



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN *EFHC2* EN PACIENTES  
MEXICANOS CON EPILEPSIA MIOCLÓNICA JUVENIL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Q.F.B. LIMA VILLEDA GABRIEL ARTURO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. AURELIO JARA PRADO**  
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA

**COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUÁREZ**  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

CD. MX., NOVIEMBRE, 2018



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN *EFHC2* EN PACIENTES  
MEXICANOS CON EPILEPSIA MIOCLÓNICA JUVENIL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Q.F.B. GABRIEL ARTURO LIMA VILLEDA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. AURELIO JARA PRADO**  
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA

**COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUÁREZ**  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

MÉXICO, CD. MX., NOVIEMBRE, 2018



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de agosto de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **LIMA VILLEDA GABRIEL ARTURO** con número de cuenta **305801447**, con la tesis titulada **"BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN EFHC2 EN PACIENTES MEXICANOS CON EPILEPSIA MIOCLÓNICA JUVENIL"**, realizada bajo la dirección del **DR. AURELIO JARA PRADO**:

Presidente: DR. JUAN CARLOS MARTÍNEZ LAZCANO  
Vocal: DRA. ALEJANDRA EUGENIA MEDINA RIVERA  
Secretario: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO  
Suplente: DRA. YALBI ITZEL BALDERAS MARTÍNEZ  
Suplente: DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUÁREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 15 de octubre de 2018

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos Institucionales**

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, que me dio las bases para crecer académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada que me permitió obtener este posgrado.

A mi Tutor, el Dr. Aurelio Jara Prado, por guiarme y apoyarme durante mi estancia en el Laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

A mi comité tutor, la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y a la Dra. Sandra Orozco Suárez, por sus críticas y enseñanzas que mejoraron este proyecto y me ayudaron a crecer profesionalmente.

## **Agradecimientos Personales**

A mis Padres, María Luisa Villeda Camargo y José Fernando Lima Cedillo y a mis hermanos, Fernando, Brenda, Mónica, Diana y Lizzouli. A todos por apoyarme siempre y darme la oportunidad de concluir esta importante etapa de mi vida. Porque sin su cariño nunca hubiera podido con esta enorme tarea. ¡Muchas gracias!

A mi tutor, el Dr. Aurelio Jara, que siempre me enseñó y apoyó desde que inicié mi servicio social y hasta la conclusión de esta tesis. Muchas gracias por todo, Doc.

A la Dra. Sandra Díaz, que además de ser parte de mi comité tutorial y ser guía en este proyecto, también le agradezco todo lo que me ha enseñado, su apoyo y las oportunidades que me ha brindado. Muchas gracias, Doctora.

A todos mis amigos del laboratorio de Neurogenética INNyN, Jorge, Leticia, Adriana, David, Ixiu, Chucho, Andrea, Danihui, Karina, Miguel, que siempre me alegraban los días en el laboratorio e indirectamente aligeraban el trabajo. Muchas gracias a todos.

A la UNAM, que me ha brindado todo desde la licenciatura y seguir creciendo hasta llegar hasta aquí; desde lo académico hasta los recursos que me ha dado y también el crecimiento como persona por todas las vivencias que me ha ofrecido.

# Índice

Lista de figuras	
Lista de Tablas	
Glosario de abreviaturas	
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Introducción</b> .....	<b>5</b>
<b>2 Antecedentes</b> .....	<b>8</b>
Epilepsia y crisis epilépticas.....	8
Epidemiología de la Epilepsia.....	8
Epilepsia Mioclónica Juvenil.....	12
Epidemiología de la Epilepsia Mioclónica Juvenil .....	12
Características clínicas generales .....	13
Tratamiento .....	17
Agregación familiar .....	18
Genética de la EMJ .....	18
Técnicas para escaneo y detección de variantes de secuencia .....	31
Conformación Polimórfica de Cadena Sencilla (SSCP) .....	31
Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).....	32
La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia desnaturalizante (DHPLC) ....	32
Análisis de Curvas de Disociación de Alta Resolución (análisis HRM).....	33
<b>3 Objetivos</b> .....	<b>34</b>
Objetivo general .....	34
Objetivos particulares .....	34

<b>4 Metodología</b> .....	<b>35</b>
Diseño Experimental .....	35
Tamaño de muestra .....	35
Criterios de selección de estudio .....	35
Descripción de pacientes incluidos en el estudio .....	37
Procedimientos .....	39
Cuantificación, pureza e integridad de las muestras de DNA .....	39
Diseño de primers .....	40
Análisis HRM (Curvas de disociación) .....	41
Secuenciación .....	42
Análisis de resultados .....	43
<b>5 Resultados</b> .....	<b>46</b>
<b>6 Discusión de resultados</b> .....	<b>55</b>
<b>7 Conclusiones y perspectivas</b> .....	<b>66</b>
<b>8 Literatura citada</b> .....	<b>68</b>
Anexo 1: Listas de primers diseñados para el análisis .....	78

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de clasificación de las epilepsias propuesto por la ILAE.....	11
<b>Figura 2</b> Curso de la epilepsia mioclónica juvenil. ....	13
<b>Figura 3</b> Subsíndromes de EMJ .....	16
<b>Figura 4</b> Representación esquemática del gen <i>EFHC1</i> .....	21
<b>Figura 5</b> Representación esquemática de Mioclonina/EFHC1 .....	22
<b>Figura 6</b> Dominio EF-Hand.....	23
<b>Figura 7</b> Comparación de proteínas ortólogas en humano y chlamydomonas que contienen el dominio DM10.....	24
<b>Figura 8</b> Interrupción de la migración radial de las neuronas cuando se afecta la función de <i>EFHC1</i> .....	26
<b>Figura 9</b> Defectos en el huso mitótico por alteración de EFHC1.....	28
<b>Figura 10:</b> Histograma de la distribución de pacientes seleccionados con respecto a la edad de inicio .....	38
<b>Figura 11</b> Representación esquemática de la ubicación de los primers diseñados para el análisis HRM .....	40
<b>Figura 12</b> Difference Plot del exon 13 de <i>EFHC2</i> .....	46
<b>Figura 13</b> Difference Plot del fragmento 'a' del exón 2 de <i>EFHC2</i> .....	47
<b>Figura 14</b> Difference plot del fragmento 'a' del exón 5 de <i>EFHC2</i> .....	48
<b>Figura 15</b> Difference plot del fragmento 'a' del exón 12 de <i>EFHC2</i> .....	48

<b>Figura 16</b> Difference plot del fragmento del exón 14 de <i>EFHC2</i> .....	49
<b>Figura 17</b> Difference plot del fragmento 'b' del exón 2 de <i>EFHC2</i> .....	50
<b>Figura 18</b> Electroferogramas que muestran las variantes encontradas en el gen <i>EFHC2</i> .....	53
<b>Figura 19:</b> Esquema de la región chrX:44,171,824-44,171,926, donde se localizan los SNPs rs61636783 y rs17146914 y los sitios de unión de factores de transcripción.....	64
<b>Figura 20</b> Representación esquemática de la proteína EFHC2 .....	65

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1</b> Resultados del tamizaje de los fragmentos 2a y 2b obtenidos por HRM y validados por secuenciación de Sanger automatizada .....	51
<b>Tabla 2</b> Resumen de resultados de la genotipificación del gen <i>EFHC2</i> .....	54
<b>Tabla 3</b> Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes encontradas .....	57
<b>Tabla 4</b> Resultados de los algoritmos de predicción para mutaciones no sinónimas, conservación de nucleótidos y señales de splicing. ....	60
<b>Tabla 5:</b> Resultados de la consulta de sitios de unión a factores de transcripción y predicción de sitios de unión.....	62
<b>Tabla 6</b> Primers diseñados para el análisis del gen <i>EFHC2</i> .....	78
<b>Tabla 7:</b> Primers usados para la secuenciación.....	80

## Glosario de abreviaturas

AS	Crisis astáticas
ACMG	Colegio Americano de Genética y Genómica Médica
CTCGs	Crisis Tónico Clónicas Generalizadas
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización)
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida Desnaturalizante de Alta Eficiencia)
GERP++	Genomic Evolutionary Rate Profiling, un algoritmo bioinformático que identifica regiones que se encuentren bajo presión evolutiva
EAJ	Epilepsia de Ausencias Juvenil
EAN	Epilepsia de Ausencias de la Niñez
EEG	Electroencefalograma
EMJ	Epilepsia Mioclónica Juvenil
HRM	High Resolution Melting (Disociación de Alta Resolución)
ILAE	International League Against Epilepsy (Liga Internacional Contra la Epilepsia)
NHGRI	National Human Genome Research Institute (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano)
SNC	Sistema Nervioso Central
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism (Conformación Polimórfica de Cadena Sencilla)

## Resumen

La Epilepsia Mioclónica Juvenil (EMJ) es una enfermedad neurológica que afecta aproximadamente a una persona por cada millón de habitantes a nivel mundial. La EMJ está considerada dentro de las Epilepsias Generalizadas Genéticas y se han encontrado mutaciones causales de la enfermedad en 5 genes: *GABRA1*, *CACNB4*, *GABRD*, genes que codifican a subunidades de distintos canales iónicos, el gen *CASR* involucrado en la homeostasis de calcio, más recientemente el gen *CPA* que participa en la biosíntesis de neuropéptidos, y el gen *EFHC1*, que a pesar de que su función aún no es clara, en él se encontraron numerosas mutaciones causantes de EMJ en pacientes mexicanos y se considera que es el gen que causa el mayor número de casos de EMJ.

Aún no se identifican todos los genes causantes de EMJ, pero existe evidencia que sugiere una asociación del gen *EFHC2* con el desarrollo de EMJ. *EFHC2* es el único parálogo de *EFHC1* y podría tener una función similar o relacionada.

El objetivo de este trabajo fue buscar variantes en el gen *EFHC2* que se asociaran a Epilepsia Mioclónica Juvenil en una muestra de 101 pacientes mexicanos con EMJ clásica. Primero se realizó un tamizaje por medio de análisis de curvas disociación de alta resolución (HRM por sus siglas en inglés) para buscar variantes de secuencia que posteriormente se confirmaron por secuenciación de Sanger automatizada.

Se encontraron 5 variantes ya reportadas: rs17146914 (p.N31S), rs61636783 (p.C57Y), rs2208592 (p.S430Y), rs3747354 (p.E507Q); rs7887384; y una nueva variante no reportada: c.\*10 T>C. Las variantes no parecen tener un efecto evidente en el fenotipo de los pacientes. Las frecuencias alélicas fueron similares a las reportadas en otras poblaciones y el análisis bioinformático de las variantes mostró que existe muy poca probabilidad que las variantes tengan efectos patogénicos en la función de *EFHC2*. Con base en las recomendaciones de la

Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI, por sus siglas en inglés) y del Colegio Americano de Genética Médica (ACMG, por sus siglas en inglés) para la clasificación de variantes genéticas con posible participación en enfermedades humanas, concluimos que las variantes encontradas no tienen un efecto patogénico en la función del gen *EFHC2* y no son causantes de Epilepsia Mioclónica Juvenil en los pacientes de esta muestra. A pesar de esto, aún no podemos descartar que se traten de variantes que puedan aumentar el riesgo de padecer EMJ y este estudio da la pauta llevar a cabo otros estudios que puedan determinar si alguna de estas variantes o haplotipos de las variantes, puedan ser de susceptibilidad a desarrollar EMJ.

Palabras clave: epilepsia mioclónica juvenil, EMJ, *EFHC2*, *EFHC1*, mioclonina, HRM, recomendaciones NHGRI y ACMG,

## Abstract

Juvenile Myoclonic Epilepsy (JME) is a neurological disorder that affects nearly one in every 1,000,000 persons worldwide. It is included in the Genetic Generalized Epilepsies and some genes known to be causal are: *GABRA1*, *GABRD* y *CACNB4*, genes that encode different ion channel subunits and the gene *EFHC1*, which function is not clear yet, numerous JME causal mutations had been found in Mexican patients and it is regarded as the principal disease gene in JME.

Not all JME genes have been identified to date, but recently, several studies suggest a tentative association between *EFHC2* gene and JME. *EFHC2* is the only *EFHC1* paralogue, and its function might be related.

The aim of this study was to find JME causative sequence variants in the *EFHC2* gene, in a sample of 101 classic JME patients. First, a screening was carried out with HRM analysis to look out for sequence variants that were later confirmed with automated Sanger sequencing.

Five previously known variants were found: rs17146914 (p.N31S), rs61636783 (p.C57Y), rs2208592 (p.S430Y), rs3747354 (p.E507Q); rs7887384, and one unknown variant c.\*10 T>C. The variant analysis was carried out following the NHGRI and ACMG guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease, and the variants found does not seem to have a noticeable effect in the phenotype of the patients. Additionally, the allelic frequencies were like those reported in other populations and therefore, could be present in healthy individuals. Furthermore, the bioinformatic analysis indicated that there is low probability that the impact of these sequence variants was pathogenic for *EFHC2* function. We conclude that the variants found do not have a pathogenic effect in *EFHC2* gene function and they are not the cause of JME in our patient sample. Despite this, we cannot dismiss the possibility that these variants may be related to an increased

risk of JME and this study is a stepping stone for more research that could establish if any of these variants are JME susceptibility alleles or haplotypes.

Keywords: juvenile myoclonic epilepsy, JME, *EFHC2*, *EFHC1*, mioclonin, HRM, NHGRI and ACMG guidelines.

# 1 Introducción

Las epilepsias son uno de los desórdenes neurológicos más frecuentes y afectan cerca del 1% de la población mundial (Singh y Trevick, 2016) y en México existen hasta 38 casos por cada 1000 habitantes. (Burneo, et al. 2005). Las causas de esta enfermedad son muy diversas, abarcando anomalías estructurales en el sistema nervioso central, de secundarias a una infección, una enfermedad metabólica, a una lesión cerebral, también de origen genético y de origen desconocido (Scheffer, *et al.* 2017).

Dentro de las epilepsias de origen genético, se encuentra la Epilepsia Mioclónica Juvenil (EMJ) y representa desde un 5% hasta un 10% de todos los casos de epilepsia, siendo este uno de los síndromes más frecuentes de epilepsia (Camfield, Striano y Camfield, 2013).

La EMJ se caracteriza por aparecer durante el curso de la adolescencia, presentando crisis mioclónicas, en ocasiones crisis tónico-clónicas generalizadas y en menor frecuencia, crisis de ausencia. Estas crisis generalmente se manifiestan al despertar y también están relacionadas a periodos de sueño insuficiente (Genton, *et al.*, 2013).

Se propuso la existencia de cuatro subsíndromes de la EMJ que se definen principalmente por el tipo de crisis que presentan y la edad de inicio. Estos subsíndromes son: EMJ clásica, epilepsia de ausencias de la niñez que evoluciona a EMJ, EMJ con crisis de ausencias juveniles y EMJ con crisis astáticas (Martínez-Juárez, et al, 2006).

La EMJ clásica es el subsíndrome más frecuente, que se observa en aproximadamente el 72% de todos los casos de EMJ. Los pacientes con este subsíndrome presentan un patrón de polipunta-onda de 4-6Hz en el electroencefalograma y sin signos de lesión cerebral en estudios de imagen

(Martínez-Juárez, et al, 2006). Estos signos clínicos son los principales factores para establecer el diagnóstico, a pesar de que desde hace algunos años se identificaron algunos genes que causan la enfermedad y se observa agregación familiar desde un 40 hasta en un 60% de los pacientes con EMJ. Entre los genes identificados como causantes de EMJ se encuentran *GABRA1* (Cossette, et al. 2002), *GABRD* (Dibbens, et al. 2004), *CACNB4* (Escayg, et al. 2000), *BRD2* (Greenberg, et al. 1988), *ICK* (Bailey, et al, 2018), *CPA1* (Sapio, et al. 2015) y *EFHC1* (Suzuki, et al. 2004). Hasta la fecha *EFHC1* es causante del mayor número de casos de EMJ, llegando hasta un 7% de todos los casos de EMJ en México (Jara-Prado, et al. 2012).

Se puede observar que la EMJ tiene una gran heterogeneidad genética y aún no están identificados todos los genes causantes de la enfermedad. Entre otros genes propuestos como candidatos a que alteraciones en su función sean causantes de EMJ, se encuentra el gen *EFHC2*, único parálogo de *EFHC1*. La similitud en estructura de estos dos genes sugiere que podrían tener una función relacionada y las alteraciones en *EFHC2* también estar involucradas en el desarrollo de EMJ. Anteriormente, el estudio de Gu, et al, 2005, sugirió la asociación de este gen con el desarrollo de EMJ, observando que el polimorfismo p.S430Y (rs2208592) se encontraba presente en el 14.4% de pacientes con EMJ contra 7.2% de controles con esta variante (Gu, et al, 2005). También otro estudio reportó una paciente con enfermedad de Norrie que estaba acompañada de epilepsia mioclónica (Rodríguez-Revenga, et al. 2007). A pesar de esto, aún no se sabe si existe una relación entre *EFHC2* y el desarrollo de EMJ.

La identificación de los genes causales de EMJ es muy importante debido a que se podría ayudar al diagnóstico de la enfermedad, así como mejorar el manejo de las crisis e incluso pueda servir para determinar nuevos blancos terapéuticos más efectivos (Delgado-Escueta, 2013).

En este sentido, la identificación de nuevos genes involucra estrategias metodológicas que incluyen la búsqueda de variantes de secuencia desconocidas en genes candidatos. Dentro de estas técnicas se encuentran aquellas en las que se realiza un tamizaje previo para determinar si existen o no variantes de secuencia sin determinar específicamente la naturaleza de la variante, que finalmente podrán ser identificadas puntualmente por medio de la secuenciación. El uso de estas técnicas previas a la secuenciación tiene como ventaja la disminución del costo y el tiempo requerido para el análisis molecular de la secuencia en cuestión, con la limitante que siempre se deben corroborar los resultados con por medio de secuenciación, ya que pueden tener menor especificidad o sensibilidad, con el riesgo de no poder detectar todas las variantes en la muestra (Taylor, et al. 2004).

Este proyecto tiene como objetivo buscar variantes de secuencia en el gen *EFHC2* utilizando la técnica de análisis de curvas de disociación de alta resolución (HRM por sus siglas en inglés) como un tamizaje previo a la secuenciación tipo Sanger automatizada, para determinar si existe la presencia de variantes en este gen que estén involucradas en el desarrollo de EMJ en pacientes mexicanos.

## **2 Antecedentes**

### **Epilepsia y crisis epilépticas**

La epilepsia o las epilepsias están definidas por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) como una enfermedad cerebral caracterizada por una predisposición a generar crisis epilépticas. También incluye las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición. Esta definición requiere la ocurrencia de al menos una crisis epiléptica no provocada (Fisher, *et al.* 2014).

La ILAE define a una crisis epiléptica como la ocurrencia transitoria de signos y síntomas resultantes de una actividad neuronal excesiva anormal o sincrónica del cerebro (Fisher, *et al.* 2014). Esta actividad anormal de las neuronas se acompaña de patrones electroencefalográficos (EEG) y manifestaciones clínicas que pueden ser motoras, alteraciones en la conciencia o sensitivas. Estos signos se pueden manifestar solos o en combinaciones complejas. Las crisis suelen ser breves con duración de segundos hasta minutos (Guerrini, Canapicchi y Montanaro, 2005).

Los factores precipitantes de las crisis epilépticas, como los estímulos luminosos, pueden provocar crisis en una persona epiléptica debido a que ya existe anomalía cerebral, a diferencia de una persona normal que no responderá a este estímulo. Por lo tanto, no debe confundirse etiología con los factores que provoquen crisis epilépticas (Fisher, *et al.* 2014).

### **Epidemiología de la Epilepsia**

A nivel mundial, se estima que cerca de 70 millones de personas padecen epilepsia, y aproximadamente el 90% se encuentra en países en desarrollo. En países desarrollados, la prevalencia se encuentra en un intervalo de 4 a 10 casos

por cada 1000 habitantes. En países con ingresos altos, la incidencia es de entre 30 y 50 nuevos casos por cada 100 000 habitantes comparados con cerca del doble de casos en países en desarrollo. Se dice que este fenómeno se encuentra estrechamente relacionado con la existencia de factores de riesgo como las enfermedades infecciosas endémicas, así como el acceso a servicios médicos e infraestructura en los servicios de salud (Singh y Trevick, 2016).

En México, estudios indican que la prevalencia se encuentra en un intervalo de 6.8 a 38.8 casos por cada 1,000 habitantes, muy similar a la prevalencia estimada para latinoamérica, que es de 6 a 44.3 casos por cada 1,000 habitantes (Burneo, et al. 2005). En estos países, las infecciones del sistema nervioso central son uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de epilepsia. Otros factores de riesgo son los errores innatos del metabolismo, los traumatismos craneales, enfermedades neurodegenerativas, los eventos cerebrovasculares, tumores del sistema nervioso central, entre otros (Singh y Trevick, 2016).

## **Clasificación de las Epilepsias**

La ILAE propone que la clasificación de las epilepsias sea de acuerdo con tres niveles con utilidad en la clínica (Figura 1). El primer nivel, la clasificación es de acuerdo con el origen de las crisis epilépticas, pudiendo ser focales, generalizadas o desconocidas. Sugerido como el primer paso en el diagnóstico en caso de no contar con estudios de imagen, EEG o video-EEG (Scheffer, *et al.* 2017).

En el segundo nivel se asume que existe evidencia suficiente para establecer un diagnóstico de epilepsia de acuerdo con la definición y que se puede establecer el tipo de epilepsia. En esta clasificación se incluye la Epilepsia Generalizada, la Epilepsia Focal, la Epilepsia Focal y Generalizada Combinada, y la Epilepsia de tipo Desconocido.

En el tercer nivel de clasificación se llega al diagnóstico del Síndrome Epiléptico específico que toma en cuenta toda la evidencia clínica relevante: tipo de crisis, EEG, video, estudios de imagen, edad de inicio, edad de remisión, factores precipitantes, pronóstico, comorbilidades, etiología, tratamiento, etc.

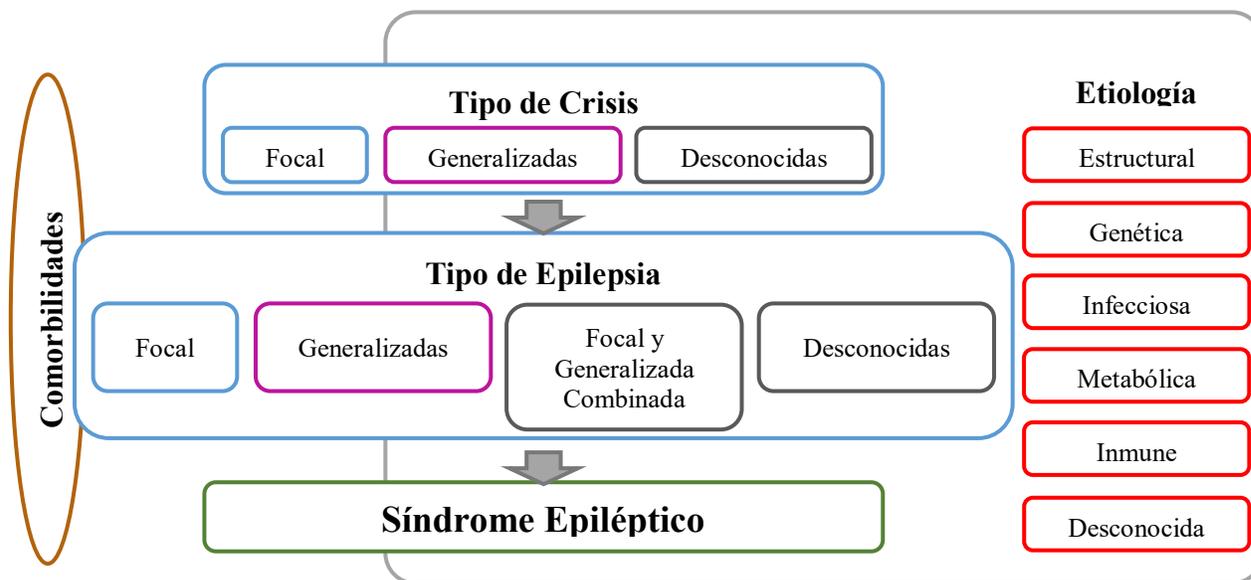
En las Epilepsias Generalizadas (segundo nivel de esta clasificación), existen cuatro síndromes epilépticos bien definidos: Epilepsia de Ausencias de la Niñez (EAN), Epilepsia de Ausencias Juvenil (EAJ), Epilepsia Mioclónica Juvenil (EMJ) y Crisis Tónico-Clónico Generalizadas (CTCGs). A estos cuatro síndromes, se les conocía como Epilepsias Idiopáticas Generalizadas debido a que no se conocía el origen de ellas, sin embargo, actualmente se encontró la etiología de estas en alteraciones de diversos genes, por lo que es adecuado que se adopte el término de Epilepsias Generalizadas Genéticas. A pesar de esto, la ILAE indica que aún es aceptable utilizar el término de Epilepsias Idiopáticas Generalizadas cuando el epileptólogo lo considere adecuado, limitando su uso a EAN, EAJ, EMJ y CTCGs (Scheffer, *et al.* 2017). Paralelamente a los tres niveles de clasificación propuestos, determinar la etiología puede ayudar al diagnóstico y al manejo del síndrome. Para este fin, las diversas etiologías se agrupan en 6 categorías que no siguen una jerarquía y tampoco son mutuamente excluyentes, por lo que un síndrome puede ser clasificado en dos o más grupos etiológicos, tomando en cuenta la necesidad que satisfacen.

El primer grupo se refiere a una etiología estructural, que se refiere a anomalías que son observables en estudios de imagen y a las que se les puede atribuir la causa de las crisis epilépticas en el paciente.

Se determina una etiología genética en las epilepsias cuando la aparición de las crisis está directamente relacionada con una mutación genética y las crisis epilépticas son el principal signo de la enfermedad. Se puede asumir una etiología genética cuando existe historia familiar de crisis epilépticas con un patrón de herencia definido, también cuando existen estudios de investigación clínica en

poblaciones con el mismo síndrome epiléptico y cuando se ha determinado que la epilepsia tiene una base molecular con un gen o una variación de número de copias directamente implicado en la enfermedad.

Otras categorías comprenden etiología de origen infeccioso, metabólico, inmune y de etiología desconocida.



**Figura 1.** Esquema de clasificación de las epilepsias propuesto por la ILAE (Traducido de Scheffer, et al. 2017)

## **Epilepsia Mioclónica Juvenil**

En 1867, Théodore Herpin reportó por primera vez un caso de epilepsia que correspondía con lo que Janz y Christian describieron detalladamente hasta 1957 y que ellos nombraron "*impulsive petit mal*". Fue hasta 1985, que la ILAE la incluyó como Epilepsia Mioclónica Juvenil en la primera clasificación internacional de epilepsias y síndromes epilépticos dentro de las Epilepsias Idiopáticas Generalizadas. (Wolf, P. *et al.* 2015).

La definición clásica de la epilepsia Juvenil nos indica que *"es un síndrome que aparece alrededor de la pubertad y está caracterizado por crisis de sacudidas mioclónicas bilaterales, únicas o repetitivas, arrítmicas, predominantemente en los brazos y sin pérdida de la conciencia. El trastorno puede ser heredado, y se distribuye de igual forma en ambos géneros. A menudo se presentan crisis tónico-clónico generalizadas y con menor frecuencia crisis de ausencia. Las crisis generalmente ocurren al despertar y se precipitan por la privación del sueño. En el EEG ictal e interictal hay patrones de polipunta-onda y punta-onda irregulares. Los pacientes con frecuencia son fotosensibles"* (Wolf, P. *et al.* 2015).

## **Epidemiología de la Epilepsia Mioclónica Juvenil**

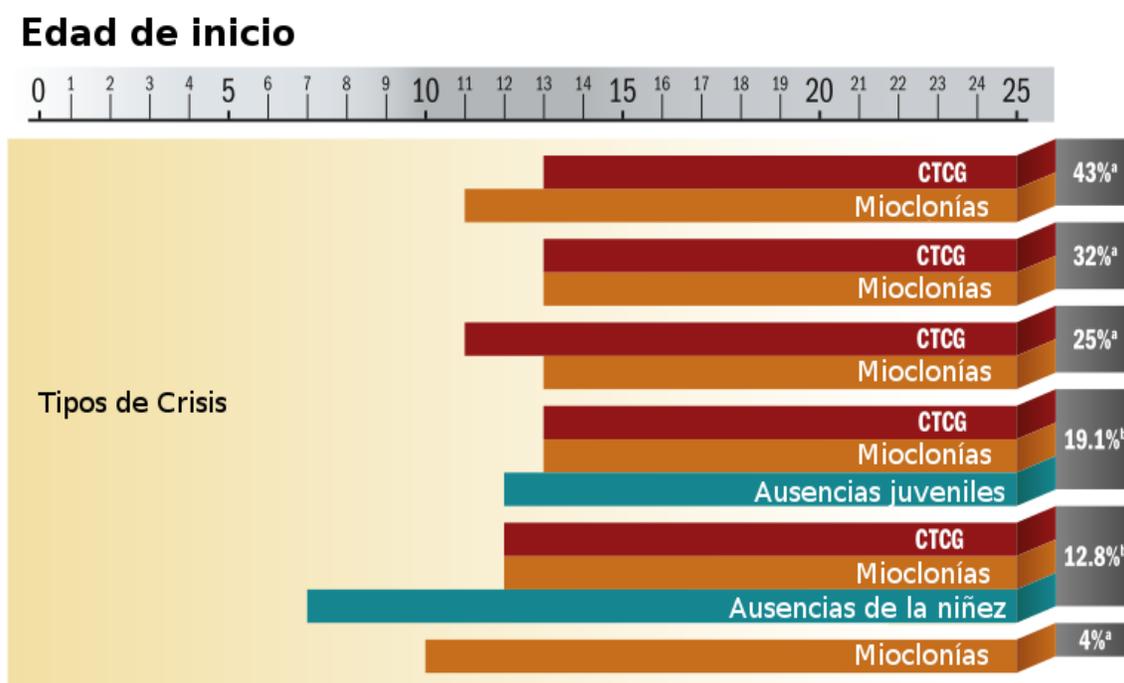
Se estima que la prevalencia de la EMJ representa un 5-10% de todas las epilepsias y cerca del 18% de las epilepsias idiopáticas generalizadas. Esto equivale a 0.1-0.2 casos por cada 100,000 habitantes. La incidencia de la EMJ es de 1 caso nuevo por cada 100,000 habitantes (Camfield, Striano y Camfield, 2013).

La EMJ tiende a ser más frecuente en mujeres representando un 60% de todos los casos de EMJ (Camfield, Striano y Camfield, 2013), a pesar de esto, otros autores

consideran que no hay diferencia estadísticamente significativa (Martínez-Juárez, *et al*, 2006).

## Características clínicas generales

La EMJ se caracteriza por la presencia de crisis mioclónicas en el 100% de los pacientes, las Crisis Tónico-Clónicas Generalizadas (CTCGs), las crisis de ausencias y crisis astáticas. Raramente se presenta *status epilepticus*, pero suelen estar asociadas a un mal tratamiento de las crisis. Las crisis ocurren principalmente justo después de despertar, en la mañana o durante una siesta; están relacionadas con despertar repentino y a periodos de sueño corto o insuficiente. (Genton, *et al*, 2013). En la Figura 2 se muestran los tipos de crisis, la edad de inicio y la combinación de las crisis en que típicamente se manifiesta la EMJ.



**Figura 2** Curso de la epilepsia mioclónica juvenil. Se muestran la edad de inicio de las crisis; CTCG: Crisis Tónico-Clónico Generalizadas (Traducido de Yacubian E. 2016).

## **Subsíndromes y endofenotipos de la EMJ**

La EMJ no es una enfermedad homogénea y se puede considerar como un espectro de trastornos con presentaciones clínicas que pueden variar desde el tipo de crisis epilépticas que presentan adicionalmente a las crisis mioclónicas, también en el patrón EEG, pronóstico, factores precipitantes de las crisis epilépticas, rasgos de personalidad, y comorbilidad con otras afectaciones psiquiátricas (Baykan y Wolf, 2017).

Debido a la gran variabilidad en la manifestación de la EMJ, diversos autores proponen subclasificaciones que sirven a diversos propósitos.

Un estudio que analizó pacientes de EMJ por tipos de crisis, edad de inicio, factores precipitantes de crisis, trastornos psiquiátricos y de personalidad, concluyó que estas características son buenos indicadores de pronóstico de la enfermedad.

Carvalho, et al. (2016), agrupa a los pacientes con EMJ en endofenotipos que se definen por los factores precipitantes de crisis epilépticas en 4 grupos, 1) pacientes con factores precipitantes generales como privación de sueño y estrés, 2) pacientes con sensibilidad a crisis inducidas por la realización de tareas específicas o actividades que involucren lenguaje, 3) pacientes con fotosensibilidad y 4) pacientes con combinaciones de factores precipitantes de los grupos 2 y 3. Este estudio encontró una mayor proporción de comorbilidad de EMJ con trastornos psiquiátricos, moderada deficiencia cognitiva, mayor frecuencia de crisis mioclónicas y menor control de crisis con tratamiento antiepiléptico en los pacientes con factores precipitantes adicionales a la privación de sueño y estrés. (Carvalho, et al, 2016).

Estos y otros estudios están centrados en marcadores de evolución de la enfermedad y control de las crisis, sin embargo, también concluyen que el tipo la

presentación de crisis de ausencias o astáticas parecen pertenecer a una entidad definida distinta a la que presentan pacientes con las características clínicas generales de la EMJ (Baykan y Wolf, 2017).

Por otro lado, Martínez-Juárez, *et al*, (2006) propuso una clasificación de subfenotipos de EMJ, basado principalmente en un estudio familiar con un enfoque genético-etiológico, tipo de crisis, edad de inicio y patrón EEG. A continuación se describen los subfenotipos:

### ***EMJ clásica***

Se presenta a una edad de inicio promedio de 15.1 años, en un intervalo que va desde los 7 hasta los 28 años, El 68% de los pacientes debutan con crisis mioclónicas aisladas al despertar y 30% debutan con crisis tónico-clónicas generalizadas. Las crisis de ausencias no son frecuentes en estos pacientes. Es el subsíndrome más frecuente en la EMJ con el 72% de los casos. Aproximadamente el 49% de los pacientes tienen familiares afectados con crisis epilépticas. El fenotipo de estas familias es variable, pudiendo presentar EMJ o CTCGs. En otros casos, los familiares solo presentaban EEG con patrones de polipunta-onda 4-6Hz (Martínez-Juárez, *et al*, 2006).

### ***Epilepsia de ausencias de la niñez (EAN) que evoluciona a Epilepsia Mioclónica Juvenil (EAN/EMJ)***

Los pacientes se caracterizan por presentar crisis de ausencia picnolépticas que comienzan en la niñez, a una edad promedio de 6.9 años (intervalo de 1-11 años). Las mioclonías y CTCGs aparecen en la adolescencia, entre los 13 y 14 años. El EEG muestra puntas y complejos de onda lenta de 3Hz. Representa aproximadamente el 18% de los casos de EMJ (Figura 3). En el 71% de las familias con EAN/EMJ hay integrantes con crisis epilépticas. Los fenotipos son

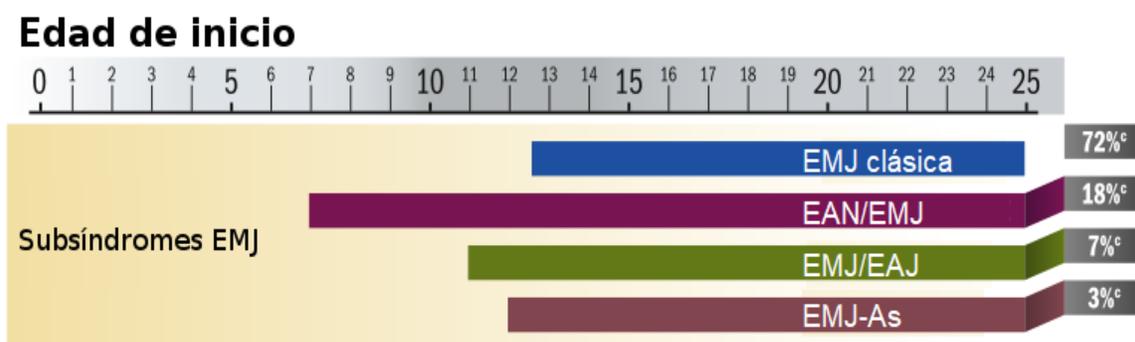
variables, pudiéndose encontrar integrantes de una misma familia con EAN/JME, EAN, CTCGs, EMJ clásica o EAN con CTCGs (Martínez-Juárez, et al, 2006).

### ***EMJ con crisis de ausencias juveniles (EMJ/EAJ)***

Son aproximadamente el 7% de los casos. Debutan con crisis de mioclónicas o CTCGs a los 14 años (8-30 años). Las mioclonías son las crisis más frecuentes en estos pacientes y también manifiestan crisis de ausencia picnoléptica en la adolescencia. El EEG puede mostrar punta-onda o polipunta onda de 4-5Hz. También complejos de polipunta-onda 4-6Hz mezclados con complejos de punta onda de 3Hz. Algunos pacientes pueden presentar EEG normal. En el 68% de las familias existen antecedentes de EMJ clásica y CTCGs (Martínez-Juárez, et al, 2006).

### ***EMJ con crisis astáticas (EMJ-AS)***

Las crisis astáticas son la primera manifestación a los 14 años (8-17 años), las crisis mioclónicas se presentan en promedio hasta los 16 años (8–28 años). El EEG presenta un patrón de polipunta y ondas lentas de 4-6Hz. En estos pacientes también se presentan antecedentes familiares de EMJ con crisis astáticas o CTCGs (Martínez-Juárez, et al, 2006).



**Figura 3** Subsíndromes de EMJ. Se representa la edad de inicio y el porcentaje de pacientes de cada subsíndrome de EMJ; EAN/EMJ: epilepsia de ausencias de la niñez que evoluciona a epilepsia mioclónica juvenil; EMJ/EAJ: Epilepsia mioclónica juvenil con crisis juveniles; EMJ-As: Epilepsia mioclónica juvenil con crisis astáticas (Traducido de Yacubian E. 2016).

## Tratamiento

En el tratamiento de la EMJ se busca lograr un control de crisis las epilépticas y buena tolerancia al fármaco antiepiléptico de modo que no se presenten efectos secundarios o reacciones adversas. En la mayoría de los pacientes las crisis epilépticas pueden ser controladas exitosamente con fármacos antiepilépticos, siendo el ácido valproico el de primera elección controlando las crisis entre un 80-90% de los pacientes tratados (Welty, 2006; Mantoan y Walker, 2011). Este fármaco tiene las desventajas de presentar efectos secundarios como sedación, tremor, aumento de peso e irregularidades en el ciclo menstrual; también puede causar efectos adversos como teratogenicidad y síndrome de ovario poliquístico. El levetiracetam es otra opción con una menor incidencia de efectos adversos y reacciones secundarias. Logrando una reducción en la ocurrencia de crisis epilépticas en hasta un 76% de los casos, sin embargo, un 15% de los pacientes presenta sedación severa (Welty, 2006). La lamotrigina puede ser otro tratamiento de primera elección, sin embargo, puede presentar severos efectos adversos como *rash* o síndrome de Stevens-Johnson; y que puede empeorar las crisis epilépticas en algunos casos (Welty, 2006).

Se sugiere siempre iniciar el tratamiento con alguno de estos fármacos en monoterapia y en caso de fallar, iniciarlo con otro de primera línea también en monoterapia antes de considerar la combinación de tratamientos. Los fármacos antiepilépticos que se deben evitar son la carbamazepina, fenitoína y oxcarbazepina debido a que pueden empeorar las crisis en EMJ (Montoan y Walker, 2011).

También se recomienda que cuando el tratamiento falla se debe evaluar que el paciente cumpla con el régimen de tratamiento farmacológico, que debe ser de por vida y acompañado de cambios en el estilo de vida para evitar factores precipitantes que no son eliminados con la terapia farmacológica. Después de

estas consideraciones, se debe reevaluar el diagnóstico en caso de fallar el tratamiento (Montoan y Walker, 2011).

## **Agregación familiar**

A pesar de que la EMJ no tiene una etiología determinada, en la literatura se reporta que del 40 al 60% de los pacientes con EMJ tienen familiares de primer y segundo grado con historial de crisis epilépticas (Tatum, Sirven & Cascino, 2014; Martínez & Hernández, 2014).

De acuerdo a lo descrito por Martínez-Juárez, *et al.* 2006, los subsíndromes de EMJ son una condición heredable. La transmisión vertical de los rasgos fenotípicos clínicos y EEG de la EMJ, sugieren una herencia autosómica dominante en el 49% de familias con esta enfermedad. En el resto de las familias, se sospecha de una herencia compleja, en donde variantes presentes en algunos genes tienen pequeños efectos que contribuyen a un riesgo o susceptibilidad a desarrollar EMJ (Delgado-Escueta, *et al.*, 2013).

## **Genética de la EMJ**

Entre los genes cuyas alteraciones están asociadas al desarrollo de EMJ se encuentran *GABRA1*, *GABRD* y *CACNB4* que codifican subunidades de distintos canales iónicos y se sabe que los principales mediadores de excitabilidad e inhibición en el SNC son los canales iónicos (Niscita, *et al.* 2012). Entre los genes que no codifican a proteínas de canales iónicos pero codifican proteínas que podrían ser de importancia en el desarrollo neuronal, se encuentran los genes *BRD2* (Greenberg, *et al.* 1988), *ICK*, *CPA6* y *EFHC1* (Suzuki, *et al.* 2004).

También se propuso que el gen *EFHC2*, único paralogo de *EFHC1*, podría tener una participación en el desarrollo de la EMJ (Gu, *et al.* 2005).

El gen *GABRA1* codifica a la subunidad  $\alpha$  del receptor para el ácido gama aminobutírico (GABA<sub>A</sub>), receptor del neurotransmisor inhibitorio más importante en el sistema nervioso central. Existen tres tipos de receptores, A, B y C siendo el A al que está asociado con el desarrollo de crisis epilépticas. El receptor de GABA<sub>A</sub> es un pentámero, que generalmente está constituido por dos subunidades  $\alpha 1$ , dos subunidades  $\beta 2$  y una subunidad  $\gamma 1$ , aunque también existen otras combinaciones. Se identificaron mutaciones en el gen en pacientes con una forma autosómica dominante de EMJ (Cossette, *et al.* 2002), una mutación en un paciente con epilepsia de ausencias de la niñez y otras mutaciones en una familia francocanadiense con epilepsia idiopática generalizada (Lachance-Touchette, *et al.* 2011). Los efectos de estas mutaciones afectan la expresión de la subunidad  $\alpha$  y también pueden afectar la capacidad de asociarse con las demás subunidades para formar el pentámero. (Ding, *et al.* 2010).

El gen *GABRD*, codifica a la subunidad  $\delta$  del receptor de GABA<sub>A</sub>, el cual sustituye a la subunidad  $\gamma 1$ , para formar un receptor que se encuentra en menor abundancia. (Knoflach, *et al.* 2016). En un estudio previo se identificaron variantes en pacientes con epilepsias idiopáticas generalizadas, entre ellas EMJ, con crisis febriles y epilepsia generalizada con crisis febriles plus. Estas variantes se asociaron a las epilepsias idiopáticas las cuales presentan un patrón de herencia compleja. (Dibbens, *et al.* 2004).

El gen *CACNB4* codifica a la subunidad auxiliar citoplasmática  $\beta 4$  del canal de calcio dependiente de voltaje (Tadmouri, *et al.* 2012). Se identificaron mutaciones en este gen en familias con EMJ y con epilepsia generalizada idiopática con CTCGs y crisis de ausencia. (Escayg, *et al.* 2000). Mutaciones en la subunidad  $\beta 4$

puede alterar una vía de señalización que regula la expresión de algunos genes y conducir al desarrollo de EMJ. (Tadmouri, *et al.* 2012).

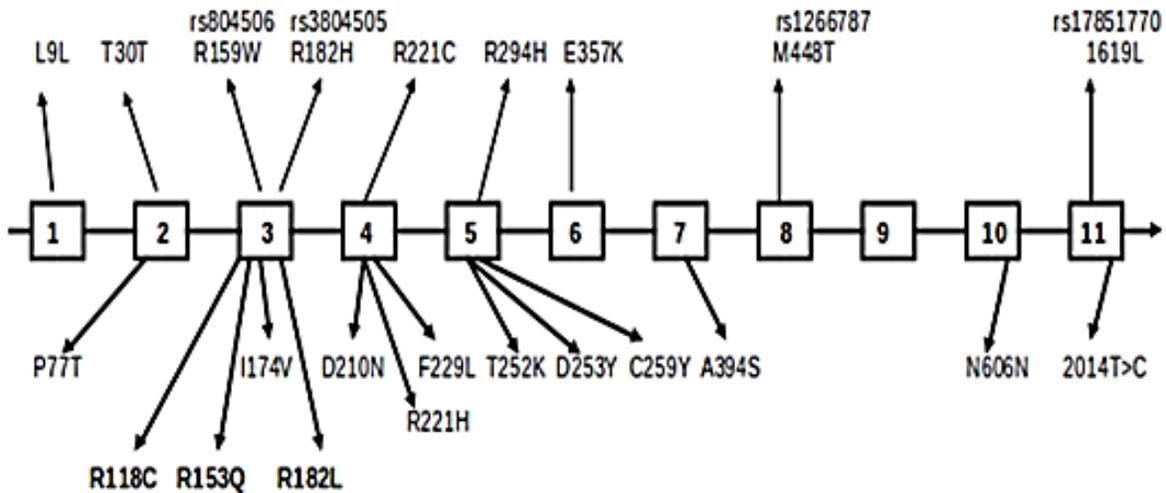
El gen *BRD2* codifica a un regulador transcripcional de genes que se expresan durante el desarrollo. Se identificó en un análisis de ligamiento en familias de ascendencia europea residentes en Los Ángeles y Nueva York. (Greenberg, *et al.* 1988). Se encontraron variantes que están asociadas a EMJ con herencia compleja, en donde SNPs tienen una participación sutil en la enfermedad. (Pal, *et al.* 2003).

Recientemente, también se identificaron otras proteínas involucradas en el desarrollo de EMJ, entre ellas la carboxypeptidasa 6A, codificada por el gen *CPA6*, cuya función aún no es elucidada a fondo, se sabe que está involucrada en el procesamiento extracelular de péptidos como neurotensina, encefalinas y angiotensina (Lyons, *et al.* 2007), así como posiblemente algunos péptidos de las vías Wtn sugiriendo su posible participación en el desarrollo del cerebro (Lyons y Fricker, 2010). Mutaciones en esta proteína se encontraron en un paciente con síndrome de Duane (Pizzuti, *et al.* 2002), en pacientes con formas familiares de Epilepsia del lóbulo temporal y crisis febriles (Salzman, *et al.* 2012; Sapio, *et al.* 2012) y más recientemente en un paciente con encefalopatía epiléptica de inicio temprano (Allen, *et al.* 2016) y pacientes con EMJ (Sapio, *et al.* 2015).

*ICK* es un gen que codifica a una proteína cinasa que fue identificada en células troncales del epitelio intestinal, participando en la cascada de señalización que regula la transición entre proliferación y diferenciación celular (Fu, *et al.* 2009). Esta proteína es expresada ubicuamente y participa en el desarrollo del sistema esquelético, endócrino y el sistema nervioso. (Lahiry, *et al.*, 2009). En un estudio reciente, se encontraron 21 variantes patogénicas causantes de EMJ. Se determinaron LOD scores de cuatro de estas variantes, revelando que segregaban con los síntomas de EMJ, aportando evidencia sólida de su participación en el desarrollo de EMJ. (Bailey, *et al.* 2018).

## Gen *EFHC1*

Localizado en la región cromosómica 6p12.3, está organizado en 11 exones que codifican a la proteína mioclonina/EFHC1 (Suzuki, *et al.* 2004). En este gen se han identificado 54 variantes asociadas a EMJ, 25 de ellas son variantes de cambio de sentido que segregan con un patrón de herencia autosómico dominante, con penetrancia incompleta. 17 de estas variantes se encontraron en pacientes de origen mexicano (Figura 4) (Jara-Prado, *et al.* 2012). Un estudio reciente analizó estas 54 variantes clasificándolas a 9 de ellas como patogénicas causantes de EMJ, 14 probablemente patogénicas, 2 probablemente benignas y 9 benignas. Los 20 restantes fueron asociadas como variantes de susceptibilidad con  $OR > 5$  (Bailey J, *et al.* 2016).



**Figura 4** Representación esquemática del gen *EFHC1*, donde se indica la posición relativa de las mutaciones identificadas como causantes de EMJ. (Jara-Prado, *et al.* 2012).

La mayoría de las variantes encontradas se localizan en la región codificante del gen y se presentan con mayor frecuencia en heterocigosis (de Nijs, *et al.* 2013). Berger y colaboradores reportaron una familia con tres pacientes de epilepsia neonatal, con crisis de tipo tónicas, clónicas y mioclónicas que no respondían a la terapia farmacológica y con un desenlace fatal antes de los 3 años. El estudio genético en esta familia reveló que ambos padres eran portadores de la mutación

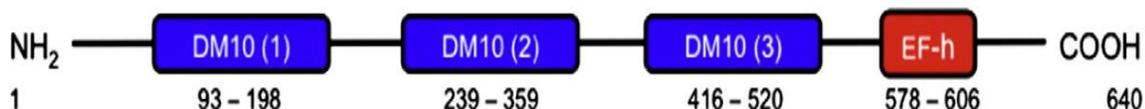
p.F229L (c.685 T->C) en estado heterocigoto, asintomáticos. Los pacientes con epilepsia neonatal tenían un genotipo homocigoto para esta mutación, un hermano asintomático con genotipo heterocigoto y otros tres hermanos asintomáticos con genotipo homocigoto igual al de referencia. (Berger, et al. 2012).

Experimentos con ratones knockout demostraron que la deficiencia en forma homocigota y heterocigota de *Efhc1* provocaban la generación espontánea de mioclonías, así como una mayor susceptibilidad para presentar crisis inducidas por pentilentetrazol, comparado contra ratones wild type. La diferencia en el fenotipo en ratones homocigotos mutantes con respecto a humanos puede deberse a las diferencias fisiológicas entre especies (Suzuki, et al. 2009).

### **Estructura de mioclonina/EFHC1**

La proteína mioclonina pertenece a un grupo de proteínas que contienen al dominio EF-Hand denominadas EFHC (EF-Hand Containing por sus siglas en inglés). Tiene un tamaño de 640aa. Contiene 3 dominios DM10 de función desconocida y un dominio EF-Hand, de unión a  $Ca^{2+}$  (Figura 5) (Jara-Prado, et al, 2012).

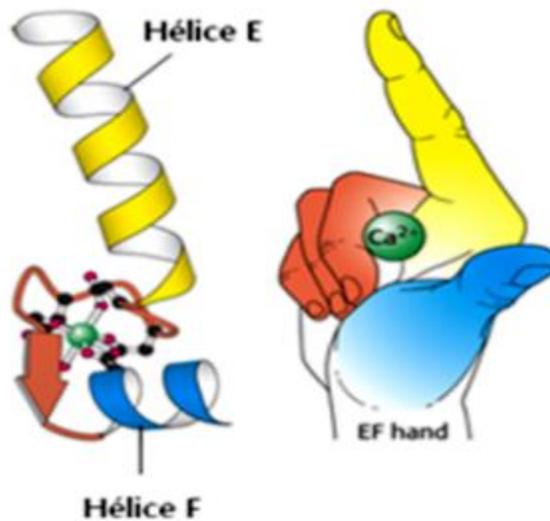
Mioclonina se asocia a estructuras celulares con microtúbulos: cilios, flagelos y el huso mitótico (Léon, et al, 2010) y relacionada a procesos de apoptosis (Susuki, et al, 2004).



**Figura 5** Representación esquemática de Mioclonina/EFHC1, donde se muestra la localización de los dominios DM10 y el dominio EF-hand (de Nijs, et al, 2013).

### **Dominio EF-hand**

Se encuentra en proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , y su estructura canónica está constituida por una estructura de Hélice-asa-hélice, con las dos alfa hélices (Hélices E y F en Figura 6.) dispuestas de forma perpendicular entre sí unidas por un asa de 12 aminoácidos. Este dominio suele encontrarse con mayor frecuencia por pares, desde uno hasta múltiples pares en una misma proteína, presumiblemente para aumentar la afinidad con el ión  $\text{Ca}^{2+}$ . El asa que interconecta las dos hélices es el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de los residuos +X, +Y, +Z, -X, -Y y -Z. Los residuos de las posiciones +X y -Z (Asp y Glu respectivamente) son los que se encuentran mayormente conservados, pero se pueden encontrar diversas composiciones. (Grisar T, *et al*, 2012)



**Figura 6** Dominio EF-Hand (Grisar T, *et al*, 2012).

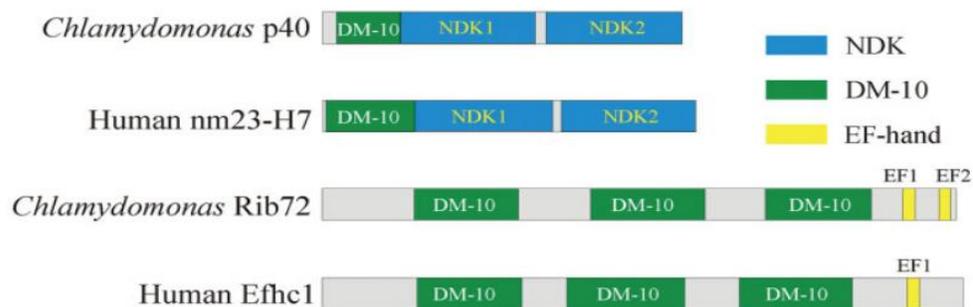
### **Dominio DM10**

La estructura secundaria de este dominio suele estar muy conservada y se compone de 7 hojas  $\beta$ , con una pequeña hélice de 3-4 residuos después de la

primera lámina  $\beta$ , y una hélice alfa en el extremo carboxilo terminal. (King, S 2006).

Se encuentra en las enzimas difosfato nucleósido cinasas tipo 7 (NDK7) en las que hay un sólo dominio DM10 en el extremo amino terminal y dos motivos catalíticos NDK. También se encuentra en algunas proteínas de estructuras que conforman los cilios y flagelos en distintas especies de eucariotas como humano, rata, ratón, erizo de mar, leishmania, tripanosomas y chlamydomonas, entre otros. Las proteínas más representativas de este tipo son mioclonina/EFHC1 y EFHC2 en humano y Rib72 de chlamydomonas. La relación de ortología en estas proteínas es evidente al presentar una identidad de secuencia de hasta el 40% y un 50% de similitud. (King, S, 2006). En la figura 7 se representan proteínas que contienen el dominio DM10.

En el caso específico de TcNDPK2, una proteína tipo NDK en *Trypanosoma cruzi*, se encontró que el dominio DM10 está muy relacionado con la localización subcelular y en su unión a microtúbulos del flagelo y citoesqueleto (Miranda, et al, 2011).



**Figura 7** Comparación de proteínas ortólogas en humano y chlamydomonas que contienen el dominio DM10 (Grisar, et al. 2012).

El dominio DM10 se encuentra en proteínas con funciones de motilidad flagelar regulada por vías señalización de nucleótidos como GTP, cGMP en respuesta a la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### ***Expresión de mioclonina/EFHC1***

En ratón adulto se detectó en todas las capas de la corteza cerebral, principalmente en neuronas piramidales; coexpresa con  $\text{Ca}_v2.3$  en el soma, núcleo y las dendritas en células de Purkinje del cerebelo (Suzuki, et al, 2004); en las neuronas del giro dentado del hipocampo. En el cerebro de ratón neonato se detecta su expresión principalmente en los cilios de las células endoteliales que rodean a los ventrículos cerebrales. También se expresa en cultivos de células troncales neuronales (Grisar, et al. 2012). Yamakawa y Suzuki, 2013, encontraron que las señales de inmunofluorescencia en neuronas eran inespecíficas y que la expresión se limitaba a cilios de células endoteliales y células del plexo coroideo.

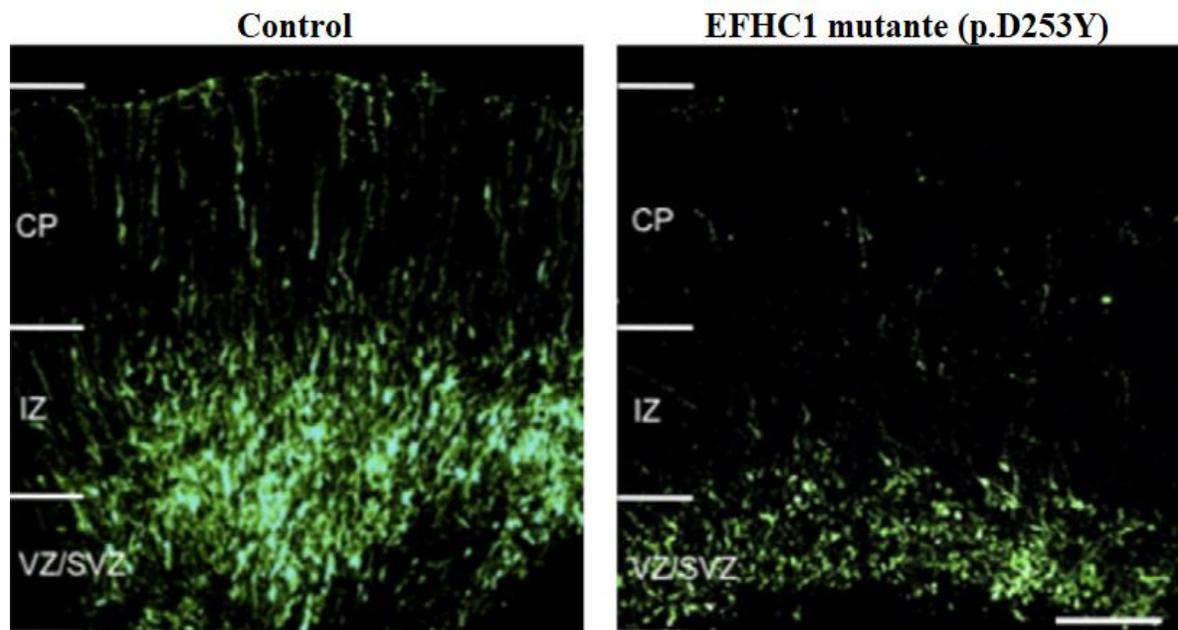
### ***Mioclonina/EFHC1 en el desarrollo de EMJ***

Suzuki y colaboradores en 2004, demostraron que mioclonina está involucrada en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  por el canal de calcio  $\text{Ca}_v2.3$  tipo-R, aumentando el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal induciendo la apoptosis durante el neurodesarrollo. Por el contrario, las mutaciones en mioclonina/EFHC1 disminuían el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyendo la apoptosis normal que desencadena un aumento en la densidad neuronal con una homeostasis de calcio deficiente y propensa a la hiperexcitabilidad, que además explicaría la sensibilidad a la privación del sueño, fatiga y consumo de alcohol (Suzuki, et al. 2004).

La relación de mioclonina con la apoptosis sugiere que es necesaria para eliminar las neuronas no deseadas durante el desarrollo de la corteza cerebral. Katano, en

2012, propuso que esto sucede mediante la interacción de mioclonina con el canal de potencial transitorio M2 (TRPM2 por sus siglas en inglés), en donde la proteína mioclonina actúa como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del dominio EF-hand activando TRPM2 y regulando la apoptosis. Esta función no está bien determinada y el autor concluye que el papel de mioclonina/TRPM2 en la apoptosis no es el mecanismo que explicaría la EMJ, pero que sí podría contribuir a la expresión del fenotipo por otras vías en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Katano, et al, 2012).

Otros estudios sugieren que las mutaciones en *EFHC1* no parecen modificar la proliferación en las células progenitoras corticales, sin embargo, alteran el desarrollo de la corteza cerebral modificando la migración neuronal que es guiada por la glía, la transición de las fases multipolares a bipolares de las neuronas de la zona intermedia de la corteza cerebral y la migración de las neuronas de forma radial y tangencial (figura 8); procesos que están mediados por microtúbulos.



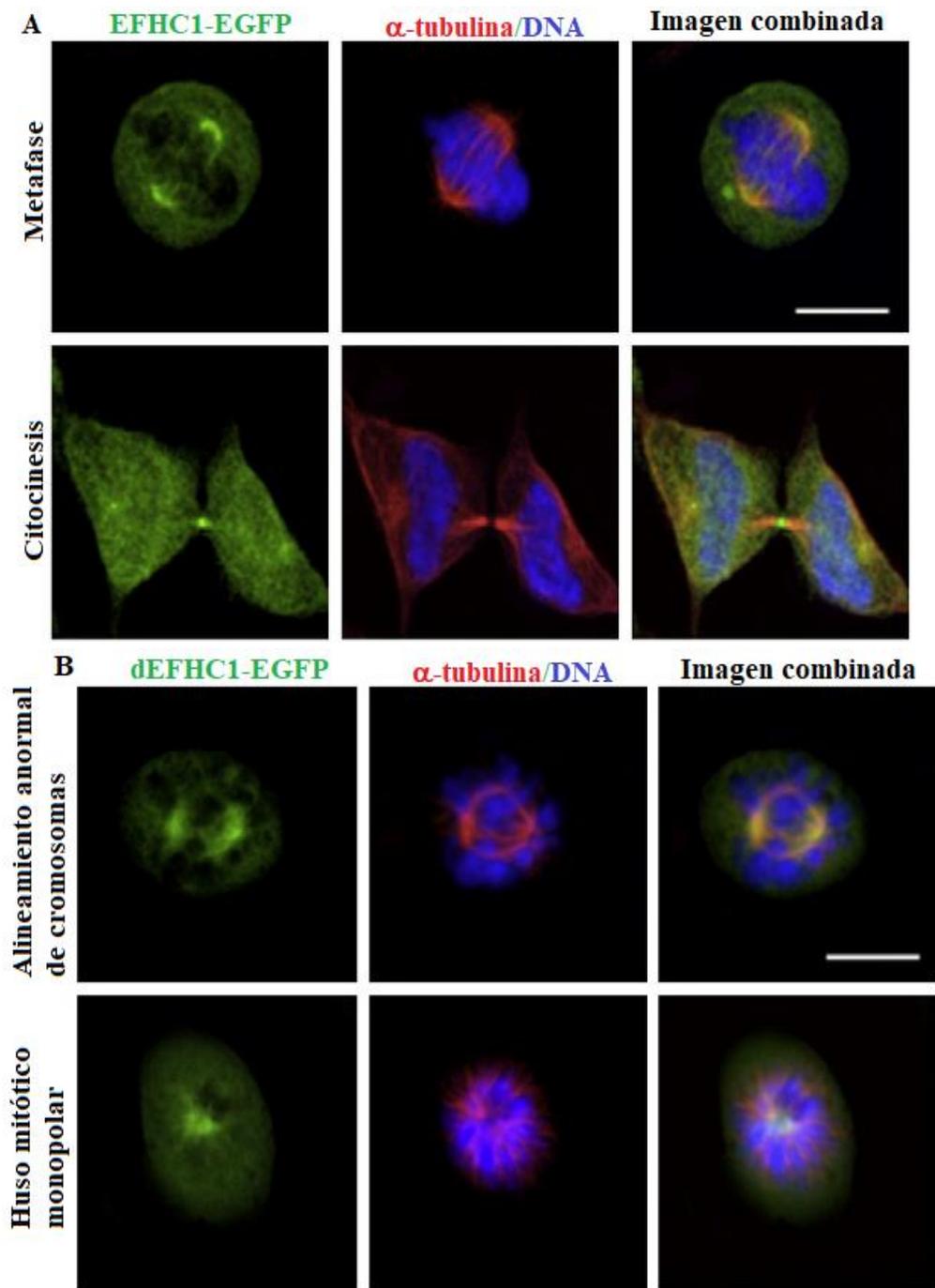
**Figura 8** Interrupción de la migración radial de las neuronas cuando se afecta la función de *EFHC1* (*EFHC1* mutante p.D253Y). VZ: Zona ventricular germinal, SVZ: zona subventricular, IZ: zona intermedia, CP: placa cortical (de Nijs, et al 2013).

El resultado de estos defectos en el desarrollo de la corteza cerebral podría producir microdisgenésia cortical (de Nijs, et al, 2013), como observaron Meenke y Janz en pacientes con epilepsia idiopática generalizada (Meenke y Janz, 1984).

La mioclonina se asocia a la  $\alpha$ -tubulina del huso mitótico, a través de una región en los primeros 45 a. a. del extremo N-terminal. La pérdida de la función de mioclonina provoca defectos en el ensamble del huso mitótico deteniendo el proceso de mitosis, llevando a las células a apoptosis (Figura 9). Este fenómeno puede estar directamente relacionado con defectos en el desarrollo de la corteza cerebral alterando la organización radial de la glía y la locomoción de las neuronas postmitóticas (de Nijs, et al, 2012; Raju, *et al.* 2017).

Un modelo en *Drosophila* mostró que *Defhc1* puede tener un papel en el desarrollo de las sinapsis neuromusculares regulando negativamente la dinámica del citoesqueleto y su crecimiento. Con base en estas observaciones, los autores postulan que cuando la función de *EFHC1* es deficiente el sobre crecimiento neural puede resultar en una liberación de neurotransmisores aumentada en la sinapsis manifestándose en el fenotipo de EMJ (de Nijs, et al, 2009).

Sin embargo, otro estudio sugiere que a pesar de que las mutaciones en *EFHC1* son causantes de EMJ, el mecanismo no se debe a una migración neuronal anormal, sino por la alteración en las funciones de mioclonina que aún son desconocidas (Yamakawa & Suzuki, 2013).



**Figura 9** Defectos en el huso mitótico por alteración de EFHC1. EFHC1 y dEFHC1 (deficiente) en verde,  $\alpha$ -tubulina en rojo y DNA en morado. **A:** se observa una metafase normal con alineamiento de los cromosomas en el plano ecuatorial celular y una citocinesis guiada hacia dos polos opuestos por los husos mitóticos. **B:** Los cromosomas no se encuentran alineados durante la metafase y el uso mitótico se encuentra unido a un único polo celular. (de Nijs, et al, 2013).

## Gen *EFHC2*

El gen *EFHC2* localizado en Xp11.3 y organizado en 15 exones, codifica a una proteína de 749aa, con un peso de 87kDa, contiene 3 dominios DM10 y un dominio EF-Hand. Por medio de splicing alternativo se puede generar otra isoforma que carece de los aminoácidos 1-587, resultando en una proteína de 162aa. Este gen es el único parálogo de *EFHC1* en humano (GeneCards GCID: GC0XM044146).

Tentativamente fue asociado al desarrollo de EMJ (Gu, *et al*, 2005). Se reportó un paciente que presentaba la Enfermedad de Norrie de forma atípica, debido a que presentaba epilepsia mioclónica. El estudio molecular mostró que presentaba una microdelección que de los genes *NDP* (causante de la enfermedad de Norrie) y el gen *EFHC2*, por lo que se sugiere que podría ser causante de la epilepsia mioclónica. (Rodríguez-Revenga, *et al*. 2007).

El estudio de Gu, *et al*. 2005, indicó que la frecuencia de la variante rs2208592 (p.S430Y) era significativamente mayor en pacientes masculinos con EMJ (encontrada en el 14.4% de pacientes contra 7.2% en sujetos control,  $p= 0.030$ ; OR = 2.17; 95-CI: 1.06–4.43), e incluso se encontró mayor asociación de esta misma variante con EMJ clásica (variante presente en el 16% de pacientes;  $p= 0.014$ ; OR = 2.46; 95-CI: 1.18–5.13). Este estudio sólo especifica a la EMJ clásica como “sin crisis de ausencia”. En mujeres no se encontró asociación de alguna variante con EMJ. (Gu, *et al*, 2005).

La localización de *EFHC2* sugiere que los posibles efectos de mutaciones en este gen confieran mayor susceptibilidad en los hombres a desarrollar epilepsia, sin embargo, ahora se sabe que *EFHC2* escapa la inactivación del cromosoma X (Castagné, *et al*, 2011).

En un estudio del 2015, se genotipificó la variante rs2208592 (p.S430Y) en 96 pacientes con epilepsia idiopática generalizada. Al comparar la frecuencia de esta

variante en los pacientes no encontraron diferencia estadísticamente significativa con el grupo control, y tampoco con respecto al sexo (Berrin, et al, 2015).

También se propuso la participación de variantes en *EFHC2* implicadas en otros desordenes cognitivos. En pacientes con síndrome de Turner se encontró la asociación de la variante rs7055196, ( $p = 0.00007$ ) con la dificultad en el reconocimiento de expresiones faciales de miedo (Weiss, et al, 2006). Otro grupo que estudiaba esta misma alteración cognitiva en pacientes con trastorno de pánico encontró una asociación de la variante rs1562875 en *EFHC2* (Blaya, et al., 2009).

La asociación del gen *EFHC2* con el desarrollo de EMJ aún no se ha corroborado con evidencia suficiente, sin embargo, se sabe que las alteraciones en el gen *EFHC1* explican la EMJ en el 9% de pacientes mexicanos (Jara-Prado, et al. 2012), por lo que la similitud en la estructura entre *EFHC1* y *EFHC2* nos indica que las proteínas codificadas por estos genes puedan tener funciones similares o relacionadas y por lo tanto es posible que *EFHC2* explique el desarrollo de EMJ en otra fracción de pacientes. (Gu, et al, 2005).

## **Técnicas para escaneo y detección de variantes de secuencia**

Las técnicas de biología molecular que sirven para revelar cambios puntuales en la secuencia de DNA se pueden clasificar en técnicas que detectan cambios ya conocidos en la secuencia (genotipificación) y técnicas que pueden detectar cambios no descritos previamente (escaneo de mutaciones). La mayoría de los métodos para escaneo de mutaciones no pueden determinar el cambio que existe en una secuencia de DNA, por lo que se usan como una primera fase para diferenciar las muestras con variantes que se deben secuenciar para conocer con precisión la naturaleza del cambio (Taylor, et al. 2004).

La elección de la técnica debe tomar en cuenta ventajas y limitaciones como la sensibilidad y la especificidad del método con relación al rendimiento y costo del procesamiento de las muestras. En general es muy difícil que una técnica pueda detectar el 100% de las mutaciones, por lo que se debe tener en cuenta la aplicación de la técnica: en el diagnóstico molecular para pacientes, esta sensibilidad debe ser muy cercano al 100%, sin embargo, en otras aplicaciones como el análisis de genes en protocolos de investigación, se puede permitir una menor sensibilidad y especificidad del método en favor de un mayor rendimiento que permita analizar un mayor número de muestras en menor tiempo y costo. No se debe perder de vista que una técnica con especificidad muy baja podría perder las ventajas al elevar el número de muestras a analizar en la fase subsecuente de un escaneo de mutaciones (Taylor, et al. 2004).

### ***Conformación Polimórfica de Cadena Sencilla (SSCP)***

Entre las técnicas más comunes destacan la SSCP, que se basa en la desnaturalización de las cadenas de DNA y una renaturalización rápida con bajas

temperaturas para favorecer la formación de estructuras secundarias de las cadenas sencillas del DNA. Las estructuras secundarias tendrán una migración distinta con respecto a su conformación y por lo tanto está determinada por la secuencia de nucleótidos, por lo que un cambio de base debe cambiar la estructura y por lo tanto el patrón de migración electroforético. (Cotton R, 2006). La sensibilidad de esta técnica puede variar desde un 35 hasta un 100%, siendo 80% el promedio reportado. (Taylor, et al. 2004).

### ***Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)***

Esta técnica se basa en la formación de heterodúplex en las cadenas de dsDNA a analizar, que serán sometidas a electroforesis en un gel con un gradiente de desnaturalización, las diferencias en los dúplex formados por las dobles cadenas migraran diferencialmente en el gel con un patrón de bandas distinto, por lo que se podrán diferenciar las que tengan alguna diferencia en la secuencia (Cotton R, 2006). Se reporta una sensibilidad del 95-100% (en promedio) con la desventaja de que se requiere estandarización extensiva por cada uno de los fragmentos a analizar y un bajo rendimiento en cuanto al procesamiento de muestras. (Taylor, et al. 2004).

### ***La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia desnaturalizante (DHPLC)***

Otra técnica que también se utiliza muy comúnmente en la detección de variantes desconocidas en el DNA. Se basa en la formación de heterodúplex para favorecer la diferencia en movilidad en la columna de cromatografía y se utiliza temperatura elevada para desnaturalizar parcialmente los fragmentos de DNA y evidenciar las diferencias en los dúplex formados. Una de las principales ventajas es una

sensibilidad superior al 95%. A pesar de esto, su principal desventaja es el costo del análisis (Taylor, et al. 2004; Cotton R, 2006).

### ***Análisis de Curvas de Disociación de Alta Resolución (análisis HRM)***

Más recientemente se desarrolló la técnica de HRM para la búsqueda de nuevas variantes en una secuencia de DNA y para genotipificación. Está basada en los perfiles de disociación que se obtienen de un dúplex de DNA dependiente de la temperatura. Esta disociación se evidencia por la incorporación de fluoróforos intercalantes que emiten su señal al encontrarse unidos a dsDNA. El perfil de disociación es dependiente de la secuencia, el tamaño y contenido de GC's en un amplicón de DNA. (Taylor, 2009).

Otros factores que modifican el perfil de disociación extrínsecos a la secuencia de DNA son la calidad y concentración, la fuerza iónica del buffer y presencia de otras sustancias como el DMSO. (Taylor, 2009; Er y Chang, 2012).

En el diseño de los experimentos de HRM, se debe tomar en cuenta un tamaño de amplicón entre 100 y 300pb. El análisis de fragmentos de mayor tamaño, como por ejemplo genes de múltiples exones y exones muy grandes deben ser analizados con amplicones más pequeños que se traslapen cubriendo toda la secuencia de interés (Er y Chang, 2012).

La sensibilidad y la especificidad del método se reportan por arriba del 98% en fragmentos de un tamaño menor a 300pb (Cui G, *et al*, 2013; Dempsey-Nunez, *et al*, 2012; Raymond, *et al*, 2013; Minucci, et al. 2013).

Entre las ventajas de la técnica se encuentra la simplicidad en el procesamiento de la muestra, rapidez, bajo costo y sensibilidad ya mencionada (Cui G, *et al*, 2013).

### **3 Objetivos**

#### **Objetivo general**

Identificar mutaciones causantes del desarrollo de Epilepsia Mioclónica Juvenil en el gen *EFHC2* de pacientes mexicanos por medio de HRM y secuenciación de Sanger automatizada.

#### **Objetivos particulares**

Estandarizar e implementar la técnica de High Resolution Melting (HRM) como metodología de tamizaje previo a la secuenciación de muestras de DNA con variantes de secuencia en el gen *EFHC2*.

Analizar las curvas de disociación de los 15 exones del gen *EFHC2* por medio de PCR-HRM para discriminar a las muestras con secuencias igual a la de referencia de las muestras con variantes de secuencia.

Secuenciar por el método de Sanger automatizado a las muestras que mostraron variantes de secuencia.

## 4 Metodología

### ***Diseño Experimental***

Es un estudio retrospectivo analítico.

### ***Tamaño de muestra***

Cálculo basado en la fórmula para estimación de la proporción de una población (n), en este caso, la proporción estimada de pacientes mexicanos con epilepsia mioclónica juvenil por mutaciones en el gen *EFHC1*.

$n = z^2 pq / d^2 = 100.03 \sim 101$  pacientes mexicanos con epilepsia mioclónica juvenil clásica.

Donde:

$$z = 1.96 \text{ para IC } 95\%$$

$$d = 0.05\%$$

$p = 0.07$  estimación de pacientes mexicanos con EMJ por mutaciones en *EFHC1* (Jara-Prado, *et al.* 2012)

$$q = 0.93$$

### ***Criterios de selección de estudio***

Se identificaron pacientes mexicanos con diagnóstico de EMJ que acudan a las consultas de Epilepsia y/o Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", el diagnóstico será confirmado por 2 neurólogos en forma independiente de acuerdo con los siguientes criterios de

diagnóstico de EMJ (Basados en la clasificación de la ILAE 2010 y del consorcio GENESS):

***Criterios de inclusión:***

- Crisis mioclónicas, predominio matutino o al despertar
- Edad de inicio entre los 10 y 25 años
- Crisis generalizadas asociadas (tónico-clónicas y ausencias)
- Examen neurológico normal
- EEG con complejos de polipunta onda lenta de 4-6 Hz o de punta onda lenta de 3Hz
- Que acepten participar en la investigación

***Criterios de exclusión:***

- Historia de crisis epilépticas sintomáticas.
- Historia familiar de epilepsia mioclónica progresiva
- Presencia de crisis parciales o ausencias mioclónicas
- Historia de inicio de crisis después de traumatismo craneoencefálico o infección del sistema nervioso central
- Lesiones estructurales en estudios de imagen RMN y tomografía
- Evidencia de enfermedad neurológica progresiva que pudiera causar epilepsia.
- Presencia de enfermedad degenerativa
- Que no acepten participar en la investigación

### **Descripción de pacientes incluidos en el estudio**

Se estudiaron 101 pacientes seleccionados de acuerdo con los criterios de inclusión. No hay diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de mujeres y hombres.

#### **Sexo**

53 mujeres (52.48%)

48 hombres (47.52%)

H<sub>0</sub>: p = 0.5, la proporción de mujeres es igual a la mitad de la muestra.

H<sub>1</sub>: p ≠ 0.5, la proporción de mujeres es distinta a la mitad de la muestra.

El valor crítico de Z = 1.9±, con un nivel de significancia del 95%

p = 0.5 Proporción de mujeres sea del 50%

$$Z_{calc} = \frac{p - p_0}{\sqrt{\frac{p_0(1 - p_0)}{n}}} = \frac{0.5248 - 0.5}{\sqrt{\frac{0.5(1 - 0.5)}{101}}} = 0.4984$$

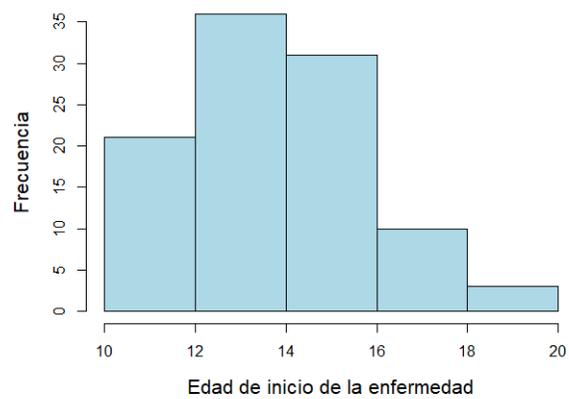
H<sub>0</sub>: se acepta, la proporción de mujeres en la muestra es igual a la mitad de la muestra

## Edad de inicio

Promedio = 14.24 años

Moda = 13 años

Intervalo = 10-20 años



**Figura 10:** Histograma de la distribución de pacientes seleccionados con respecto a la edad de inicio

## Procedimientos

### ***Cuantificación, pureza e integridad de las muestras de DNA***

A partir de un banco de DNA genómico 101 pacientes con EMJ seleccionados se prepararon alícuotas a una concentración de 25ng/ $\mu$ l determinadas por espectrofotometría en el equipo Genova Nano Jenway de micro volúmenes. La integridad del DNA fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con buffer TBE 1x.

La degradación puede representar un problema al momento de su procesamiento en técnicas de biología molecular, más específicamente en la PCR, entre mayor sea el grado de fragmentación existe menor probabilidad de amplificar ciertas regiones (Giardina, et al., 2009).

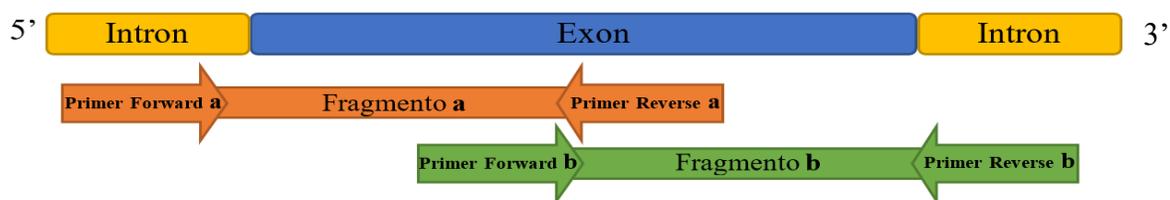
En el caso de la técnica de HRM, se van a amplificar fragmentos menores a 250pb, aumentando la probabilidad de amplificar incluso en DNA genómico muy fragmentado. Además, a pesar de que la reacción se lleva a cabo en un equipo de PCR en tiempo real, la técnica es cualitativa, por lo que el número de copias no afecta en el análisis (Tze-Kiong & Jan-Gowth, 2012).

La concentración de las muestras está en un intervalo muy variable, desde menos de 10ng/ $\mu$ l, hasta más de 2000ng/ $\mu$ l. Sin embargo, la mayoría de las muestras se encuentran entre los 50ng/ $\mu$ l y 650ng/ $\mu$ l. La concentración que presenta la mayoría de las muestras se considera aceptable, ya que algunos estudios indican que se pueden tener buenos resultados con una cantidad desde 0.1ng de DNA por reacción de PCR (Giardina, et al, 2009).

## Diseño de primers

Para este estudio, se diseñaron 30 pares de primers para cubrir los 15 exones del gen *EFHC2* (Anexo 1). Se utilizó la herramienta Primer Blast con la secuencia ENSG00000183690 ([www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/)) como referencia, verificando especificidad con la base de datos del genoma humano como referencia. Se consideraron amplicones de tamaño <250pb,  $T_m \sim 60^\circ\text{C}$ . Se analizaron las propiedades fisicoquímicas en la herramienta Oligo Analyzer Tool - IDT para evitar la formación de homodímeros y heterodímeros.

Estos parámetros de diseño están basados en las condiciones requeridas para un análisis de High Resolution Melting (Er, *et al.* 2012; Cui, *et al.*, 2013; HRM User Guide, Applied Biosystems). Para la mayoría de los exones se diseñaron múltiples amplicones que abarcaran la totalidad del exón de forma traslapada para cumplir con los parámetros de diseño (Figura 11).



**Figura 11** Representación esquemática de la ubicación de los primers diseñados para el análisis HRM. Se amplifica un fragmento 'a' con los primers **Forward a** y **Reverse a** (en naranja) y un fragmento 'b' que se amplifica con los primers **Forward b** y **Reverse b**. De este modo se puede analizar un exón completo por medio de fragmentos traslapados más pequeños.

## Estandarización de condiciones de PCR

Se hicieron PCR de gradiente de temperatura para cada par de primers con una etapa de desnaturalización inicial a  $94^\circ\text{C}$  durante 5 minutos y 40 ciclos que comprendían una etapa de desnaturalización por 30 segundos a  $94^\circ\text{C}$  y otra etapa

de alineamiento/extensión en gradiente desde 55°C hasta 65°C durante 15 segundos. Esto se realizó en un termociclador de punto final. Estas condiciones en el programa de PCR las indicadas por el proveedor (HRM User Guide, de Applied Biosystems). Los gradientes fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en buffer TBE 1x, con Gel Red como revelador.

Las temperaturas de alineamiento ( $T_m$ ) óptimas para los pares de primers diseñados y las condiciones de PCR propuestas son adecuadas al tener  $T_m$ 's de 59° o 60°C, sin presentar amplificaciones inespecíficas. (Anexo 1)

### ***Análisis HRM (Curvas de disociación)***

Con esta técnica se pretende hacer un tamizaje de todas las muestras para discriminar las muestras con variantes de secuencia desconocidas de aquellas con secuencia igual a la secuencia de referencia (ENSG00000183690) en toda la región codificante de *EFHC2*. Todas aquellas muestras que mostraran una curva de disociación distinta al genotipo de referencia son secuenciadas.

Para este análisis se utilizó un termociclador de tiempo real Step One de Applied Biosystems y las reacciones se prepararon en placas de 48 pocillos. Cada reacción de PCR-HRM se preparó con 3.5µl de Melt Doctor Master Mix, 2µl de la alícuota de DNA genómico a 25ng/µl, ajustando el volumen necesario para tener una concentración de primers de 100nmol/L en la reacción y a un volumen final de 8µl con agua libre de DNAsas. En cada placa se incluyeron controles negativos (agua libre de DNAsas) y un control positivo que corresponde a una muestra de DNA con genotipo igual a la secuencia de referencia, previamente determinado por secuenciación de Sanger.

Las condiciones de reacción de PCR se realizaron con una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. Posteriormente 40 ciclos que

comprendían una etapa de desnaturalización por 30 segundos a 94°C y otra etapa de alineamiento/extensión a la T<sub>m</sub> indicada en la tabla 5 (Anexo 1) de acuerdo con el fragmento correspondiente durante 45 segundos.

La determinación de la curva de disociación se realizó inmediatamente después de la PCR y comprende una etapa inicial de 5 minutos a 60°C y posteriormente un incremento gradual y continuo de temperatura equivalente al 0.3% por segundo. El equipo de PCR en tiempo real registró la señal de fluorescencia de forma continua durante todo el proceso.

Para el análisis de las curvas de disociación obtenidas se utilizó el software High Resolution Melt (HRM) Software v3.0, definiendo los controles positivos, así como las zonas de pre-melt y post-melt de acuerdo con el manual de usuario del software y se seleccionaron las muestras que se indicaban con una variante para su secuenciación.

### ***Secuenciación***

Se amplificaron fragmentos que abarcaban los exones completos utilizando los pares indicados en la tabla 5 (Anexo 1) y su T<sub>m</sub> respectiva según era el caso. Para esta etapa se prepararon reacciones de PCR punto final que contenían 7.5µl de Master Mix de Qiagen, 2µl de DNA genómico 25ng/µl, los primers se utilizaron a una concentración final en la reacción equivalente a 100nmol/L, y las reacciones se llevaron a un volumen final de 15µl con agua libre de DNAsas. Las condiciones de la PCR de punto final fueron las mismas que se utilizaron para la PCR-HRM, sin la etapa de disociación. Los fragmentos amplificados se verificaron en electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1x.

Posteriormente la reacción de secuenciación se llevó a cabo directamente utilizando 1µl del producto de PCR amplificado, 1µl de Big Dye Terminatorv3.1,

3.5µl de Sequencing Buffer Big Dye Terminator v3.1. La concentración final de primers en las reacciones se ajustaron a 500nmol/L. El volumen final de las reacciones fue de 20µl ajustando con agua libre de DNAsas.

Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron de acuerdo con el proveedor del Kit Big Dye Terminator v3.1, que comprenden una etapa de desnaturalización inicial a 96°C durante 30 segundos, seguido de 25 ciclos con una etapa de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 50°C por 45 segundos y elongación a 60°C por 45 segundos. Finalmente, una elongación final a 72°C durante un minuto.

Las reacciones de secuencia se purificaron en columnas con 50mg de Sephadex G-50 (Sigma Aldrich), hidratadas con 800µl de agua inyectable. Se elimina el exceso de agua de las columnas por centrifugación a 3000 r.p.m./2min. Se cargó la reacción completa en la columna y de nuevo se sometió a centrifugación bajo las mismas condiciones, obteniendo las muestras puras en 20µl de agua inyectable. Las reacciones purificadas se secaron en una centrifuga acoplada a vacío (*Speed-Vac HETO*) durante 45 minutos sin calor. Las reacciones secas se resuspendieron en 14µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) y se cargaron en una placa de 96 pozos. Las reacciones contenidas en la placa se sometieron a un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y centrifugación de la placa a 4500r.p.m./3min. La secuenciación se llevó a cabo en un Secuenciador ABI3130. Los electroferogramas fueron analizados manualmente en el software Sequencing Analysis v5.3 comparándolos contra la secuencia de referencia ENSG00000183690 (<http://www.ensembl.org/index.html>).

### **Análisis de resultados**

Este análisis se realiza como un primer paso para identificar si las variantes encontradas en *EFHC2* estén involucradas en el desarrollo de EMJ y se lleva a cabo de acuerdo con los lineamientos y recomendaciones del Instituto Nacional de

Investigación del Genoma Humano (NHGRI) y el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG), con un procedimiento similar al realizado por Bailey, *et al*, 2016, para variantes de secuencia sin estudios funcionales de mutaciones del gen *EFHC1* en pacientes con EMJ. (MacArthur, *et al*, 2014; Richards, *et al*. 2015; Bailey, *et al*. 2016).

Se inició con la determinación de la posición genómica de las variantes encontradas en ensamble de referencia del genoma humano versión GRCh38.p7 para saber si estaban ya reportadas en estudios previos y las bases de datos ensembl ([ensembl.org/index.html](http://ensembl.org/index.html)) y dbSNP ([ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)).

### ***Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes***

Se extrajeron las frecuencias alélicas de las variantes en las bases de datos Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>), NHLBI GO Exome Sequencing Project (GO-ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) y 1000 genomas (<http://www.internationalgenome.org/>).

***Predicción de la probabilidad de alterar la función de la proteína por mutaciones no sinónimas:*** Se utilizaron seis algoritmos distintos: SIFT/PROVEAN Human SNPs tool ([sift.icvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.icvi.org/www/SIFT_enst_submit.html), Choi, *et al*, 2012; Choi Y, 2012), PolyPhen2 ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), Adzhubei, *et al*. 2010), Mutation Taster ([mutationtaster.org/](http://mutationtaster.org/), Schwars, *et al*. 2014), Mutation Assessor ([mutationassessor.org/r3/](http://mutationassessor.org/r3/), Reva, *et al*. 2011) y FATHMM ([fathmm.biocompute.org.uk/inherited.html](http://fathmm.biocompute.org.uk/inherited.html), Shihab, *et al*, 2013).

**Grado de conservación de los nucleótidos durante la evolución:** del ensamble del genoma humano versión GRCh37/hg19 en la base de datos UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) se obtuvieron las puntuaciones pre calculadas de conservación de nucleótidos de phyloP para 46 especies de mamíferos placentarios (Pollard, *et al*, 2010), phyloP para 100 especies de vertebrados (Siepel A, *et al*. 2005) y puntuaciones de sustitución pre calculadas de GERP++ (Davydov E, *et al*, 2010).

**Predicción de los efectos de variantes de secuencia en las señales de splicing:** se utilizó el servidor de Human Splicing Finder 3.0 (<http://www.umd.be/HSF3/>; Desmet, *et al*, 2009) para predecir si las variantes tienen algún posible efecto en el procesamiento del mRNA.

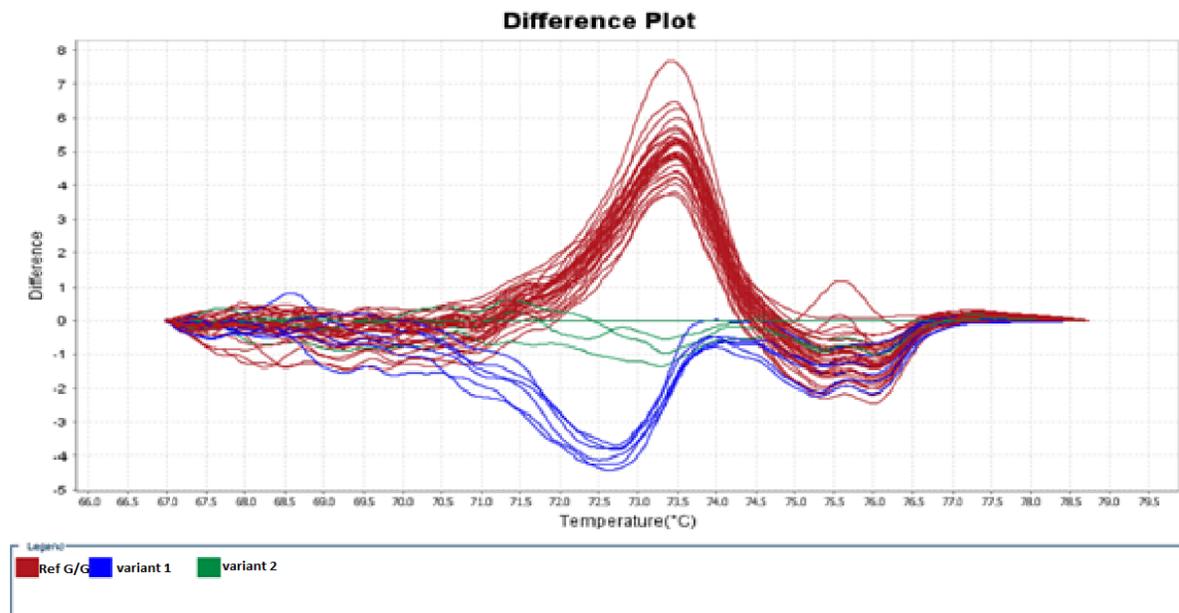
**Predicción de sitios diana para miRNAs:** para predecir si las variantes encontradas en región 3'UTR generan modificaciones en los sitios diana para miRNA, se utilizaron los servidores miRWalk 3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), miRDB (<http://www.mirdb.org/>) y miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)

**Elementos reguladores de DNA:** Consultar si las variantes encontradas están relacionadas con elementos de regulación del DNA, como sitios de unión de factores de transcripción y predicción de sitios de unión de factores de transcripción. Esta información fue consultada en el servidor <http://www.regulomedb.org/index>. (Boyle A, *et al*. 2012)

## 5 Resultados

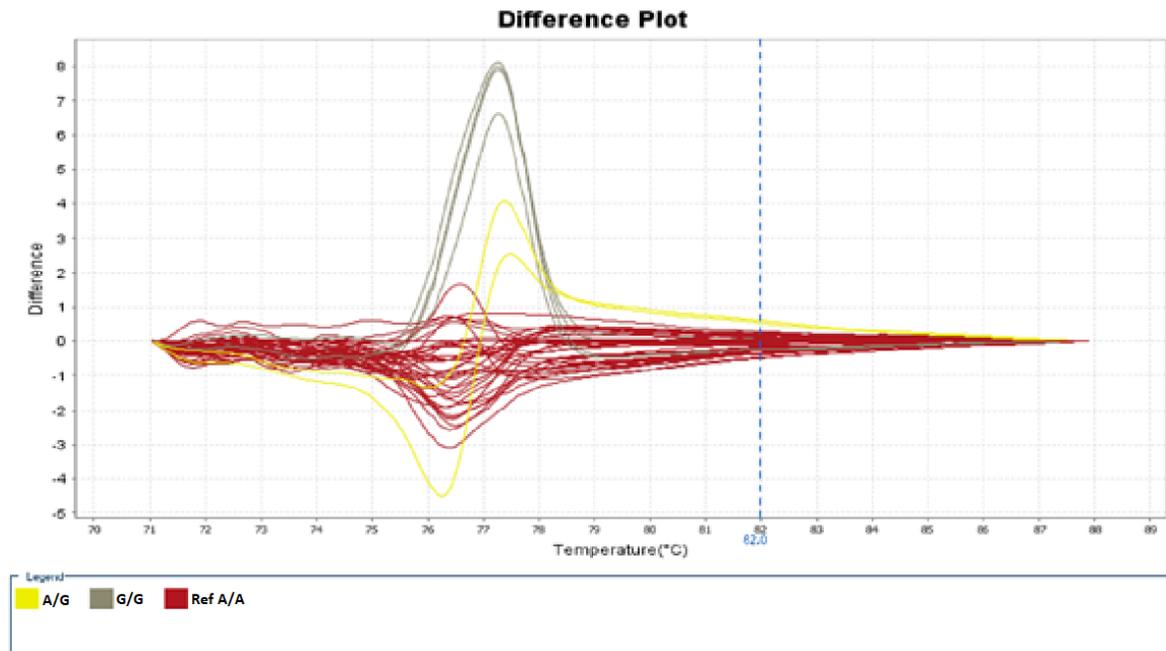
El análisis de las curvas de disociación HRM de los 15 exones del gen *EFHC2* mostró que existen muestras con variantes de secuencia en los exones 2, 4, 9, 10, 13 y 15. Estos resultados se resumen en la Tabla 2.

El análisis HRM compara las diferencias en la temperatura de disociación entre amplicones que tienen variantes en la secuencia de nucleótidos y se grafica la diferencia que hay en el grado de disociación del amplicón con respecto a la temperatura (Difference Plot). El algoritmo que realiza el software de análisis HRM, agrupa las muestras de acuerdo con esta diferencia y determina el número de variantes presentes en cada experimento de HRM. A las muestras que tienen un patrón de disociación similar al de la muestra de referencia les asigna este genotipo. Todas aquellas muestras distintas al genotipo de referencia se agrupan y se les asigna un número de variante, pero de genotipo desconocido (Figura 12).



**Figura 12** Difference Plot del exon 13 de *EFHC2*. Las muestras con genotipo de referencia se muestran en rojo, al momento del análisis indicaba una variante desconocida en azul y una segunda variante desconocida en verde.

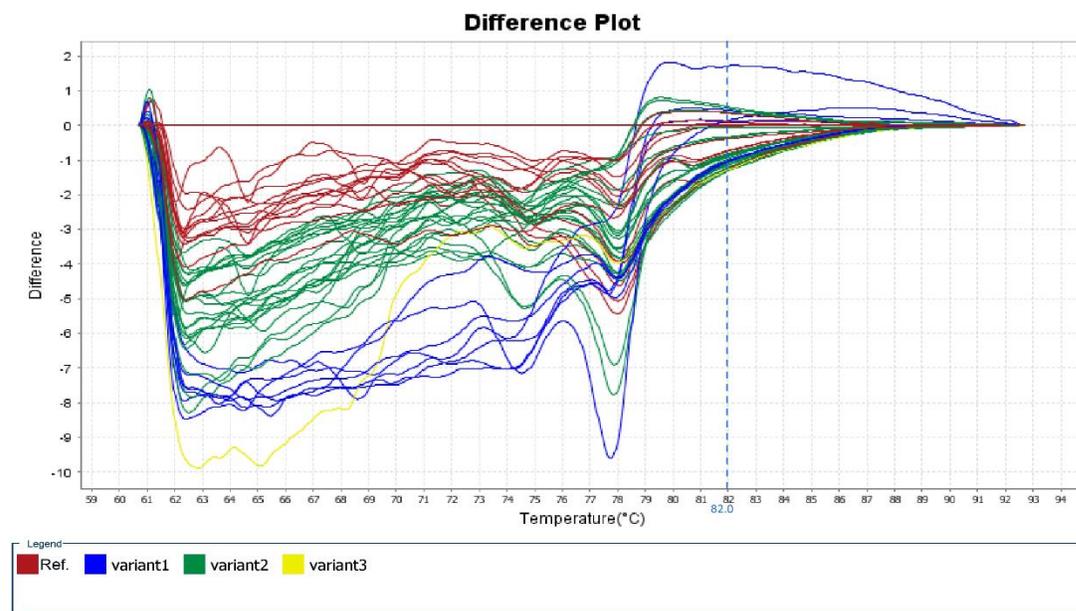
Cuando se tienen muestras de genotipo conocido, también se incluyen como control en el análisis y el software puede agruparlas directamente a ese genotipo (por ejemplo, la Figura 13).



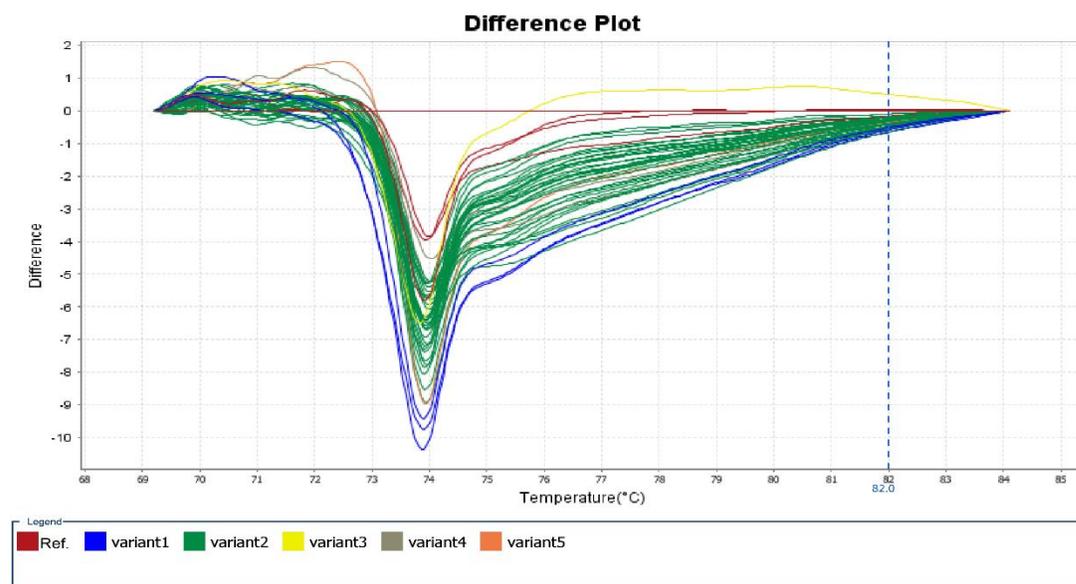
**Figura 13** Difference Plot del fragmento 'a' del exón 2 de *EFHC2*. Las muestras con genotipo de referencia (A/A) se muestran en rojo, las muestras con genotipo A/G (rs17146914) en color amarillo y las muestras con genotipo G/G (rs17146914) en color gris.

También se observa que en algunos casos el algoritmo del análisis HRM mostraba muchas variantes distintas a la secuencia de referencia incluso entre duplicados de una misma muestra, sin embargo, la curva de todas ellas era muy similar, por lo que se decidió secuenciar aquellas muestras con curvas de disociación con mayores diferencias con respecto a la curva del genotipo de referencia sin encontrarse variantes de secuencia. Por lo tanto, las variantes falsas que el algoritmo asigna como variantes de secuencia se pueden atribuir a la variación natural de los datos que el software no puede definir bien. (Figuras 14 a 16). En estos casos, para descartar que se tratara realmente de una variante, también se

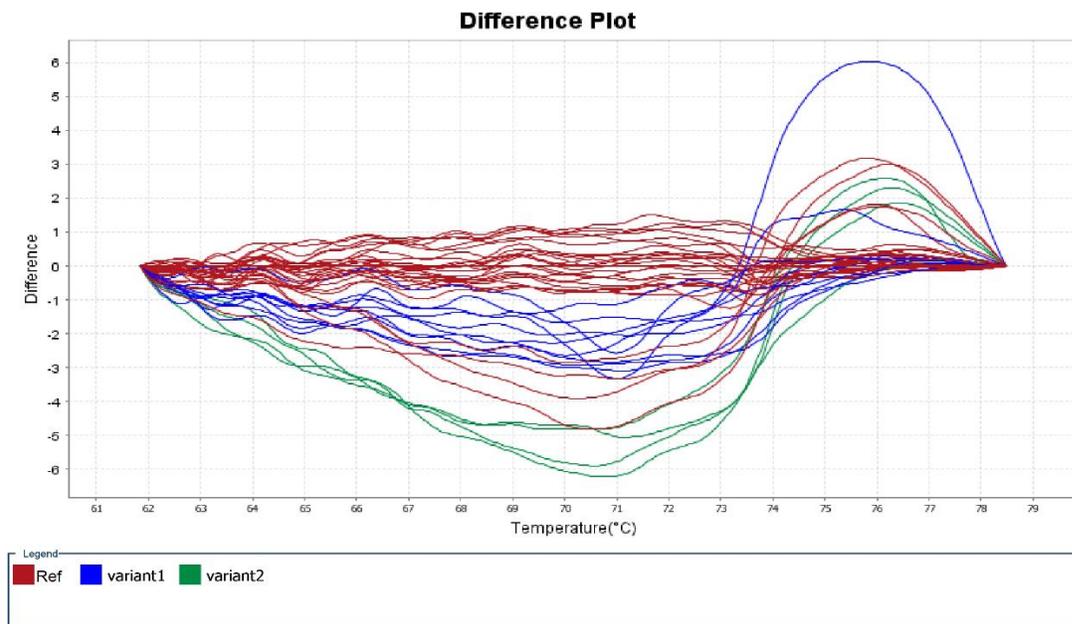
secuenciaron algunas muestras y se confirmó que se trataba de genotipos igual al genotipo de referencia.



**Figura 14** Difference plot del fragmento 'a' del exón 5 de *EFHC2*. Muestra 3 variantes (falsos positivos) con una curva de disociación similar al genotipo de referencia (Ref).



**Figura 15** Difference plot del fragmento 'a' del exón 12 de *EFHC2*. Muestra 5 variantes (falsos positivos) con una curva de disociación similar a genotipo de referencia (Ref).

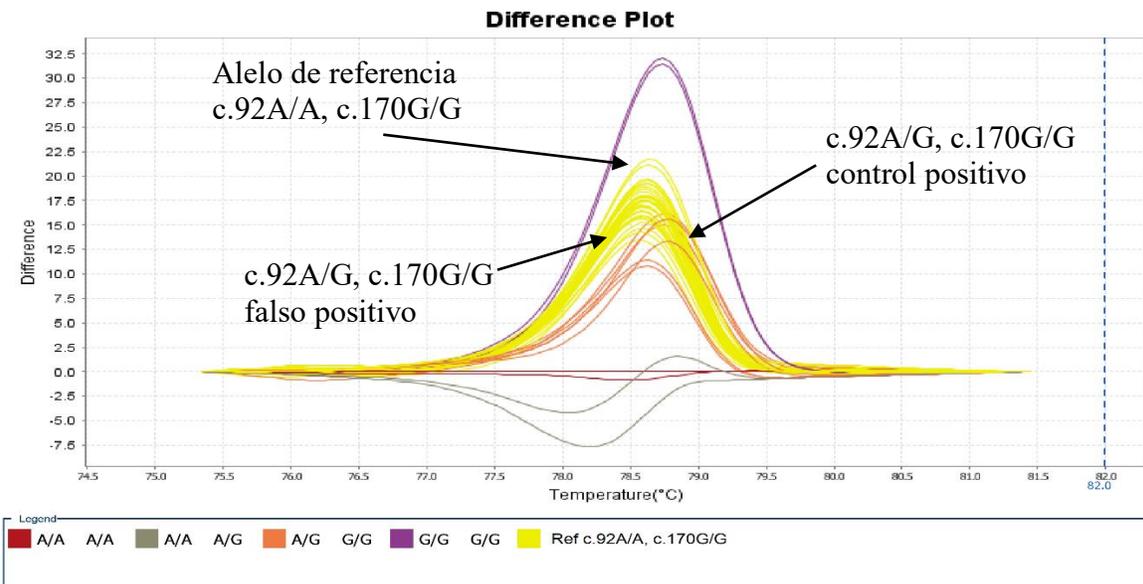


**Figura 16** Difference plot del fragmento del exón 14 de *EFHC2*. Muestra 2 variantes (falsos positivos) con una curva de disociación similar al genotipo de referencia.

En el análisis HRM se encontraron variantes en 2a y 2b del exón 2. La secuenciación reveló que se trata de dos SNPs, un cambio de A>G en la posición c.92, no sinónimo (p.Asn31Ser) identificado como rs17146914 y el SNP localizado en la posición c.170 G>A, no sinónimo (p.Cys57Tyr) identificado como rs61636783.0

El SNP c.92A/G (rs17146914) se localiza dentro del fragmento 2a y también en el fragmento 2b del exón 2. La segunda variante encontrada en este exón, el SNP c.170G/A (rs61636783) sólo se localiza en el fragmento 2b y se encuentra a 78pb río abajo del SNP c.92A/G.

Esto representó un problema para el algoritmo que no pudo asignar genotipos adecuadamente, ya que, a pesar de que en algunos casos las curvas pueden parecer bien definidas, en otros casos cuando las muestras procesadas resultan ser muy variadas las curvas no parecen definir muy bien el genotipo. Esto se debe a la cercanía entre los dos SNPs en esta región. (Figura 17).



**Figura 17** Difference plot del fragmento 'b' del exón 2 de *EFHC2*. Se muestran distintos genotipos combinados con los que se contaba hasta ese momento durante el análisis; el algoritmo asignó erróneamente el genotipo c.92A/G, c.170G/G (curvas color naranja indicado con una flecha) a una muestra con genotipo igual al de referencia (curvas amarillas) confirmada por secuenciación.

Se reporta que puede haber hasta un 10% de muestras con genotipos mal determinados por medio de HRM debido a que la presencia de distintos SNPs en un mismo amplicón, implica una mayor complejidad en su perfil de disociación y las curvas de disociación de heterocigotos pueden ser similares entre sí y llevar a una clasificación errónea (Er K-T, et al, 2012).

En este fragmento pueden existir 9 posibles combinaciones de alelos: 4 homocigotos distintos (c.92A/A, c.170G/G; c.92G/G, c.170G/G; c.92A/A, c.170A/A; y c.92G/G, c.170A/A) y 5 combinaciones con heterocigotos (c.92A/G, c.170A/A; c.92A/A, c.170A/G; c.92A/G, c.170A/G, c.92G/G, c.170A/G; y c.92A/G, c.170G/G) por lo que se decidió secuenciar todas las muestras con curvas de disociación distintas a la curva de la secuencia de referencia (c.92A/A, c.170G/G).

Con los resultados de secuenciación se pudo determinar la sensibilidad y la especificidad la técnica en los fragmentos 2a y 2b en esta muestra. Para el fragmento 2b sólo se tomó en cuenta la diferenciación del genotipo de referencia

de cualquier otro genotipo con variante de secuencia, debido a que los resultados de las réplicas de algunas muestras podían indicar dos variantes distintas a la secuencia de referencia y distintas entre sí. Los datos obtenidos para calcular la sensibilidad y especificidad del análisis HRM en los fragmentos 2a y 2b se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1** Resultados del tamizaje de los fragmentos 2a y 2b obtenidos por HRM y validados por secuenciación de Sanger automatizada

Resultados del análisis HRM vs secuenciación de Sanger automatizada	Número de muestras por fragmento	
	2a	2b
Muestras <b>CON</b> variantes de secuencia encontradas por HRM (Verdaderos positivos)	9	14
Muestras positivas en HRM <b>SIN</b> variantes de secuencia (Falsos positivos)	0	2
Muestras <b>SIN</b> variantes de secuencia encontradas por HRM (Verdaderos negativos)	91	83
Muestras <b>CON</b> variantes de secuencia no encontradas por HRM (Falsos negativos)	1	2

Con estos datos se determinó que el análisis HRM utilizado para discriminar muestras con variantes de secuencia tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100% para el fragmento 2a, y para el fragmento 2b tiene una sensibilidad del 87.5% y una especificidad del 97.6%. En estos casos, la sensibilidad fue menor a la sensibilidad del 98% reportado en otros estudios (Cui G, *et al*, 2013; Dempsey-Nunez, *et al*, 2012; Raymond, *et al*, 2013; Minucci, *et al*. 2013), a pesar de esto, resultó superior a la técnica de SSCP que tiene un 80% de sensibilidad, pero menor al promedio reportado para dHPLC y DGGE (Taylor, *et al*. 2004).

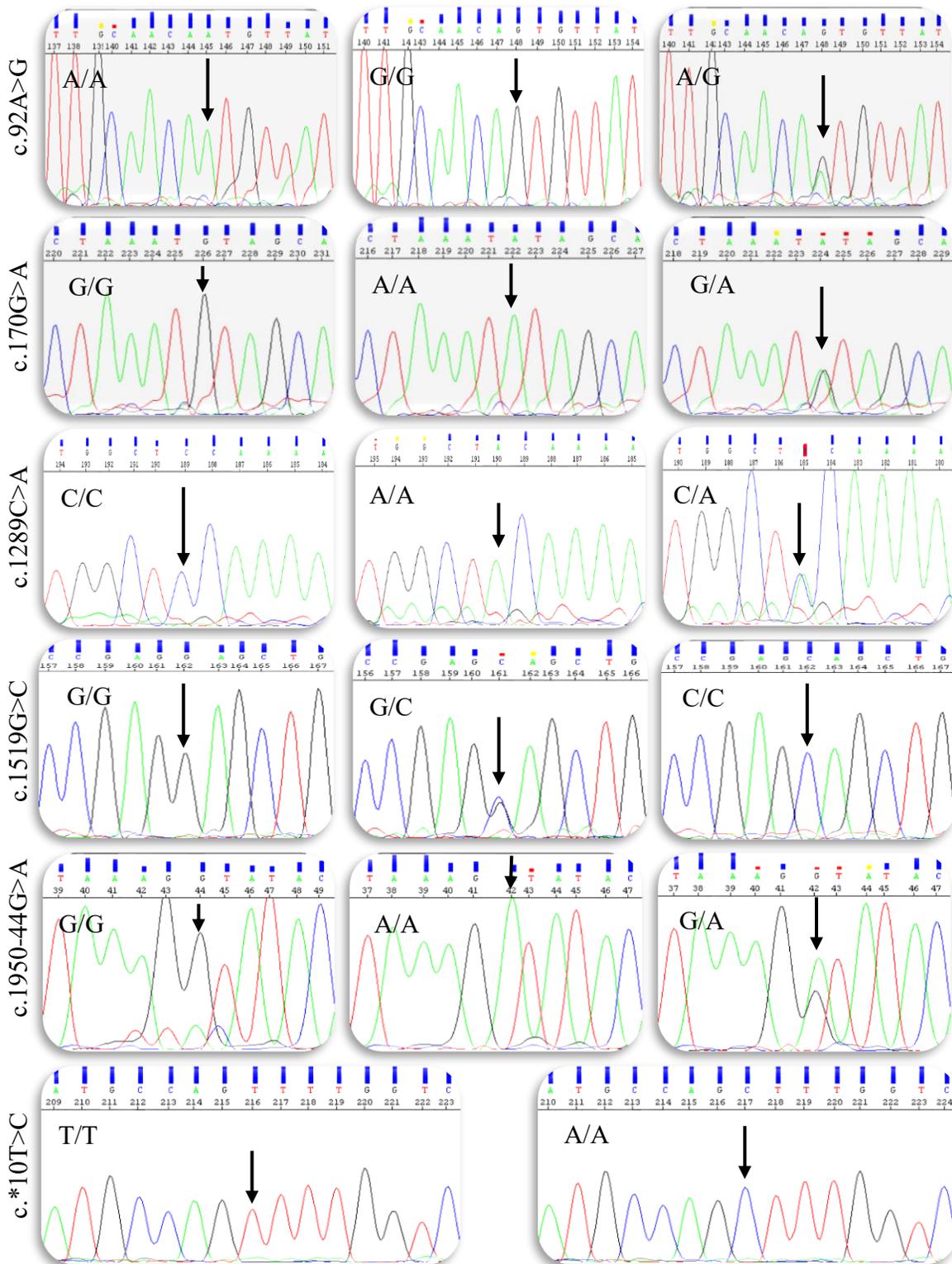
En los demás fragmentos no se pudo determinar la sensibilidad de la técnica de HRM ya que el objetivo era realizar el tamizaje con HRM para disminuir el número

de muestras a secuenciar y así también disminuir el costo y el tiempo de procesamiento de muestras.

En todos los demás fragmentos también se confirmaron por secuenciación algunas muestras que el software de HRM indicaba como genotipo de referencia. Principalmente se seleccionaron aquellas muestras cuya curva de disociación tenían mayores diferencias con respecto al control con genotipo de referencia y en ninguno de estos casos se encontraron variantes de secuencia.

Por otra parte, en el análisis HRM si se encontraron variantes de secuencia en los fragmentos 9, 10a, 13 y 15a que se confirmaron por secuenciación.

En el exón 9 se encontró el SNP rs2208592 en la posición c.1289 con cambio de C>A no sinónima (p.Ser430Tyr). En el exón 10 se encontró el SNP identificado como rs3747354, en la posición c.1519, un cambio de G>C no sinónimo (p.Glu507Gln). En la región intrónica previa al exón 13 se encontró un cambio de G>A, SNP no codificante identificado como rs7887384 localizado en c.1950-44. En el exón 15 se encontró un SNP en la posición c.\*10T>C de la región 3'UTR. Este SNP no se ha reportado previamente y se encontró en genotipo homocigoto. En la figura 18 se muestran los electroferogramas de cada variante.



**Figura 18** Electroferogramas que muestran las variantes encontradas en el gen *EFHC2*, cada una de las filas muestran una variante y las flechas indican la posición de la variante.

En la tabla 2 se resumen los resultados de las variantes encontradas en la muestra de pacientes con EMJ. Soló se muestran los resultados de los 34 pacientes que tuvieron alelos distintos a la secuencia de referencia ENSG00000183690 (<http://www.ensembl.org/index.html>) en las seis posiciones identificadas. Los 67 pacientes restantes mostraron tener un genotipo igual al de referencia.

**Tabla 2** Resumen de resultados de la genotipificación del gen *EFHC2*, sólo se muestran los resultados de los loci con variantes.

ID	Sexo	rs17146914 p.N31S A>G	rs61636783 p.C57Y G>A	rs2208592 p.S430Y C>A	rs3747354 p.E507Q G>C	rs7887384 (c.1950-44 G>A)	c.*10 T>C
79	M	G	G	A	G	G	T
386	M	G	G	C	G	G	T
404	F	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T
776	M	G	G	A	G	G	T
898	F	A/G	G/G	C/A	G/G	G/G	T/T
1253	F	A/G	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T
1288	F	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T
1387	F	A/G	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T
1428	F	A/G	G/G	C/A	G/G	G/G	T/T
408	F	A/A	G/A	C/C	G/G	G/G	T/T
995	M	A/A	A	C	G	G	T
1235	F	A/A	G/A	C/C	G/G	G/A	T/T
1247	M	A/A	A	C	G	G	T
1	F	A/A	G/G	C/A	G/G	G/G	T/T
121	F	A/A	G/G	C/A	G/G	G/G	T/T
665	F	A/A	G/G	A/A	G/G	G/G	T/T
681	F	A/A	G/G	A/A	G/G	G/A	T/T
685	M	A/A	G	A	G	A	T
725	F	A/A	G/G	A/A	G/C	G/A	T/T
743	F	A/A	G/G	A/A	G/G	G/A	T/T
773	M	A/A	G	A	G	A	T
802	M	A/A	G	A	G	G	T
818	M	A/A	G	A	G	G	T
897	F	A/A	G/G	C/A	G/G	G/G	T/T
966	F	A/A	G/G	C/A	G/G	G/G	T/T
975	F	A/A	G/G	A/A	G/G	G/G	T/T
1421	F	A/A	G/G	C/A	G/G	G/A	T/T
504	F	A/A	G/G	C/C	C/G	G/G	T/T
613	M	A/A	G	C	C	G	T
822	F	A/A	G/G	C	G/G	G/A	T/T
1290	M	A/A	G	C	C	G	T
1297	M	A/A	G	C	G	A	T
1397	F	A/A	G/G	C/C	G/G	G/A	T/T
1255	F	A/A	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C

F: femenino; M: Masculino; En color azul se indican las muestras que presentan variantes en dos o más posiciones.

## 6 Discusión de resultados

En 34 de los pacientes analizados se encontraron 6 variantes en el gen *EFHC2*, 11 de ellos con más de una variante. Cuatro de estas variantes encontradas son no sinónimas y ya habían sido reportadas previamente: rs17146914 (p.N31S) presente en el 8.9% de pacientes, rs61636783 (p.C57Y) presente en el 3.9% de pacientes, rs2208592 (p.S430Y) presente en el 17.8% de pacientes y rs3747354 (p.E507Q) presente en el 3.9% de pacientes; otra variante ya reportada en el intrón 12-13 (rs7887384) en el 9.9% de pacientes y una nueva variante no reportada: c.\*10 T>C. en la región 3'UTR en un solo paciente. Los genotipos de los pacientes que presentaron variantes en uno o más de los loci identificados en el gen *EFHC2*, se muestran en la tabla 2.

Para el análisis de los resultados obtenidos, nos basamos en las recomendaciones que emitieron el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano de los Estados Unidos (NHGRI) y el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) para el estudio de variantes de secuencia causantes de enfermedades humanas.

En estas recomendaciones se sugieren estrategias que se deben seguir para clasificar a las variantes como causales de enfermedad. Este proceso involucra contrastar evidencia a nivel genético, experimental y bioinformático del gen y de las variantes estudiadas para que estas puedan clasificarse con mayor certeza como gen causante de enfermedad y variantes patogénicas, de modo que los resultados tengan mayor utilidad en un contexto clínico de diagnóstico y tratamiento. (MacArthur, *et al*, 2014; Richards, *et al*. 2015)

Bailey, *et al*, 2016, realizaron un estudio de variantes en el gen *EFHC1* con pacientes de EMJ que está basado en estas recomendaciones para determinar si las variantes en *EFHC1* son causantes de EMJ y el presente estudio también trata

de seguir estos lineamientos, tomando en cuenta sus limitaciones, al tener evidencia sólo a nivel genético y bioinformático.

Como primer paso, observamos que a partir de los genotipos presentes en los pacientes y sus signos clínicos, las variantes no parecen tener efecto en el fenotipo de los pacientes, por ejemplo, la variante rs17146914 (A>G p.N31S) que presentan el paciente 79 (paciente de sexo masculino, hemicigoto G), los pacientes 1253 y 1288 (pacientes de sexo femenino con genotipos A/G y G/G respectivamente) y los pacientes con genotipos homocigotos de referencia (A/A), presentan las características clínicas típicas de EMJ clásica edad de inicio alrededor de los 15 años de edad que debuta con crisis mioclónicas y patrón de polipunta onda 4-6Hz (Martínez-Juarez, 2006). Y En comparación los pacientes que presentaron edad de inicio arriba de 20 años o por debajo de 13 años también pueden presentar un genotipo igual al de la secuencia de referencia.

Así mismo, cuando comparamos pacientes que presentan más de una variante se observan las mismas características clínicas, por ejemplo, un paciente de sexo femenino identificado como 725, presenta tres de las seis variantes encontradas: rs2208592 (A/A) (p.S430Y), la variante rs3747354 (G/C) (p.E507Q) y rs7887384 (G/A) (c.1950-44 G>A). La edad de inicio de esta paciente fue a los 18 años, presentando crisis mioclónicas como principal signo clínico. Esta paciente fue la única que presentó variantes en 3 loci del gen *EFHC2*, el máximo en esta muestra de pacientes.

En este estudio no fue posible realizar una prueba de asociación de las variantes encontradas debido a que no se pretendía estudiar individuos sanos, por lo que no contamos con controles para hacer una comparación.

Sin embargo, comparamos nuestros datos con las frecuencias alélicas de las variantes reportadas en bases de datos de población latina (ExAC), población mexicana residente de Los Ángeles (1000 genomas), población americana

caucásica y población afroamericana (GO-ESP). Las frecuencias alélicas de los SNPs encontrados es similar a las reportadas en otras poblaciones, guardando mayor semejanza con población americana pero cercana a la población mexicana de Los Ángeles. En general, la frecuencia que tiene una mayor diferencia con la muestra de pacientes es la población latina. (Ver Tabla 3 más adelante).

El SNP rs2208592 (p.Y430) ya se había asociado tentativamente al desarrollo de EMJ en hombres, sin embargo, la asociación se perdió cuando los autores del estudio hicieron un ajuste estadístico, dejando la posible asociación como base para otros estudios que trataran de replicar o rechazar este hallazgo (Gu, et al, 2005) y Berrin, *et al.* 2015, replicaron el estudio de este mismo SNP y no encontraron asociación con el desarrollo de epilepsia en 96 pacientes de IGE.

**Tabla 3** Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes encontradas

Variante	Pacientes de EMJ clásica							MAF en bases de datos públicas			
	Mujeres [n = 53]				Hombres [n = 48]		MAF	ExAC	1000 genomas	GO-ESP	
	Frecuencias genotípicas				Frecuencias alélicas		Ambos sexos	Latinos	MXL	EA	AA
rs17146914 p.N31S A>G	A/A	A/G	G/G	f(G)	A	G	f(G)	f(G)	f(G)	f(G)	f(G)
	[47]	[4]	[2]		[45]	[3]					
	0.886	0.075	0.037	<b>0.075</b>	0.937	<b>0.062</b>	<b>0.071</b>	<b>0.160</b>	<b>0.145</b>	<b>0.074</b>	<b>0.033</b>
rs61636783 p.C57Y G>A	G/G	G/A	A/A	f(A)	G	A	f(A)	f(A)	f(A)	f(A)	f(A)
	[51]	[2]	[0]		[46]	[2]					
	0.962	0.037	0.0	<b>0.018</b>	0.958	<b>0.041</b>	<b>0.025</b>	<b>0.005</b>	<b>0.010</b>	<b>0.008</b>	<b>0.023</b>
rs2208592 p.S430Y C>A	C/C	C/A	A/A	f(C)	C	A	f(A)	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)
	[41]	[7]	[5]		[42]	[6]					
	0.773	0.132	0.094	<b>0.160</b>	0.875	<b>0.125</b>	<b>0.150</b>	<b>0.441</b>	<b>0.250</b>	<b>0.083</b>	<b>0.063</b>
rs3747354 p.E507Q G>C	G/G	G/C	C/C	f(C)	G	C	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)
	[51]	[2]	[0]		[46]	[2]					
	0.962	0.037	0.0	<b>0.018</b>	0.958	<b>0.041</b>	<b>0.025</b>	<b>0.083</b>	<b>0.031</b>	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>
rs7887384 G>A	G/G	G/A	A/A	f(A)	G	A	f(A)	f(A)	f(A)	f(A)	f(A)
	[45]	[8]	[0]		[45]	[3]					
	0.849	0.150	0	<b>0.075</b>	0.937	<b>0.062</b>	<b>0.071</b>	<b>0.151</b>	<b>0.072</b>	<b>0.056</b>	<b>0.021</b>
c.*10 T>C	T/T	T/C	C/C	f(C)	T	C	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)	f(C)
	[52]	[0]	[1]		[48]	[0]					
	0.981	0.0	0.018	<b>0.018</b>	1.0	<b>0.0</b>	<b>0.012</b>	-	-	-	-

MAF: frecuencia del alelo menor; MXL: Mexicanos residentes de Los Angeles; EA: Americanos caucásicos; AA: Afroamericanos. El número de pacientes por genotipo se muestra entre corchetes [ ].

Los otros SNPs ya reportados sólo están depositados en las bases de datos sin algún tipo estudio que los relacione con el desarrollo de EMJ o algún otro fenotipo de cualquier tipo.

La diferencia en las frecuencias observadas en esta muestra de pacientes con respecto a la frecuencia observada en población Mexicana de Los Angeles (1000 genomas), que debería ser la de mayor semejanza, podría deberse a distintas razones: a) el tamaño de la muestra es pequeño, pudiendo verse afectada por el azar, b) que la técnica de HRM no tenga una sensibilidad y especificidad mayor al 98%, como ha sido reportado en otros estudios (Cui G, *et al*, 2013; Dempsey-Nunez, *et al*, 2012; Raymond, *et al*, 2013; Minucci, *et al*. 2013), y c) que la ancestría de ambas poblaciones sea realmente distinta y sería importante determinar frecuencias en población en sujetos sanos.

A pesar de la diferencia en las frecuencias alélicas encontradas de los SNPs en esta muestra de pacientes y en otras poblaciones, se puede observar que estas variantes pueden encontrarse en distintas poblaciones y esto sugiere que no tienen un efecto negativo en la función de *EFHC2* que pueda explicar el desarrollo de EMJ. Se debe tomar en cuenta que en estas bases de datos no siempre se cuenta con la certeza de que únicamente esté reportada información de individuos sanos, pudiendo contener variantes patogénicas y por ello se debe contrastar con otro tipo de evidencia (Richards, *et al*. 2015).

En este aspecto, el probar experimentalmente mediante técnicas *in vitro* o *in vivo* el efecto de una variante que con mucha probabilidad no tiene consecuencias negativas en la función de una proteína puede ser muy costoso. Por ello realizamos un análisis bioinformático que nos permitió predecir las posibles consecuencias moleculares de las variantes encontradas en el gen *EFHC2*.

Para la predicción del efecto de un cambio de aminoácido en la función de la proteína, se utilizaron los algoritmos SIFT/Provean, Polyphen 2, Mutation asesor,

Mutation taster y FATHMM. Los resultados obtenidos indican que las sustituciones encontradas no son deletéreas para la función de la proteína, clasificando los cambios como 'polimorfismo', 'benigno', 'tolerado', 'neutral' o 'bajo' dependiendo el algoritmo (ver la Tabla 4, más adelante).

En el caso de la variante p.E507Q (rs3747354), el algoritmo SIFT, lo clasificó como probablemente dañino, sin embargo, la puntuación fue de 0.013 y se encuentra muy cercano al umbral (0.015) establecido en SIFT para clasificar como tolerada o dañina a una sustitución (Choi, *et al*, 2012).

Otra forma de evaluar el efecto de una variante de secuencia es el determinar el grado de conservación de los nucleótidos en la secuencia de un gen. Para este fin, se extrajo la puntuación de los algoritmos GERP++, phyloP de mamíferos y phyloP de vertebrados disponibles en el servidor UCSC Genome Browser versión GRCh37/hg19. Estos algoritmos calculan una puntuación que indica si un nucleótido está conservado o evolucionan más rápidamente. Las puntuaciones con valores positivos indican sitios que se encuentran más conservados durante la evolución y los sitios que no se están conservados tienen una evolución más rápida en este caso los puntajes poseen valores negativos. (Davydov E, *et al*. 2010; Pollard, et al. 2010).

Los puntajes de GERP++ y phyloP en mamíferos y vertebrados de las variantes ya reportadas en algunos casos son positivos y esto nos indica que están conservados, sin embargo, estos valores se encuentran cercanos a los puntajes promedio que tienen los sitios que corresponden a regiones codificantes (GERP++ = 2.93 y phyloP ~ 2.0), que están sujetos a mayor presión selectiva que regiones no codificantes, pero no necesariamente indica que sean esenciales para la función. (Davydov E, *et al*. 2010; Pollard, et al. 2010). El único nucleótido que muestra un mayor grado de conservación es el de la variante rs3747354 (p.E507Q) con un puntaje de 5.85 y 5.24 para GERP++ y phyloP<sub>verteb</sub> respectivamente (Tabla 4).

El grado de conservación que tiene esta variante concuerda con el resultado que se obtuvo en el algoritmo de SIFT, que la clasifica como probablemente dañina. Esto podría deberse a que SIFT se apoya en el grado de conservación a nivel de aminoácido para realizar la predicción (Choi, *et al*, 2012).

Por otro lado, se probaron las sustituciones de nucleótido de las variantes en Human Splicing Finder 3.0 para predecir si están involucradas en el splicing del mRNA o pudieran generar nuevas señales de splicing en el transcrito. Este algoritmo indicó que el SNPs rs17146914 podría crear un nuevo sitio ESS (exonic splicing silencer), y los SNPs rs61636783 y rs3747354 con posibilidad de crear nuevos sitios ESE (exonic splicing enhancer), probablemente alterando el splicing de *EFHC2*. Sin embargo, no es suficiente evidencia para soportar dicho efecto, ya que estas variantes están reportadas en distintas poblaciones sin un fenotipo de enfermedad aparente (Tabla 4).

La variante c.\*10 T>C en región 3'UTR, al no ser codificante no podría tener un efecto directo en la estructura o función de la proteína. Las puntuaciones reportadas por GERP++ y phyloP de esta posición son negativos, lo que indica que no es un sitio conservado y puede tolerar variaciones durante la evolución (Davydov E, *et al*, 2010; Pollard, *et al*, 2010; Siepel A, *et al*. 2005).

Como sabemos, la región 3'UTR de un transcrito de mRNA, es muy importante en la regulación de la expresión de un gen, por esta razón, se buscó en los servidores de miRWalk, mirdb y miRTarBase la posibilidad de que la variante c.\*10 T>C causara una ganancia o pérdida de un sitio diana para un miRNA en el extremo 3'UTR del transcrito, sin embargo, ninguno de los miRNAs reportados tiene como secuencia diana a la posición c.\*10, por lo que tampoco parece estar involucrada en este proceso.

**Tabla 4** Resultados de los algoritmos de predicción para mutaciones no sinónimas, conservación de nucleótidos y señales de splicing.

<b>Variante</b>	rs17146914 c.92A>G p.N31S	rs61636783 c.170G>A p.C57Y	rs2208592 c.1289C>A p.S430Y	rs3747354 c.1519 G>C p.E507Q	rs7887384 c.1950-44 G>A	c.*10 T>C
-----------------	---------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	-------------------------------	-----------

Predicción del efecto de un cambio de a. a. en la función de la proteína

<b>SIFT</b>	Predicción	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Dañina	NA	NA
	Puntuación	0.168	1.0	0.913	0.013		
<b>Provean</b>	Predicción	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	NA	NA
	Puntuación	-1.97	2.67	-0.33	-2.18		
<b>Polyphen 2</b>	Predicción	Benigna	Benigna	Benigna	Benigna	NA	NA
	Puntuación	0.032	0.000	0.002	0.166		
<b>Mutation Asesor</b>	Impacto Funcional	Bajo	Neutral	Neutral	Medio	NA	NA
	FI Score	1.745	-1.935	0.035	2.02		
<b>Mutation Taster</b>	Predicción	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo	NA	NA
	Probabilidad	0.997	0.999	0.9999	0.073		
<b>FATHMM</b>	Predicción	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Tolerada	NA	NA
	Puntuación	-0.30	-0.24	-0.30	-0.31		

Grado de conservación de los nucleótidos durante la evolución

<b>GERP++</b>	Puntuación	2.92	2.93	-3.6	5.85	-2.47	-0.633
<b>phyloP</b>	Puntuación 46 Mamíferos	1.808	0.697	-0.6733	2.472	-0.559	-0.440
	Puntuación 100 Vertebrados	1.550	1.034	0.6395	5.243	-0.612	0.938

Predicción de los efectos de variantes de secuencia en las señales de splicing

<b>Human Splicing Finder 3.0</b>	Resultado	Creación de un sitio ESS	Creación de un sitio ESE	NA	Alteración de un sitio ESE	NA	NA
	Interpretación	Probable alteración del splicing	Probable alteración del splicing	No afecta el splicing	Probable alteración del splicing	NA	NA

NA: No aplica; ESE: Exonic Splicing Enhancer; ESS: Exonic Splicing Silencer.

<b>Variante</b>	<b>Puntuación</b>	<b>Resultado</b>	<b>FT que se unen</b>	<b>Predicción de</b>
-----------------	-------------------	------------------	-----------------------	----------------------

	Regulome DB		a esa región	Motifs
<b>rs61636783</b> <b>c.170G&gt;A</b> <b>p.C57Y</b>	3a	Poca probabilidad de afectar la unión de FT	TEAD4 TAL1 USF1 GATA2 CEBPB	DMRT4
<b>rs17146914</b> <b>p.N31S</b> <b>A&gt;G</b>	3a	Poca probabilidad de afectar la unión de FT	TEAD4 TAL1 GATA2 CEBPB	Foxj3 FOXJ2 DMRT1 DMRT7 Sox18
<b>rs7887384</b> <b>c.1950-44</b> <b>G&gt;A</b>	6	Mínima evidencia de unión de FT	-	Glis2 BARHL1 BARHL2
<b>rs2208592</b> <b>c.1289C&gt;A</b> <b>p.S430Y</b>	6	Mínima evidencia de unión de FT	-	E2F3
FT: Factores de Transcripción.				

**Tabla 5:** Resultados de la consulta de sitios de unión a factores de transcripción y predicción de sitios de unión

Por otra parte, se buscó evidencia del posible efecto de las variantes encontradas en el gen *EFHC2* en mecanismos regulatorios como la unión de factores de transcripción, afectación de sitios predichos de unión a factores de transcripción (motifs) y modificaciones a histonas en el servidor RegulomeDB.org. (Boyle A, *et al.* 2012).

En este servidor sólo se encontró información de 4 de las variantes encontradas: rs17146914 (p.N31S), rs61636783 (p.C57Y), rs7887384 y rs2208592 (Tabla5).

En la región de DNA donde se localizan las variantes rs17146914 (p.N31S) y rs61636783 (p.C57Y) se pueden unir hasta cinco factores de transcripción disitintos: TEAD4, cuya expresión se encuentra principalmente relacionada con el desarrollo de células de musculo esquelético (OMIM: \*601714); TAL1, que está involucrado en diversos procesos durante el desarrollo embrionario, desde el

sistema hematopoyético, neural y endotelial (OMIM: \*187040); USF1, un factor de transcripción de genes que modulan la homeostasis de lípidos y glucosa (OMIM: \*191523), GATA2, regula la expresión de genes en células hematopoyéticas (OMIM: \*137295); y CEBPB, un factor de transcripción de genes involucrados en diversas funciones, entre ellas alfa-tubulina en células progenitoras corticales en cerebro de ratón, en procesos de respuesta inmune antiviral y su sobreexpresión está relacionada a procesos de cáncer (OMIM: \*189965).

Sin embargo, las variantes identificadas no se localizan en los sitios con mayor puntuación correspondiente a una secuencia motif canónica de unión y obtuvieron una puntuación que indicaba poca probabilidad de afectar la unión de factores de transcripción (Tabla 5 y Figura 19) (Boyle A, *et al.* 2012).

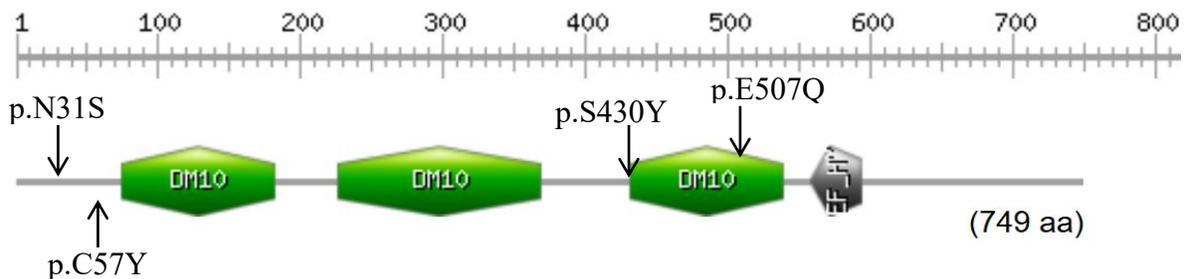
De las variantes rs7887384 y rs2208592 existe muy poca evidencia que indique la unión de factores de transcripción las regiones del DNA donde se localizan y sólo se identificó la presencia de probables motifs de unión. Por lo que no es suficiente para indicar que puedan afectar realmente la unión de factores de transcripción (Boyle A, *et al.* 2012).

Finalmente, desde el punto de vista estructural (Figura 19), se observa que las variantes codificantes rs17146914 (p.N31S), rs61636783 (p.C57Y), se ubican en el extremo N terminal, en una región previa al primer dominio DM10. El cambio de asparagina por serina en la posición 31, podría no tener un efecto tan importante en la estructura de la proteína, debido a que se tratan de aminoácidos polares y su estructura no es radicalmente distinta. Sin embargo, el cambio de cisteína por tirosina en la posición 57, podría tener alguna consecuencia debido a que se sustituye un aminoácido pequeño con carácter polar por otro aminoácido que es no polar aromático y más voluminoso, además, se sabe que cisteína puede formar puentes disulfuro que son determinantes en la estructura terciaria de muchas proteínas.



Con la variante rs2208592 (p.S430Y), de nuevo hay una sustitución de un aminoácido polar pequeño (serina) por otro que es voluminoso y no polar (tirosina). Esta variante se encuentra justo antes del inicio del tercer dominio DM10. Por último, la variante rs3747354 (p.E507Q) está ubicada dentro del tercer dominio DM10, con una sustitución de un aminoácido cargado negativamente (glutamato) por glutamina, de carga positiva.

Lamentablemente, a la fecha aún no se encuentra resuelta la estructura tridimensional de EFHC2 ni de alguna otra proteína similar sobre la que podamos hacer un análisis estructural que pueda ayudar a determinar si estas variantes tienen algún efecto en la estructura terciaria. Tomando en consideración los resultados que ya se discutieron previamente, sería importante estudiar si tienen pequeños efectos en la función de la proteína que combinados entre sí o con otros factores que puedan ser de susceptibilidad o riesgo a padecer EMJ, como es el caso de los SNPs en el gen *BRD2*. (Pal, et al, 2003).



**Figura 20** Representación esquemática de la proteína EFHC2 que muestra la ubicación de los tres dominios DM10 y el dominio EF-Hand. Con flechas se indica la posición en la proteína de las variantes codificantes encontradas. (Figura generada en la herramienta PROSITE de ExpASY (<https://prosite.expasy.org/>) a partir de la secuencia de la proteína EFHC2 (NP\_079460.2).

## 7 Conclusiones y perspectivas

A pesar de las limitaciones que se presentaron en el análisis del exón 2, la técnica de High Resolution Melting nos permitió identificar muestras con variantes de secuencia en el gen *EFHC2* que fueron confirmadas e identificadas por secuenciación de Sanger automatizada. Como ventaja encontramos que fue menor el número de muestras que se debieron secuenciar completas, disminuyendo así considerablemente el tiempo de procesamiento. Por lo tanto, la técnica de HRM es una buena opción para realizar un tamizaje de las muestras previo a la secuenciación.

De este modo, se encontraron 6 variantes de secuencia de un solo nucleótido: las variantes no sinónimas rs17146914 (p.N31S) y rs61636783 (p.C57Y) en el exón 2, la variante no sinónima rs2208592 (p.S430Y) en el exón 9, la variante no sinónima rs3747354 (p.E507Q) en el exón 10, la variante rs7887384 (c.1950-44 G>A) no codificante en región intrónica 12-13 y la variante c.\*10 T>C en la región 3'UTR.

Cinco de estas variantes ya se encuentran reportadas en bases de datos públicas y su frecuencia es similar a las de otras poblaciones, indicándonos que no deben tener un efecto negativo en la función de *EFHC2*. Así mismo, los resultados del análisis bioinformático indican que estas variantes tienen mucha probabilidad de ser no patogénicas, incluso para la variante c.\*10 T>C que no se había reportado antes.

Con base en estos resultados, podemos decir que las variantes encontradas en el gen *EFHC2* no son causantes de Epilepsia Mioclónica Juvenil clásica en los pacientes de esta muestra, sin embargo, aún no podemos descartar que se traten de variantes que puedan aumentar el riesgo de padecer EMJ.

En este sentido, ahora que se conocen las principales variantes de secuencia presentes en el gen *EFHC2* de pacientes mexicanos con EMJ, que puede servir para

diseñar un estudio de casos y controles con el suficiente poder estadístico para determinar si estas variantes podrían conferir mayor riesgo a padecer EMJ, o incluso considerar el estudio de *EFHC2* desde un punto de vista epigenético, ya que se sabe que escapa a la inactivación del cromosoma X (Castagné R, *et al.* 2011) o alterar un mecanismo de regulación más complejo que involucre afectación en la unión de factores de transcripción, cuya desregulación, podría desencadenar la enfermedad.

## 8 Literatura citada

Adzhubei I, *et al.* (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*. 7(4):248-249.

Allen N, *et al.* (2016). Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*. 57(1): e12-7.

Bailey J, *et al.* (2016). *EFHC1* variants in juvenile myoclonic epilepsy: reanalysis according to NHGRI and ACMG guidelines for assigning disease causality. *Genetics in Medicine*. 2016 Jul 28. doi: 10.1038/gim.2016.86.

Bailey J, *et al.* (2018). Variant Intestinal-Cell Kinase in Juvenile Myoclonic Epilepsy. *The New England Journal of Medicine*. 378(11): 1018-1028.

Baykan B y Wolf P. (2017). Juvenile myoclonic epilepsy as a spectrum disorder: A focused review. *Seizure*. 49: 36–41.

Berger I, *et al.* (2012) Intractable epilepsy of infancy due to homozygous mutation in the *EFHC1* gene. *Epilepsia*. 58: 1436 – 1440.

Berrin T, *et al.* (2015). No relation between *EFHC2* gene polymorphism and Idiopathic generalized epilepsy. *African Health Sciences*. 15(4):1204-10.

Blaya C, *et al.* (2009). Preliminary evidence of association between *EFHC2*, a gene implicated in fear recognition, and harm avoidance. *Neuroscience Letters*. 452: 84–86.

Boyle A, *et al.* (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*. 22(9):179.

Burneo J, *et al.* (2005). Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Research*. 66 (2005) 63–74.

Camfield C, Striano P y Camfield P. (2013). Epidemiology of juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 28: S15–S17.

Carvalho K, *et al.* (2016). Cognitive performance in juvenile myoclonic epilepsy patients with specific endophenotypes. *Seizure*. 40: 33–41.

Castagné R, *et al.* (2011). Influence of sex and genetic variability on expression of X-linked genes in human monocytes. *Genomics*. 98: 320–326.

Choi Y, *et al.* (2012). Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE*, 7(10): e46688.

Choi Y. (2012). A Fast Computation of Pairwise Sequence Alignment Scores Between a Protein and a Set of Single-Locus Variants of Another Protein. *In Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine (BCB '12)*. ACM, New York, NY, USA, 414-417.

Crespel, *et al.* (2013). Management of juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 28. S81–S86.

Cossette P, *et al.* (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*. 31(2):184-9.

Cotton R. (2006). Mutation Detection. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. doi: 10.1038/npg.els.0005672.

Cui G, *et al.* (2013). Development of a high-resolution melting method for genotyping of risk HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles and ethnic distribution of these risk alleles. *Gene*. 514: 125–130.

Davydov E, *et al.* (2010). Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Computational Biology*. 6(12). e1001025. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001025>.

da Silva Sousa P, *et al.* (2005). Self-perception of factors that precipitate or inhibit seizures in juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure*. 14, 340—346.

de Nijs L, *et al.* (2009). EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. *Nature Neuroscience*. 12(10): 1266-1276.

de Nijs L, *et al.* (2013). Juvenile myoclonic epilepsy as a possible neurodevelopmental disease: Role of EFHC1 or Myoclonin1. *Epilepsy & Behavior*. 28: S58–S60.

de Nijs L, *et al.* (2012). Mutations of EFHC1, linked to juvenile myoclonic epilepsy, disrupt radial and tangential migrations during brain development. *Human Molecular Genetics*. 21(23): 5106–5117.

Dempsey-Nunez, *et al.* (2012). High resolution melting analysis of the MMAA gene in patients with cblA and in those with undiagnosed methylmalonic aciduria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 107: 363–367.

Desmet F, *et al.* (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acid Research*. 37(9). e67.

Delgado-Escueta A, *et al.* (2013). The quest for Juvenile Myoclonic Epilepsy genes. *Epilepsy & Behavior*. 28: S52–S57.

Dibbens L, *et al.* (2004). *GABRD* encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABA<sub>A</sub> receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Human Molecular Genetics*. 13(13). 1315-1319.

Ding L, *et al.* (2010). GABA<sub>A</sub> Receptor  $\alpha$ 1 Subunit Mutation A322D Associated with Autosomal Dominant Juvenile Myoclonic Epilepsy Reduces the Expression and Alters the Composition of Wild Type GABA<sub>A</sub> Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(34). 26390–26405.

Er K-T, *et al.* (2012). High-resolution melting: Applications in genetic disorders. *Clinica Chimica Acta* 414: 197–201.

Escayg, *et al.* (2000). Coding and Noncoding Variation of the Human Calcium-Channel  $\beta$ <sub>4</sub>-Subunit Gene CACNB4 in Patients with Idiopathic Generalized Epilepsy and Episodic Ataxia. *American Journal of Human Genetics*. 66:1531–1539.

Fisher R, *et al.* (2014). A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 55(4):475–482.

Fu Z. *et al.* (2009). Intestinal cell kinase, a MAP kinase-related kinase, regulates proliferation and G<sub>1</sub> cell cycle progression of intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*. 297(4): G632–G640.

Genton P, *et al.* (2013). Clinical aspects of juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 28. S8–S14.

Graffelman J y Weir B. (2016). Testing for Hardy–Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome. *Heredity*. 116, 558–568.

Greenberg D, Delgado-Escueta AV y Widelitz H. (1988). Juvenile myoclonic epilepsy may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. *American Journal of Medical Genetics*. 31:185–192.

Grisar T, *et al.* (2012). Myoclonin1/EFHC1 in cell division, neuroblast migration, synapse/dendrite formation in juvenile myoclonic epilepsy. *In: Noebels JL, Avoli M,*

Gu W, *et al.* (2005). A new EF-hand containing gene EFHC2 on Xp11.4: Tentative evidence for association with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Research*. 66: 91–98.

Guerrini R, Canapicchi, R y Montanaro, D. (2005). Epilepsy. *Pediatric Neuroradiology: Brain*. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. Pp995–1047.

Jara-Prado A, *et al.* (2012). Novel myoclonin1/EFHC1 mutations in Mexican patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure*. 21:550-554.

King, S. (2006). Axonemal Protofilament Ribbons, DM10 Domains, and the Link to Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 63:245–253.

Knoflach F, *et al.* (2016). GABA<sub>A</sub> receptor-mediated neurotransmission: Not so simple after all. *Biochemical Pharmacology*. 115. 10–17.

Lachance-Touchette P. *et al.* (2011). Novel  $\alpha$ 1 and  $\gamma$ 2 GABA<sub>A</sub> receptor subunit mutations in families with idiopathic generalized epilepsy. *European Journal of Neurosciences*. 34(2):237-49.

Lahiry P, *et al.* (2009). A Multiplex Human Syndrome Implicates a Key Role for Intestinal Cell Kinase in Development of Central Nervous, Skeletal, and Endocrine Systems. *American Journal of Human Genetics*. 84(2): 134–147.

Léon C, *et al.* (2010). Distribution of EFHC1 or Myoclonin 1 in mouse neural structures. *Epilepsy Research*. 88, 196—207.

Lyons P, *et al.* (2007). Characterization of Carboxypeptidase A6, an Extracellular Matrix Peptidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(11): 7054–7063.

Lyons P y Fricker Lloyd. (2010). Substrate Specificity of Human Carboxypeptidase A. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(49): 38234–38242.

MacArthur D, *et al.* (2014). Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*. 508: 469-476.

Maljevic S, *et al.* (2006). A mutation in the GABA(A) receptor alpha (1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Annals of Neurology*. 59(6):983-7.

Mantoan L y Walker M. (2011). Treatment Options in Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Current Treatment Options in Neurology*. 13(4): 355–370.

Martínez-Juárez I, *et al.* (2006). Juvenile myoclonic epilepsy subsyndromes: family studies and long-term follow-up. *Brain*. 129, 1269–1280.

Meencke J y Janz D. (1984) Neuropathological findings in primary generalized epilepsy: a study of eight cases. *Epilepsia*. 25: 8 – 21.

Minucci A, *et al.* (2013). Small Amplicons High Resolution Melting Analysis (SA-HRMA) allows successful genotyping of acid phosphatase 1 (ACP1) polymorphisms. *Clinica Chimica Acta*. 416:86–91

Miranda M, *et al.* (2011). TcNDPK2, a Trypanosoma cruzi microtubule-associated nucleoside diphosphate kinase. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 177: 152–155.

Niscita F, *et al.* (2012). The genetics of monogenic idiopathic epilepsies and epileptic encephalopathies. *Seizure*. 21: 3–11.

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 601714. Fecha de última edición: 04/28/2010. World Wide Web URL: <https://omim.org/>

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 187040. Fecha de última edición: 03/29/2018. World Wide Web URL: <https://omim.org/>

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 191523. Fecha de última edición: 07/11/2017. World Wide Web URL: <https://omim.org/>

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 137295. Fecha de última edición: 04/20/2016. World Wide Web URL: <https://omim.org/>

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 189965. Fecha de última edición: 04/25/2014. World Wide Web URL: <https://omim.org/>

Pal D, *et al.* (2003). BRD2 (RING3) Is a Probable Major Susceptibility Gene for Common Juvenile Myoclonic Epilepsy. *American Journal of Human Genetics*. 73:261–270.

Pedersen S y Petersen K. (1988). Juvenile myoclonic epilepsy: clinical and EEG features. *Acta Neurologica Scandinavica*. 97:160–3.

Pizzuti A, *et al.* (2002). Investigative Ophthalmology & Visual Science. 43: 3609-3612.

Pollard K, *et al.* (2010). Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Research*. 20(1):110-21.

Raymond L, *et al.* (2013). Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the CDKL5 gene: Identification of novel mutations. *Gene*. 512: 70–75.

Raju P, *et al.* (2017). Microtubule-associated defects caused by *EFHC1* mutations in juvenile myoclonic epilepsy. *Human Mutation*. DOI: 10.1002/humu.23221.

Reva B, *et al.* (2011). Predicting the Functional Impact of Protein Mutations: Application to Cancer Genomics. *Nucleic Acids Research*. 39:17 e118. doi:10.1093/nar/gkr407

Rodríguez-Revenga L, *et al.* (2007). Contiguous deletion of the NDP, MAOA, MAOB, and EFHC2 genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy. *American Journal of Medical Genetics*. 1;143A (9):916-20.

Rogawski M, *et al.*, Editores. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4ª Edición. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98188/>.

Rossetto MG, *et al.* (2011). *Defhc1.1*, a homologue of the juvenile myoclonic gene EFHC1, modulates architecture and basal activity of the neuromuscular junction in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*. 20:4248–4257.

Salzmann A, *et al.* (2012). Carboxypeptidase A6 gene (CPA6) mutations in a recessive familial form of febrile seizures and temporal lobe epilepsy and in sporadic temporal lobe epilepsy. *Human Mutation*. 33(1):124-35.

Sapio M, *et al.* (2012). Naturally occurring carboxypeptidase A6 mutations: effect on enzyme function and association with epilepsy. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(51):42900-9.

Sapio M, *et al.* (2015). Novel Carboxypeptidase A6 (CPA6) Mutations Identified in Patients with Juvenile Myoclonic and Generalized Epilepsy. *PLOS ONE*. DOI:10.1371/journal.pone.0123180.

Scheffer I, *et al.* (2017). ILAE Classification of the Epilepsies Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 58(4): 512–521

Schwars J, *et al.* (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*. 11, 361–362.

Shihab HA, *et al.* (2013). Predicting the Functional, Molecular and Phenotypic Consequences of Amino Acid Substitutions using Hidden Markov Models. *Human Mutation*. 34:57-65.

Shorvon D. (2010). The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. 52(6):1052–1057.

Singh A y Trevick S. (2016). The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurologic Clinics*. 34: 837–847.

Siepel A, *et al.* (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research*. 2005 Aug;15(8):1034-50.

Suzuki T, *et al.* (2004). Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*. 36: 842– 849.

Suzuki T, *et al.* (2009). Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. *Human Molecular Genetics*. 18(6): 1099–1109.

Tadmouri A, *et al* (2012). Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *The EMBO Journal*. 31: 3730–3744.

Taylor C, *et al.* (2004). Current and Emerging Techniques for Diagnostic Mutation Detection. *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*. Humana Press. Totowa, NJ. Pp 9-44.

Taylor C. (2009). Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochemical Society Transactions*. 37: 433–437.

Weiss, *et al.* (2006). Identification of *EFHC2* as a quantitative trait locus for fear recognition in Turner syndrome. *Human Molecular Genetics*. 16(1): 107–113.

Welty T. (2006). Juvenile Myoclonic Epilepsy: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Pediatric Drugs*. 8 (5): 303-310.

Wolf P, *et al.* (2015). Juvenile myoclonic epilepsy: A system disorder of the brain. *Epilepsy Research*. 114, 2—12.

Yacubian E. (2016). Juvenile myoclonic epilepsy: Challenges on its 60th anniversary. *Seizure: European Journal of Epilepsy*.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2016.09.005>.

Yamakawa K y Suzuki T. (2013). Re-evaluation of myoclonin1 immunosignals in neuron, mitotic spindle, and midbody — Nonspecific? *Epilepsy & Behavior*. 28: S61–S62

## Anexo 1: Listas de primers diseñados para el análisis

**Tabla 6** Primers diseñados para el análisis del gen EFHC2

Exón	Fragmento	Primer	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (pb)
<b>1</b>	1a	EFHC2 1a F	GTGACGCCGCTTCCCCTCTC	60	192
		EFHC2 1a R	CCGGGAGCTGTGACCTCGGA		
	1b	EFHC2 1b F	AGGCAACGTGGGGGCCAAAC	60	171
		EFHC2 1b R	CCGGGAGCTGTGACCTCGGA		
<b>2</b>	2a	EFHC2 2a F	TGCCACTTTATTTGCATTTTGTG	59	210
		EFHC2 2a R	CCAGGCTTTTCATCACTCACC		
	2b	EFHC2 2b F	TCTCTTATGTTACAGGTGGGA	60	230
		EFHC2 2b R	TTCTCCCAGTGTCATGTGA		
<b>3</b>	3a	EFHC2 3a F	CATGGCTGATGTGTAGAATGAGT	60	258
		EFHC2 3a R	TGAATTGTGTCATCTTCAGGGT		
	3b	EFHC2 3b F	AAAAGCCAAACCAACTACAGAAT	60	159
		EFHC2 3b R	AAGGCAGGAGTCAGAAGTGA		
<b>4</b>	4a	EFHC2 4a F	GGGTTGTTAGTGAATGTGCTGT	60	188
		EFHC2 4a R	TGTCCGGCCATAGAAGACAA		
	4b	EFHC2 4b F	GGA CT TCTATCCGGCGTCAT	60	198
		EFHC2 4b R	CTTCTGGACATTGCACTGGG		
	4c	EFHC2 4c F	GGCCGACATTCAAGATTTATGA	60	158
		EFHC2 4c R	TGAAGACAAGA ACTCAACAAACG		
<b>5</b>	5a	EFHC2 5a F	CCACCATGCCTGACCAAAA	60	167
		EFHC2 5a R	GTTTCAGGGTGTGCGAGGGA		
	5b	EFHC2 5b F	TGTAGAACACGTAGAGCCCT	60	165
		EFHC2 5b R	TCATCACACAAGAAGTAATGCAG		
	5c	EFHC2 5c F	TGGAGACCGTAGAGAACTCA	60	169
		EFHC2 5c R	CCCACAAGCAAATTCAAAGTGG		
<b>6</b>	6a	EFHC2 6a F	TTGAGTGCCACCTCTATGCC	60	196
		EFHC2 6a R	ATCGAACAGGTAGCCATCCG		
	6b	EFHC2 6b F	TCAACCAGGCCAGATAACAGA	60	167
		EFHC2 6b R	CGTAACTCGCCCCACTGTT		

**Tabla 5 (continuación): Primers diseñados para el análisis del gen EFHC2**

<b>Exón</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm(°C)</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<b>7</b>	7a	EFHC2 7a F	TCCTGGTTCTTTGGAGGGTC	60	157
		EFHC2 7a R	TCATCACAGTCATAAAGGAGCAC		
	7b	EFHC2 7b F	GATAGTGACCTGTCCCTAGGA	60	203
		EFHC2 7b R	GAGCCTAGCATTGAAACTCCA		
<b>8</b>	8a	EFHC2 8a F	TTTCAAAACAGCCATAATCAGGG	60	196
		EFHC2 8a R	GGTGTGGGCTTGAGGTCTAT		
	8b	EFHC2 8b F	ACCTCAGTTTCATGCAAGCC	60	186
		EFHC2 8b R	CTAAAATCATGGTTCCTCAAGC		
<b>9</b>	9	EFHC2 9 F	TGCTCTAACTCTCATTCTCTTCC	60	250
		EFHC2 9 R	TCATGTTCCCTAATTTTCAACA		
<b>10</b>	10a	EFHC2 10a F	TGGTGGTCTGTGCTTGAAGA	60	219
		EFHC2 10a R	CATTCACCGTGACTCCAATG		
	10b	EFHC2 10b F	AGGCCGAGGAGCTGTACATTGGA	60	157
		EFHC2 10b R	TGCGGAGGGCTGAGAGGCAA		
<b>11</b>	11a	EFHC2 11a F	GGCCATCAGCAAGATTGGGCTCC	59	181
		EFHC2 11a R	TTGTGTGCTTAGAGTCAGCAGCTTT		
	11b	EFHC2 11b F	ACTTGCCCTACAAAAGCTGAAGCA	60	161
		EFHC2 11b R	TGGACAACCTTGAGGGGAAAACAGGT		
<b>12</b>	12a	EFHC2 12a F	TGCTGCTCCCAAATTAAGAA	60	238
		EFHC2 12a R	GGTAGTGACGTGCAATGGTT		
	12b	EFHC2 12b F	TTTGACTGTTGGAAACCTTGC	60	180
		EFHC2 12b R	TCTCGATCTTCATACACACAGGA		
	12c	EFHC2 12c F	TGGATTTCTTAATCGCACTGG	60	161
		EFHC2 12c R	TCCTTCATTACTCAGGTTACAGA		
<b>13</b>	13	EFHC2 13 F	ACTTCCATGTGTACATTCTCAGGAAACA	60	249
		EFHC2 13 R	TGCAGGACAATCCCTATCAAGAGTGG		
<b>14</b>	14	EFHC2 14 F	ACATTCTGGAGGGTCAGAAGCAATAAGA	60	391
		EFHC2 14 R	AGCACTCTTTCCAAAAGCACTGATGT		
<b>15</b>	15a	EFHC2 15a F	CCAGTAGACCACAAAGTCCTTATGAACC	60	231
		EFHC2 15a R	TCCTCTAAGCCAAACGCGTCCT		
	15b	EFHC2 15b	GGACGCGTTTGGCTTAGAGGAGG	60	219
		EFHC2 15b	AACAGTACGTCGGCAATGTAACATGA		

**Tabla 7: Primers usados para la secuenciación**

<b>Exón</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<b>1</b>	EFHC2 1a F	GTGACGCCGCTTCCCGTCTC	60	210
	EFHC2 1a R	CCGGGAGCTGTGACCTCGGA		
<b>2</b>	EFHC2 2a F	TGCCACTTTATTTGCATTTTGTG	60	341
	EFHC2 2b R	TTCCTCCCAGTGTGTCATGTGA		
<b>3</b>	EFHC2 3a F	CATGGCTGATGTGTAGAATGAGT	60	349
	EFHC2 3b R	AAGGCAGGAGTCAGAAGTGA		
<b>4</b>	EFHC2 4a F	GGGTTGTTAGTGAATGTGCTGT	60	336
	EFHC2 4c R	TGAAGACAAGAACTCAACAAACG		
<b>5</b>	EFHC2 5a F	CCACCATGCCTGACCAAAA	59	402
	EFHC2 5c R	CCCACAAGCAAATTCAAAGTGG		
<b>6</b>	EFHC2 6a F	TTGAGTGCCACCTCTATGCC	59	278
	EFHC2 6b R	CGTAACTCGCCCCACTGTT		
<b>7</b>	EFHC2 7a F	TCCTGGTTCTTTGGAGGGTC	60	288
	EFHC2 7b R	GAGCCTAGCATTTGAAACTCCA		
<b>8</b>	EFHC2 8a F	TTTCAAACAGCCATAATCAGGG	59	259
	EFHC2 8b R	CTAAAATCATGGTTCCTCAAGC		
<b>9</b>	EFHC2 9 F	TGCTCTAACTCTCATTTCTCTTCC	60	250
	EFHC2 9 R	TCATGTTCCCTAATTTTCAACA		
<b>10</b>	EFHC2 10a F	TGGTGGTCTGTGCTTGAAGA	60	339
	EFHC2 10b R	TGCGGAGGGCTGAGAGGCAA		
<b>11</b>	EFHC2 11a F	GGCCATCAGCAAGATTGGGCTCC	59	255
	EFHC2 11b R	TGGACAACCTTGAGGGGAAAACAGGT		
<b>12</b>	EFHC2 12a F	TGCTGCTCCCAAATTAAGAA	60	426
	EFHC2 12c R	TCCTTCATTACTCAGGTTACAGA		
<b>13</b>	EFHC2 13 F	ACTTCCATGTGTACATTCTCAGGAAACA	60	249
	EFHC2 13 R	TGCAGGACAATCCCTATCAAGAGTGG		
<b>14</b>	EFHC2 14 F	ACATTCTGGAGGGTCAGAAGCAATAAGA	60	391
	EFHC2 14 R	AGCACTCTTTCCAAAAGCACTGATGT		
<b>15</b>	EFHC2 15a F	CCAGTAGACCACAAAAGTCCTTATGAACC	60	428
	EFHC2 15b R	AACAGTACGTCGGCAATGTAACATGA		