



11254
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

ANTICUERPOS SERICOS CONTRA GLUR3B1 EN
EPILEPSIA PARCIAL REFRACTARIA COMPARADO
CON ANTICUERPOS SERICOS CONTRA GLUR3B1
EN EPILEPSIA PARCIAL NO REFRACTARIA

REPORTE PRELIMINAR
QUE PRESENTA
WALTER EDUARDO SANCHEZ VIDES
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN
NEUROLOGIA PEDIATRICA

TUTOR DE TESIS: LETICIA MUNIVE BAEZ



MEXICO, D. F.

2005

m343134



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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


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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**


**ANTICUERPOS SÉRICOS CONTRA GLUR3B1 EN EPILEPSIA PARCIAL
REFRACTARIA COMPARADO CON ANTICUERPOS SÉRICOS CONTRA
GLUR3B1 EN EPILEPSIA PARCIAL NO REFRACTARIA.**



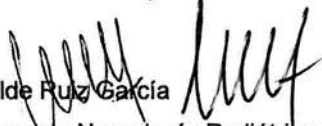
SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.


Dr. Pedro Antonio Sánchez Márquez

Director de Enseñanza


Dr. Luis Heshiki Nakandakari

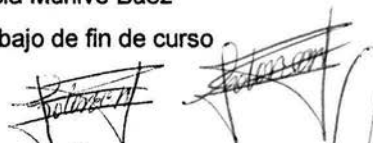
Jefe del departamento de Pre y Posgrado


Dra. Matilde Ruiz García

Profesora titular del curso de Neurología Pediátrica


Dra. Leticia Munive Báez

Tutora de trabajo de fin de curso


Dra. María Dolores Correa

Asesora en Metodología y Bioestadística


Dr. Pedro Gutiérrez Castellón

Asesor en Metodología y Bioestadística



**ANTICUERPOS SÉRICOS CONTRA GLUR3B1 EN EPILEPSIA PARCIAL
REFRACTARIA COMPARADO CON ANTICUERPOS SÉRICOS CONTRA
GLUR3B1 EN EPILEPSIA PARCIAL NO REFRACTARIA.**


¹Dr. Walter Eduardo Sánchez Vides, ²Dra. Leticia Munive, ²Dra. Matilde Ruiz,
³Dra. María Dolores Correa, ⁴Dr. Pedro Gutiérrez.

¹Residente de Neurología Pediátrica, ²Servicio de Neurología, ³Bacteriología
Experimental, ⁴Metodología de Investigación. Instituto Nacional de Pediatría.

INTRODUCCION: La epilepsia constituye uno de los principales problemas de salud pública, un porcentaje considerable son refractarias o de difícil control farmacológico, es importante identificar éste grupo de manera temprana para iniciar tratamientos agresivos que permitan un mejor control.

OBJETIVOS: Comparar los niveles séricos de anticuerpos contra GluR3B1 en pacientes con epilepsia parcial refractaria y epilepsia parcial no refractaria. Describir los niveles séricos de anticuerpos contra GluR3B1 en pacientes con epilepsia parcial sintomática y epilepsia parcial criptogénica.

MATERIAL Y METODOS: Se realizó en forma preliminar un estudio observacional, comparativo, prospectivo y transversal. Se revisaron expedientes de los pacientes con diagnóstico de epilepsia atendidos en el Servicio de Neurología, seleccionando 20 pacientes que cumplieron criterios de inclusión, el grupo control lo formaron 20 pacientes pareados por edad (con diferencia hasta de un año) y sexo, con diagnóstico de epilepsia parcial no refractaria. Se obtuvo financiamiento externo por medio de donativo realizado al Instituto Nacional de Pediatría para adquisición del péptido GluR3B1, actualmente protocolo detenido en espera de recibir reactivo, al concluirse trámites administrativos con SIGMA-GENOSYS Corporation; almacenándose muestras de pacientes con el fin de concluir proyecto en una segunda etapa.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Walter Eduardo
Sánchez Vides
FECHA: 12/04/2005
FIRMA: 

INDICE

1. Introducción.....	5
2. Objetivos.....	11
3. hipótesis.....	12
4. Material y Método.....	13
Diseño del estudio.....	13
Población.....	13
Criterios de inclusión.....	13
Criterios de exclusión.....	13
Variables.....	14
Muestra.....	14
Análisis estadístico.....	15
Aspecto éticos.....	16
5. Resultados.....	17
6. Recomendaciones.....	17
7. Referencias bibliográficas.....	18
8. Anexos.....	20

INTRODUCCION

La epilepsia es una Afección crónica con diferentes etiologías, caracterizada por repetición de crisis debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales asociadas eventualmente a síntomas clínicos o paraclínicos¹. Constituye uno de los principales problemas de salud pública. En México la prevalencia oscila entre 1.8 y 2 % lo que representa más de un millón de personas, de los cuales el 75% inician la enfermedad antes de los 15 años².

El diagnóstico de epilepsia es esencialmente clínico y electroencefalográfico, contando con herramientas de apoyo para realizar el diagnóstico etiológico como: tomografía axial computarizada craneal (TAC), resonancia magnética craneal (RM), tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

Desde el punto de vista etiológico se divide en sintomática, criptogénica e idiopática³. Es factible hablar de epilepsia sintomática cuando se dispone de una prueba que indique que un evento patológico precede la aparición de epilepsia, causando secuelas orgánicas que afectan la corteza cerebral y que ese sitio coincide con la sintomatología clínica y electroencefalográfica del paciente³. Criptogénico (del griego *Kryptos* "oculto") cuando se sospecha un origen secundario a una "lesión" cerebral, pero que no se ha podido demostrar con las pruebas complementarias al momento de clasificarla³. Epilepsias idiopáticas son usualmente entidades heredadas que causan alteraciones en transmisión de información a nivel neuronal sin anormalidad estructural³.

La respuesta al tratamiento farmacológico en general es buena, el 63% de los pacientes con epilepsia de reciente inicio permanecen libres de crisis durante el tratamiento con fármacos anticonvulsivantes o después de suspender la medicación⁴. La prevalencia de crisis convulsivas es mayor en pacientes con epilepsia sintomática o criptogénica respecto a epilepsia idiopática (40% vs. 26%) y en los pacientes con mas de 20 crisis antes de iniciar el tratamiento⁴. Los pacientes con muchas crisis antes de iniciar la terapia tienen una respuesta inadecuada al tratamiento inicial o mayor probabilidad de desarrollar epilepsia refractaria⁴. Entre el 35 y 40% de las epilepsias se vuelven difíciles de controlar

a pesar de diferentes combinaciones de medicamentos anticonvulsivantes, éste grupo de epilepsias es conocido de diversas formas: epilepsias de difícil control, epilepsias refractarias, epilepsias intratables o epilepsias farmacorresistentes⁵. No existe consenso para una definición del término epilepsia refractaria. Recientemente se han propuesto varias definiciones que consideran número de fármacos y tiempo de evolución de crisis epilépticas a pesar de terapia. Kwan y Brodie⁴ consideran epilepsia refractaria a una condición en la cual por lo menos dos anticonvulsivantes han fallado para controlar las crisis (debido a falta de eficacia pero no por efectos adversos). Berg⁶ propone considerar epilepsia refractaria cuando exista falla para el control de crisis epilépticas a pesar de 3 ó más fármacos de primera línea, con más de una crisis por mes durante 18 meses.

Identificar de forma temprana pacientes con epilepsia refractaria es de mucha importancia para iniciar el esquema farmacológico adecuado y evitar la propagación del foco epiléptico. Predictores de intratabilidad identificados son: inicio antes del año de edad, etiología sintomática, espasmos infantiles, alta frecuencia de crisis, historia de estado epiléptico, actividad lenta difusa y actividad focal punta onda en el electroencefalograma⁷. Hasta el momento no se tienen pruebas de laboratorio de fácil realización que se relacionen con refractariedad independientemente del tiempo de duración de ésta.

En 1942, Kopeloff *et al*⁸ demostraron que una respuesta autoinmune a un antígeno inyectado en corteza cerebral de monos desencadenó crisis epilépticas por lo que plantearon la hipótesis que un mecanismo autoinmune podría participar en desencadenar epilepsia después de infección o trauma. Pasaron más de 50 años sin evidencia convincente de la participación de un mecanismo autoinmune en la génesis de epilepsia⁹, pero en años recientes aparece evidencia que demuestra aumento de anticuerpos séricos contra el receptor de glutamato en el Síndrome de Rasmussen lo que implica un mecanismo autoinmune¹⁰.

Las sinapsis glutamatérgicas son las sinapsis predominantes en el sistema nervioso central de los mamíferos⁹. Al liberarse el glutamato actúa sobre

diferentes tipos de receptores de la membrana postsináptica. Hasta la fecha se conocen dos grandes grupos de receptores a glutamato.

El primer grupo son los llamados receptores ionotrópicos por que están acoplados a un canal catiónico, estos son ensamblajes multiméricos de cuatro unidades y son subdivididos en dos grupos: NMDA, llamado así por que reconoce al N-metil-D-aspartato y el segundo llamado no-NMDA, por que no reconoce al N-metil-D-aspartato sino al AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metilisoaxazol-4-propionato) y al kainato, estos dos últimos comparten estructuras básicas comunes, pero se pueden subdividir en base a la secuencia de aminoácidos; así los receptores AMPA en GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4; los receptores de tipo Kainato en GluR5, GluR6, GluR7¹¹. La mayoría de los receptores de glutamato son ionotrópicos; es decir, los lugares de enlace de los agonistas y el canal iónico asociado se hallan incorporados dentro del mismo complejo macromolecular. Los agonistas actúan para que se incremente la probabilidad de que el canal se abra. Los receptores de AMPA se distinguen de los de NMDA por sus agonistas selectivos (glutamato para los receptores de AMPA; aspartato y NMDA para los receptores de NMDA). La interacción del glutamato con los receptores de AMPA incrementa la probabilidad de que un canal iónico asociado se abra y permita el flujo de iones a través de la membrana. Se cree que la activación de los receptores de AMPA subyace a la gran mayoría de las transmisiones sinápticas rápidas en el SNC¹². La concentración de glutamato requerida para activar de mediana a máximamente estos receptores es de aproximadamente 15 μM ¹². Algunos receptores AMPA de neuronas y astrocitos en estructuras tan diversas como el cuerpo estriado, el hipocampo o el cerebelo, son permeables al Ca^{2+} , ésta permeabilidad al Ca^{2+} probablemente tenga gran importancia en la excitación neuronal por los receptores del glutamato, particularmente en los casos donde los receptores de NMDA parecen no operar¹².

El segundo grupo lo forman los receptores metabotrópicos de glutamato, reciben este nombre por su enlace mediante proteínas G a enzimas citoplasmáticas asociadas a segundos mensajeros, formado por los subgrupos mGluR1 al mGluR6.

La síntesis del GluR3 humano se codifica en el gen GRIA3 localizado en el cromosoma Xq25-q26¹³, es un receptor proteico formado por 894 aminoácidos, con peso molecular 101023 Da, dividido en dos dominios extracelulares que fijan ligandos (S1: aminoácidos 29-552 y S2: aminoácidos 657-823) y 4 porciones transmembranales (M1, M2, M3, M4) con sitios de glicosilación en aminoácidos 63, 266, 380, 415 y 422. La glicosilación influye en varias propiedades de los receptores incluyendo actividad de canales y modulación por lectinas¹².

La estimulación excesiva de las vías glutamatérgicas o la manipulación farmacológica que conduce a la activación del receptor de glutamato puede precipitar crisis epilépticas¹². La actividad epiléptica normalmente es resultado de activación de receptores de AMPA, a medida que la crisis epiléptica se intensifica, se observa una mayor implicación de los receptores de NMDA. Los antagonistas del receptor de NMDA pueden reducir la intensidad y la duración de la crisis epiléptica. El antagonismo de la activación del receptor de AMPA normalmente previene el inicio del evento. Esto sugiere que la actividad epileptiforme depende de la interacción entre el AMPA sináptico y los receptores de NMDA¹². Rogers¹⁰ demostró que conejos inmunizados con el dominio extracelular del GluR3 desarrollaron conductas típicas de crisis epilépticas, hemiparesia, con cambios neuropatológicos inflamatorios a nivel cerebral similares a los observados en pacientes con encefalitis de Rasmussen. Anticuerpos séricos a la estructura completa del GluR3 fueron detectados por análisis de Western Blot en dos de cuatro niños con encefalitis de Rasmussen¹⁰. El suero de conejos inmunizados con GluR3 se administró a ratas de laboratorio en las que se observó una acción agonista sobre el receptor GluR3 y causó daño neuronal a través de mecanismos excitotóxicos o lisis dependiente del complemento¹⁴. Anticuerpos hacia un péptido de 20 aminoácidos de la región extracelular del receptor GluR3 llamado GluR3B1 (aminoácido 400 a 419 NEYERFVPFSDQQISNDSAS) mimetizó el efecto de glutamato en cultivos neuronales y los ratones inmunizados con GluR3B1 desarrollaron síntomas parecidos a los observados en Encefalitis de Rasmussen¹⁴. El péptido GluR3B1 (aminoácido 400 al 419) forma parte del

dominio extracelular S1 y contiene un sitio de glicosilación en la posición 415 cercano al otro dominio extracelular S2, se cree que ambos dominios adoptan una forma bilobular y es el sitio de unión de glutamato y otros agonistas como AMPA. Por lo menos cinco estudios soportan la idea que los receptores de glutamato como muchas otras proteínas son construidas en forma modular, un dominio forma el poro, similar al canal de potasio, y dos dominios forman el sitio de unión de ligando^{15 16 17 18 19}. Estas observaciones apoyan la idea que los anticuerpos séricos contra GluR3 están involucrados en la patogénesis del Síndrome de Rasmussen. Wiendl²⁰ demostró elevación de anticuerpos séricos contra GluR3B1 en 30% de adultos con epilepsia refractaria de etiología no inflamatoria y en 20% de pacientes con encefalitis de Rasmussen, sugiriendo que su presencia puede ser secundaria mas que primaria para el proceso de la enfermedad y no es exclusiva del Síndrome de Rasmussen, estudios previos en adultos no han demostrado incremento en los niveles séricos de anticuerpos contra GluR3 en enfermedades neurológicas como meningitis, encefalitis, síndrome de Guillain-Barré, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, enfermedad de Creutzfeld-Jakob; sugiriendo que su elevación es exclusiva en pacientes con epilepsia refractaria²⁰. No se ha demostrado elevación de anticuerpos contra GluR3 en los pocos casos estudiados de epilepsias que responden adecuadamente al tratamiento¹⁰, estos estudios no se han desarrollado en población pediátrica con epilepsia refractaria.

Es importante reconocer de forma temprana los pacientes con epilepsia que tienen mas riesgo de evolucionar a refractariedad, esto permitiría iniciar un tratamiento farmacológico agresivo y una vigilancia mas cercana de la enfermedad para evitar complicaciones. Los indicadores de refractariedad conocidos corresponden a características clínicas, etiología y alteraciones electroencefalográficas. No se dispone al presente de una prueba de laboratorio que correlacione con refractariedad al tratamiento.

La importancia de realizar éste estudio radica en la posibilidad de demostrar la utilidad de la determinación sérica de anticuerpos contra GluR3B1 como una prueba de laboratorio fácil de realizar, reproducible, accesible, con poco riesgo para el paciente y que ayude a identificar tempranamente los casos de

epilepsia parcial que evolucionan a refractariedad, esto sería de utilidad para la toma de decisiones respecto a dosis, esquema inicial de anticonvulsivantes, cambio de medicamentos, prevención de complicaciones como el estado epiléptico y el deterioro cognitivo secundario a frecuencia elevada de crisis epilépticas.

OBJETIVOS

1-Comparar los niveles séricos de anticuerpos contra GluR3B1 en pacientes con epilepsia parcial refractaria y epilepsia parcial no refractaria.

2-Describir los niveles séricos de anticuerpos contra GluR3B1 en pacientes con epilepsia parcial sintomática y epilepsia parcial criptogénica.

HIPOTESIS

H0: No existen diferencias en el nivel de anticuerpos séricos contra GluR3B1 en pacientes con epilepsia parcial refractaria comparado con pacientes con epilepsia parcial no refractaria.

H1: Existe incremento de anticuerpos séricos contra GluR3B1 en pacientes con epilepsia parcial refractaria comparado con pacientes con epilepsia parcial no refractaria.

MATERIAL Y METODO

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Estudio de tipo observacional, comparativo, prospectivo y transversal

POBLACIÓN:

Pacientes con diagnóstico de epilepsia parcial refractaria con más de 6 meses de atención en el Servicio de Neurología del Instituto Nacional de Pediatría

CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE CASOS:

- Pacientes con diagnóstico de epilepsia parcial refractaria de etiología sintomática o criptogénica.
- Cualquier género.
- Desde 6 meses hasta 18 años.
- Pacientes con un mínimo de seis meses de seguimiento en el Servicio de Neurología.
- Firma de consentimiento informado por padres o tutores de paciente.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE CONTROLES:

- Pacientes con diagnóstico de epilepsia parcial no refractaria de etiología sintomática o criptogénica.
- Cualquier género.
- Desde 6 meses hasta 18 años.
- Pacientes con un mínimo de seis meses de seguimiento en el servicio de neurología.
- Firma de consentimiento informado por padres o tutores de paciente

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE CASOS:

- Epilepsias y Síndromes epilépticos generalizados.
- Epilepsias y Síndromes epilépticos que no se determina si son parciales o generalizados.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE CONTROLES:

- Epilepsias y Síndromes epilépticos generalizados.
- Epilepsias y Síndromes epilépticos que no se determina si son parciales o generalizados

LUGAR DEL ESTUDIO:

Servicio de Neurología del Instituto Nacional de Pediatría, centro de tercer nivel de la Secretaría de Salud

DURACIÓN DEL ESTUDIO:

A partir de agosto 2004, la fecha de finalización está sujeta a la disponibilidad del péptido para montar la técnica de anticuerpos séricos contra GluR3B1

VARIABLES:

Variable Independiente:

Niveles séricos de anticuerpos contra GluR3B1: variable numérica continua.

Variable Dependiente:

Diagnóstico o no de epilepsia parcial refractaria: variable cualitativa, nominal y dicotómica

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

No se encontró un estudio que reúna las mismas características de la población y patología estudiada. Se encontraron estudios realizados en adultos donde comparan Síndrome de Rasmussen, epilepsia parcial sintomática, enfermedades degenerativas, inflamatorias y autoinmunes que afectan sistema nervioso, pero en ningún momento epilepsia parcial refractaria versus epilepsia parcial no refractaria en adultos o en población pediátrica, que sería nuestro grupo de estudio, por lo que se decidió realizar un estudio piloto de 20 pacientes en cada grupo

PROCESO DE LA INVESTIGACIÓN:

- 1) En una primera fase se revisaron los expedientes clínicos de todos los pacientes con diagnóstico de epilepsia atendidos en el servicio de neurología durante los meses de septiembre y octubre 2004, seleccionando 20 pacientes que cumplieron criterios de inclusión y formaron el grupo de casos; el grupo control lo formaron 20 pacientes pareados por edad (con diferencia hasta de un año) y sexo, con diagnóstico de epilepsia parcial no refractaria.
- 2) En una segunda fase se solicitó a los padres de los pacientes su participación en el estudio, firmando Carta de consentimiento informado (anexo).
- 3) A los pacientes reclutados para el estudio se les tomaron 2 ml de sangre para la determinación de anticuerpos contra GluR3B1.
- 4) No fue posible implementar la técnica de ELISA para determinar niveles séricos de Anti-GluR3B1 (anexo) por falta del péptido GluR3B1, procediendo a almacenar los sueros de los pacientes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se efectuará análisis estadístico a través del paquete STATA 8, efectuándose descripción de las variables mediante medidas de tendencia central y dispersión con cálculo de media aritmética +/- desviación estándar en caso de números continuos con distribución Gaussiana; mediante mediana con cálculo de mínimos - máximos en el caso de variables continuas sesgadas o con porcentajes en el caso de variables categóricas. Se efectuará comparación de las variables de entrada al estudio así como de las variables de desenlace a través de chi-cuadrada o prueba exacta de Fisher en el caso de variables categóricas o a través de T de Student o en su defecto U de Mann-Whitney en el caso de variables numéricas considerando en cada caso un valor significativo de $p < 0.05$

ASPECTOS ÉTICOS:

El proyecto seguirá los lineamientos internacionales para investigación biomédica en seres humanos (CIOMS-WHO 1993), los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la asociación Médica Mundial (declaración de Helsinki) en su 52ª asamblea general (Edimburgo, Escocia octubre del 2000) y será conducido en conformidad con las buenas prácticas clínicas vigentes y de acuerdo a los requerimientos locales.

Todos los padres o tutores firmaron el consentimiento informado para participar en el mismo (anexo). Todos los datos obtenidos del proceso de investigación permanecerán confidenciales y serán propiedad del INP. La identidad de los pacientes permanecerá en el anonimato y no serán públicos datos que revelen su identidad.

RESULTADOS

El análisis de los resultados se llevará a cabo posterior al procesamiento de las muestras.

REFERENCIAS

- ¹ Gastaut H. Diccionario de Epilepsia. Ginebra: OMS; 1973.
- ² Rubio Donnadiou Francisco, Resendiz Aparicio Juan. Lineamientos para el tratamiento de epilepsia. Programa Prioritario de epilepsia, SSA, AMN, CAMELICE, OMS.
- ³ Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1989; 30:389-399.
- ⁴ Kwan, P., Brodie, M.J. (2000). Early identification of refractory epilepsy. *New Eng J Med.* 342, 314-319.
- ⁵ Sander JWAS. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 1993;34:1007-16.
- ⁶ Berg, A.T. S. Shinnar et al. Early development of intractable epilepsy in children *Neurology* 2001;56: 1445-1452.
- ⁷ Camfield C, Camfield P, Gordon K, Dooley J. Does the number of seizures before treatment influence ease of control or remission of childhood epilepsy? Not if the number is 10 or less. *Neurology* 1996; 46: 414.
- ⁸ Kopeloff L.M., Barrera S.E. y Kopeloff N. Recurrent convulsive seizures in animals produced by immunologic and chemical means. *Am. J. Psychiatry* 98, 881-902 (1942).
- ⁹ McNamara J. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 1999; 399: A15-A22.
- ¹⁰ Rogers, S.W. et al, (1994). Autoantibodies to glutamate receptor GluR3 in Rasmussen's encephalitis. *Science* 265, 648-651.
- ¹¹ Keinanen, K., Widsen, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T.A., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249, 556-560.
- ¹² R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, and S. F. Traynelis. The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews* 1999. 51: 7-62.
- ¹³ GeneBank accesión numberP42263.
- ¹⁴ He X-P, Patel M, Whitney KD, et al. Glutamate receptor GluR3 antibodies and death of cortical cells. *Neuron* 1998; 20: 153-163.

-
- ¹⁵ Conn, P.J., Pin, J-P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 37, 205-237.
- ¹⁶ Stern P, Behe P, Schoepfer R and Colquhoun D (1992) Single-channel conductance of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc R Soc Lond B* 250:271-277.
- ¹⁷ Stern P, Cik M, Colquhoun D and Stephenson FA (1994) Single channel properties of cloned NMDA receptors in a human cell line with results from *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 476:391-397.
- ¹⁸ Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard PO, O'Hara PJ and Heinemann SF (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*13:1345-1357.
- ¹⁹ Stern-Bach Y, Russo S, Neuman M and Rosenmund C (1998) A point mutation in the glutamate binding site blocks desensitization of AMPA receptors. *Neuron* 21:907-918.
- ²⁰ Wiendl H, Bien CG, Bernasconi P, et al. GluR3 antibodies: prevalence in focal epilepsy but no specificity for Rasmussen's encephalitis. *Neurology* 2001; 57:511-514.

Anexo 1: Definiciones operacionales.

Epilepsia: Presentación crónica y recurrente de fenómenos paroxísticos por descargas eléctricas anormales en el cerebro (crisis epilépticas) que tiene manifestaciones clínicas variadas y causas muy diversas.

Epilepsia parcial: síntoma explicable por la disfunción de una región cerebral y EEG con descarga focalizada que dura de segundos a pocos minutos.

Epilepsia Parcial Refractaria: más de una crisis epiléptica por mes en últimos 6 meses a pesar del uso adecuado de dos o más fármacos anticonvulsivantes de primera línea.

Epilepsia parcial no refractaria: sin crisis epilépticas en los últimos 6 meses independientemente de la cantidad de fármacos anticonvulsivantes.

Anticuerpos: proteínas unidas a azúcares (glicoproteínas) secretadas por un tipo particular de células, llamadas linfocitos B. Su propósito es reconocer cuerpos extraños como bacterias y mantener al organismo libre de ellos.

Autoanticuerpo: Anticuerpo dirigido contra componentes normales del organismo producido en algunos estados patológicos.

Receptor: es una estructura (generalmente una proteína) o sitio molecular sobre la superficie o en el interior de una célula que se liga a sustancias tales como hormonas, drogas o neurotransmisores.

ELISA: es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (enzyme linked inmuno sorbent assay). Como todo ensayo inmunoenzimático, la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos.

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

SERVICIO DE NEUROLOGIA

Protocolo de Anticuerpos séricos contra GluR3B1 en epilepsia parcial refractaria comparado con anticuerpos séricos contra GluR3B1 en epilepsia parcial no refractaria.

HOJA DE RECOLECCION DE INFORMACION

Expediente: □□□□□□

Edad en meses: □□

Género: □

1.-masculino

2.-femenino

Diagnóstico: □

1.-epilepsia parcial refractaria

2.-epilepsia parcial no refractaria

Etiología: □

1.-Sintomática

2.-Criptogénica

Niveles de anticuerpos contra GluR3: □□□ densidades ópticas.

INFORMACION PARA EL PACIENTE Y FORMULARIO DE
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Protocolo: Anticuerpos séricos contra GluR3B1 en epilepsia parcial refractaria comparado con anticuerpos séricos contra GluR3B1 en epilepsia parcial no refractaria.

Patrocinador del estudio:

Servicio de Neurología, Instituto Nacional de Pediatría

Dirección: Avenida Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes-Cuicuilco, Delegación Coyoacán, CP 04530, México D.F.

Teléfono: 10840900 extensión 1358

Investigador del estudio: Dra. Leticia Munive Báez

Centro: Instituto Nacional de Pediatría, Servicio de Neurología

Dirección: Avenida Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes-Cuicuilco, Delegación Coyoacán, CP 04530, México D.F.

Teléfono: 10840900 extensión 1358

INTRODUCCION

Se le está preguntando si aprobará la participación de su hijo en un estudio de investigación en el que se determinará la presencia en sangre de un anticuerpo. También se le preguntará a su hijo si desea participar en el estudio. La participación en éste estudio es totalmente voluntaria. Usted puede decidir si quiere que su hijo participe o no en el estudio. Si su hijo participa en el estudio, usted puede retirarlo del estudio en cualquier momento. En cualquier caso, su decisión no implicará penalidad alguna ni afectará la atención médica que su hijo regularmente recibe ni cualquier beneficio que en otras circunstancias su hijo tuviera derecho a recibir. Si hubiere algo que usted no entiende acerca del estudio luego de leer ésta información, sírvase consultar al médico del estudio que atiende a su hijo o a un miembro del personal del estudio.

El objetivo de éste estudio es ayudar a los investigadores a descubrir si existe elevación de anticuerpos séricos contra el péptido GluR3B1 en niños de 6 meses a 18 años de edad con diagnóstico de epilepsia parcial refractaria.

La determinación de anticuerpos séricos contra el péptido GluR3B1 es una prueba que no está disponible de forma comercial, no ha sido validada como prueba de laboratorio para apoyar el diagnóstico de epilepsia; por lo tanto se considera un examen experimental en éste estudio.

Su hijo participará en éste estudio en una sola ocasión, al permitir la extracción de una muestra de sangre de 2 ml. Un total de 40 pacientes participarán en el estudio en el servicio de Neurología del Instituto Nacional de Pediatría. La muestra de sangre se almacenará y posteriormente por medio de una técnica de laboratorio llamada ELISA se determinará la presencia del anticuerpo.

Esto es lo que sucederá, si usted decide permitirle a su hijo que participe en éste estudio:

Lo *primero* que se hará es revisar éste documento. Antes de que usted lo firme, el médico del estudio o el personal del mismo responderán cualquier pregunta que usted pueda tener.

El médico que atiende a su hijo hablará con usted y con su hijo acerca de la epilepsia que éste sufre, le hará preguntas acerca de la salud de su hijo y registrará la frecuencia de crisis en los últimos 6 meses.

Se le extraerá a su hijo de una vena de su brazo 2 ml de sangre (aproximadamente la mitad de una cucharada cafetera) para realizar el análisis de laboratorio. Éste análisis se refiere a la determinación de anticuerpos contra el péptido GluR3B1.

Al coleccionar las 40 muestras de sangre se realizará por un método llamado ELISA el análisis de laboratorio.

Sus Responsabilidades

Si usted decide permitir que su hijo participe en éste estudio, usted y su hijo deberán:

-
- Permitir la toma de una muestra de sangre de 2 ml (aproximadamente la mitad de una cucharada cafetera)

Si usted no cumple con las indicaciones descritas previamente, su hijo no podrá ser incluido en el estudio.

Beneficios

Sí su hijo participa en éste estudio no recibirá remuneración económica, se realizará el análisis de forma gratuita, éste examen no forma parte de los análisis de rutina.

Su hijo puede o no beneficiarse personalmente al participar en éste estudio.

La participación de su hijo en éste estudio ayudará a los investigadores a descubrir sí los anticuerpos contra el péptido GluR3B1 se encuentran elevados en pacientes con epilepsia refractaria.

Riesgos

Los riesgos para su hijo están en relación a la extracción de sangre. Éstos incluyen dolor, infección, hematoma (moretón) en el lugar donde se extrajo la sangre, y desmayo. Su hijo puede experimentar o no algunos de éstos efectos colaterales.

Suspensión temprana

Usted puede decidir que su hijo abandone el estudio en cualquier momento. Su médico también puede decidir retirar a su hijo del estudio si no cumplen las instrucciones dadas, por razones médicas o por otros motivos. También existe la posibilidad que el estudio pueda ser suspendido por el patrocinador, antes de que su hijo complete la participación en el mismo.

Compensación

Si su hijo tuviera alguna lesión o enfermedad que se presentara como resultado directo de tomar parte en éste estudio, se le proporcionará tratamiento médico

que se coordinará a través del investigador principal. Este tratamiento estará disponible sin costo para usted.

Usted no renuncia a ninguno de sus derechos legales al firmar esta forma de consentimiento

No tendrá algún costo para el paciente el participar en éste estudio.

Confidencialidad y Privacidad de los Datos

Formulario del Estudio: Durante el estudio, el médico que atiende a su hijo registrará la información sobre su hijo en el formulario de estudio. Esta información incluirá la historia clínica de su hijo. El médico la conservará para el archivo del estudio. Usted tiene el derecho de revisar la copia de estos formularios del estudio que conservará el médico. Su hijo no será identificado por su nombre. En cambio, se le asignará un número de identificación de paciente. En estos formularios se identificará a su hijo únicamente con un número de sujeto del estudio. Todos los registros en los que figure el nombre de su hijo serán conservados por el médico que atiende a su hijo y se mantendrá su confidencialidad. El nombre de su hijo nunca aparecerá en reportes o publicación alguna. Sin embargo como los formularios del estudio contendrán otra información que puede ser exclusiva de su hijo y la historia clínica, es posible que ésta información identifique a su hijo aún sin un identificador directo como su nombre.

Registro médicos que no sean los formularios del estudio: Puede ser que la comisión de ética e investigación de la Institución, la Secretaría de Salud en México y otros organismos regulatorios del gobierno necesiten revisar los registros médicos de su hijo para asegurarse de que la información incluida en los formularios del estudio es correcta. Dichas revisiones tendrán lugar en el centro de estudio o en el lugar donde se archivaran los registros.

Uso de la información: el médico del estudio podrá utilizar la información reunida sobre su hijo durante el estudio.

Autorización para divulgar: Al firmar éste formulario de consentimiento informado, usted está autorizando que se realice la divulgación de información.

No tiene que autorizar la divulgación de información. No obstante, si no lo hace, su hijo no podrá participar en el estudio.

Vencimiento de la autorización: Debido a que esta información está siendo divulgada para ser utilizada en la investigación, la autorización para divulgar y utilizar la misma no posee una fecha de vencimiento.

Financiamiento del estudio

El patrocinador NO le está pagando al médico que atiende a su hijo, únicamente cubre los costos de la compra de reactivo para desarrollar la técnica de anticuerpos contra el péptido GluR3B1.

En Caso de dudas

Para dudas sobre sus responsabilidades o los procedimientos del estudio sírvase contactar a:

Investigador principal. Dra. Leticia Munive, teléfono 10840900 Ext. 1358

Para dudas sobre los derechos de su hijo como participante en éste estudio, sírvase contactar a:

Comité de Ética. Dr. Rigoberto Martínez-Benavides, Teléfono. 10840900 Ext. 1482

Para dudas sobre las posibles lesiones ocasionadas por procedimientos del estudio sírvase contactar a:

Investigador principal. Dra. Leticia Munive, teléfono 10840900 Ext. 1358

Formulario de consentimiento

Declaración de participante voluntario

- Estoy de acuerdo en forma voluntaria en que mi hijo participe en éste estudio
- Entiendo que el Servicio de Neurología, patrocinador del estudio puede suspender el estudio en cualquier momento. Si esto sucediera, entiendo que a mi hijo no se le realizarán las evaluaciones planeadas
- He leído y entiendo ésta declaración de consentimiento informado y los riesgos descritos
- Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de éste formulario de consentimiento
- He tenido la oportunidad de formular preguntas y entiendo las respuestas dadas a todas las preguntas

1. sujeto

(el sujeto deberá firmar, anotar su nombre y la fecha se su puño y letra)

Nombre del sujeto (letra de imprenta)

Firma del sujeto

fecha (día/mes/año)

2. Firma de los padres y/o tutor

(los padres y/o tutor deberán firmar, anotar su nombre y fecha de su puño y letra)

PADRE

Nombre del padre o tutor

Firma del padre o tutor

fecha (día/mes/año)

MADRE

Nombre de la madre o tutor

Firma de la madre o tutor

fecha (día/mes/año)

3. Testigos

TESTIGO 1

Nombre del primer testigo

Firma del primer testigo

fecha (día/mes/año)

Dirección del primer testigo:

Relación con el sujeto de investigación: _____

TESTIGO 2

Nombre del segundo testigo

Firma del segundo testigo

fecha (día/mes/año)

Dirección del segundo testigo:

Relación con el sujeto de investigación: _____

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

SERVICIO DE NEUROLOGIA

Protocolo de Anticuerpos séricos contra GluR3B1 en epilepsia parcial refractaria comparado con anticuerpos séricos contra GluR3B1 en epilepsia parcial no refractaria.

TOMA DE MUESTRA SANGUINEA

Se obtendrá una muestra de 2 ml de sangre por punción de una vena, empleando agujas desechables de 23G X 25mm o 21G X 32 mm, previa limpieza del área elegida con torunda y alcohol. Las muestras se colectaran en un tubo seco sin anticoagulante y luego refrigeradas entre 4 y 8°C, posteriormente centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos para obtener finalmente el suero.

TECNICA DE ELISA PARA DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS
CONTRA GluR3B1.

Para determinar anticuerpos en el suero de los pacientes se usará un procedimiento estándar: se colocan 50 µl/pozo del péptido GluR3B1 a 20µg/mL en PBS con tween 20 al 0.05% v/v (PBS-T) en placas de unión fuerte (high binding-Maxisorp, Nunc), y se incuba durante toda la noche a 4 °C. Los lavados se realizan 5 veces con 100 µl/pozo de PBS-T, durante 5 minutos. Se incuba con albúmina bovina al 10.0% en PBS-T durante 2 h a 37 °C. Después de lavar otras 5 veces, los sueros problema se diluyen desde 1:10 hasta 1:10,000 en PBS-T y se incuban, por duplicado, durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar 5 veces se añaden 50 µl/pozo de peroxidasa-anticuerpos contra IgG a la dilución óptima establecida en ensayos previos de titulación. Se incuba 2 horas más a 37 °C y se hacen 3 lavados con PBS-T y 2 con PBS. Para revelar la reacción se añaden 50 µl/pozo de la solución de sustrato/cromógeno que contiene, por cada 10 mL de solución de citratos 0.1M: 4 µl de H₂O₂ al 30%, y 4 mg de O-fenilendiamina. Se incuba durante un máximo de 30 minutos, después de lo cual se para la reacción con 50 µl/pozo de H₂SO₄ 2.0 N y se registra la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA.