la plataforma STRING.

Se debe incluir el nombre de la proteína codificada por el gen de interés y seleccionar Homo sapiens como organismo en el que se estudian sus interacciones.

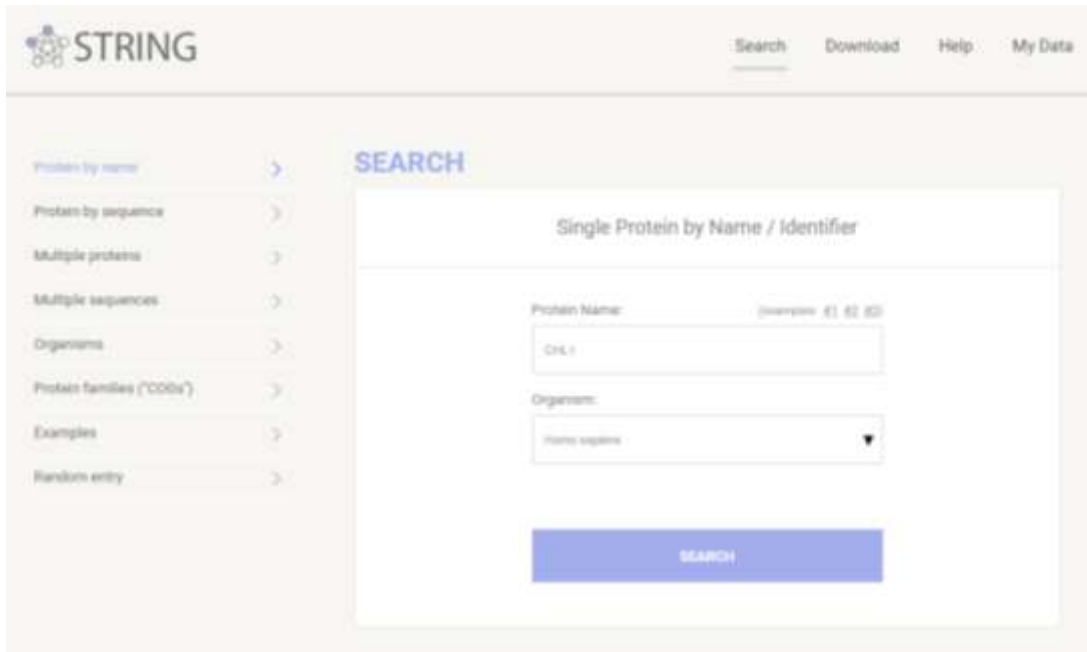
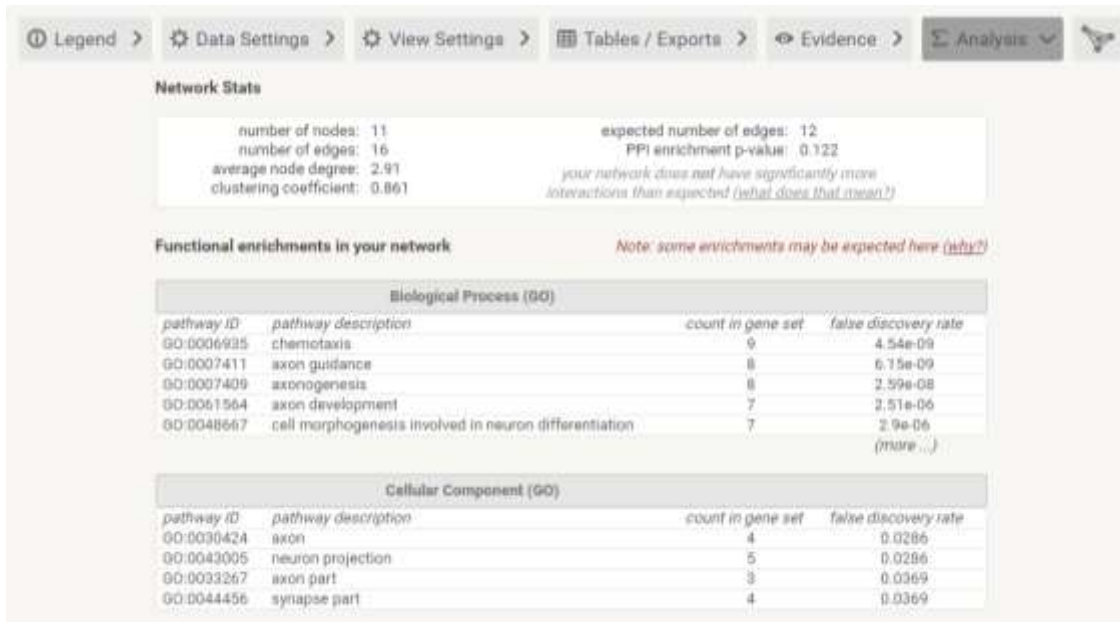


Figura 18. Condiciones a modificar para ajustar los parámetros de la red.



Figura 19. Análisis del enriquecimiento por Gene Ontology que se puede incluir dentro del análisis en STRING.

No reportaremos en este trabajo estos resultados dado que no construimos redes basados en análisis experimentales.



De acuerdo con los datos consignados en la Tabla 6, la construcción de redes de interacción para las proteínas codificadas por los genes en cada región cromosómica comprometida por las CNV descritas se realizó en orden por paciente, luego se presentarán primero las redes correspondientes a genes comprometidos en el paciente ER13, posteriormente las del paciente ER14, y por último las correspondientes al paciente ER16.

En el paciente ER13 se detectó una duplicación en 22q11.1 y una delección 19q13.11-q13.12. La delección 22q11.1 supone compromiso del gen *Rab36* como asociado a fenotipo epileptógenos, mientras que delección 19q13.11-q13.12 compromete en nuestro paciente al

gen *LG14*. Las redes de interacción proteica para los productos de estos genes se pueden observar en Figura 20 y Figura 21.

En el paciente ER14 se detectó una deleción homocigota en 1p36, asociada a una duplicación 18p11.31. En la región 1p36 llama la atención el compromiso de varios genes, de los que se mostrarán los análisis de redes de dos en particular: *KCNAB2* y *KLHL17*, por haber obtenido los resultados más interesantes (Ver Figura 22 y Figura 23). En la región 18p11.31 se localizan más de 10 genes, solo dos de ellos relacionados con enfermedad: *LPN2* y *TGIF1*. Dado que *TGIF1* tiene expresión en el cerebro en desarrollo según datos de modelos animales [88], este fue el gen que seleccionamos para construir la red molecular (Ver Figura 24).

En el paciente ER16 se detectó una deleción de la región cromosómica Xq28, que compromete el gen *TMLHE*, por lo que para este único gen se construyó la red molecular (Ver Figura 25).

No es destacable en ninguna de las muestras analizadas regiones ni porcentajes relevantes con homocigosidad, que justifiquen la búsqueda de genes causales recesivos en ellos o en otros familiares.

Cabe mencionar además, que se identificaron CNV con tamaños de 70 a 500 kb, consideradas como polimórficas y a las que no se les ha atribuido capacidad funcional para producir enfermedad.

Aunque no se detectó ningún reordenamiento no balanceado, esto no excluye otras alteraciones citogenéticas en los pacientes estudiados, pero ellos contaban con estudio previo de cariotipado reportados como normales. Además, la técnica pudo no detectar deleciones o duplicaciones en porcentajes minoritarios de mosaicismo.

Figura 20. Red de interacciones proteicas más importantes para Rab36.

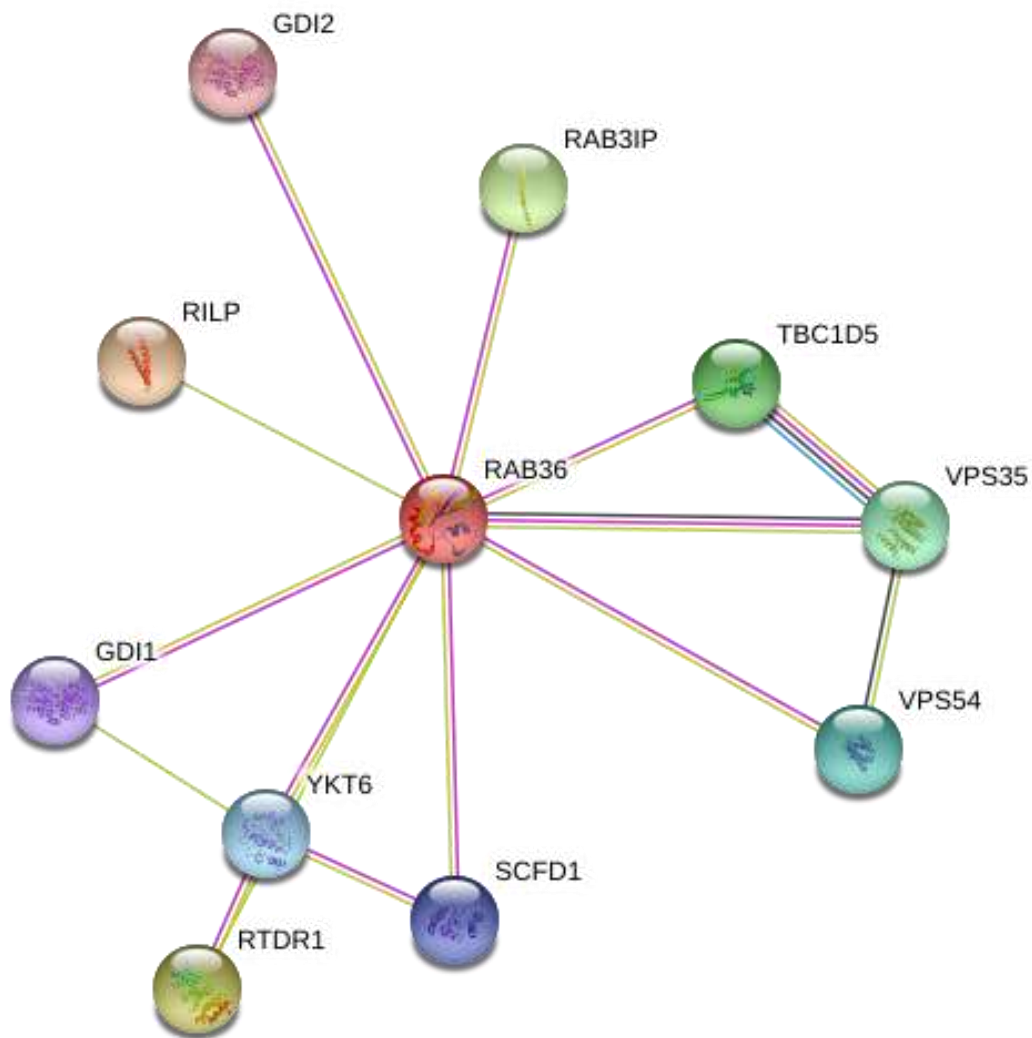


Figura 21. Red de interacciones proteicas más significativas para LGI4.

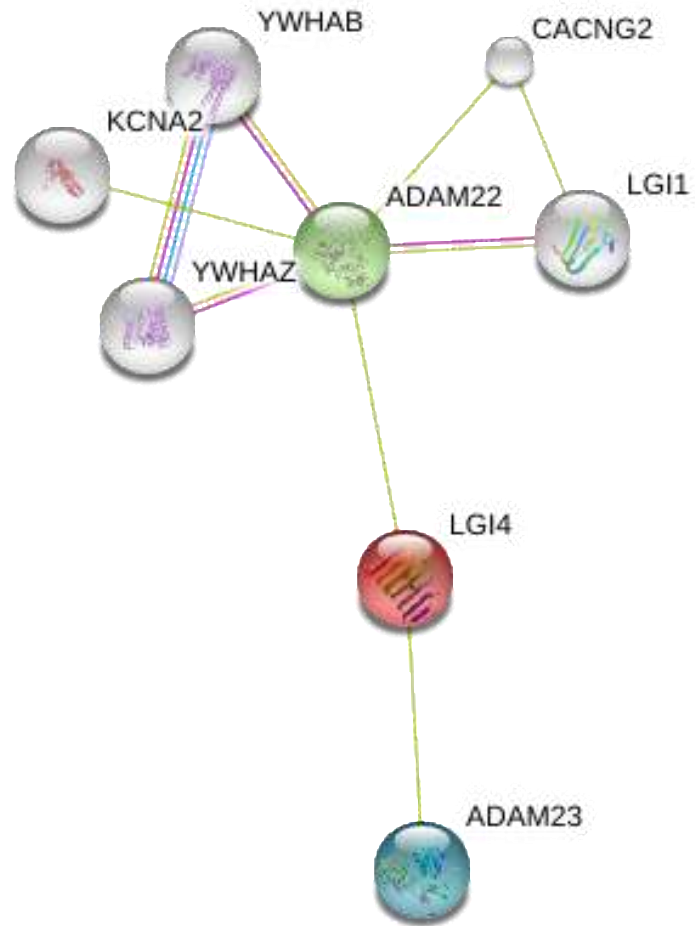


Figura 22. Red de interacciones proteicas más importantes para KCNAB2.

Nótese que las aristas son gruesas y cortas, es decir hay poca distancia entre los nodos, lo que representa una mayor fuerza de asociación.

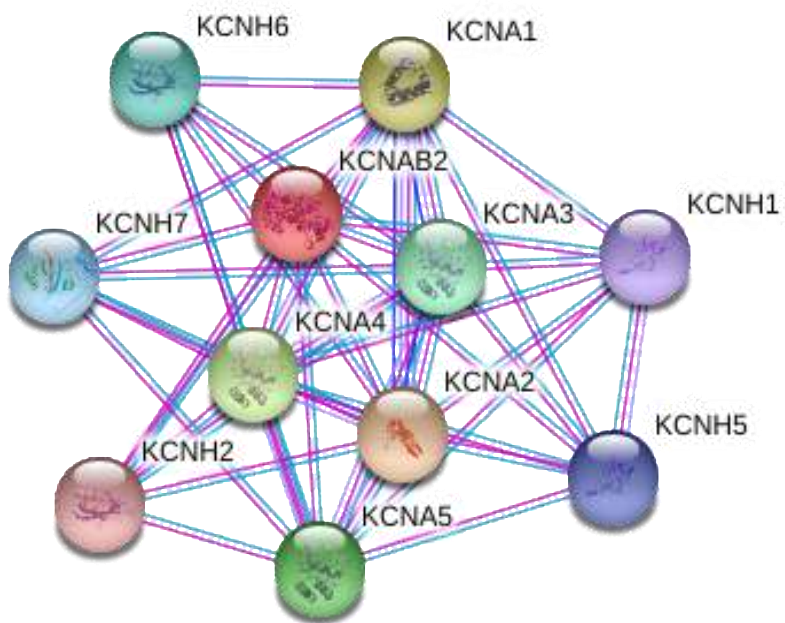


Figura 23. Red de interacciones proteicas más importantes para KLHL17.

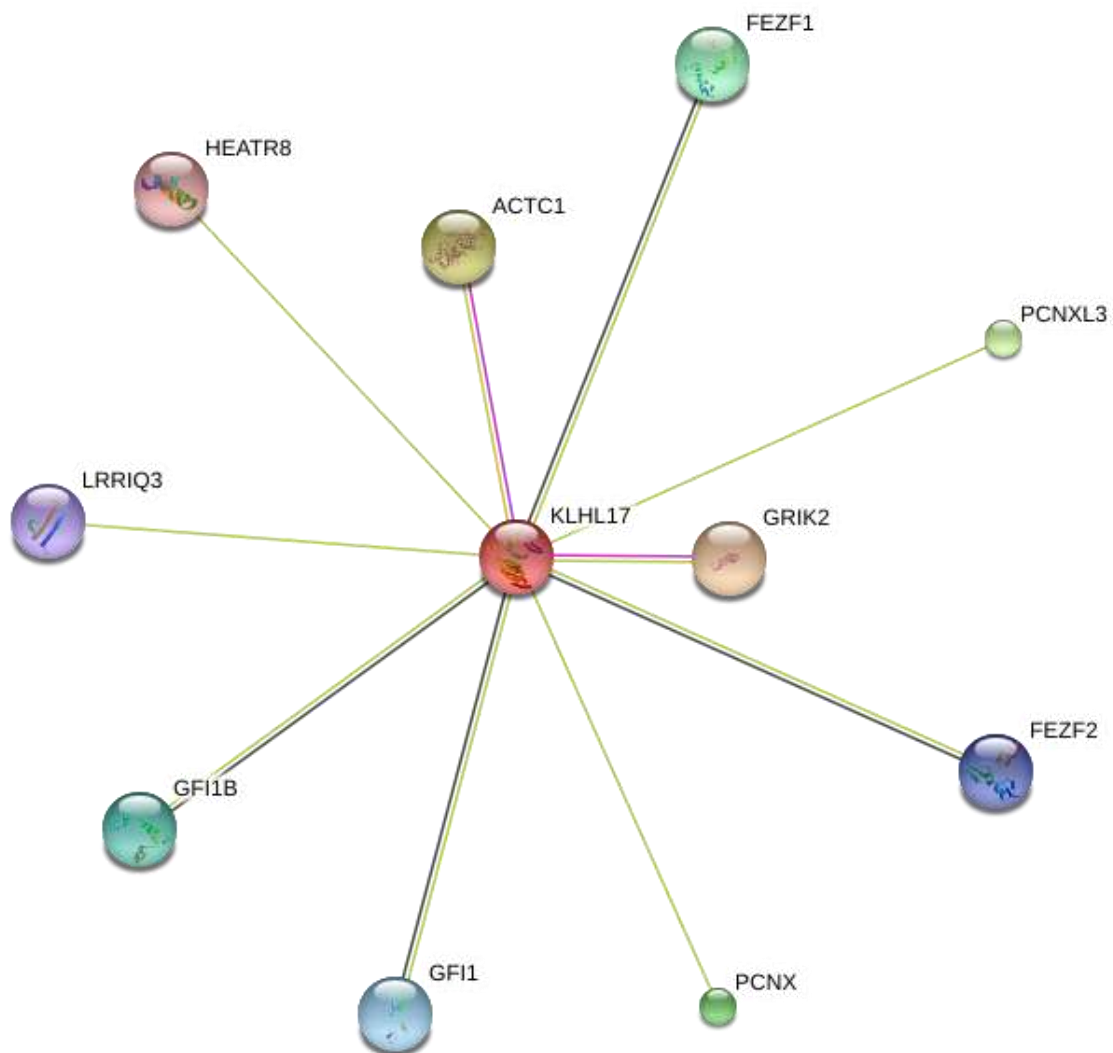


Figura 24. Red de interacciones proteicas más importantes para TGIF1.

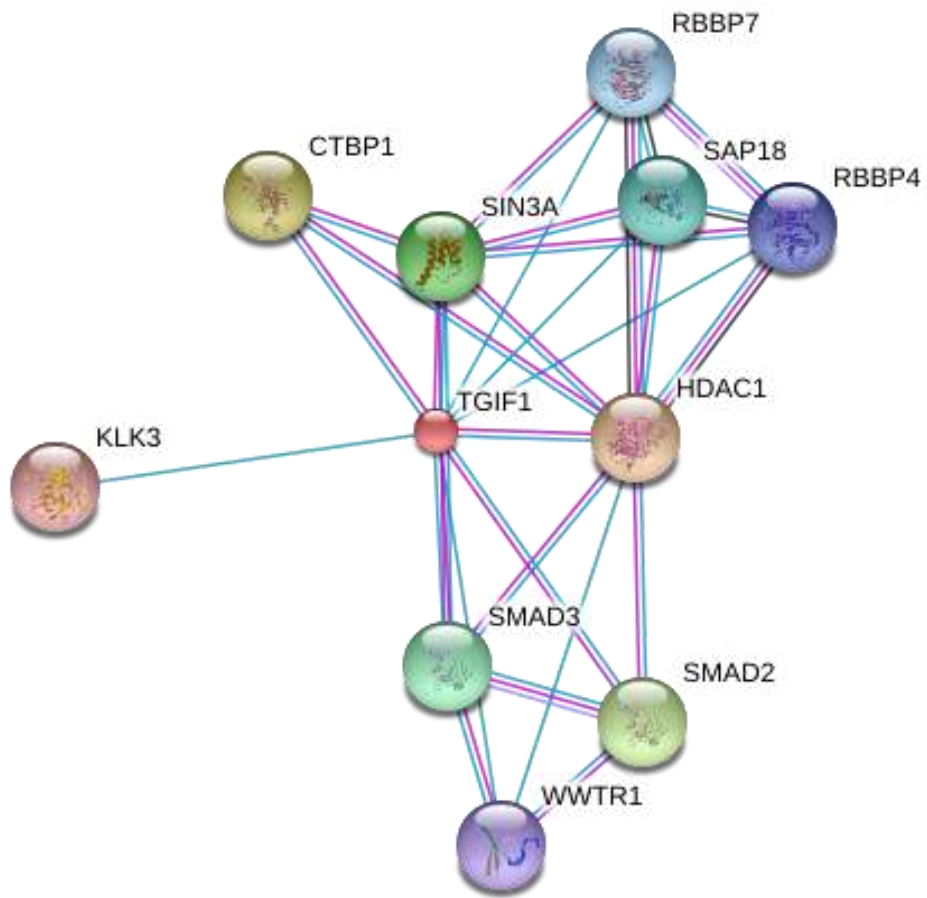
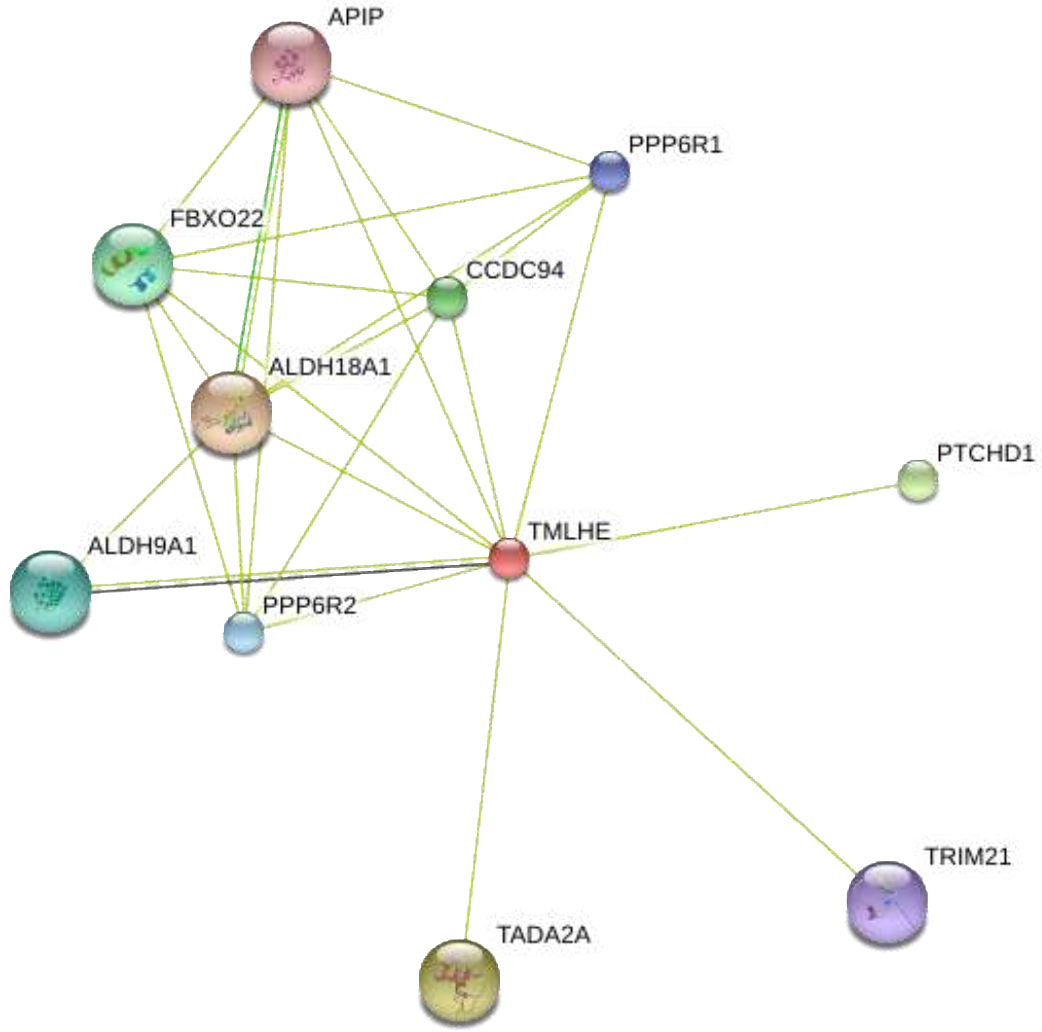


Figura 25. Red de interacciones proteicas más importantes para TMLHE.



Por otra parte, desde la publicación de los primeros datos de la secuencia del DNA humano la variabilidad genética se ha relacionado principalmente con los SNP, recientemente cobrando importancia su asociación con la susceptibilidad a padecer enfermedades de herencia multifactorial [89]. Se estima que a través de todo el genoma se distribuyen hasta 20 millones de ellos, aproximadamente un SNP por cada 100 a 300 nucleótidos [90].

El estudio genómico de nuestros pacientes incluyó la evaluación funcional de 392.197 polimorfismos en todo el genoma, relacionados previamente con diferentes fenotipos de enfermedad. 10 polimorfismos distribuidos en 6 genes fueron seleccionados para continuar con el análisis. Del total de polimorfismos evaluados, corresponderían apenas a un 0.003% de la cobertura.

La selección de dichos SNP se realizó posterior al tratamiento informático y estadístico de los datos, según las siguientes recomendaciones:

Inicialmente se excluyeron polimorfismos con Call Rate < 80 %, Frecuencia Alélica Menor (MAF) < 0.01 o que no se encontraran en equilibrio de Hardy Weinberg. Más de 390.000 polimorfismos fueron descartados tras este primer filtro, y se procedió a buscar entre ellos los más frecuentemente mencionados en la literatura como asociados con epilepsia, tras lo cual 67 SNP fueron seleccionados. 23 tenían *Call Rates* por debajo del 90% por lo que fueron excluidos. Entre los restantes 44, se seleccionaron aquellos asociados con refractariedad a

fármacos, quedando finalmente 10 SNP seleccionados, los cuales presentamos en la Tabla 7. Las frecuencias alélicas detectadas se presentan en la Tabla 8.

Tabla 7. Polimorfismos evaluados por el microarreglo seleccionado que se han relacionado previamente con respuesta a FAE.

SNP	Alelos	Gen
rs2305748	C / T	SCN1B
rs2234922	A / G	EPHX1
rs10517402	C / T	EPHX1
rs1544410	A / G	VDR
rs731236	C / T	VDR
rs2032582	A / G / T	ABCB1
rs1045642	C / T	ABCB1
rs717620	A / G	ABCC2
rs2273697	A / G	ABCC2
rs2706110	A / G	NFE2L2

Tabla 8. Frecuencias alélicas en los diferentes SNP seleccionados, detectadas en el grupo de pacientes analizados.

SNP	Alelos	Gen	Combinación alélica más frecuente en nuestra serie		Combinación alélica menos frecuente		Combinación alélica menos frecuente	
rs2305748	C / T	SCN1B	CC	100%	TT	0%	CT	0%
rs2234922	A / G	EPHX1	AA	100%	GG	0%	AG	0%
rs10517402	C / T	EPHX1	CC	100%	TT	0%	CT	0%
rs1544410	A / G	VDR	GG	100%	AA	0%	AG	0%
rs731236	C / T	VDR	TT	100%	CC	0%	CT	0%
rs2032582	A / G / T	ABCB1	TG	60%	TT	20%	GG	20%
rs1045642	C / T	ABCB1	TC	80%	CC	20%	TT	0%
rs717620	A / G	ABCC2	GG	100%	AA	0%	AG	0%

rs2273697	A / G	ABCC2	GG	100%	AA	0%	AG	0%
rs2706110	A / G	NFE2L2	GG	100%	AA	0%	AG	0%

Posterior a su detección, se hizo una revisión más profunda de la literatura científica y las bases de datos dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), dbGAP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap>), y se utilizaron herramientas como Variation Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/>) para evaluar la posible implicación patogénica de los polimorfismos encontrados.

En la discusión se detalla la descripción de los SNP evaluados en los genes *SCN1B*, *EPHX1*, *ABCB1* y *NFE2L2*, y se amplía la información sobre su papel en la respuesta a fármacos en pacientes con epilepsia.

Cabe mencionar que 19 de 19 pacientes genotificados presentaron alelo C (CC) para el SNP rs10517402 localizado en el gen *EPHX1*, cuyo alelo más común en población americana y anglosajona es el T, siendo esta la única asociación encontrada con el fenotipo de refractariedad a los medicamentos en los casos estudiados.

Tabla 9. Resumen de los resultados según los objetivos propuestos.

Objetivos	Resultado
<p>Detectar, por medio de aCGH/SNP, la presencia de rearrreglos genómicos en pacientes Colombianos con ER.</p>	<p>En 3 de los 19 pacientes analizados se detectaron variantes en el número de copias genómicas posiblemente relacionadas con su enfermedad.</p> <p>En el paciente ER14 se detectó una delección homocigota en la región cromosómica 1p36, asociada a una ganancia de material genético en el brazo corto del cromosoma 18, en la región cromosómica 18p11.31.</p> <p>En el paciente ER13 se detectó una pérdida heterocigota de material genético en el brazo largo del cromosoma 19, en la región 19q13.11-q13.12, y una ganancia en el brazo largo del cromosoma 22, en la región 22q11.1.</p> <p>En el paciente ER16 se detectó una delección de la región cromosómica Xq28.</p>
<p>Determinar la frecuencia de rearrreglos genómicos en el grupo de pacientes en estudio.</p>	<p>En aproximadamente un 15% de los pacientes analizados se encontró posibles rearrreglos genómicos patogénicos.</p> <p>En 20% de ellos se describe una delección homocigota, en 40% de ellos una delección, y en 40% de ellos una duplicación.</p> <p>No se detectaron pérdidas de la heterocigosidad en regiones cromosómicas relacionadas con el fenotipo estudiado.</p>
<p>Determinar la frecuencia de SNP incluidos en la plataforma de aCGH/SNP en el grupo de pacientes en estudio.</p>	<p>En el grupo de pacientes analizados se detectaron 10 SNP relacionados con el fenotipo de Refratariedad a los tratamientos farmacológicos. Del total de polimorfismos evaluados, corresponde apenas a un ~ 0.003% de la cobertura. Estos 10 polimorfismos se encuentran distribuidos en 6 genes. Las frecuencias alélicas detectadas se presentan en los resultados a manera de tabla.</p>
<p>Describir el cuadro clínico de los pacientes en los que se encuentran los rearrreglos genómicos y compararlos con cuadros reportados en la literatura.</p>	<p>Los cuadros de los pacientes analizados se revisan en la sección de resultados. La descripción de los cuadros clínicos de pacientes reportados en la literatura se detalla a continuación en la discusión, con apartados en los que cuando es posible se realiza la comparación con los de nuestros casos.</p>
<p>Establecer el origen de los rearrreglos genómicos como <i>de novo</i> o hereditarios.</p>	<p>No se logró determinar el origen de los rearrreglos genómicos en los pacientes en los que se describieron CNV posiblemente patogénicas.</p>
<p>Analizar el papel potencial de los rearrreglos genómicos y los SNPs encontrados en el fenotipo de Farmacoresistencia mediante la proposición de redes de interacción génica.</p>	<p>Por medio de herramientas bioinformáticas diversas, y reportando en este trabajo los resultados obtenidos a partir de la base de datos STRING, se realizó un análisis de las interacciones entre los genes involucrados en los rearrreglos que en la literatura se reportan como relacionados con epilepsia y/o respuesta al tratamiento farmacológico.</p>

8. Discusión

Recientemente ha crecido la evidencia sobre reorganizaciones cromosómicas que causan RM idiopático (en un 1 a 23% de los casos) y otros fenotipos neurológicos [91], y diversos estudios han intentado estudiar el papel de alteraciones genómicas ya sea como predisponentes, causales o modificadoras de diferentes fenotipos en epilepsia. Sus datos sugieren un nuevo paradigma para el uso de los análisis moleculares en investigación básica y en clínica: Tipos específicos de epilepsia tienen una arquitectura genética que es susceptible de estudio [43,44].

Dentro de las causas de epilepsia, las etiologías adquiridas / no genéticas corresponden aproximadamente al 30% de los casos, teniendo el resto un componente genético o una causa genética claramente establecida [92]. Las epilepsias generalizadas han demostrado la mayor concordancia en estudios en gemelos (cercana al 80%) sugiriendo que son este tipo de epilepsias las de mayor componente genético, mientras las epilepsias focales son concordantes en un porcentaje mucho menor (36%) [93].

Las metodologías de citogenética molecular y otros análisis se utilizan cada vez más para el estudio de aberraciones cromosómicas que no son visibles a la citogenética convencional y que han sido relacionadas como causa de epilepsias genéticas, esto es principalmente microdeleciones y microduplicaciones [60].

El FISH multisonda permite detectar deleciones, traslocaciones y con menor resolución duplicaciones, pero se requiere lograr la hibridación de las sondas en núcleos metafásicos y la técnica requiere experiencia del analista, es laboriosa en su ejecución y además es costosa [60]. La técnica de MLPA, que utiliza una sonda específica para cada región en estudio para por una única reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificar esos fragmentos y de acuerdo con la electroforesis capilar de los productos de PCR identificar según la intensidad de las sondas si existen deleciones y duplicaciones [94]. había sido ampliamente utilizada por su fácil ejecución, costos bajos y sensibilidad para la detección de pérdida o ganancia de material genético en regiones cromosómicas subteloméricas en el estudio diagnóstico de pacientes con RM [94].

El descenso en costos y alta sensibilidad de las técnicas basadas en microarreglos como metodologías de estudio y diagnósticas que no solo abarcan regiones subteloméricas sino el resto de los cromosomas ha permitido la identificación de otros rearrreglos que podrían asociarse a RM, Autismo y otros fenotipos neurológicos. En la práctica clínica, se está empezando a construir la evidencia sobre el rol que juegan este tipo de pruebas genéticas en el algoritmo diagnóstico de pacientes con epilepsia [63,95], dado que permiten el análisis simultáneo de varias regiones del genoma acortando los tiempos de reporte de resultados y los costos que implica el análisis no de una sino de varias secuencias del DNA en pasos sucesivos y no simultáneos [61]. El trabajo publicado por Galizia *et al.* en el que se utilizó al aCGH como método piloto para la detección de trastornos genómicos asociados a ER, logró en aprox. 25% de los casos demostrar una microdelección / microduplicación asociada a algún otro rearrreglo cromosómico, en ocasiones más grande [65].

A pesar de su alta heredabilidad, las aproximaciones genéticas al estudio de la epilepsia basadas en el estudio de genes individuales o en la búsqueda de candidatos mediante GWAS, han emitido datos interesantes para iniciar el entendimiento de la trama genómica en la complejidad de la enfermedad [63,96], no siendo completamente evaluada la asociación entre rearrreglos cromosómicos y epilepsia, mucho menos la relación con fenotipos como la refractariedad al manejo farmacológico.

Girirajan *et al.* proponen que con el estudio de microarreglos es posible identificar rearrreglos genómicos que, evaluados a la luz de un solo rasgo fenotípico, podrían asociarse a mayor severidad [97]. Lo anterior se relaciona con el número de genes comprometidos, ya que a mayor número de CNV en un paciente es más probable que se altere un mayor número de genes. A pesar de que por la resolución de los microarreglos utilizados en este estudio se hizo una restricción hacia el análisis de CNV de gran tamaño (> 400 kb), los autores no descartan que CNV pequeñas, SNV, SNP, y factores epigenéticos también contribuyan a la variación fenotípica en pacientes con enfermedad neurológica.

Striano P *et al.* por su parte, plantean que los pacientes con epilepsia tienen una carga mayor de CNV raras, de gran tamaño y con varios genes comprometidos, y esta carga aumenta si además presentan RM o algún otro rasgo neuropsiquiátrico [98]. En pacientes con epilepsia, las CNV podrían ser utilizadas como screening/diagnóstico preferiblemente en los casos anteriores. En su trabajo no se puede establecer una asociación clara entre el fenotipo y el genotipo de los pacientes, pero se propone que es posible que los rearrreglos cromosómicos

estén implicados más en la modificación del fenotipo que en la causa de la epilepsia.

Poduri A. *et al.* encontraron en un estudio basado en metodologías de aCGH que variantes genómicas que comprometen los genes *PARK2*, *AKT3*, *CACNA1B*, *KCNJ3*, *PMP22*, *PCDH*, *EGR3*, *MAPK3* y *GABARAP* podrían asociarse con el desarrollo de epilepsia [99]. Sin embargo, hay que mencionar que dado el carácter observacional del estudio, pudo existir un sesgo de selección de los pacientes. Los autores además plantean que el peso de las CNV y el poder diagnóstico del microarreglo podrían estar sobreestimados. Sin embargo, es uno de los únicos estudios en los que incluyen población pediátrica de centros de referencia en donde se practica frecuentemente el uso del microarreglo como parte del algoritmo diagnóstico para epilepsia, encontrando que hasta un 40% de los pacientes presentó al menos una CNV identificable[99].

Según Galizia *et al.* rearrreglos cromosómicos que contienen genes relacionados con procesos neurales pueden modificar los fenotipos de severidad en epilepsia. En un estudio, describieron dos CNV que contienen a los genes *CHRNA7* y *GOLGA2*, pero no se comprometieron en comprobar su patogenicidad. Sin embargo, proponen que en pacientes adultos con epilepsia, con fenotipos de severidad como la refractariedad al tratamiento, se debe considerar al aCGH como metodología de identificación de CNV que pudieran explicar el cuadro clínico, y que el estudio molecular en dichos pacientes debería formar parte del pool paraclínico, junto a las neuroimágenes, la electroencefalografía, etc. [65]. Cabe mencionar que su trabajo deja ver varias dificultades metodológicas entre las que cuenta la selección de los pacientes, que no fue ideal dada la falta de datos relacionados con

dismorfismos tanto faciales como en otras localizaciones corporales, anomalías del crecimiento prenatal y el grado de RM, lo que refleja la situación de la mayoría de historias clínicas de pacientes adultos, y que es un punto en común en los diferentes artículos científicos que se han revisado para el desarrollo de nuestro trabajo.

Más promisorio aun, es el uso de las técnicas de NGS para el diagnóstico más acertado de la etiología de la epilepsia. El equipo de EuroEPINOMICS ha evaluado la eficiencia diagnóstica de las técnicas de NGS y estiman que al utilizar paneles de unos 265 genes, se pueden identificar mutaciones causales de epilepsia, previamente reconocida como idiopática y presumiblemente genética, hasta en un 50% de los pacientes [100]. Sin embargo, su aplicación específicamente en la identificación de genes asociados a ER continua siendo desconocida. Recientemente se propuso a la biología de sistemas basada en paneles génicos por NGS o GWAS, como un elemento clave en el estudio molecular de las causas y factores de susceptibilidad a epilepsia [96]. Johnson *et al.* describieron una red constituida por más de 400 genes asociados a la epilepsia tras analizar la expresión génica en muestras de tejido cerebral extraídas de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, para luego evaluar si existían conjuntos de genes que se expresaban de forma conjunta y si estos podían tener implicaciones funcionales en la epilepsia. Sus resultados fueron puestos a prueba en un modelo de ratón que permitió demostrar la conservación de los mecanismos supuestamente implicados en epilepsia en ambas especies, lo que confirmó la utilidad de las aproximaciones de estudios de asociación y de la genética de sistemas como herramienta de estudio de enfermedades complejas, en este caso epilepsia.

En la mayoría de artículos revisados es claro que fenotipos de la epilepsia como es la refractariedad a FAE son dejados de lado. Mencionan algunos autores que la alta frecuencia intercrisis previa al inicio del manejo con FAE puede ser un factor de mal pronóstico y que se asocia a mediano plazo a farmacoresistencia, lo que sugiere que existen factores neurobiológicos propios de cada individuo afectado y otros comunes a varios pacientes que pueden estar relacionados tanto con la severidad del cuadro epiléptico como con la respuesta a FAE [40].

Existen reportes en la literatura de múltiples procesos a nivel cerebral que contribuyen con la farmacoresistencia promoviendo la severidad de los cuadros epilépticos [41]:

- Neuroinflamación.
- Aumento constitutivo de la transmisión sináptica excitatoria.
- Cambios en la inhibición GABAérgica.
- Muerte celular neuronal.
- Patrones aberrantes de inervación dependientes de un crecimiento axonal anormal.
- Entre muchos otros.

A pesar de que pueden parecer muy ‘amplios’ en el sentido en que no representan una única vía molecular, se han hecho esfuerzos por integrarlos y se ha encontrado que algunos genes que participan en una o varias vías de señalización relacionadas con esos procesos tienen un patrón de expresión muy característico en el tejido epiléptico farmacoresistente, y es muy diferente al patrón que se encuentra para otras patologías cerebrales, por ejemplo en tejido

cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer [42]. Lo anterior sugiere que alteraciones en la expresión no de uno sino de varios genes implicados en estos mecanismos biológicos podrían estar relacionadas con el mecanismo causante de la refractariedad, y es allí en donde radica la importancia del estudio genómico.

Una revisión sistemática de la literatura recoge metodologías de identificación de CNV patogénicas en epilepsia basadas microarreglos de expresión génica en tejido cerebral de pacientes con ER [42]. Aunque al menos 12 estudios de buena calidad se encuentran descritos en ella, no fue posible establecer mecanismos que se asocien fuertemente a la farmacorresistencia. Existe sin embargo entre todos ellos un solapamiento importante de los genes que se encuentran diferencialmente expresados en los pacientes con ER.

Con un análisis juicioso de esos genes solapantes los autores pudieron proponer un modelo de interacción molecular que podría asociarse con el desarrollo de refractariedad: Con genes regulados a la alta se construyó una red que revela que existe una disregulación de las proteínas involucradas en el mantenimiento de la morfología de las hendiduras sinápticas, que incide finalmente en su función. Con los genes regulados a la baja se construyó una red que revela que existe una disregulación de las proteínas involucradas en mecanismos apoptóticos, el crecimiento y la proliferación celular, y en el mantenimiento de la morfología neuronal. Los autores invitan a otros investigadores a utilizar este tipo de metodologías de análisis para encontrar datos que soporten las hipótesis actuales de farmacorresistencia o permitan formular otras. Y dicho esto, desde hace un par de años se empieza a detectar un aumento en la literatura de estudios sobre fenotipos epilépticos

[78,86,101,102,103]. Sin embargo, no existe evidencia suficiente que soporte el uso de la tecnología de microarreglos para el estudio rutinario de pacientes con ER en países en desarrollo como el nuestro, y solo en un caso se encuentra reporte en la literatura de cohortes de pacientes latinoamericanos en la que haya sido evaluado la genómica de la epilepsia [104], no describiéndose específicamente el fenotipo de refractariedad a los FAE.

Nosotros encontramos una duplicación 22q11.1 y una delección heterocigota 19q13.11q13.12 en el mismo paciente (ER13). El paciente no tiene el fenotipo para considerar en él diagnóstico de Síndrome por Microduplicación 22q11.2 que incluye en su espectro de presentación cardiopatía congénita, anomalías urogenitales, insuficiencia velofaríngea y trastornos del aprendizaje [105] y no tiene rasgos suficientes que permitan configurar una Epilepsia Autosómica Dominante con Afectación Auditiva (ADPEAF por sus siglas en inglés) en la que recientemente se describieron alteraciones en el locus 19q13.

En 2011, Piccione *et al.* reportaron el caso de un niño de 10 años de edad con epilepsia mioclónica con una duplicación *de novo* en la región cromosómica 22q11.2 [83]. Se encontró en el paciente una microduplicación de 630kb en 22q11.22q11.23 que comprometía 18 genes, la mayoría relacionados con la síntesis de la cadena ligera de la Ig Lambda, lo que llevó a los autores a especular que el fenotipo neurológico se debía a un efecto dosis dependiente de otros genes allí localizados relacionados con otros procesos biológicos, y les llamó la atención en particular el gen *Rab36* que codifica la proteína asociada a ras Rab36 que se cree está involucrada en el transporte de vesículas al interior de la célula.

Las GTPasas Rab catalizan la formación de dominios específicos en las membranas de diferentes tipos celulares, a las que son llevadas por medio de inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI por sus siglas en inglés), para unirse allí a proteínas efectoras de señales y ser posteriormente estabilizadas para participar de las cascadas de vías secretorias y endocíticas, con efectos que alcanzan incluso a la organización de los compartimentos del Complejo de Golgi (CG) para permitir el adecuado procesamiento, clasificación y secreción de vesículas [106]. Se cree que la sobreexpresión de Rab36 induce el clustering de lisosomas y endosomas al rededor del CG, y que de expresarse en tejido cerebral, Rab36 podría por los mecanismos mencionados antes interferir en el adecuado procesamiento de neurotransmisores, bien sea por alteraciones en la secreción o tráfico vesicular que alteran la función sináptica, o por compromiso del transporte de medicamentos anticonvulsivantes al interior de la barrera hematoencefálica [83].

Al evaluar las interacciones de Rab36 con otras proteínas utilizando la base de datos STRING, se pudo construir una red en la que varios nodos llaman la atención (Ver Figura 20).

Al menos 2 inhibidores de la disociación de GDP, GDI1 y GDI2, de gran importancia para la regulación de la disociación de nucleótidos de guanina que reduce la acumulación de GTPasa activa durante las vías de transducción de señales [107] interactúan con la proteína Rab3. De manera interesante, el gen que codifica para uno de estos inhibidores, el GDI1, se localiza en la región cromosómica Xq28, frecuentemente asociada con RM [108], y la cual encontramos alterada en otro de nuestros pacientes.

Aunque no los dos descritos aquí, existe un inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina que ha sido relacionado con epilepsia, el inhibidor de la disociación RabGDP alfa, cuya principal función es la regulación de mecanismos celulares de neurotransmisión en los que participan proteínas Rab pequeñas y cuyas mutaciones causan un tipo de RM ligado al X asociado a crisis convulsivas, que al parecer son causadas por hiperexcitabilidad neuronal secundaria a la inadecuada modulación de la sinapsis [109].

Existe un complejo proteico dentro de las células conocido como el retrómero, que se encarga del transporte vesicular del endosoma al CG para la recuperación de proteínas de membrana [81,110]. Tiene un subcomplejo que selecciona las cargas que contiene las moléculas VPS35, VPS29 y VPS26, y otro con las nexinas SNX1 y SNX2 que permiten la conformación tubular de los endosomas. El retrómero es reclutado a la membrana del CG por acción de la proteína RAB7 que al ser inhibida por TBC1D5 impide el adecuado transporte vesicular [111]. La disfunción del retrómero es un conocido factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas [112]. Tanto VPS35 como TBC1D5 se demuestran en la red molecular como proteínas relacionadas con Rab36, aunque al realizar la búsqueda en la literatura no se encontraron artículos científicos que expliquen su interacción.

En modelos animales se ha demostrado que la expresión de *VPS35* promueve la maduración de las dendritas en las neuronas del sistema nervioso central embrionario, principalmente en el hipocampo [112]. Mutaciones en *VPS35* se han relacionado con pobre supervivencia neuronal y sensibilidad neuronal aumentada a toxinas ambientales [113], y se cree

que el mecanismo por el que *VPS35* se relaciona con neurodegeneración en enfermedades como el Parkinson y la Demencia tipo Alzheimer subyace en la perturbación de la funcionalidad del retrómero que contribuye a una transmisión glutaminérgica alterada y a otras alteraciones metabólicas propiciadas en el microambiente neuronal como son trastornos de la función mitocondrial [114,115,116,117]. No se encuentra en la literatura evidencia suficiente para asociar *VPS35* con epilepsia.

Cuando las vesículas asociadas al retrómero se acercan al CG, específicamente al *trans*-Golgi, proteínas del complejo GARP son responsables del anclaje de estas a las membranas [118]. *VPS54*, importante componente del complejo GARP que en la red supuesta de interacciones de Rab36 aparece como asociada, ha demostrado en modelos animales que mutado causa desestabilización de todo el complejo, alterando el transporte retrógado de vesículas y confundiendo la señalización de proteínas endosomales y del CG, causando a largo plazo deterioro morfológico y funcional del CG [119,120]. Su disfunción se ha asociado principalmente a enfermedades de la motoneurona como Esclerosis Lateral Amiotrófica, pero los mecanismos específicos por los que llevaría a la enfermedad son aun pobremente comprendidos, aunque ampliamente estudiados [120,121,122].

Por otro lado, la red muestra que Rab36 interactúa con Ykt6, una proteína SNARE implicada en el transporte vesicular entre los compartimentos del CG neuronal y el re-ensamblaje del CG una vez se ha producido la mitosis [123]. La proteína Ykt6 actúa con la Sintaxina 5, la proteína Gos28 y la proteína GS15 para la regulación del transporte vesicular intra-Golgi, cuya importancia radica en lograr la adecuada acomodación de 'cargas pesadas' de

moléculas que deben ser secretadas y que no pueden ser insertadas en vesículas de transporte de tamaño promedio [106]. *Ykt6* tiene altos niveles de expresión en neuronas del sistema nervioso central, y aunque se cree que está indirectamente relacionada con la exocitosis de las vesículas sinápticas su función en el cerebro aun no es clara [124,125].

La proteína RILP, más ampliamente conocida como Prickle1, se ha descrito como asociada con Epilepsia Mioclónica Progresiva (PME por sus siglas en inglés), un síndrome caracterizado por crisis convulsivas mioclónicas usualmente generalizadas y grados variables de deterioro cognitivo posterior al inicio de crisis, relacionado principalmente con demencia [126]. Varios trabajos de investigación lograron mapear como causa de este síndrome a alteraciones en la región cromosómica 12q12-q13, considerando inicialmente que se trataba de un fenotipo alélico a la Enfermedad de Unverricht-Lundborg, la forma más pura y menos grave de PME [127,128]. Sin embargo, llamaba la atención de los investigadores que los individuos afectados en las familias estudiadas cursaban inicialmente con ataxia desde los 4 a 5 años de edad, para posteriormente hacer un cuadro clínico inequívoco de PME [126]. Por esto, Bassuk *et al.* decidieron resecuenciar 47 genes contenidos en la región cromosómica descrita, y encontraron en todas las familias afectadas una mutación missense homocigota en *PRICKLE1* (c.311G→A, R104Q) que altera un aminoácido altamente conservado evolutivamente y entre especies, llevándolos a la conclusión que eran las alteraciones en este gen las responsables del fenotipo, un síndrome de herencia autosómica recesiva de PME y ataxia [126]. Posteriormente, se ha confirmado que la proteína Prickle1 se expresa en múltiples regiones de la corteza cerebral, algunas de ellas consideradas importantes focos epilépticos como el hipocampo y el tálamo, y también

en la corteza cerebelosa, lo que explicaría los asociados fenotipos de ataxia, y se ha demostrado en modelos animales que la interrupción de la interacción entre Prickle1 y la proteína REST resulta en enfermedad neurodegenerativa [126]. Recientemente también se ha asociado a Prickle1 con agenesia del cuerpo caloso y polimicrogiria [129].

Valvo *et al.* reportaron el caso de una niña de 6 años con una microduplicación en 22q11.2 con Epilepsia de Picos y Ondas Continuas durante el Sueño (CSWS por sus siglas en inglés), con trastorno del comportamiento (ADHD) posterior a la epilepsia. Describen que el Síndrome por Microduplicación 22q11.2 reportado en la literatura incluye: rasgos dismórficos, anomalías cardíacas, trastornos del comportamiento o trastornos del movimiento corporal, pero no existen suficientes reportes en los que pacientes afectados cursan con epilepsia como para incluir a este fenotipo neurológico como característico, y ningún reporte en el que los pacientes sufran específicamente de CSWS [84]. Dado que en otros síndromes causados por alteraciones genómicas en esta región cromosómica (DiGeorge, velocardiofacial) se ha descrito como posible causa que los Low copy repeats (LCRs22) y elementos Alu que funcionan como substratos de la recombinación meiótica NAHR se alteren, los autores proponen que en esta paciente los LCRs 22A y 22D que rodean la duplicación de 2.5 Mb descrita contengan genes aun no descritos que pudieran relacionarse con la epilepsia [84].

Deleciones intersticiales en el brazo largo de cromosoma 19 han sido relacionadas con el síndrome de genes contiguos caracterizado por retardo del crecimiento uterino y posnatal,

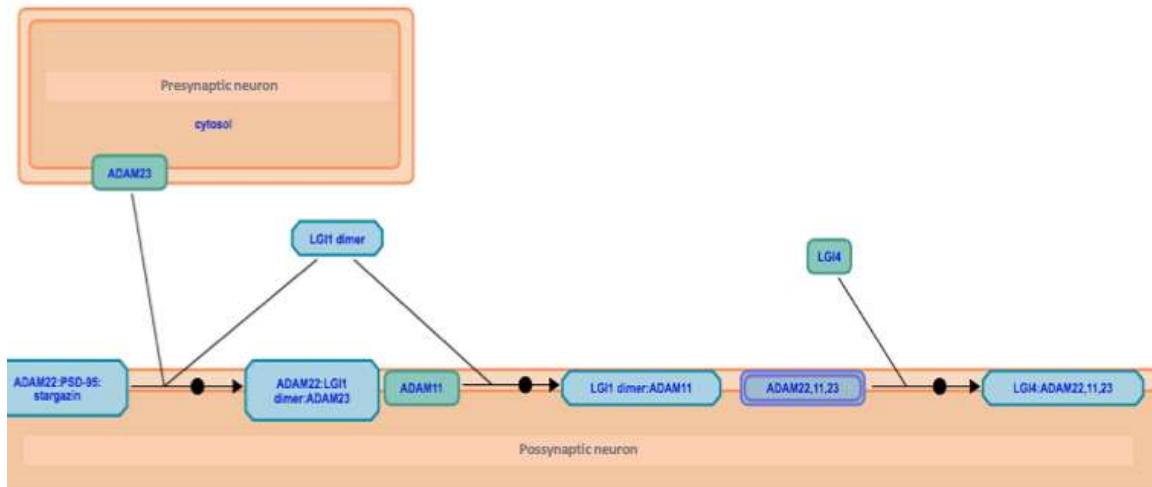
trastornos de la deglución, microcefalia, anomalías urogenitales y alteraciones de la piel [130,131].

Específicamente en la región 19q13.11 se localiza el gen *LGI4*, asociado con Convulsiones Neonatales e Infantiles Benignas Familiares (BFIS por sus siglas en inglés) y Epilepsia Infantil de tipo Ausencia [132,133]. *LGI4* es un gen que se expresa en altos niveles en el neuroporo rostral durante el desarrollo embrionario y en las células de Purkinje cerebelosas, en los compartimentos intracelulares correspondientes al Retículo Endoplasmático (RE), el CG y las vesículas de transporte [134] cuya función no se conoce completamente.

Se construyó una red de interacciones proteicas para *LGI4* utilizando la herramienta bioinformática STRING, y se realizó una búsqueda en la literatura sobre la relación de los diferentes nodos involucrados con mayor fuerza de asociación y epilepsia (Ver Figura 21).

LGI4 interactúa como ligando de dos proteínas ADAM, familia de glicoproteínas ancladas a la membrana celular que contienen un dominio desintegrina y un dominio metaloproteasa [135]. Estas son ADAM22 y ADAM23, responsables de la escisión proteolítica de muchas proteínas transmembrana y de la liberación de su dominio extracelular (Figura 26). Particularmente ADAM22 es un probable ligando de las integrinas en el cerebro, involucrada con la regulación de la adhesión celular y la inhibición de la proliferación, y receptor neuronal para *LGI1*, paróloga de *LGI4* [136]. La función de ADAM23 es menos conocida.

Figura 26. Esquema de la interacción entre las proteínas ADAM22 y ADAM23 y LGI1 obtenido en el repositorio REACTOME.



Mutaciones en *LGI1* han sido descritas en aproximadamente el 50% de pacientes ADPEAF y en al menos el 2% de pacientes con Epilepsia Parcial Idiopática con Afectación Auditiva (IPEAF por sus siglas en inglés) [80,137,138]. También se ha asociado a *LGI1* como el autoantígeno responsable de la Encefalitis Límbica, un trastorno neurológico que oncluye crisis convulsivas dentro de su cuadro clínico [139].

Fukata *et al.* demostraron que *LGI1* aumenta la transmisión sináptica mediada por receptores AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) en el hipocampo. *ADAM22*, que atrae a *LGI1* como su ligando, en estado mutado falla y las dos proteínas no pueden asociarse, lo que impide que prosiga adecuadamente la transmisión sináptica y resulta en el anclaje de *ADAM22* a las membranas postsinápticas ricas en subunidades de canales de Calcio codificadas por el gen *CACNG2*, también relacionado con el gen *LGI4*. La

subunidad gamma 2 participa en el transporte de los receptores AMPA hacia las membranas sinápticas, para la regulación de la sinapsis rápida en la corteza cerebral [140]. Todos estos mecanismos interdependientes se relacionan con fenómenos epileptógenos.

Letts *et al.* describieron en un modelo animal la primera asociación de disrupción homocigota del gen *CACNG2* y crisis epilépticas de tipo ausencias [141], en el que la disminución en la expresión de *CACNG2* en conjunto con la de otros canales de Calcio predispone al aumento en la frecuencia de crisis convulsivas y la severidad de las mismas. Otros estudios sugieren más bien una actividad supresora de crisis por *CACNG2* cuando también se altera la expresión de su homólogo *CACNG4* [142].

De acuerdo con lo reportado en la red, tanto *LGI4* como *LGI1* interactúan de forma indirecta con el canal de potasio dependiente de voltaje *KCNA2*. Este miembro de la subfamilia *shaker* de canales de potasio dependientes de voltaje fue por primera vez reportado como asociado con epilepsia en seres humanos por Pena *et al.* [143], puesto que previamente se había relacionado en un modelo murino con ataxia y crisis convulsivas [144,145]. Pena *et al.* describieron una variante mutacional que en la proteína altera la conformación del sensor de voltaje, lo que es primordial para el adecuado funcionamiento del canal, por lo que se consideró como patogénica, pero sugirieron análisis funcionales debían ser llevados a cabo para confirmar a las mutaciones en *KCNA2* como causales de un nuevo fenotipo de Canalopatía. Poco tiempo después de este reporte, Syrbe *et al.* describieron 4 diferentes mutaciones de novo en *KCNA2* en seis pacientes no relacionados que padecían encefalopatías epilépticas, y realizaron en estudio funcional de las mutaciones encontradas

reportando tanto pérdida como ganancia de función del canal o efecto dominante negativo, sugiriendo que el fenotipo epileptógeno puede darse tanto por hiperexcitabilidad neuronal como por silencio eléctrico en las membranas que expresan el canal [146]. Recientemente se consideró que el fenotipo causado por mutaciones en *KCNA2* también incluye crisis convulsivas que tienen buena respuesta a los FAE y ataxias episódicas [147].

En el paciente ER14 se detectó una delección homocigota 1p36, asociada a una duplicación 18p11.31. Li *et al.* mediante un análisis de ligamiento basado en eventos de recombinación mapearon el locus más probablemente relacionado con el diagnóstico de BFIS a un intervalo de 12.4-cM de tamaño entre los marcadores D1S2864 y D1S2830, que corresponden a la región 1p36.12-p35.1 (NCBI Map Viewer Build 34), dato que soporta la asociación de la región cromosómica 1p36 con fenotipos de epilepsia [71].

La primera descripción clínica que relacionaba a la región cromosómica 1p36 con epilepsia la realizaron Bahi - Buisson *et al.* en 2008, con un estudio retrospectivo de 91 pacientes con diagnóstico de delección 1p36 [70]. El 87.9% de los pacientes tenía una delección 1p36 pura y 12.1% tenía un rearrreglo complejo. 58% de los pacientes presentó epilepsia: las crisis iniciaron en los primeros 6 meses de vida en el 79.2% de ellos, teniendo 25 de ellos crisis generalizadas, 6 crisis focales simples y 4 crisis focales complejas. Todos los pacientes recibieron manejo anticonvulsivante (excepto uno a quien por frecuencia ictal decidieron suspender), y en el seguimiento, 35.9% desarrollaron ER. Cabe anotar que los pacientes que iniciaron crisis como espasmos infantiles o crisis focales y recibieron por tal motivo esteroides como tratamiento antes que otros FAE, respondieron mejor al control de crisis

que quienes iniciaron con FAE distintos, por lo que los autores proponen que en pacientes con Deleción 1p36 con crisis iniciales de tipo espasmos infantiles, se deberían utilizar esteroides a altas dosis para lograr adecuado control de la epilepsia. En nuestro paciente, no tenemos récord en la historia clínica que indique que las primeras crisis convulsivas fueran espasmos infantiles, y actualmente como se mencionó cursa con crisis de tipo ausencias, y no tiene por tal razón manejo anticonvulsivante con corticoesteroides.

Saito *et al.* reportaron el caso de un niño de 3 meses de edad con crisis focales simples y espasmos infantiles, con RNM cerebral simple con polimicrogiria perisilviana. Tenía un rearreglo complejo en el cariotipo 46,XY,der(1)t(1;4)(p36.23;q35) con gran deleción 1p36 de 8.6Mb [72]. Este paciente fue tratado exitosamente con pulsos de ACTH con normalización posterior del EEG, lo que estaría en congruencia con lo reportado previamente por Bahi - Buisson *et al.*

Kanabar *et al.* realizaron un estudio retrospectivo de pacientes con deleción 1p36 con fenotipo concomitante de epilepsia y apnea del sueño, y describieron sus características cónicas, la semiología de las crisis epilépticas y datos de EEG. Todos los pacientes presentaban asociado dismorfismo facial, RM e hipotonía. La semiología sugería en todos ellos crisis focales o focales que secundariamente generalizan, tanto tónicas como tónico-clónicas. Los autores plantean que la identificación de los riesgos potenciales asociados a la epilepsia en pacientes con deleciones en la región cromosómica 1p36 permite enfocar de forma diferente su tratamiento y seguimiento y hacer un esfuerzo aun mayor por lograr en ellos el control de las crisis, puesto que encontraron una asociación positiva entre los picos

de descargas anormales en los trazados electroencefalográficos y los episodios de apnea, que ponen en riesgo la vida de los afectados [74].

Paciorkowsky *et al.* reportaron que grandes deleciones en 1p36 (4 a 8 Mb) se detectan en pacientes con espasmos infantiles, y que el 25% de los pacientes con diagnóstico de Síndrome por Delección 1p36 tendrá espasmos infantiles. La región crítica comprometida por el descrito Síndrome por Delección 1p36 compromete clásicamente varios genes, entre los que destacan *GABRD*, *KCNAB2*, y *KLHL17*, que codifica una proteína que interactúa con *GRIK2* y que sería clave en la regulación pos-sináptica [73].

Shimada *et al.* realizaron estudio genómico para detección de CNV por microarreglos a pacientes con sospecha diagnóstica o diagnóstico confirmado de Delección 1p36, y proponen a *KCNAB2* como gen candidato para explicar los diferentes tipos de epilepsias, encefalopatías epilépticas y otros fenotipos neurológicos como RM severo/profundo que padecen los pacientes [75]. En su trabajo, es interesante además el análisis de correlación genotipo - fenotipo que mostró que el tamaño de delección más probablemente relacionada con más leve fenotipo neurológico y dismorfismo facial en los pacientes comprende entre 1.8 - 2.1 y 1.8 - 2.2 Mb, y que pacientes con deleciones > 6.2 Mb tuvieron fenotipos neurológicos muy severos. Sin embargo, recientemente Yamamoto *et al.* reportan que no consideran que el tamaño de la delección se relacione con la severidad del fenotipo, puesto que algunos pacientes con deleciones muy pequeñas pueden padecer epilepsias intratables [75].

KCNAB2 es un gen que codifica para la subunidad Beta de un tipo de Canal de Potasio, cuya porción citoplasmática modula la conformación característica de las subunidades alfa [148]. Participa en la regulación de la señalización neuronal aumentando la actividad del canal y evitando la hiperexcitabilidad [148].

Pacientes con sospecha de Deleción 1p36 fueron evaluados por Heilstedt *et al.* realizándoles FISH para pérdida de *KCNAB2*. 37.5% de los pacientes presentaron deleción de las sondas correspondientes a *KCNAB2*, y el 89% de estos cursaba con diferentes tipos de epilepsia, mientras que en aquellos pacientes en que no se detecto la deleción solo el 27% sufría de crisis convulsivas, lo que lleva a pensar a los autores que la pérdida de la subunidad beta del Canal de Potasio podría, por alteración de la repolarización de la membrana y aumento de la excitabilidad neuronal, ser la causa de la predisposición a presentar crisis convulsivas [149]. En el caso de nuestro paciente, la deleción en la región cromosómica 1p36 era homocigota, pero se han reportado deleciones hemicigóticas que también se presentan en pacientes con epilepsia, luego la haploinsuficiencia de *KCNAB2*, o bien de otros genes allí localizados, también podría jugar un papel como causa de crisis convulsivas [149].

Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) como *KCNAB2* controlan el flujo de iones potasio a través de las membranas celulares basándose en la diferencia de potenciales eléctricos a ambos lados de estas [150]. La familia Kv, compuesta por canales formados por cuatro subunidades y seis segmentos transmembrana, se estudia desde su descripción a partir del mutante *Shaker* de *Drosophila melanogaster* [151] y es la familia de canales iónicos más diversa.

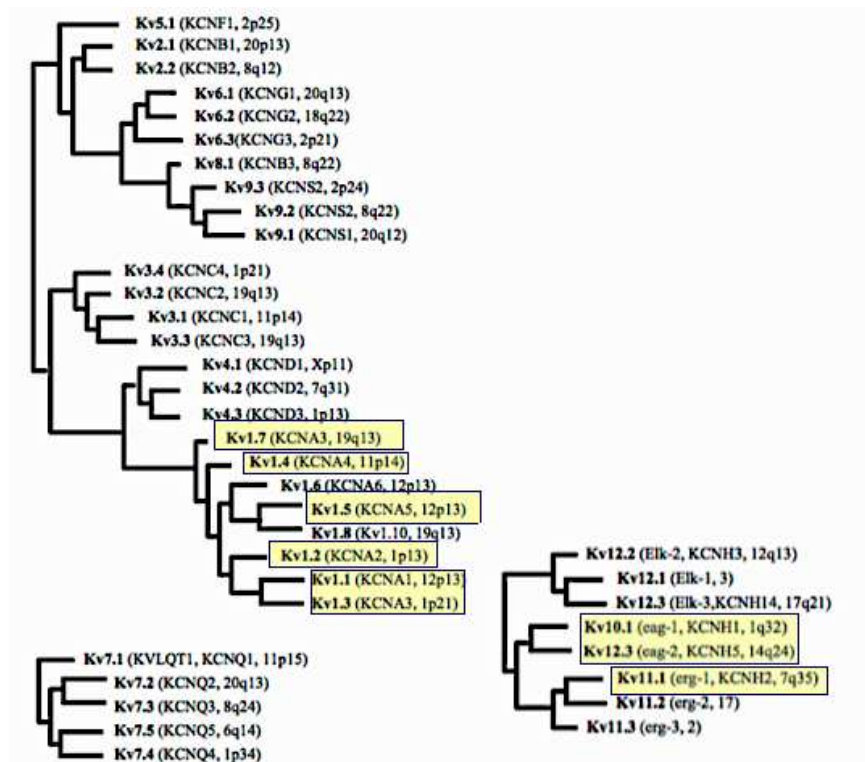
En modelos murinos, las células gliales expresan mRNA de diferentes tipos de canales de potasio dependientes de voltaje, principalmente Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5 y Kv1.6, los cuales también se ven sobrerrepresentados en las membranas celulares en los estudios de inmunohistoquímica [152]. Así mismo, se ha visto que las corrientes de K(+) fluyen predominantemente a través de los canales que se forman por complejos heteroméricos como en Kv1.5 y en menor proporción por homoméricos como Kv1.4 o Kv1.6 [152]. Estos resultados son importantes para demostrar como en tejido cerebral se expresan varios tipos de canales iónicos dependientes de voltaje, luego si en realidad están interrelacionados como lo sugiere la red construida con la herramienta STRING, tendría sentido que la alteración de alguno de ellos actuara como modificadora de todo el fenotipo de repolarización de las membranas. También existe evidencia que reporta como en el sistema nervioso central, puede modificarse la conformación de algunos de los canales de potasio dependientes de voltaje, en función de la región cerebral o el tipo celular [153].

Hay fenotipos neurológicos asociados claramente a alteraciones en los canales de potasio dependientes de voltaje. La Ataxia Episódica Tipo 1 (EA1 por sus siglas en inglés) por ejemplo es causada por mutaciones puntuales en el gen KCNA1 que codifica para el canal Kv1.1 [154,155,156]. Este canal de potasio también se ha asociado a epilepsia por un mecanismo relacionado la vía de señalización NRG1-ErbB4 que fue estudiado en un modelo murino pero que no se comprende completamente, y se necesita mayor evidencia para determinar si en efecto Kv1.1 tendría alguna implicación causal en estos fenotipos [157].

Figura 27. Esquema filogenético de los canales de Potasio dependientes de voltaje.

En amarillo se resaltan canales que se relacionan con KCNAB2 según la red de interacción proteica construida con STRING.

* Tomado y Modificado de García RV. *et al.* [150].



Como se mencionó antes, el canal de potasio dependiente de voltaje KCNA2 fue reportado como asociado con epilepsia por Pena *et al.* (Pena SDJ, 2015), quienes describieron una variante mutacional que en la proteína altera la conformación del sensor de voltaje, lo que es primordial para el adecuado funcionamiento del canal [143]. Además, Syrbe *et al.* describieron mutaciones en *KCNA2* como causa de encefalopatías epilépticas [146]. Según la evidencia, deleciones o mutaciones en los genes que codifican los canales de potasio

Kv1.1 y Kv1.2 (*KCNA1* y *KCNA2*) resultan en trastornos de la excitabilidad neuronal [158,159].

El modelo animal de ratones *Kcna1*-null causa en los murinos un fenotipo de epilepsia límbica similar al fenotipo humano de la MTLE, con EEG que demuestran crisis parciales que secundariamente generalizan [160]. Por otra parte, murinos *Kcna2*-null desarrollan un fenotipo epiléptico más severo, con crisis con semiología de tallo tan graves que causan rápidamente la muerte [144]. Apoyados en estos modelos, y según la creciente cantidad de reportes de pacientes con alteraciones en *KCNA1* y *KCNA2* consideradas causales de epilepsia, se describe a estos genes como “*hotspots para epileptogénesis*” [161].

Addis *et al.* realizaron estudio genómico para detección de CNV por microarreglos a 144 niños con epilepsias de tipo ausencia. Llamativamente, se encontró duplicación y no deleción en la región 1p36.33 en un paciente del estudio, de 914 Kb, en la que se compromete el gen *KLHL17*, ya propuesto como candidato por Paciorkowsky *et al.* [78]. Se construyó una red molecular a partir de este gen utilizando la herramienta bioinformática STRING (Ver Figura 23), dado que adicionalmente a estos dos reportes, no se encuentra información en la literatura sobre asociación de este gen y epilepsia.

El nodo que corresponde al gen *GRIK2*, destaca entre los demás. A pesar de que Sander *et al.* descartaron a *GRIK2* como relacionado con epilepsias generalizadas idiopáticas [162], recientemente se reportó en hermanos hijos de padres consanguíneos y afectados por grados variables de RM, epilepsia, distonía y trastornos del comportamiento una mutación

homocigótica de tipo non-sense en este gen, que codifica para el Canal Ionotrópico de Glutamato tipo 6 [163]. Además, en población Han de China central hace pocos meses se reportó una asociación de los polimorfismos rs9390754 y rs4840200 en *GRIK2* con epilepsia. El primero, con mayor riesgo a presentar el fenotipo epileptógeno, y el segundo con mayor riesgo de presentar farmacorresistencia si se es portador del alelo C. Se verificó en nuestros pacientes el genotipo para este polimorfismo según este reporte, pero se encontró en ellos presencia de alelo T [164].

Zhang *et al.* reportaron el caso de tres pacientes con ER con delección 1p36, estudiados por diferentes metodologías citogenéticas: Cariotipo de alta resolución, MLPA, FISH, aCGH/SNP. En dos de los casos la CNV en 1p36 comprometía al gen *PEX10* por alteraciones *de novo*, demostrando por RTPCR que este gen estaba sobreexpresado en un caso y disminuído en el otro, lo que a pesar de ser discordante sugiere, según los autores, que la expresión anormal de *PEX10* causada por CNV en esta región cromosómica podría relacionarse con el fenotipo de epilepsia en los pacientes [77].

PEX10, como codificador de una de las proteínas implicadas en la biogénesis de los peroxisomas, se ha descrito involucrado en trastornos de este tipo de herencia autosómica recesiva autosomal, que usualmente tienen compromiso multisistémico. En un modelo animal, Hanson *et al.* describieron que individuos con trastornos de la biogénesis de los peroxisomas con mutaciones en *PEX10* pueden desarrollar compromiso neurológico dado por neuropatía periférica de aparición temprana [165]. Reportan que durante la embriogénesis los ratones *Pex10* mutantes homocigotos experimentan pérdida progresiva

de los movimientos, y al nacimiento o a las pocas horas desarrollan falla ventilatoria secundaria a debilidad de los músculos accesorios para la respiración, encontrándose en la neuropatología hallazgos compatibles con daño espinal por la alteración metabólica.

Como mencionamos en los resultados, en la región 18p11.31 se localizan más de 10 genes, solo dos de ellos relacionados con enfermedad: *LPN2* y *TGIF1*. *LPN2* codifica para la proteína Lipina 2 implicada en el metabolismo lipídico y relacionada con un tipo de Lipodistrofia en pacientes que dentro del fenotipo no padecen crisis convulsivas, por lo que no se incluyó en el análisis. Por su parte, *TGIF1*, que codifica una proteína de homeodominios atípicos con extensiones en bucle de tres aminoácidos (TALE) que actúa como reguladora transcripcional, es un correpresor transcripcional activo de proteínas SMAD y podría participar en la transmisión de señales nucleares durante el desarrollo y en el adulto, expresándose en tejido cerebral según varios modelos de desarrollo animal [88]. Mutaciones en *TGIF1* se asocian con holoprosencefalia y recientemente con ER [166,167].

Maurer-Morelli *et al.* realizaron un análisis de ligamiento en una familia con MTLE, característicamente refractaria a los tratamientos farmacológicos habituales [79], identificando a la región cromosómica 18p11.31 como candidata para el desarrollo de este fenotipo, con un LOD score positivo significativo con Z max. de 3.12 en el marcador D18S452. Verrotti *et al.* reportaron el caso de un paciente masculino de 5 años de edad con epilepsia severa con crisis frecuentes de corta duración de tipo ausencia y atónicas, además retardo global del desarrollo, con algunas anomalías menores al examen físico. El paciente tenía neuroimagen por RNM con hiperintensidades subcorticales inespecíficas en el

hemisferio izquierdo por lo que no se consideraba epilepsia lesional, y se le inició tratamiento con valproato al menos por dos meses con posterior mala respuesta, tras lo que se decidió adición de etosuximida, con respuesta aceptable por varios meses. Hizo un estatus convulsivo de larga duración por el que ingresa admitido a urgencias en donde toman EEG que demostró descargas pico-onda bilaterales, sincrónicas, con frecuencia de 3–3.5 Hz y duración de 4 a 10 segundos alternantes con complejos de onda lenta de 3–4 Hz, y un ritmo final sincrónico simétrico teta-delta. Se decidió entonces adicionar topiramate al manejo (continuando valproato y etosuximida), lo que en el EEG de control 1 mes después demostró disminución de la frecuencia de las descargas anormales. Se le realizó aCGH que detectó una deleción de 4.6 Mb en 18p11.32p11.31 sobrelapante con la región que contiene al gen *TGIF1* registrada en OMIM como la región de Holoprosencefalia Tipo 4 (MIM 142946) [168].

Hasta el momento de publicación de ese artículo no había registro en la literatura indexada de asociaciones de esta CNV con epilepsia, pero si tres casos incluidos en los repositorios DECIPHER y Database of Genomic Variants (DGV) de pacientes que dentro de su fenotipo patológico presentaban crisis convulsivas, sin dato en las descripciones clínicas sobre la respuesta a tratamientos [168]:

El primero, DECIPHER ID 255600, se trata de un paciente masculino con trastorno deglutorio, hipoacusia, cardiopatía congénita, anomalía genitourinaria asociada a infecciones urinarias recurrentes, retardo del crecimiento y antecedente de necrosis avascular de la cabeza femoral, espina bífida oculta, trastorno del comportamiento, trastorno del lenguaje, RM y crisis convulsivas focales [169]. El segundo caso, DECIPHER ID 282667,

se trata de un paciente masculino con diabetes insípida e hiponatremia crónica secundaria asociado a múltiples malformaciones congénitas: Microcefalia, hipotelorismo ocular, puente nasal deprimido, labio y paladar hendido. Además, el paciente padecía de crisis convulsivas de semiología no especificada, con hallazgo imagenológico de holoprosencefaia semilobar [170]. El tercer y último caso detectado en las bases de datos, se trata de un paciente con epilepsia generalizada refractaria a tratamientos farmacológicos en quien en la neuroimagen por RNM no se encontró ninguna disgenesia cortical, a anotar sin signos de holoprosencefalia [171].

Alteraciones en esta región cromosómica también han sido ampliamente descritas en pacientes con fenotipos normales o RM leve, por lo que Keaton *et al.* sugieren su carga genética es de penetrancia incompleta y expresividad variable [172].

Se encuentra en la literatura un reporte de una paciente colombiana portadora de una deleción 18p11.32-p11.21 de 11964 Mb, considerada una CNV de gran tamaño, con un fenotipo neurológico leve y con múltiples anomalías menores al examen físico: Se trata de una niña de en edad escolar, hija de padres no consanguíneos, sin antecedentes pre o perinatales de importancia. Enviada a valoración genética por retardo en el desarrollo psicomotor con compromiso predominante del lenguaje, y en quien al examen físico se describe talla baja con peso en percentiles inferiores, cara alargada, sinofris, arcos cigomáticos prominentes, incisivos centrales anchos, hiperpigmentación de los dientes, hipoplasia del hemitórax izquierdo, pectus excavatum, clinodactilia del quinto dedo bilateral, y sindactilia del segundo y tercer artejo bilateral [173].

Dicho lo anterior, se decidió construir una red molecular alrededor del gen *TGIF1*, candidato más fuerte a causar los fenotipos neurológicos en los pacientes con deleciones en la región cromosómica 18p11 (Ver Figura 24).

SMAD2 y *SMAD3*, los dos genes relacionados con *TGIF1* que inicialmente llaman la atención en la red, son estructuralmente muy similares y se considera que regulan de formas equiparables las señales en la vía del $TGF\beta$ [174]. Se ha encontrado que después de lesiones isquémicas con reperfusión cerebral las proteínas Smad2/3 exhiben efectos neuroprotectores por activación de vías anti-inflamatorias y anti-apoptóticas [175]. En tejido cerebral murino, la isoforma Smad2 (Delta exon 3) es la más abundante. A través del desarrollo y el envejecimiento de los animales se ha visto un cambio en los patrones de expresión de esta isoforma en particular y de otras proteínas SMAD, lo que sugiere que cumplen en efecto un papel especial durante la maduración cerebral [176], lo que se soporta en estudios adicionales que demuestran que ratones Smad2-CNS-KO (Knock Out para SMAD2 en el Sistema Nervioso Central) cursan con múltiples alteraciones del desarrollo motor (principalmente incoordinación motora / ataxia) y del comportamiento [177].

Smad3 se expresa altamente en las neuronas de la granulosa en el giro dentado de ratones adultos, en las células progenitoras de la subgranulosa, y en otras regiones cerebrales en menor proporción, persistiendo a través de las distintas etapas del desarrollo [178].

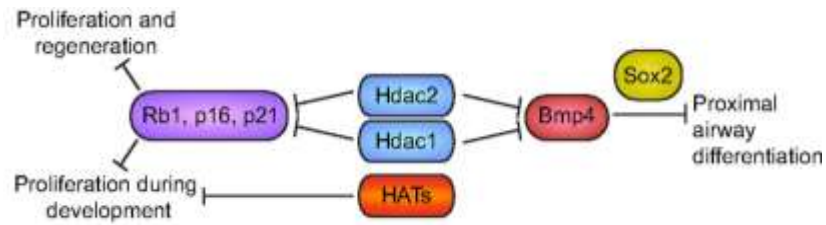
La deficiencia de Smad3 promueve el catabolismo de dopamina en el núcleo estriado, disminuye la capacidad de soporte de los astrocitos a las neuronas dopaminérgicas y puede inducir agregación de la proteína α -sinucleína. Todo lo anterior se relaciona con parkinsonismo, lo que ha sugerido a las proteínas Smad como blancos terapéuticos futuros [179]. Este modelo animal deficiente en Smad3 representa un importante avance en el estudio de la Enfermedad de Parkinson, pues exhibe disfunción hipocampal, neurogénesis disminuida y falla funcional del giro dentado, en donde como se mencionó antes se expresa en altos niveles [180].

Otro de los nodos que destaca en la red de interacción proteica para TGIF1 es el correspondiente al gen *SIN3A*. Witteveen *et al.* describen mutaciones en este gen en pacientes con RM, trastornos del espectro autista, crisis convulsivas, anomalías menores al examen físico, talla baja y microcefalia, características del Síndrome por microdelección 15q24, región en donde se encuentra ubicado el gen [181].

El gen *HDAC1* codifica para la Histona Desacetilasa 1. Es ampliamente conocido que las histonas juegan un papel crucial en la regulación de la transcripción del material genético, y que alteraciones en ellas se han relacionado con múltiples fenotipos de enfermedad. La proteína HDAC1 interacciona principalmente con Rb1 formando un complejo que es un elemento clave en el control de la proliferación celular y la diferenciación celular [182].

Figura 28. Esquema de la interacción entre HDAC1, otras proteínas histonas y Rb1 y algunos efectos.

* Tomado y modificado de Herriges M. *et al.* [182].



En el sistema nervioso en desarrollo, las células de la glia radial son progenitoras transitorias cuya proliferación y diferenciación está guiada por diferentes mecanismos genéticos y ambientales. Tao *et al.* describieron en un modelo animal (*Xenopus laevis* – Rana africana) que la expresión de *HDAC1* está regulada a la baja durante el desarrollo cerebral, especialmente en la corteza periventricular, y que la disminución programada de sus niveles por acción de morfolinós modifica secundariamente la acetilación de histonas H4 (H4K12), permitiendo la liberación del DNA para favorecer la transcripción génica, lo que resulta en la proliferación y diferenciación de las células de la glia radial [183]. Estos mecanismos epigenéticos regulados por *HDAC1* y otras histonas podrían no solo relacionarse con este proceso del desarrollo cerebral, sino con otros que si pudieran estar implicados en epileptogénesis. Sin embargo, no hay evidencia al respecto.

Por interacción con la proteína FUS de unión al ARN, la HDAC1 ha sido relacionada a Esclerosis Lateral Amiotrófica. En familias con mutaciones en FUS se ha demostrado alteración en la reparación del DNA y baja actividad de las histonas desacetilasas durante el ciclo celular, particularmente de la HDAC1 [184]. Defectos en la reparación del DNA relacionados con las histonas desacetilasas también se describen como relacionados con el deterioro cognitivo secundario al envejecimiento y a enfermedades neurodegenerativas, y se ha descrito un papel neuroprotector de la HDAC1 para este fenotipo por un mecanismo relacionado con unión a la proteína SIRT1 necesaria para la reparación de daños en la doble hebra por el mecanismo de unión de extremos no homólogos [185].

En el paciente ER16 se detectó una deleción de la región cromosómica Xq28. En la literatura se encuentran múltiples reportes de variantes en el número de copias de esta región cromosómica asociadas a fenotipos neurológicos:

Las variantes en el número de copias en la región cromosómica Xq28 son hasta ahora la aberración cromosómica más frecuentemente descrita en pacientes con RM, particularmente en hombres. Pero no se trata de deleciones, sino de duplicaciones que ocurren por diversos mecanismos que incluyen la duplicación intersticial mediada por duplicación segmentaria y las duplicaciones terminales o disomías funcionales. El gen en esta región que con mayor frecuencia se ve involucrado es el gen *MECP2*, asociado a fenotipos de RM severo, epilepsias muy refractarias a los manejos farmacológicos, y predisposición a las infecciones recurrentes que empeoran significativamente la salud de los pacientes, particularmente como causa de Síndrome de Rett [108]. En nuestra paciente sin

embargo, este gen no se encuentra comprometido, y no cumple criterios para considerar el diagnóstico sindromático.

Hino-Fukuyo *et al.* demostraron una CNV patogénica en Xq28 dada por duplicación de esta región en pacientes con Síndrome de West, el cual es el diagnóstico actual de la paciente que reportamos. Adicionalmente, se encuentran reportes sobre alteraciones en Xq28 asociadas con RM ligado a X, displasias corticales, glaucoma y síndromes dismórficos [86].

El gen *TMLHE*, localizado en esta región cromosómica y comprometido en nuestra paciente, codifica para una enzima que cataliza la conversión de epsilon-N-trimetilisina a beta-hidroxi-N-epsilon-trimetilisina en el primer paso de la síntesis de L-carnitina [186]. Deficiencias en este gen se han asociado principalmente a trastornos del espectro autista, existiendo ya 2 variantes en el número de copias y 3 mutaciones descritas como patogénicas en autismo de herencia recesiva ligada al X [186]. Sin embargo, no se encuentran reportes en la literatura de asociación específica de este gen con síndromes epilépticos.

Se construyó para *TMLHE* una red de interacción molecular, una vez más valiéndonos de la herramienta bioinformática STRING (Ver Figura 25).

El gen *ALDH18A1*, uno de los que ha sido representado en nuestra red, codifica la enzima P5CS que participa en la síntesis de ornitina y prolina, necesarios para el adecuado desarrollo de diferentes tejidos blandos ricos en elastina y colágeno [187]. En relación con su función, sus alteraciones causan principalmente fenotipos de Cutis Laxa (MIM 616603,

MIM 219150). Sin embargo, recientemente varios grupos de investigación han reportado su asociación con fenotipos neurológicos, que ya se encuentran registrados en repositorios clínicos como OMIM (MIM 601162, MIM 616586).

La caracterización de una familia neozelandesa con Cutis Laxa que además presentaba fenotipos neurológicos diversos (retardo global del desarrollo/RM severos, coreoatetosis y otros movimientos anormales) permitió la identificación de una mutación ancestral en *ALDH18A1* de tipo missense (2350C>T - H784Y). Tras un análisis in vitro e in vivo a partir de fibroblastos de la dermis de un individuo afectado de una de las familias, se demostró que la sustitución de aminoácidos en la proteína P5CS no afectaba la biosíntesis de ornitina ni prolina, por lo que los autores sugirieron que existieran funciones aun no caracterizadas de P5CS que afectan al tejido conectivo y al tejido nervioso por otros mecanismos [188]. Más reciente es la publicación de Gardeitchik *et al.* en la que los autores se aventuran a asociar definitivamente a mutaciones en *ALDH18A1* con fenotipos neurológicos en pacientes con Cutis Laxa: Aunque la epilepsia en estos pacientes es más común cuando hay mutación en *ATP6VOA2*, disgenesia del cuerpo caloso y posturas distónicas sí fueron relacionadas con nuestro gen de interés [189].

Panza *et al.* reportaron que mutaciones en el gen *ALDH18A1* causan Paraplegia Espástica Autosómica Dominante Tipo 9 (SPG9) [190]. En dos familias con SPG9 detectaron mutaciones heterocigotas de *ALDH18A1* que resultan en pérdida de la actividad de la proteína P5CS, por efecto dominante negativo.

Otro de los genes implicados en la red molecular es el *PTCHD1*. Su función no es completamente conocida pero por estudios con genes reporteros se ha sugerido que forma parte de la vía de señalización de Sonic Hedgehog [191]. Aunque no se ha asociado específicamente con epilepsia, tiene altos niveles de expresión en cerebelo y corteza cerebral, principalmente en el lóbulo temporal, que es un importante foco epileptógeno [192].

Se ha descrito asociado a RM hasta en un 10% de las formas no sindrómicas. Por ejemplo, Filges *et al.* reportaron dos pacientes masculinos de una misma familia con una deleción Xp22.11 que comprometía al gen *PTCHD1* como posible causa del fenotipo de RM [192]. Además, estos pacientes presentaban rasgos de trastorno del espectro autista.

Torrìco *et al.* reportaron una duplicación de 27 bp en la región promotora del gen *PTCHD1* en tres pacientes con trastornos del espectro autista que no fue reportada en controles sanos ($p = 0.024$), e hicieron un análisis en el que la actividad transcripcional del gen disminuía hasta un 26% al presentarse la variante en el número de copias, sugiriendo que esta si tiene un efecto patogénico y que variantes raras como la descrita por ellos pueden contribuir a la enfermedad [193].

Se estima que aproximadamente el 40% del total de afectados por síndromes epilépticos continua padeciendo crisis a pesar de un óptimo tratamiento farmacológico, lo que incrementa los gastos públicos relacionados con el control de la enfermedad, la discapacidad en términos de ausentismo laboral y escolar, la morbimortalidad, incluso la mortalidad por otras causas (principalmente suicidio).

Ha crecido el esfuerzo por mejorar los perfiles diagnósticos, etiológicos y el rendimiento de las pruebas empleadas en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, entre las que se ha incluido a la epilepsia y a sus fenotipos, *i.e.* la refractariedad al tratamiento. Esto último es de particular interés ya que permite dirigir la terapéutica y disminuir las tasas de falla del tratamiento farmacológico, lo que a su vez disminuiría los ya mencionados costos relacionados con el control de la enfermedad y el impacto en los sistemas de salud, y vimos en la discusión como numerosos artículos citados tratan de hacer una aproximación a la influencia de variantes en número de copias y alteraciones puntuales en genes sobre la respuesta al tratamiento farmacológico de los pacientes que padecen crisis recurrentes mal controladas.

Nosotros consideramos que los genes comprometidos por las CNV detectadas en nuestros pacientes más probablemente son modificadores del fenotipo epiléptico, bien sea por acción directa o por su asociación con otros genes en múltiples redes biológicas, y como se describió a lo largo de la discusión hay algunos hallazgos que podrían relacionarse directamente con la respuesta a FAE.

Lo anterior, en concordancia con lo planteado inicialmente por Girirajan *et al.* y ahora aceptado en el ámbito científico en relación con el 'segundo golpe': un paciente puede tener una CNV o una mutación que sea causa del fenotipo, y una, dos o más CNV o mutaciones puntuales que modifiquen la severidad del fenotipo [97].

Tras el análisis molecular ampliado de pacientes con microdeleción 16p12.1 vs. pacientes controles sin CNV patológicas en el estudio de microarreglos, Girirajan *et al.* observaron que los probandos portadores de la microdeleción tenían hasta seis veces más CNV asociadas que los controles, y hasta sesenta veces más CNV que la población general [97]. Estos datos sugieren que esas CNV adicionales pudieran tener algún papel dentro de la variabilidad fenotípica entre los pacientes, a lo que denominan 'segundo golpe', y para confirmar su hipótesis, evaluaron otros síndromes genómicos:

- Microdeleción 1q21.1.
- Deleción 15q13.3.
- Deleción 16p11.2.
- Duplicación 22q11.2 (también descrita en este trabajo).
- Deleción 16p12.1.

Encontraron una correlación inversa entre la proporción de casos de novo y la prevalencia de segundos golpes: Raramente, los casos *de novo* suponen más riesgo teórico de tener CNV asociadas que los casos en que se han heredado las variantes [97] o casos en que el primer golpe corresponde a una CNV claramente asociada con un síndrome como es el caso de pacientes con Síndrome de Williams.

Lo anterior soportaría la hipótesis del doble golpe, demostrándose mayor tasa de presencia de CNV posiblemente patogénicas crípticas en pacientes con una gran CNV patogénica,

que tendrán penetrancia y expresividad variables y por ende modificarán de formas diferentes el fenotipo en los pacientes.

Cabe recordar la hipótesis de la *severidad intrínseca*. Sabemos que los pacientes tienen caracteres endógenos que harán que tengan un fenotipo más o menos grave, con presentación más o menos frecuente de crisis convulsivas y mejor o peor respuesta a los tratamientos. Sin embargo, desde hace al menos dos décadas nos hemos concentrado en que esos factores endógenos dependen exclusivamente del metabolismo del fármaco, por ejemplo en su blanco terapéutico. Con la gran cantidad de información con que contamos ahora, y tras todo lo que hemos mencionado en este trabajo, creemos que es necesario reenfocar los esfuerzos hacia los otros posibles factores modificadores, como podrían ser estas variantes en número de copias que recurrentemente se están detectando en pacientes con epilepsias de distintos tipos.

En eso precisamente consiste la *severidad intrínseca*, en entender como un todo los diferentes modificadores del fenotipo en cada paciente, y que como mencionan Rogawski *et al.*, en caso de demostrarse experimentalmente que factores genómicos y epigenómicos juegan un papel dentro de la farmacoresistencia, se podrían redirigir los esfuerzos terapéuticos para vencer todas las barreras que tiene un individuo para alcanzar un control óptimo de crisis y disminuir la carga de enfermedad relacionada con la refractariedad [194].

Ahora bien, mencionábamos que el análisis de datos genómicos surge como importante herramienta para el reconocimiento de causas de enfermedad pero, más importante en este

trabajo, de posibles nuevos blancos terapéuticos, como podrían ser algunos genotipos modificadores. Ya hablamos del papel potencial que tienen genes afectados por CNV detectadas en los pacientes incluidos en este estudio, o las propias CNV por alteración estructural, pero también analizamos el papel de diferentes polimorfismos en la respuesta a los fármacos en pacientes con epilepsia. Estos polimorfismos se recogen en la Tabla 7 presentada en los resultados, y las frecuencias alélicas detectadas para cada uno de ellos en la Tabla 8.

Vamos a mencionar la literatura más reciente que los vincula con epilepsia y respuesta a FAE, recordando que analizar la función *in situ* de los SNP asociados a enfermedades comunes / complejas permite conocer su efecto y cómo estos participan en la fisiopatología de las enfermedades, para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento a los pacientes [89].

Lopes-Cendes *et al.* presentaron evidencia fuerte a favor de que la información sobre SNP en genes relacionados con la respuesta a fármacos asociada a la información clínica de los pacientes afectados por epilepsia (en su trabajo MTLE específicamente) permite predecir la respuesta al tratamiento con una exactitud superior al 80% (0.8177) [195].

El SNP rs2305748 representa un cambio de una Citosina por una Timina en la posición g.35039234C>T, según la más reciente anotación de la secuencia del DNA, GRCh38.p7. Contenido dentro del gen *SCN1B*, condiciona la transcripción de al menos 2 mRNA distintos.

Varios estudios lo han relacionado con epileptogénesis y respuesta a FAE, principalmente a carbamazepina (CBZ) [196,197,198], y también se describen asociaciones de este polimorfismo a susceptibilidad a diferentes tipos de arritmias cardíacas [199]. Jang *et al.*, en un estudio realizado en población coreana, no encontraron asociación entre polimorfismos en *SCN1B* y la respuesta a FAE (CBZ) [200].

En este estudio, el 100% de los pacientes tuvo el mismo genotipo: CC. Al revisar los datos poblacionales, y según información en un estudio reciente por Namazi *et al.*, esta combinación alélica es la más prevalente al compararla con el genotipo CT [201]: En asiáticos la prevalencia del genotipo CC es del 100%, en europeos del 97.%, y en africanos subsaharianos del 99.1%. En este último trabajo, como ha ocurrido en otros anteriores, la frecuencia de este genotipo (CC) no permite evaluar de forma adecuada la asociación con la respuesta a FAE.

Nosotros no podemos en nuestro análisis soportar que este polimorfismo se relacione con buena o mala respuesta a fármacos, pero nos llama la atención que se encuentra en la región cromosómica 19q13.11, justo en donde se detectó en el paciente ER13 una gran deleción de 5 Mb.

El gen *EPHX1*, localizado en la región cromosómica 1q42.12, codifica para la enzima Epóxido Hidrolasa. Esta proteína es crítica para la degradación de compuestos aromáticos / cíclicos y la conversión de epóxidos, en diferentes procesos de detoxificación.

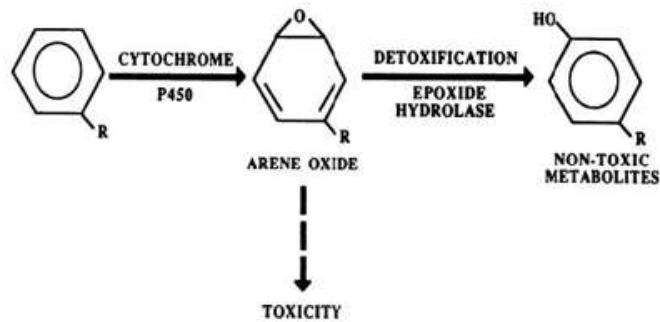
Desde la década de los 80' se reconoce a la epóxido Hidrolasa como la base molecular de reacciones anormales a Fenitoína y otros fármacos [203,204]. La Fenitoína es un potente FAE derivado de la hidantoína (difenilhidantoína, dilantina) que se metaboliza por medio del complejo citocromo monooxigenasa P450 a múltiples compuestos oxidados [203]. Los óxidos aromáticos son intermediarios en estas reacciones, pero si no se detoxifican pueden covalentemente unirse a macromoléculas celulares y favorecer la muerte celular, alteraciones en la proliferación y diferenciación celular, y como haptenos pueden predisponer a la activación de cascadas de respuestas inmunológicas (Figura 29). Se cree que la razón por la cual mutaciones y polimorfismos en *EPHX1* se asocian a Síndrome Hidantoínico Fetal y otros padecimientos secundarios a intoxicación por fenitoína, es precisamente la alteración en su metabolismo [205].

Gennis *et al.* describieron 3 pacientes hermanos con epilepsia que desarrollaron reacciones adversas a fenitoína caracterizadas por fiebre, rash cutáneo, linfadenopatías, y hepatitis anictérica. Tras la suspensión del tratamiento con este FAE se recuperaron completamente. Monocitos de sangre periférica de los 3 pacientes fueron cultivados y expuestos a diferentes metabolitos de fenitoína, fenobarbital y CBZ. Las células de todos los pacientes exhibieron toxicidad aumentada por metabolitos de fenitoína y CBZ, con adecuada respuesta a los metabolitos del fenobarbital [207]. El anterior fue uno de los primeros estudios en que fue fuerte la evidencia de alteraciones genéticas en el metabolismo de los FAE que podían alterar la respuesta de los pacientes.

En este gen detectamos principalmente dos polimorfismos asociados con la respuesta a FAE: rs2234922 (c.416A>G) y rs10517402 (c.337T>C).

Figura 29. Esquema de la función de la Epóxido Hidrolasa.

* Tomada y modificada del sitio web del Maharaj Nakorn Chiangmai Hospital [206].



Daci *et al.* genotificaron 5 SNP en diferentes genes relacionados con respuesta a FAE en 145 pacientes epilépticos tratados con CBZ en monoterapia y en 100 controles pareados por edad y sexo, sanos. Transversalmente se midió en ellos las concentraciones plasmáticas de CBZ y de sus dos principales metabolitos: carbamazepina-10,11-epóxido (CBZE) y carbamazepina-10,11-trans dihidrodiol (CBZD), ajustándolas a la dosis por Kg de peso. Demostraron que para el SNP rs2234922, pacientes epilépticos con genotipo GG exhibían un metabolismo reducido de la carbamazepina al compararlos con pacientes con genotipo AA. Esto representa mayores concentraciones plasmáticas del fármaco a dosis menores, lo que modifica sin duda su metabolismo, aunque no se sabe con exactitud de qué forma

puesto que la CBZ no es un sustrato natural de la Epóxido Hidrolasa. Así mismo, en pacientes con genotipo CC para el SNP rs10517402 (c.337T>C) se registraron niveles plasmáticos menores de metabolitos de CBZ, lo que también representa mayores concentraciones plasmáticas del fármaco a dosis menores [208]. Varios autores han soportado con sus trabajos que los SNP aquí mencionados del gen *EPHX1* están significativamente relacionados con alteraciones en el *clearance* de CBZ [209,210,211,212].

De manera llamativa, nuestros pacientes en un 100% son portadores del genotipo AA para el SNP rs2234922 (c.416A>G) y el genotipo CC para el SNP rs10517402 (c.337T>C). No es claro si esto podría 'equilibrar' el *clearance* de CBZ en ellos, y consideramos deberían hacerse en nuestra población más estudios al respecto.

Dos de los pacientes estudiados por nosotros tienen como parte de su manejo polifarmacológico a CBZ:

El paciente ER1 es una niña de 14 años de edad, fruto de la segunda gestación de la madre, que nace con APGAR bajo y requirió soporte vital, con posterior hospitalización hasta el 8 día de vida en UCIN. Tuvo varias dificultades durante su desarrollo dadas principalmente por eventos trombóticos múltiples que condicionan en la actualidad un diagnóstico de amaurosis posisquémica por trombosis de vasos retinianos, y antecedente quirúrgico importante de laparotomía exploratoria por peritonitis pos-isquemia mesentérica masiva. Tiene además diagnóstico de ER y trastorno del espectro autista, que no se consideran relacionados con ataques cerebrovasculares isquémicos pues no ha presentado clínica de tal y las

neuroimágenes no soportan. Está siendo actualmente manejada con CBZ 200 mg cada 12 hrs y Fenobarbital 150 mg cada 24 hrs, sin adecuado control de crisis. Tiene últimos niveles séricos de CBZ en 7.0 mcg/mL (Valores de referencia entre 5 a 12 mcg/mL) en rango terapéutico, y Fenobarbital en 5.0 mcg/mL (Valores de referencia entre 10 a 30 mcg/mL) en rango subterapéutico, por lo que se encuentra en ajuste de este último.

El paciente ER12 es una niña de 11 años de edad, fruto del primer embarazo de la madre, sin complicaciones pre o perinatales, quien tiene diagnóstico de Encefalopatía epiléptica, retardo severo del neurodesarrollo y discapacidad intelectual limítrofe. Está siendo actualmente manejada con CBZ 200 – 300 - 200 mg cada 8 horas, con últimos niveles séricos reportados en historia clínica como terapéuticos pero sin dato exacto del valor, Topiramato 100 -100 - 100 mg cada 8 horas, Fenitoína 3 cc cada 12 horas, Lacosamida 50 – 50 - 100 mg cada 8 horas, y Prednisolona 15 mg cada día, sin adecuando control de crisis. Aunque las neuroimágenes son normales, los trazados electroencefalográficos y videotelemetrías son persistentemente anormales.

Puesto que ambas pacientes continúan teniendo un pobre control de crisis, no es posible determinar si el *clearance* de CBZ en ellas pudiera estar influenciado por el equilibrio entre los polimorfismos rs2234922 (c.416A>G) y rs10517402 (c.337T>C).

La MTLE es una forma prevalente de epilepsia, que contribuye a la mayoría de los casos de pacientes con ER relacionada con factores genéticos [213]. A ella se han asociado al menos

9 polimorfismos en el gen *NFE2L2*, bien sea como polimorfismos de riesgo o factores protectores para desarrollar resistencia a los tratamientos farmacológicos.

El polimorfismo rs2706110 G>A en el gen *NFE2L2* se asocia con un aumento significativo en el riesgo de padecer ER en pacientes con MTLE, al igual que un haplotipo de *NFE2L2* que lo contiene (OR = 7.11, 95% CI 1.53-32.98) [213].

Todos los pacientes genotipificados por nosotros son portadores del alelo G, que es precisamente el relacionado con el aumento del riesgo.

Es así que enfermedades complejas como las epilepsias, múltiples factores pueden afectar la expresión y función de los genes involucrados en una misma vía de señalización, que al verse comprometida puede causar un fenotipo patológico [214]. Dentro de estos factores podríamos contar polimorfismos como los anteriormente mencionados, y CNV como las descritas en los pacientes aquí estudiados.

Estudios recientes sugieren que más importante que solo genotipificar polimorfismos y alteraciones genómicas es analizar y demostrar el efecto funcional sobre el producto génico y las redes de interacción proteína-proteína [214]. Lo anterior, con el fin de proponer nuevas terapéuticas (Figura 30). Cabe mencionar que en los estudios preclínicos, las aproximaciones de la biología de sistemas y el análisis de redes biológicas permiten de una forma más eficiente descubrir fármacos, que serán más efectivos y tendrán menos efectos adversos que aquellos que se enfocan en una proteína individual o una vía de señalización

única, como lo eran los denominados FAE clásicos [215]. Si bien se han utilizado en algunos pacientes varios medicamentos para actuar en diferentes puntos clave dentro de una red biológica y lograr de esta forma el control de las crisis, es posible mediante las aproximaciones de la biología de sistemas atacar múltiples puntos de interés en una red con un solo medicamento al tener como blanco, por ejemplo, un factor de transcripción único que module las diferentes vías de señalización en interacción que están alteradas en un cerebro epiléptico.

Entonces, harán falta estudios de carácter funcional para soportar la evidencia científica con que hasta ahora contamos y que ha sido presentada aquí.

No hay que dejar a un lado la necesidad de estudiar las poblaciones de pacientes desde la clínica y en sus características genéticas para tener las bases adecuadas para proceder con dichos estudios funcionales. Es nuestro deber como científicos y como profesionales de la salud velar por que las cargas de enfermedad y socioeconómicas derivadas de padecer epilepsia se reduzcan, optimizando el acercamiento diagnóstico y terapéuticas mediante el uso de la tecnología que cada vez está más a nuestro alcance, como es el caso de los microarreglos. Nuestro grupo de investigación espera ser pionero en esta iniciativa.

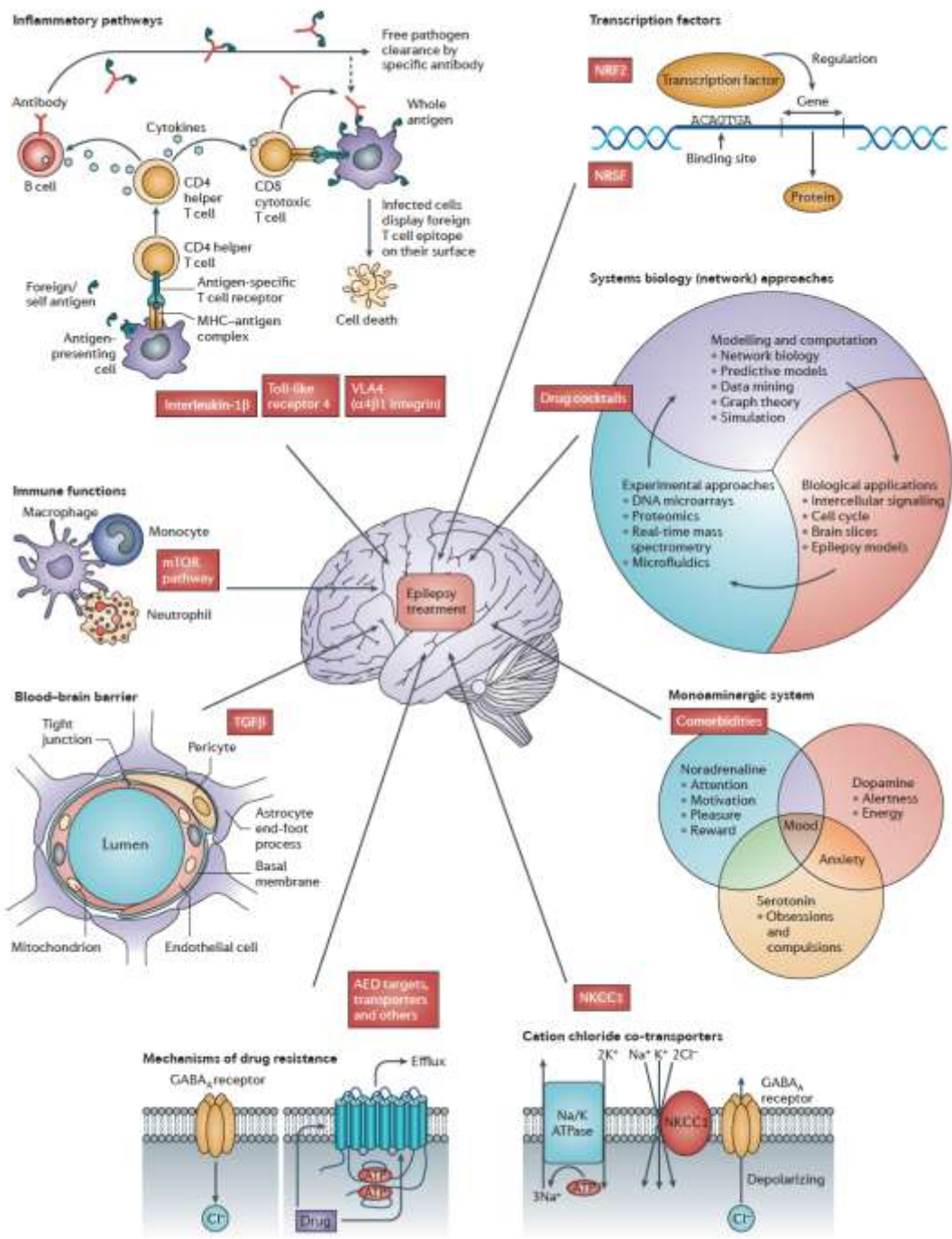


Figura 30. Aproximaciones terapéuticas en epilepsia de descubrimiento reciente.

En esta imagen, tomada de Löscher *et al.*, se describen algunas terapias de reciente descubrimiento para el tratamiento de epilepsias severas, a partir de la identificación de blancos terapéuticos en vías de neuroinflamación, función de la barrera hematoencefálica, función de diferentes tipos de receptores para neurotransmisores y de transportadores multidroga, que surge del desarrollo acelerado de la biología de sistemas (o el estudio de redes biológicas) [215].

Abreviaturas de la gráfica: MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; NRF2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NRSF, neuron-restrictive silencer factor; TGF β , transforming growth factor- β ; VLA4, very late antigen 4.

9. Conclusiones

Confirmamos durante el proceso de inclusión de casos y revisión de historias clínicas que la epilepsia es una condición neurodegenerativa que tiene un gran impacto en las diferentes esferas vitales de los pacientes que la padecen. Aun mayor es el impacto en ellos y en su entorno familiar si no se logra el control de las crisis con las primeras decisiones terapéuticas.

Vimos como en los últimos años, gracias a múltiples estrategias lideradas por grupos interdisciplinarios y multicentro, han mejorado los perfiles diagnósticos y el rendimiento de las pruebas empleadas en el estudio de la epilepsia, particularmente en referencia a las encefalopatías epilépticas que responden pobremente a los FAE. Esperamos, en un futuro cercano, utilizar la información disponible para dirigir la terapéutica en nuestros pacientes y disminuir las ratas de falla del tratamiento farmacológico, lo que a su vez disminuiría los costos relacionados con el control de la enfermedad y el impacto en el sistema de salud en nuestro país.

En este estudio se ha demostrado en el 15% de los casos analizados rearrreglos genómicos que podrían estar asociados con la refractariedad a los tratamientos farmacológicos: Una duplicación en 22q11.1 y una deleción 19q13.11-q13.12 en uno de los pacientes, una deleción homocigota en 1p36 y una duplicación 18p11.31 en otro, y en el tercer paciente una deleción de la región cromosómica Xq28. Sin embargo, aun es escasa la evidencia en la literatura existente que permita soportar estas conclusiones.

Por lo pronto, sabemos que la deleción 22q11.1 que compromete al gen Rab36 y la deleción 19q13.11-q13.12 que compromete al gen LGI4, son más probablemente eventos modificadores del fenotipo.

En la región 1p36 llamó la atención el compromiso de varios genes, dos en particular: KCNAB2 y KLHL17, ambos a nuestro parecer relacionados con el fenotipo del paciente, según reportes previos en la literatura. En la región 18p11.31 se localizan más de 10 genes, solo dos de ellos relacionados con enfermedad: LPN2 y TGIF1, y creemos que solo TGIF1 se relacionaría con el fenotipo de severidad en epilepsia.

En el paciente ER16 se detectó una deleción de la región cromosómica Xq28, que compromete el gen TMLHE, necesitando mayor evidencia para proponerlo como asociado al fenotipo de epilepsia o de respuesta a FAE.

Dicho lo anterior, consideramos que los genes comprometidos por las CNV detectadas en nuestros pacientes son con mayor probabilidad modificadores del fenotipo epiléptico, bien sea por acción directa o por su asociación con otros genes en múltiples redes biológicas, a las cuales intentamos aproximarnos.

Se requieren estudios funcionales que permitan evaluar *in vitro* o *in vivo* las redes biológicas construidas, para estudiar su potencial papel en farmacorresistencia.

Pudimos detectar al menos 10 polimorfismos distribuidos en 6 genes, que sospechamos se relacionan con la respuesta a fármacos según la evidencia científica consignada en bases de datos y artículos de investigación. Es importante reconocer a los SNP no solo como fuente de variación genética sino por su implicación en los fenotipos de enfermedad, dado que de acuerdo con nuestros datos sí podrían modificar el plan de tratamiento en un paciente con ER que no responde adecuadamente a determinados FAE.

Es de resaltar que 19 de 19 pacientes estudiados son portadores del alelo C (CC) para el SNP rs10517402 localizado en el gen EPHX1, cuyo alelo más común en población americana y anglosajona es el T. Este alelo se relaciona con necesidad de menores dosis del fármaco CBZ, optimizando su *clearance*. Dos pacientes incluidas en este estudio toman actualmente CBZ como medicación antiepiléptica. Puesto que ambas continúan teniendo un pobre control de crisis, no es posible determinar si el *clearance* de CBZ en ellas pudiera estar influenciado por el equilibrio entre este polimorfismo y el denominado rs2234922.

Dado que la tecnología de microarreglos se presta como método de tamización genómica para detectar no solo anomalías estructurales sino también SNVs/SNPs relacionados con enfermedad, y gracias a la relativa baja en sus costos en los últimos años propiciada por el aumento en su uso, planteamos el estudio de los pacientes con trastornos potencialmente

genómicos a partir de esta metodología, tanto para la aproximación diagnóstica como el análisis del impacto terapéutico.

Hacen falta estudios de carácter funcional para soportar la evidencia aquí presentada, y esperamos como grupo de investigación ser pioneros en estos.

Limitaciones

Los autores consideramos que es un limitante el tamaño muestral recogido y analizado en este estudio, y esperamos poder ampliarlo a futuro para hacer más robustos los resultados.

Hasta el momento en que se da por concluido este trabajo de grado, no fue posible la demostración del origen parental de los rearrreglos genómicos encontrados en nuestros pacientes, dado que por el alza en los precios de los microarreglos frente a lo contemplado al inicio del proyecto (secundaria al alza en el precio del dólar) *no fue posible realizar las pruebas genéticas a los padres de los pacientes afectados*. Sin embargo, este proyecto recientemente obtuvo financiación en la Convocatoria para Proyectos de Investigación 2016-2017 del Hospital Militar Central, una de las instituciones en que se llevó a cabo, y se espera terminar el desarrollo de los objetivos planteados y la ampliación del tamaño de muestra para nutrir los resultados.

Perspectivas

Es importante continuar el análisis CNV y SNV/SNP en pacientes con fenotipos neurológicos diversos en nuestro país, para aportar mayor información epidemiológica sobre su descripción clínica y genética y brindar un aporte al conocimiento sobre el potencial patogénico de los posibles hallazgos. Es por esta razón que como grupo de investigación, y a través de la línea de investigación en neurogenética, se plantearán nuevos proyectos relacionados con este tema. Es de nuestro interés particular ampliar el estudio genético a la aplicación de técnicas de NGS (paneles moleculares, exoma clínico, exoma completo) a nuestros pacientes para continuar el descubrimiento de genes o regiones genómicas modificadoras del fenotipo y posibles blancos terapéuticos.

A partir de estos datos poblacionales esperamos reunir la suficiente evidencia para plantear estudios de carácter funcional, que podrían incluso desarrollarse en el marco de una tesis doctoral de alguno de los co-investigadores.

Consideraciones éticas

Este estudio de investigación fue presentado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, el Comité de Ética en Investigación del Hospital de la Misericordia y el Comité Independiente de Ética en Investigación del Hospital Militar Central.

El trabajo de investigación se clasifica como “con riesgo mínimo”, por cuanto es un estudio descriptivo y analítico, que empleará el registro de datos por medio de una entrevista, un examen físico diagnóstico y la extracción de sangre, por punción venosa con un volumen no mayor a 7 ml. Se anexa formato de consentimiento informado realizado según las directrices consignadas en la Resolución 8430 de 1993 y con las correcciones pertinentes realizadas por los entes evaluadores.

Dilemas éticos:

Este proyecto no propone ningún dilema ético en cuanto al respeto de la autonomía del paciente, no se pone en riesgo la vida ni la integridad de los sujetos de investigación, no se genera omisión en el actuar médico por parte de los investigadores y los exámenes médicos, de laboratorio y el manejo de la información se realizarán de la misma manera en todos los participantes.

Declaración de existencia de conflicto de interés:

Los investigadores de esta propuesta declaran no tener conflictos de intereses.

Fuente de financiación

Este estudio de investigación fue financiado por la Convocatoria de Apoyo a Posgrados 2015 de la Dirección de Investigación y Extensión de la Universidad Nacional de Colombia con Código Hermes 25307.

Además recibió apoyo en especie por parte del Laboratorio No. 3 del Instituto de Genética perteneciente a la Maestría en Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia.

Recientemente recibió apoyo por parte de la Convocatoria para proyectos de Investigación 2016-2017 del Hospital Militar Central con Código 2016 – 108, actualmente en trámites de legalización para ejecución presupuestal, con la que se espera estudiar molecularmente a los padres de los pacientes en quienes se encontró una CNV posiblemente patogénica.

Referencias Bibliográficas

1. Fisher, R.S., *et al.* (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* , 46, 470 - 472.
2. *Centers for Disease Control.* (s.f.). Recuperado el 09 de 2015, de <http://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/publications/AAG/epilepsy.htm>
3. *UK Epilepsy Society.* (s.f.). Recuperado el 10 de 2015, de <http://www.epilepsysociety.org.uk/aboutepilepsy/whatisepilepsy/epilepsy-didyouknow>
4. *Epilepsy Foundation.* (s.f.). Recuperado el 01 de 2016, de <http://www.epilepsyfoundation.org/aboutepilepsy/whatisepilepsy/statistics.cfm>
5. Burneo, J.G., *et al.* (2005). Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Research* , 66 (1-3), 63-74.
6. Pradilla, A.G., *et al.* (2003). National Neuroepidemiological Study in Colombia (EPINEURO). *Rev Panam Salud Publica* , 14 (2), 104-111.
7. Velez, A., *et al.* (2006). Epilepsy in Colombia: Epidemiologic profile and classification of epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia* , 47 (1), 193 –201.
8. Medina Malo, C., *et al.* (2004). Epidemiología: Dimensión del Problema. En M. M. C, *Epilepsia: Aspectos Clínicos y Psicosociales* (Vol. 1, págs. 39–44). Bogotá: Editorial Médica Panamericana.
9. Méndes Ayala, A., *et al.* (2015). Burden of epilepsy in Colombia. *Neuroepidemiology* , 44, 144-148.
10. ILAE Task Force on Classification and Terminology. (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* , 42, 796-803.
11. Yusta Izquierdo, A. (2005). Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. *Emergencias* , 17, S68-S73.
12. Pedley, T.A., *et al.* (1997). En *Epilepsy: a comprehensive textbook* (págs. 499-512). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
13. Liu, Y., *et al.* (2000). Recent development in NMDA receptors. *Chin Med Journal* , 113 (10), 948–956.
14. Gilkey, J.C., *et al.* (1978). A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. *J Cell Biol* , 76, 448-466.
15. Li, F., *et al.* (2009). Clinical Implications of Basic Research: Memory and the NMDA receptors. *N Engl J Med* , 16, 302 .
16. Dingledine, R., *et al.* (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* , 51 (1), 7–61.
17. Hosford, D.A., *et al.* (1992). The role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice. *Science* , 257, 398–401.

18. Hosford, D., & Wang, Y. (1997). Utility of the lethargic (lh/lh) mouse model of absence seizures in predicting the effects of lamotrigine, vigabatrin, tiagabine, gabapentin, and topiramate against human absence seizures. *Epilepsia* , 38, 408-414.
19. Contreras, D. (2002). Mecanismos de generación de oscilaciones rápidas (2080 Hz) en circuitos tálamo-corticales. *Rev Neurol* , 35, 135-141.
20. Cavazos, J.E., *et al.* (1994). Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci* , 14, 3106–3121 .
21. Gastaut, H. (1969). Classification of the epilepsies: proposal for the international classification. *Epilepsia* , 10, 514–521.
22. Merlis, J.K. (1970). Proposal for an international classification of the epilepsies. *Epilepsia* , 11, 114–119.
23. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1981). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* , 22, 489-501.
24. Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. (1985). Proposal for classification of epilepsy and epileptic syndromes. *Epilepsia* , 26, 268-278.
25. Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. (1989). Proposal for revised classification of epilepsy and epileptic syndromes. *Epilepsia* , 30, 389–399.
26. Lüders, H., *et al.* (1993). Expanding the international classification of seizures to provide localization information. *Neurology* , 43 , 1650-1655.
27. Berg, A.T., *et al.* (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology. *Epilepsia* , 51, 676-685.
28. Shinnar, S. (2010). The new ILAE classification. *Epilepsia* , 51, 715-717.
29. Salas-Puig, J. (2011). Nueva propuesta de clasificación de las crisis epilépticas y de las epilepsias de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE). *Rev Neurol* , 52 (9), 513-514.
30. Gómez-Alonso, J., *et al.* (2011). Nueva clasificación de las epilepsias de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE): ¿un paso en dirección equivocada? *Rev Neurol* , 52, 541–547.
31. Ferrie, C.D. (2010). Terminology and organization of seizures and epilepsies: radical changes not justified by new evidence. *Epilepsia* , 51, 713-714.
32. Wolf, P. (2010). Much ado about nothing? *Epilepsia* , 51, 717-718.
33. Avanzini, G. (2010). A sound conceptual framework for an epilepsy classification is still lacking. *Epilepsia* , 51, 720-722.
34. Glauser, T., *et al.* (2006). ILAE Treatment Guidelines: Evidence-based Analysis of Antiepileptic Drug Efficacy and Effectiveness as Initial Monotherapy for Epileptic Seizures and Syndromes. *Epilepsia* , 47 (7), 1094–1120.

35. Grupo de Trabajo en Epilepsias de la Sociedad Neurológica Argentina. (2005). Guías para el tratamiento farmacológico de la Epilepsia en adultos. *Revista Neurológica Argentina* , 30, 17–24 .
36. Perucca, E. (1998). Pharmacoresistance in epilepsy: how should it be defined? *CNS Drugs* , 10, 171-179.
37. Kwan, P., *et al.* (2006). Refractory Epilepsy: mechanisms and solutions. *Expert reviews neurother* , 6 (3), 397–406 .
38. Arzimanoglou, A., Bourgeois, M., Kahane, P., Hirsch, E., Boddaert, N., Ryvlin, P., *et al.* (2008). Epilepsy surgery in children: from a multidisciplinary network to the creation of an expertise and care centre. *Neurochirurgie* , 54 (3), 479-483.
39. Kwan, P., & Brodie, M.J. (2000). Early identification of Refractory Epilepsy. *N Engl J Med* , 342, 314–319.
40. Schmidt, D., *et al.* (2009). New developments in antiepileptic drug resistance: an integrative view. *Epilepsy Currents* , 9, 47-52.
41. Gall, C.M., *et al.* (2004). Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis. *Adv Exp Med Biol* , 548, 12-33.
42. Mirza, N., *et al.* (2011). Exploring the genomic basis of pharmacoresistance in epilepsy: an integrative analysis of large-scale gene expression profiling studies on brain tissue from epilepsy surgery. *Human Molecular Genetics* , 20 (22), 4381–4394.
43. Charria-Ortiz, G.A. (2007). Genética de las epilepsias. *Medicina* , 67 (6), 601-613.
44. Thomas, R.H., *et al.* (2014). The hidden genetics of epilepsy-a clinically important new paradigm. *Nat Rev Neurol* , 10 (5), 283-292.
45. Ministerio de Salud de Chile. (2008). *Guía Clínica: Epilepsia en el niño*. Santiago: Minsal.
46. Ramírez, J., *et al.* (2009). MLPA en el estudio de Iso desórdenes genómicos. *Revista Médica Universitaria* , 5 (2).
47. Lupski, J.R. (1998). Genomic disorders: Structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* , 14, 417–422.
48. Stankiewicz, P., & Lupski, J.R. (2010). Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* , 61, 437-455.
49. Lupski, J.R., & Stankiewicz, P. (2005). Genomic disorders: Molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* , 1, e49.
50. Stankiewicz, P., & Lupski, J.R. (2002). Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics* , 18 (2), 74-82.
51. Tjio, J.H., *et al.* (1956). The Chromosome Number of Man. *Hereditas* , 1 (1), 1–6 .
52. *Estudios Genéticos* (s.f.). Recuperado el 2016, de <http://www.estudiosgeneticos.com.ar/estudiosgeneticos/microarray.php>
53. *Illumina* (s.f.). Recuperado el 2017 de

<https://www.illumina.com/technology/beadarray-technology.html>

54. *Illumina* (s.f.). Recuperado el 2017 de <https://www.illumina.com/techniques/microarrays.html>

55. Hoheisel, J.D. (2006). Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet*, 7 (3), 200-210 .

56. Márquez-González, H., *et al.* (2013). Microarreglos. Los puentes en el abismo del conocimiento del retraso mental diagnosticado en la infancia (RM). *Acta Pediatr Mex*, 34, 275-279 .

57. Cooper, G.M., *et al.* (2011). A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet*, 43 (9), 838-846.

58. Manning, M., *et al.* (2010). Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*, 12 (11), 742-745 .

59. Berkovic, S., & Thomas, R. (2014). The hidden genetics of epilepsy—a clinically important new paradigm. *Nature Reviews Neurology* .

60. Rooms, L., *et al.* (2005). Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat*, 25 (6), 513-524 .

61. Byeon, J.H., *et al.* (2014). Application of array-based comparative genomic hybridization to pediatric neurologic diseases. *Yonsei Med J*, 55 (1), 30-36.

62. McMahon, J.M., *et al.* (2010). Detection of microchromosomal aberrations in refractory epilepsy: a pilot study. *Epileptic Disord*, 12 (3), 192-198.

63. Mefford, H.C., Muhle, H., Ostertag, P., & von Spiczak, S. (2010). Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS Genet*, 6 (5), e1000962.

64. Iourov, I.Y., *et al.* (2012). Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. *Mol Cytogenet*, 5 (1), 46.

65. Galizia, E., *et al.* (2012). Array comparative Genomic Hybridization: results from an adult population with drug resistant epilepsy and co-morbidities. *European Journal of Medical Genetics*, 55 (5-3), 342-348.

66. Velasco, H.M., *et al.* (2012). Polimorfismo c3435t del gen abcb1 (mdr1) en pacientes con epilepsia refractaria en tres centros de referencia nacional en Colombia. *Medicina*, 33 (4), 249-259.

67. Maradei Anaya, S.J., *et al.* (2013). Detection of subtelomeric reangements due to MLPA in paediatric patients with refractory epilepsy in Colombia: the role of the CHL1 gene in pharmacoresistance. *Rev Neurol*, 57 (10), 444-450.

68. Buysse, K., *et al.* (2009). Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet*, 52 (6), 398-403.

69. Hollenbeck, D., *et al.* (2016). Clinical relevance of small copy-number variants in chromosomal microarray clinical testing. *Genet Med*, Epub 2016 Sep 15.

70. Bahi-Buisson, N., *et al.* (2008). Spectrum of epilepsy in terminal 1p36 deletion syndrome. *Epilepsia* , 49 (3), 509-515.
71. Li, H.Y., *et al.* (2008). A novel genetic locus for benign familial infantile seizures maps to chromosome 1p36.12-p35.1. *Epilepsia* , 49 (5), 490-492.
72. Saito, Y., *et al.* (2011). Polymicrogyria and infantile spasms in a patient with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev* , 33 (5), 437-441.
73. Paciorkowsky, A.R., *et al.* (2011). Copy number variants and infantile spasms: evidence for abnormalities in ventral forebrain development and pathways of synaptic function. *Eur J Hum Genet* , 19 (12), 1238-1245.
74. Kanabar, G., *et al.* (2012). Multiple causes of apnea in 1p36 deletion syndrome include seizures. *Seizure* , 21 (5), 402-406.
75. Shimada, S., *et al.* (2014). Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. *Brain & Development* .
76. Yamamoto, T., Shimada, S., Shimojima, K., Ikeda, H., & Oguni, K. (2015). Epilepsy in 1p36 Deletion Syndrome Is Not Associated with Deletion Size. *J Pediatr Epilepsy* , 4 (1), 4-7.
77. Zhang, Y., *et al.* (2015). Abnormal expression of PEX10 gene may be related to epilepsy associated with 1p36 copy number variations. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* , 32 (1), 6-10.
78. Addis, L., Rosch, R.E., Valentin, A., & Makoff, A. (2016). Analysis of rare copy number variation in absence epilepsies. *Neurol Genet* , 2 (2), E56.
79. Maurer-Morelli, C.V., *et al.* (2012). A Locus Identified on Chromosome18P11.31 is Associated with Hippocampal Abnormalities in a Family with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol* , 10 (3), 124.
80. Bisulli, F., *et al.* (2014). Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: A new locus on chromosome 19q13.11–q13.31. *Epilepsia* , 55 (6), 841–848.
81. Wang, D., Li, X., Jia, S., Wang, Y., Wang, Z., Song, X., *et al.* (2015). Copy number variants associated with epilepsy from gene expression microarrays. *J Clin Neurosci* , 22 (12), 1907-1910.
82. Hintze, J.P., Kirby, A., Torti, E., Batanian, J.R. (2016). Prolidase Deficiency in a Mexican-American Patient Identified by Array CGH Reveals a Novel and the Largest PEPD Gene Deletion. *Mol Syndromol* , 7(2), 80-86.
83. Piccione, M., *et al.* (2011). The first case of myoclonic epilepsy in a child with a de novo 22q11.2 microduplication. *Am J Med Genet A* , 155A (12), 3054-3059.
84. Valvo, G., *et al.* (2012). 22q11.2 Microduplication syndrome and epilepsy with continuous spikes and waves during sleep (CSWS). A case report and review of the literature. *Epilepsy Behavior* , 25 (4).
85. Singh, H.R., Yang, Z., Siddiqui, S., Peña, L.S., Westerfield, B.H., *et al.* (2009). A novel Alu-mediated Xq28 microdeletion ablates TAZ and partially deletes DNL1L in a patient with Barth syndrome. *Am J Med Genet A* , 149A(5), 1082-1085.
86. Hino-Fukuyo, N., & Kikuchi, A. (2015). Genomic analysis identifies candidate pathogenic variants in 9 of 18 patients with unexplained West syndrome. *Hum Genet* , 134 (6), 649-658.

87. Boutry-Kryza, N., Labalme, A., Ville, D., de Bellescize, J., Touraine, R., Prieur, F., *et al.* (2015). Molecular characterization of a cohort of 73 patients with infantile spasms syndrome. *Eur J Med Genet* , 58(2), 51-58.
88. Bertolino, E. (1996). Expression of a novel murine homeobox gene in the developing cerebellar external granular layer during its proliferation. *Dev Dyn* , 205, 410-420.
89. Ramírez-Bello, J., *et al.* (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México* , 149, 220-228.
90. 1000 Genomes Project Consortium. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* , 467, 1061-1073.
91. DeVries, B.B., *et al.* (2003). Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* , 40, 385-398.
92. Mefford, H.C. (2014). CNVs in Epilepsy. *Curr Genet Med Rep* , 2, 162–167.
93. Berkovic, S.F. (1998). Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol* , 43 (4), 435–445.
94. Northrop, E., *et al.* (2005). Detection of Cryptic Subtelomeric Chromosome Abnormalities and Identification of Anonymous Chromatin Using a Quantitative Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Assay. *Hum Mut* , 26 (5), 477–486 .
95. Helbig, I. (2014). New technologies in molecular genetics: the impact on epilepsy research. *Prog Brain Res* , 213, 253-278.
96. Johnson, M.R. (2015). Systems genetics identifies Sestrin 3 as a regulator of a proconvulsant gene network in human epileptic hippocampus. *Nat Commun* , 6, 6031.
97. Girirajan, S., *et al.* (2012). Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* , 367 (14), 1321-1331 .
98. Striano, P., *et al.* (2012). Clinical significance of rare copy number variations in epilepsy. *Arch Neurol* , 69 (3), 322-330 .
99. Olson, H., *et al.* (2014). Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Ann Neurol* , 75 (6), 943-958.
100. European Science Foundation. (s.f.). *Functional genomic variation in the epilepsies - EuroEPINOMICS*. Recuperado el 2 de 2016, de EuroEPINOMICS: <http://www.esf.org/index.php?id=6396>
101. Naseer, M.I., *et al.* (2015). Genome wide analysis of novel copy number variations duplications/deletions of different epileptic patients in Saudi Arabia. *BMC Genomics* , 16 (S1), S10.
102. Ma, Y.P., *et al.* (2014). Clinical features and genome-wide copy number variation analysis in 60 children with early-onset epileptic encephalopathies of unknown cause. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* , 16 (11), 100-1104.
103. Fanciulli, M., *et al.* (2014). Copy number variations and susceptibility to lateral temporal epilepsy: a study of 21 pedigrees. *Epilepsia* , 55 (10), 1651-1658.

104. Martínez-Juárez, I.E., *et al.* (2012). Refractory epilepsy: use of the new definition and related risk factors. A study in the study of a mexican population in a third level centre. *Rev Neurol* , 54 (3), 159-166.
105. Orpha.net. (2011). *Orpha.net*. (M.-F. Portnoi, Ed.) Recuperado el 11 de 2016, de Síndrome de microduplicación 22q11.2 : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=ES&Expert=1727
106. Pfeffer, S.R. (2012). Rab GTPase localization and Rab cascades in Golgi transport. *Biochem Soc Trans* , 40 (6), 1373–1377.
107. Leipe, D.D., *et al.* (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology* , 317 (1), 41-72.
108. Yamamoto, T., & Shimojima, K. (2014). Clinical impacts of genomic copy number gains at Xq28. *Hum Genome Var* , 1, 14001.
109. Ishizaki, H., *et al.* (2000). Role of rab GDP dissociation inhibitor alpha in regulating plasticity of hippocampal neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA* , 97 (21), 11587-11592.
110. OMIM. (14 de 4 de 2014). (P. A. Hartz, Editor) Recuperado el 11 de 2016, de TBC1 DOMAIN FAMILY, MEMBER 5; TBC1D5: <http://www.omim.org/entry/615740>
111. Seaman, M.N.J., *et al.* (2009). Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci* , 122, 2371-2382.
112. Wang, C.L., *et al.* (2012). VPS35 regulates developing mouse hippocampal neuronal morphogenesis by promoting retrograde trafficking of BACE1. *Biol Open* , 1 (12), 1248-1257.
113. Wang, H.S., *et al.* (2014). In vivo evidence of pathogenicity of VPS35 mutations in the Drosophila. *Mol Brain* , 7, 73.
114. Tian, Y., *et al.* (2015). VPS35-deficiency results in an impaired AMPA receptor trafficking and decreased dendritic spine maturation. *Mol Brain* , 8 (1), 70.
115. Wang, W., *et al.* (2016). Parkinson's disease-associated mutant VPS35 causes mitochondrial dysfunction by recycling DLP1 complexes. *Nat Med* , 22 (1), 54-63.
116. Wang, C., *et al.* (2016). VPS35 regulates cell surface recycling and signaling of dopamine receptor D1. *Neurobiol Aging* , 46, 22-31.
117. Yin, J. (2016). Vps35-dependent recycling of Trem2 regulates microglial function. *Traffic* .
118. Perez-Victoria, F.J. (2008). Requirement of the human GARP complex for mannose 6-phosphate-receptor-dependent sorting of cathepsin D to lysosomes. *Mol Biol Cell* , 19, 2350-2362.
119. Karlsson, P., *et al.* (2013). Loss of vps54 function leads to vesicle traffic impairment, protein mis-sorting and embryonic lethality. *Int J Mol Sci* , 14 (6), 10908-10925.
120. Schmitt-John, T. (2015). VPS54 and the wobbler mouse. *Front Neurosci* , 9, 381.
121. Saberi, D., *et al.* (2016). The Spatiotemporal Pattern of Degeneration in the Cerebellum of the Wobbler Mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* , 75 (4), 347-357.

122. Moser, J.M., *et al.* (2013). The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol Genet Genomics* , 288 (5-6), 207-229.
123. NCBI Gene Database. (2008). *NCBI Gene Database*. Recuperado el 11 de 2016, de YKT6 v-SNARE homolog (*S. cerevisiae*) [*Homo sapiens* (human)]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10652>
124. Hasegawa, H., *et al.* (2004). Intramolecular protein-protein and protein-lipid interactions control the conformation and subcellular targeting of neuronal Ykt6. *J Cell Sci* , 117, 4495–4508.
125. Huang, C.T., *et al.* (2008). Identification of Gene Transcripts in Rat Frontal Cortex That Are Regulated by Repeated Electroconvulsive Seizure Treatment. *Neuropsychobiology* , 58, 171-177.
126. Bassuk, A.G., Wallace, R.H., *et al.* (2008). A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. *Am J Hum Genet* , 83 (5), 572-581.
127. Berkovic, S.F., Mazarib, A., *et al.* (2005). A new clinical and molecular form of Unverricht-Lundborg disease localized by homozygosity mapping. *Brain* , 128 (652–658).
128. El-Shanti, H., *et al.* (2006). A distinct autosomal recessive ataxia maps to chromosome 12 in an inbred family from Jordan. *Brain Dev* , 28, 353–357.
129. Bassuk, A.G., & Sherr, E.H. (2015). A de novo mutation in PRICKLE1 in fetal agenesis of the corpus callosum and polymicrogyria. 29 (4), 174-177.
130. Malan, V., *et al.* (2009). 19q13.11 deletion syndrome: a novel clinically recognisable genetic condition identified by array comparative genomic hybridisation. *J Med Genet* , 46 (9), 635-640.
131. Schuurs-Hoeijmakers, J.H., *et al.* (2009). Refining the critical region of the novel 19q13.11 microdeletion syndrome to 750 Kb. *J Med Genet* , 46 (6), 421-423.
132. Ishii, A., *et al.* (2010). Positive association between benign familial infantile convulsions and LGI4. *Brain Dev* , 32 (7), 538-543.
133. GeneCards. (s.f.). *LGI4 Gene*. Recuperado el 11 de 2016, de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LGI4>
134. Senechal, K.R., *et al.* (2005). ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Hum Molec Genet* , 14, 1613-1620.
135. López, J.C., *et al.* (2001). *Metaloproteasas – Desintegrinas en el campo de la ofidiología*. Recuperado el 11 de 2016, de http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_2051.pdf
136. STRING Database. (s.f.). *LGI4 interaction network*. Recuperado el 11 de 2016, de <http://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=5m01hoACKO3u>
137. Morante-Redolat JM, G.-P. A.-S. (2002). Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet* , 11, 1119–1128.
138. Kalachikov S, E. O. (2002). Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* , 30, 335–341.

139. Lai, M., *et al.* (2010). Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* , 9, 776–785.
140. Honore, T., *et al.* (1982). The binding of [3H]AMPA, a structural analogue of glutamic acid, to rat brain membranes. *Journal of Neurochemistry* , 38 (1), 173-178.
141. Letts, V.A. (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca(2+)-channel gamma subunit. *Nature Genet* , 19, 340-347.
142. Sharp, A.H., *et al.* (2001). Biochemical and anatomical evidence for specialized voltage-dependent calcium channel gamma isoform expression in the epileptic and ataxic mouse, stargazer. *Neuroscience* , 105 (3), 599-617.
143. Pena, S.D.J. (2015). Ataxia and myoclonic epilepsy due to a heterozygous new mutation in KCNA2: proposal for a new channelopathy. *Clinical Genetics* , 87 (2), e1–e3.
144. Brew, H.M., *et al.* (2007). Seizures and reduced life span in mice lacking the potassium channel subunit Kv1.2, but hypoexcitability and enlarged Kv1 currents in auditory neurons. *J Neurophysiol* , 98, 1501–1525.
145. Xie, G. (2010). A new Kv1.2 channelopathy underlying cerebellar ataxia. *J Biol Chem* , 285, 32160–32173.
146. Syrbe, S., *et al.* (2015). De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy . *Nature Genetics* , 47, 393–399.
147. Corbett, M.A., *et al.* (2016). Dominant KCNA2 mutation causes episodic ataxia and pharmacoresponsive epilepsy. *Neurology* .
148. GeneCards. (s.f.). *KCNAB2 Gene*. Recuperado el 21 de 11 de 2016, de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KCNAB2>
149. Heilstedt, H.A. (2001). Loss of the potassium channel beta-subunit gene, KCNAB2, is associated with epilepsy in patients with 1p36 deletion syndrome. *Epilepsia* , 42 (9), 1103-1111.
150. García, R.V., *et al.* (06 de 10 de 2005). El Canal del potasio Kv 1.3: papel fisiológico y biología del complejo funcional. *Disertación de Tesis Doctoral* . Barcelona, España. Obtenido de http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/36149/2/01.RVG_INTRODUCCION.pdf
151. Papazian, D.M., *et al.* (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* , 237 (4816), 749-753.
152. Schmidt, K. (1999). Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the shaker family (Kv1) in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res* , 843 (1-2), 145-160.
153. Coleman, S.K., *et al.* (1999). Subunit composition of Kv1 channels in human CNS . *J Neurochem* , 73 (2), 849-858.
154. Zuberi, S.M., *et al.* (1999). A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain* , 122 (5), 817-825.
155. Demos, M.K., *et al.* (2009). A novel KCNA1 mutation associated with global delay and persistent cerebellar dysfunction. . *Mov Disord* , 24 (5), 778-782.

156. Tomlinson, S.E., *et al.* (2013). Clinical, genetic, neurophysiological and functional study of new mutations in episodic ataxia type 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84 (10), 1107-1112.
157. Li, K.X., *et al.* (2011). Neuregulin 1 regulates excitability of fast-spiking neurons through Kv1.1 and acts in epilepsy. *Nat Neurosci*, 15 (2), 267-273.
158. Rea, R., *et al.* (2002). Variable K(+) channel subunit dysfunction in inherited mutations of KCNA1. *J Physiol*, 538 (1), 5-23.
159. Rasband, M.N. (2010). Clustered K⁺ channel complexes in axons. *Neurosci Lett*, 486 (2), 101-106.
160. Wenzel, H.J., *et al.* (2007). Structural consequences of Kcna1 gene deletion and transfer in the mouse hippocampus. *Epilepsia*, 48 (11), 2023-2046.
161. Wimmer, V.C., *et al.* (2010). Axon initial segment dysfunction in a mouse model of genetic epilepsy with febrile seizures plus. *J Clin Invest*, 120 (8), 2661-2671.
162. Sander, T., *et al.* (1995). Refinement of map position of the human GluR6 kainate receptor gene (GRIK2) and lack of association and linkage with idiopathic generalized epilepsies. *Neurology*, 45 (9), 1713-1720.
163. Córdoba, M. (2015). Expanding the spectrum of Grik2 mutations: intellectual disability, behavioural disorder, epilepsy and dystonia. *Clin Genet*, 87 (3), 293-295.
164. Wang, X., *et al.* (2016). Association between glutamate receptor 2 polymorphisms and epilepsy in children. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 18 (6), 492-495.
165. Hanson, M.G., *et al.* (2014). Peripheral nervous system defects in a mouse model for peroxisomal biogenesis disorders. *Dev Biol*, 395 (1), 84-85.
166. Gripp, K.W., *et al.* (2000). Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet*, 25 (2), 205-208.
167. Melhuish, T.A., *et al.* (2000). The interaction of the carboxyl terminus-binding protein with the Smad corepressor TGIF is disrupted by a holoprosencephaly mutation in TGIF. *J Biol Chem*, 275 (50), 39762-39766.
168. Verrotti, A. (2015). Deletion 18p11.32p11.31 in a Child with Global Developmental Delay and Atypical, Drug-Resistant Absence Seizures. *Cytogenet Genome Res*, 146 (2), 115-119.
169. DECIPHER. (s.f.). Recuperado el 2016 de <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/255600#overview>
170. DECIPHER. (s.f.). Recuperado el 2016 de <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/282667#overview>
171. Heinzen, E.L., *et al.* (2010). Rare deletions at 16p13.11 predispose to a diverse spectrum of sporadic epilepsy syndromes. *Am J Hum Genet*, 86, 707-718.
172. Keaton, A.A., *et al.* (2010). TGIF mutations in human holoprosencephaly: correlation between genotype and phenotype. *Mol Syndromol*, 1, 211-222.
173. Pachajoa, H. (2016). Síndrome por delección 18p diagnóstico por array de hibridación genómica comparada. Presentación de un caso con fenotipo leve. *Arch Argent Pediatr*, 114 (6), e448.

174. Liu, L., *et al.* (2016). Smad2 and Smad3 have differential sensitivity in relaying TGF β signaling and inversely regulate early lineage specification. *Sci Rep* , 6, 21602.
175. Liu, F.F., *et al.* (2015). Neuroprotective effects of SMADs in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion. *Neural Regen Res* , 10 (3), 438-444.
176. Ueberham, U., *et al.* (2009). Smad2 isoforms are differentially expressed during mouse brain development and aging. *Int J Dev Neurosci* , 27 (5), 501-510.
177. Wang, L., *et al.* (2011). Smad2 protein disruption in the central nervous system leads to aberrant cerebellar development and early postnatal ataxia in mice. *J Biol Chem* , 286 (21), 18766-18774.
178. Tapia-González, S., & Muñoz, M.D. (2013). Smad3 is required for the survival of proliferative intermediate progenitor cells in the dentate gyrus of adult mice. *Cell Commun Signal* , 11, 93.
179. Tapia-González, S., *et al.* (2011). Dopamine and α -synuclein dysfunction in Smad3 null mice. *Mol Neurodegener* , 6, 72.
180. Muñoz, M.D., *et al.* (2016). Smad3 deficiency inhibits dentate gyrus LTP by enhancing GABAA neurotransmission. *J Neurochem* , 137 (2), 190-199.
181. Witteveen, J.S., Willemsen, M.H., Dombroski, T.C., van Bakel, N.H., Nillesen, W.M., van Hulten, J.A., *et al.* (2016). Haploinsufficiency of MeCP2-interacting transcriptional co-repressor SIN3A causes mild intellectual disability by affecting the development of cortical integrity. *Nat Genet* , 48 (8), 877-887.
182. Herriges, M., & Morrisey, E.E. (2014). Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* , 141, 502-513.
183. Tao, Y., *et al.* (2015). HDAC1 regulates the proliferation of radial glial cells in the developing *Xenopus* tectum. *PLoS One* , 10 (3), e0120118.
184. Wang, W.Y., *et al.* (2013). Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat Neurosci* , 16 (10), 1383-1391.
185. Dobbin, M.M., *et al.* (2013). SIRT1 collaborates with ATM and HDAC1 to maintain genomic stability in neurons. *Nat Neurosci* , 16 (8), 1008-1015.
186. OMIM. (s.f.) Recuperado el 2017 de EPSILON-TRIMETHYLLYSINE HYDROXYLASE; TMLHE: <https://omim.org/entry/300777>
187. Martinelli, D., *et al.* (2012). Understanding pyrroline-5-carboxylate synthetase deficiency: clinical, molecular, functional, and expression studies, structure-based analysis, and novel therapy with arginine. *J Inherit Metab Dis* , 35 (5), 761-776.
188. Bicknell, L.S. (2008). A missense mutation in ALDH18A1, encoding Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS), causes an autosomal recessive neurocutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* , 16 (10), 1176-1186.
189. Gardeitchik, T., *et al.* (2014). Clinical and biochemical features guiding the diagnostics in neurometabolic cutis laxa. *Eur J Hum Genet* , 22 (7), 888-895.

190. Panza, E., *et al.* (2016). ALDH18A1 gene mutations cause dominant spastic paraplegia SPG9: loss of function effect and plausibility of a dominant negative mechanism. *Brain* , 139 (1), e3.
191. Noor, A., *et al.* (2010). Disruption at the PTCHD1 locus on Xp22.11 in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Sci Transl Med* , 2.
192. Filges, I. (2011). Deletion in Xp22.11: PTCHD1 is a candidate gene for X-linked intellectual disability with or without autism. . *Clin Genet* , 79, 79-85.
193. Torrico, B., *et al.* (2015). Contribution of common and rare variants of the PTCHD1 gene to autism spectrum disorders and intellectual disability. *Eur J Hum Genet* , 23 (12), 1694-1701.
194. Rogawski MA. (2013). The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Epilepsia* , 54 (2), 33-40.
195. Silva-Alves, M., Secolin, R., Carvalho, B.S., Yasuda, C.L., Bilevicius, E., Alvim, M.K.M., *et al.* (2017). A Prediction Algorithm for Drug Response in Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy Based on Clinical and Genetic Information. *PLoS ONE* , 12 (1), e0169214.
196. Uebachs, M., *et al.* (2012). Loss of $\beta 1$ accessory Na⁺channel subunits causes failure of carbamazepine, but not of lacosamide, in blocking high-frequency firing via differential effects on persistent Na⁺currents. *Epilepsia* , 53, 1959–1967.
197. Scheffer, I.E., *et al.* (2007). Temporal lobe epilepsy and GEFS⁺phenotypes associated with SCN1B mutations. *Brain* , 130, 100–109.
198. Battino, D., *et al.* (1995). Clinical pharmacokinetics of antiepileptic drugs in paediatric patients. Part II. Phenytoin, carbamazepine, sulthiame, lamotrigine, vigabatrin, oxcarbazepine and felbamate. *Clin Pharmacokinet* , 29, 341–369.
199. Ricci, M.T., *et al.* (2014). SCN1B gene variants in Brugada Syndrome: a study of 145 SCN5A-negative patients. *Sci Rep* , 25 (4), 6470.
200. Jang, S., *et al.* (2009). Polymorphisms in the voltage-gated sodium channel genes and antiepileptic efficacy of carbamazepine. *J Korean Neurol Assoc* , 27, 147–153.
201. Namazi, S., *et al.* (2015). SCN1A and SCN1B gene polymorphisms and their association with plasma concentrations of carbamazepine and carbamazepine 10, 11 epoxide in Iranian epileptic patients. *Iran J Basic Med Sci* , 18 (12), 1215–1220.
203. OMIM. (s.f.). Recuperado el 05 de 01 de 2017, de <https://omim.org/entry/132810?search=ephx1&highlight=ephx1>.
204. Strickler, S.M., *et al.* (1985). Genetic predisposition to phenytoin-induced birth defects. 326, 746-749.
205. Buehler, B.A., *et al.* (1990). Prenatal prediction of risk of the fetal hydantoin syndrome. *New Eng J Med* , 322, 1567-1571.
206. *Maharaj Nakorn Chiangmai Hospital.* (2011). Recuperado el 2016 de http://www.med.cmu.ac.th/hospital/dis/2011/index.php?option=com_content&view=article&id=49:-anticonvulsants-cross-reactivity-&catid=16:answers-the-questions&Itemid=34

207. Gennis, M.A., *et al.* (1991). Familial occurrence of hypersensitivity to phenytoin. *Am J Med* , 91, 631-634.
208. Daci, A., *et al.* (2015). Polymorphic Variants of SCN1A and EPHX1 Influence Plasma Carbamazepine Concentration, Metabolism and Pharmacoresistance in a Population of Kosovar Albanian Epileptic Patients. *PLoS One* , 10 (11), e0142408.
209. Puranik, Y.G., *et al.* (2013). Association of carbamazepine major metabolism and transport pathway gene polymorphisms and pharmacokinetics in patients with epilepsy. *Pharmacogenomics* , 14 (1), 35-45.
210. Hung, C.C., *et al.* (2012). Association of polymorphisms in EPHX1, UGT2B7, ABCB1, ABCC2, SCN1A and SCN2A genes with carbamazepine therapy optimization. *Pharmacogenomics* , 13 (2), 159-169 .
211. Chbili, C., *et al.* (2016). Effects of EPHX1 and CYP3A4*22 genetic polymorphisms on carbamazepine metabolism and drug response among Tunisian epileptic patients. *J Neurogenet* , 30 (1), 16-21.
212. Ma, C.L., *et al.* (2015). Association between PK/PD-involved gene polymorphisms and carbamazepine-individualized therapy. *Pharmacogenomics* , 16 (13), 1499-1512 .
213. Liu, Z. (2015). Association of KEAP1 and NFE2L2 polymorphisms with temporal lobe epilepsy and drug resistant epilepsy. *Gene* , 571 (2), 231-236.
214. Bakir-Gungor, B., *et al.* (2013). Identifying SNP targeted pathways in partial epilepsies with genome-wide association study data. *Epilepsy Research* , 105 (1-2), 92-102.
215. Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R., & Schmidt, D. (2013). New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nar Rev Drug Discov* , 12 (10), 757-776.