



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE
I.S.S.S.T.E.**

**EPILEPSIA REFRACTARIA A TRATAMIENTO Y SU RELACION
CON MUTACIONES EN EL GEN DE LA SUBUNIDAD ALFA DEL
CANAL DE SODIO (SCN1A)**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO EN :

NEUROLOGÍA PEDIATRICA

PRESENTA:

DR. RAMON ERNESTO JIMÉNEZ ARREDONDO

ASESOR DE TESIS: DR. JUVENAL GUTIERREZ MOCTEZUMA
DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN
DRA. ELSA SOLÓRZANO GOMEZ

MEXICO, D.F. NOVIEMBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE
I.S.S.S.T.E.

SERVICIO DE NEUROLOGÍA PEDIATRICA

**EPILEPSIA REFRACTARIA A TRATAMIENTO Y SU RELACION
CON MUTACIONES EN EL GEN DE LA SUBUNIDAD ALFA DEL
CANAL DE SODIO (SCN1A)**

T E S I S

OPCION DE GRADO:

OBTENER EL TITULO EN NEUROLOGÍA PEDIATRICA

PRESENTA:

DR. RAMON ERNESTO JIMÉNEZ ARREDONDO

ASESOR DE TESIS: DR. JUVENAL GUTIERREZ MOCTEZUMA
DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN
DRA. ELSA SOLÓRZANO GOMEZ

MEXICO, D.F. NOVIEMBRE 2007

Registro Investigación: 223.2007.

DR. MAURICIO DI SILVIO LOPEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
DEL CMN 20 DE NOVIEMBRE I.S.S.S.T.E.

DR. JUVENAL GUTIERREZ MOCTEZUMA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUROLOGÍA PEDIATRICA

DR. JUVENAL GUTIERREZ MOCTEZUMA
ASESOR DE TESIS

DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN
ASESOR DE TESIS

DRA. ELSA SOLÓRZANO GOMEZ
ASESOR DE TESIS

DR. RAMON ERNESTO JIMÉNEZ ARREDONDO
MEDICO RESIDENTE DE LA SUBESPECIALIDAD
EN NEUROLOGÍA PEDIATRICA

DEDICATORIA

A MI ESPOSA, MARY; Por ti; por todo tu amor y fuerza para seguir adelante. Te amo.

A MI FAMILIA; MIS PADRES; que son mi orgullo; a mi PADRE por su apoyo siempre; a mi MADRE por esperar con ansia mi regreso a casa; A MIS HERMANOS por hacer mi vida entera.

A MIS MAESTROS: DR. GUTIERREZ, DRA. SOLÓRZANO, DR. VENTA.
Por su enseñanza, por su lección de vida, por su confianza. Gracias...

AGRADECIMIENTO

Por su apoyo para la realización del presente trabajo: gracias...

DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN
DR. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ
DR. MAURICIO DI SILVIO LOPEZ
DRA. SILVIA GARCIA
DR. RAUL ESPARZA
DRA. LILIANA GARCIA ORTIZ
BIÓLOGO EXP. JUAN CARLOS PEREZ RAZO

I N D I C E

RESUMEN	página 6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
MATERIAL Y METODOS	17
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	34

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El polimorfismo y mutaciones específicas de determinados genes, se relacionan a la fisiopatología y respuesta al tratamiento en epilepsia. La Epilepsia Refractaria, es una falla en el control de las crisis a pesar de 2 o más antiepilépticos a dosis máxima con más de una crisis mensual por 18 meses. Los canales iónicos tienen funciones como controlar y mantener potenciales de acción a través de las membranas celulares. Algunos síndromes epilépticos se asocian a mutaciones en estos canales, siendo factor importante para refractariedad al tratamiento.

MATERIAL Y METODO. Estudio observacional, descriptivo, transversal, no aleatorizado realizado en pacientes con Epilepsia Refractaria atendidos en Neurología Pediátrica del CMN 20 de Noviembre. Estudio molecular en sangre periférica por extracción de DNA, con identificación de mutaciones en el gen *SCN1A* por PCR, con corrimiento electroforético y secuenciación confirmatoria.

RESULTADOS. Participaron 5 pacientes, 4 varones, 1 mujer. Edad mínima 113 y máxima 229 meses. Dos pacientes con diagnóstico de Epilepsia Parcial Motora Secundariamente Generalizada, uno con Epilepsia de Lóbulo Temporal, y dos con Epilepsia Tónico Clónico Generalizada. Frecuencia inicial de crisis, mínima de 12 y máxima de 360 mensuales, actualmente con mínima de 2 y máxima de 180 crisis. Tres pacientes con efectos adversos al tratamiento, 2 asociados a lamotrigina. Se encontraron 2 cambios en la secuencia del gen *SCN1A*: el primero, en posición 5,445 del DNA codificante con sustitución de G/A; el segundo en posición 5,465 con cambio en triplete GCC/GAA, que produce codificación de aminoácido diferente (Glu/Ala).

DISCUSIÓN. La modificación encontrada en la secuencia genómica, no cambia la estructura molecular de la proteína sintetizada específica, por lo que no podemos establecer con certeza su relación directa con la refractariedad en la epilepsia o su carácter genético normal en la población mexicana.

SUMMARY

INTRODUCTION. Polymorphism and specific mutations in some genes are in relationship with pathophysiology and improved management in epilepsy. Refractory epilepsy in childhood is a failure of two or more drugs and one or more seizures per month over on 18 month period. Ion channels have functions as control and maintain the action potential in cell membranes. Some epilepsy syndromes are associate it to this channels, being this an important factor for refractivity in treatment.

SUBJECTS AND METHODS. Observational, descriptive, transversal, no randomized study in patients with refractory epilepsy in Paediatric Neurology Service at National Medical Center "November 20th". For molecular study we used blood, and we used DNA obtained for mutation identify on *SCN1A* gen by PCR with electrophoresis and sequence confirmation.

RESULTS. Five patients were included, 4 male and 1 feminine. Minimal age was 113 months and maximum was 229 months. Two patients have motor partial seizures evolving to secondarily generalized seizures, one with seizures of temporal lobe and two patients with generalized tonic clonic seizures. Initial frequency were minimum 12 and maximum 360 seizures per month, and actually with minimum 2 and maximum 180 seizures also per month. Three patients had adverse effects to treatment, 2 in relationship with lamotrigine. We find two changes in *SCN1A* gen sequence: first on 5,445 position in DNA codifying with substitution of G/A; second on 5,465 position with change in GCC/GAA triplet, that produces codification for a different aminoacid (Glu/Ala).

DISCUSSION: Modification find it in genomic sequence, does not change molecular structure in synthesized protein, for that reason, we can not affirm it s direct relationship with refractory epilepsy or if this is just a normal characteristic in Mexican population.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las variaciones determinadas genéticamente y su asociación a la respuesta farmacológica se define como farmacogenética ⁽¹⁾. Vogel, en 1959 fue el primero en proponer el término de farmacogenética ⁽²⁾, sin embargo históricamente ya desde el año 1909, Garrod, fundador de la bioquímica genética fue el primero en sugerir que las variaciones en el metabolismo de los fármacos eran dependientes de características heredables a los descendientes. ⁽³⁾ Posteriormente, Motulsky en 1957 reafirmó el hecho de que las variaciones en el metabolismo de los fármacos eran dependientes de una actividad enzimática heredable genéticamente ⁽⁴⁾. En la década de los 70's se observa un aumento en el desarrollo de esta ciencia, cuando en 1973 Vesell demuestra que el metabolismo de diversos fármacos en gemelos idénticos era de menor diferencia que el metabolismo comparado con gemelos no idénticos ⁽⁵⁾.

Muchos de los fármacos que tienen esta variabilidad determinada por factores genéticos se administran a niños, por lo que la expresión clínica del resultado del empleo de estos medicamentos debe tomarse en cuenta, ya que de esto dependerá en parte el efecto farmacológico adecuado. Sin embargo, debemos mencionar que estos factores genéticos asociados tanto al polimorfismo (cambio en la secuencia nucleotídica de un gen que se presenta con una frecuencia mayor al 1%) como a mutaciones (cambios en la secuencia de nucleótidos en algún punto del genoma) específicas de determinados genes, se relacionan no solo a una respuesta farmacológica adecuada, sino además, en la fisiopatología misma de determinadas entidades nosológicas, estableciéndose de varias formas una correlación estrecha entre la fisiopatología y la respuesta al tratamiento, como es en el caso que nos concierne, la epilepsia. ^(6,7) Se estima que a nivel mundial 10.5 millones de niños menores de 15 años cursan con epilepsia activa, lo que representa casi el 25% de la población global con epilepsia. Anualmente 3.5 millones de personas desarrollan epilepsia y de éstas el 45% son menores de 15 años y más del 80% viven en países en desarrollo. Estudios poblacionales de epilepsia de inicio en la infancia indican una incidencia anual de 61 a 124 por 100 000 en países en desarrollo y de 41 a 50 por 100 000 en países desarrollados; la

incidencia desciende de manera progresiva desde alrededor de 150 por 100 000 en el primer año de vida a 45 a 50 por 100 000 después de los 9 años ⁽⁸⁾. La epilepsia es un síntoma complejo causado por una variedad de procesos patológicos a nivel cerebral que se caracteriza por la presencia de descargas neuronales ocasionales, excesivas y desordenadas que pueden ser detectadas por manifestaciones clínicas, videos y electroencefalogramas o ambos. ⁽⁹⁾. Engel define la epilepsia como una enfermedad no específica, ni siquiera como un síndrome único, sino como una amplia categoría de síntomas complejos que se presentan por un gran número de alteraciones en las funciones cerebrales y que pueden ser por sí solas secundarias a una gran variedad de procesos patológicos.⁽¹⁰⁾

Actualmente, con los avances y progresos en la epileptología se ha propuesto una clasificación que considere algunos indicadores como la causa de la alteración, la edad de ocurrencia, los datos asociados con las crisis, localización y otros aspectos; adoptando así la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) una clasificación de epilepsia y síndromes epilépticos ^(9,10). Esta clasificación sugiere la división en: epilepsias relacionadas a localización (focal, local, parcial) y síndromes epilépticos sin determinación focal o generalizada y síndromes especiales: crisis relacionadas a situaciones determinadas. Esta clasificación actual de la ILAE emplea además otros dos criterios: uno es el topográfico, el cual nos lleva a una dicotomía entre epilepsias generalizadas y epilepsia parcial siendo denominada ésta última como epilepsias relacionadas a localización. El otro criterio se basa en la etiología del desorden, el cual separa las epilepsias de causa conocida (sintomáticas o secundarias) de aquellas en las que probablemente resultan de una alteración cerebral no determinada (epilepsia criptogénica) y aquellas que no son debidas a ninguna lesión o enfermedad sino a una posible propensión genética para las crisis, siendo determinadas este tipo como idiopáticas, indicando que en estos casos la epilepsia es una enfermedad no secundaria a ninguna otra condición ⁽¹¹⁾.

Los esfuerzos por realizar una clasificación generalmente aceptada tiene una gran implicación clínico práctica, debido a que de acuerdo al tipo de crisis o Síndrome

epiléptico se realizará el tratamiento farmacológico apropiado. Aún así, con el tratamiento adecuado, el riesgo acumulado de recurrencia para la epilepsia en niños es de 42% a los 8 años de seguimiento, con solo el 3% de todas las recurrencias presentándose después de 5 años ^(8,11). Cerca del 64% de los pacientes que han tenido crisis en la infancia estarán en remisión en la adultez (\geq 5 años) y de esos pacientes solo el 16% aún estará bajo tratamiento. El 75% de los pacientes de todas las edades lograrán remisión con el tratamiento antiepiléptico adecuado, con la suspensión del tratamiento tras 3 años de control de las crisis, presentándose recaídas en el 25% de los pacientes, siendo estas recaídas de una alta variabilidad de acuerdo a los diferentes síndromes epilépticos.

Enzo Guerrini ⁽¹¹⁾, sugiere que los niños con epilepsia pueden ser divididos en 4 grupos pronóstico principales:

- 1) Grupo de las Epilepsias Benignas: por ejemplo la epilepsia rolándica benigna, presente en el 20 a 30% de pacientes considerados en estos 4 grupos, en el cual la remisión ocurre después de pocos años y el tratamiento puede ser suspendido.
- 2) Grupo de Epilepsias Fármacosensibles: por ejemplo las ausencias, presente en 30% de los pacientes; en el cual el control de las crisis es fácilmente alcanzado por medicación; la remisión espontánea ocurre después de algunos años.
- 3) Grupo de Epilepsias Fármacodependientes: en el cual el tratamiento farmacológico controlará las crisis, pero no ocurrirá remisión espontánea. La suspensión del tratamiento será seguido de recaídas y el tratamiento será de por vida.
- 4) Grupo de las Epilepsias Refractarias con pobre pronóstico, presente en el 13 a 17% de los pacientes.

La definición de Epilepsia Refractaria es arbitraria, se refiere tanto a la severidad como a la frecuencia de las crisis para cada niño de manera individual, en general en su definición se refiere al número de drogas antiepilépticas empleadas y la remisión mínima o frecuencia de crisis durante un tiempo determinado de

tratamiento; así la Asociación Nacional de los Centros de Epilepsia define a la epilepsia farmacorresistente cuando las crisis no llegan a estar bajo control después de 9 meses de tratamiento bajo el cuidado de médico especialista, sin embargo aún esta definición varía con los diversos autores ⁽¹¹⁾. Berg define la epilepsia intratable como una falla en el control de las crisis a pesar del empleo de 2 o más fármacos antiepilépticos de primera línea a dosis máxima con un promedio de más de una crisis mensual por 18 meses y no más de 3 meses consecutivos libre de crisis durante este intervalo ⁽¹²⁾.

La fisiopatología y mecanismos de la epilepsia refractaria aún no son bien conocidos, sin embargo, se considera que la epilepsia refractaria a tratamiento es un proceso multifactorial donde influyen factores genéticos, como las variaciones genéticas en los canales iónicos, factores relacionados con la misma enfermedad como el tipo de crisis y su progresión a pesar del tratamiento; así como factores bioquímicos del paciente como alteración en los sitios de acción farmacológica, alteración en el transporte hasta llegar a nivel cerebral, e incluso factores relacionados a las drogas mismas como el desarrollo de tolerancia o mecanismos inefectivos de acción de las drogas administradas. ⁽¹³⁾

Sin embargo, por si solo o de manera independiente, ninguno de estos factores explican en su totalidad esta entidad; existen dos hipótesis principales que explican la refractariedad farmacológica de las epilepsias: La Hipótesis de los Multitransportadores y la Hipótesis del Blanco de las Drogas. ⁽¹⁴⁾ La resistencia múltiple a fármacos no solo se observa en epilepsia, también se encuentra relacionada a resistencia en enfermedades como el cáncer, infecciones bacterianas, artritis reumatoide y muchas más. Esta resistencia se caracteriza por falta de respuesta a gran cantidad de fármacos no relacionados funcional ni estructuralmente entre sí, lo que sugiere que mecanismos no específicos están involucrados independientemente de su mecanismo de acción. Esta teoría de Multitransportadores de fármacos inició en 1973 con el descubrimiento de Kield Dano de transportadores activos de un agente quimioterapéutico como la daunorrubicina en células tumorales resistentes a tratamiento con otros agentes, lo cual vino a ser apoyado por el descubrimiento de Víctor Ling quien lo

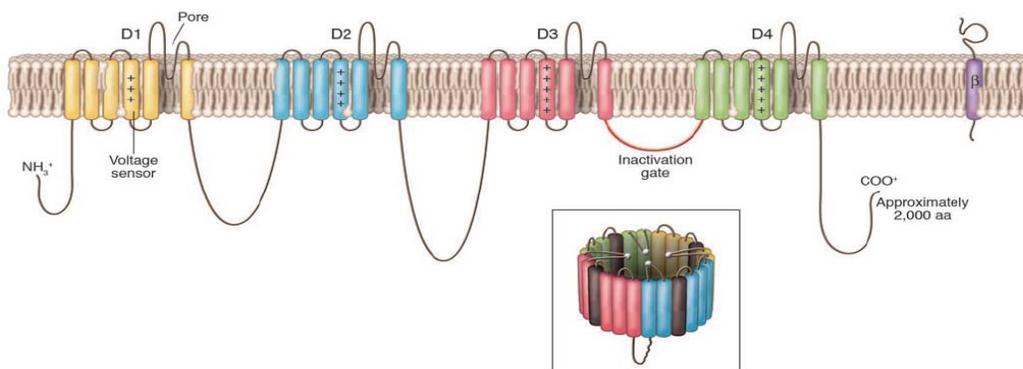
correlacionó con la sobreexpresión de una proteína de 170 kDa denominada P glicoproteína en células tumorales resistentes a tratamiento. El gen que codifica la P glicoproteína fue denominado Multidrug Resistase 1 (MDR1) Gen; ⁽¹⁴⁾. Además de la P glicoproteína otros transportadores han sido identificados en células cancerígenas resistentes a múltiples fármacos, como las Proteínas Resistentes a Multifármacos (MRPs) y Proteína Resistente a Cáncer de Seno (BCRP) ambas pertenecientes a una súper familia de transportadores que regula la circulación de drogas, péptidos, iones y xenobióticos en la barrera de la membrana celular, denominada ATP Binding Cassette o Transportadores ABC. ⁽¹⁵⁾

Esta P glicoproteína se localiza en la membrana celular de muchos tejidos normales donde pueden evitar la entrada de drogas estructuralmente diferentes, conjugados de fármacos y sus metabolitos, otros compuestos celulares, todo lo cual protege de concentraciones citotóxicas de tales fármacos. ⁽¹⁵⁾ En cerebro, la P glicoproteína junto con otros multitransportadores de fármacos están localizados en la membrana apical de células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica y favorece tanto la penetración cerebral limitada de fármacos como el aumento en la extrusión de muchos de ellos. ⁽¹⁶⁾

Otra hipótesis más reciente que explica la resistencia al tratamiento en la epilepsia, y que nos ocupa principalmente en el presente trabajo, es la hipótesis del Sitio de Acción de Drogas (Drug Target), la cual hace alusión a que la falta de respuesta farmacológica se debe a la pérdida intrínseca o adquirida de la sensibilidad de los blancos terapéuticos a nivel cerebral. La hipótesis está basada principalmente en estudios con carbamazepina (CBZ) sobre los canales de sodio voltaje dependientes en neuronas hipocampales. Remy y Cols. Ampliaron los trabajos iniciales de Vreugdenhil, mostrando que el bloqueo de los canales de Na⁺ voltaje dependiente por la CBZ está perdido en pacientes resistentes a CBZ, además de la pérdida de inhibición dependiente de canales de sodio por CBZ, la recuperación rápida de la inactivación de Na⁺ era sensible a CBZ en pacientes fármacorresistentes, mientras que la recuperación era marcadamente más lenta en células de pacientes con repuesta a CBZ; basado en lo anterior se sugirió que la pérdida de la sensibilidad de los fármacos en los canales iónicos,

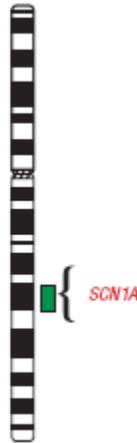
particularmente en los de sodio podría explicar el desarrollo de epilepsia refractaria a tratamiento. (17)

Los canales iónicos forman una amplia familia de macromoléculas cuyas funciones son controlar y mantener los potenciales de acción a través de las membranas celulares, secreción y transducción de señales. (18) De acuerdo al estudio de las alteraciones en los canales iónicos, denominadas canalopatías, se ha encontrado que algunos síndromes epilépticos se asocian a distintas mutaciones en estos canales iónicos y que varias de las principales drogas antiepilépticas tienen su principal mecanismo de acción sobre estos mismos, por lo que alteraciones a este nivel son un factor importante para la refractariedad al tratamiento. Un canal iónico que representa un punto crucial en el desarrollo de la epileptogénesis es el canal de sodio voltaje dependiente. (19) Los canales de sodio son proteínas transmembranales operadas por voltaje que llegan a ser selectivamente permeables a iones de sodio cuando la membrana se despolariza y están generalmente cerrados en estado de reposo. (19) El canal de sodio está formado por una subunidad alfa grande, proteínas transmembranales con aproximadamente 2000 residuos aminoácidos que componen 4 dominios homólogos que forman el poro de Na⁺. Cada dominio está formado por 6 segmentos transmembrana, el cuarto de los cuales actúa como sensor de voltaje y los segmentos quinto y sexto de los 4 dominios forman el poro del canal. La subunidad B1 de los canales de sodio dependientes de voltaje es una proteína integral de membrana que tiene una región simple transmembrana y un dominio amino terminal extracelular prominente.



Proteínas transmembranales de las Subunidades de Sodio.

En el hombre las Subunidades alfa son codificadas por un mínimo de 5 genes diferentes, entre estos se encuentran *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN5A*, *SCN6A* y *SCN8A*. Las Subunidades alfa 1 se encuentran codificadas en el gen *SCN1A* y las alfa 2 en el gen *SCN2A*, ambos del locus 2q24. (20)



Localización del gen *SCN1A* en el Cromosoma 2.

En los últimos 15 años la evidencia en experimentos sugiere que los canales de sodio son un objetivo primario de una variedad de fármacos antiepilépticos, principalmente de fenitoína (PHT), carbamazepina (CBZ) y lamotrigina (LTG) donde el bloqueo de los canales de sodio es el principal mecanismo de acción. En este sentido, el tratamiento de la epilepsia en general, se basa en determinar correctamente el tipo de crisis, síndrome epiléptico, etiología y factores precipitantes. Una vez determinado el tipo exacto de crisis se debe iniciar con monoterapia con el fármaco que ha demostrado una mejor combinación de alta eficiencia y baja toxicidad en estudios comparativos. Con una monoterapia apropiadamente seleccionada y llevada a dosis máximas toleradas se obtiene un control de crisis reportado hasta en el 60 a 90%. Fallas en la monoterapia se asocian a incumplimiento del tratamiento, alergia al fármaco, lesiones cerebrales amplias o progresivas, crisis parciales, más de un tipo de crisis, desventajas neuropsiquiátricas y múltiples tratamientos previos. Una vez iniciado el tratamiento se deben realizar determinación de concentraciones plasmáticas del fármaco si las crisis no han sido controladas con dosis promedio o dosis máxima tolerada. Si aún con la primera droga utilizada a dosis máxima las crisis no han sido controladas se

debe agregar un segundo fármaco, de preferencia continuando aún con la administración del primero. Al obtener concentraciones plasmáticas en niveles terapéuticos de la segunda droga se deberá valorar el retiro o no, lentamente, de la primera droga. Un tercer fármaco no debe ser agregado hasta que se documente que las crisis no pueden ser controladas con las dosis máximas toleradas de los dos primeros fármacos administrados. En pacientes con Epilepsia Refractaria frecuentemente se requiere la administración de tres fármacos o más, por lo que se debe considerar alternativas terapéuticas actualmente disponibles. ⁽⁹⁾ En aquellos pacientes con crisis parciales puede considerarse un procedimiento quirúrgico de resección cortical si cumple los criterios para dicho procedimiento como son la presencia de crisis refractarias a tratamiento, de crisis que reducen significativamente la calidad de vida, de un foco epiléptico localizado y de predictores biológicos de persistencia de las crisis. En pacientes que no son candidatos a cirugía de epilepsia se dispone actualmente de cuatro opciones terapéuticas:

- 1) Estimulación del nervio vago
- 2) Uso de fármacos antiepilépticos menos comunes (acetazolamida, clorazepato, diazepam, mefenitoína, mefobarbital, fonacemida, metosuximida, parametadiona y fenosuximida).
- 3) Fármacos experimentales (ganaxolone, losigamone, N metil tetrametil-ciclopropil carboxamida, nimodipino, pregabalina, remacemide, rufinamida, regatabina, estiripentol y talampanel).
- 4) Procedimientos quirúrgicos experimentales ⁽⁹⁾

Por lo anterior, nuestro objetivo general es determinar la presencia de mutaciones en el gen *SCN1A* con la falta de respuesta al tratamiento en una muestra de pacientes con Epilepsia Refractaria, tratados en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. Siendo nuestros objetivos específicos: 1) Seleccionar los pacientes con epilepsia refractaria de acuerdo a la definición de Berg, 2) Describir las características clínicas y los hallazgos electroencefalográficos de los pacientes con Epilepsia Refractaria, 3) Análisis molecular del dominio IV del gen *SCN1A*

(exón 26) en la búsqueda de mutaciones y 4) Correlacionar la presentación clínica y los hallazgos electroencefalográficos con la presencia de mutaciones en el gen *SCN1A*.

MATERIAL Y METODO

Se trata de un estudio observacional, descriptivo, transversal, prospectivo, prolectivo, con un muestreo no aleatorio y de evaluación abierta, donde se estudiaron pacientes pediátricos con diagnóstico de Epilepsia Refractaria a Tratamiento que se encuentran en manejo por parte del servicio de Neurología Pediátrica del CMN 20 de Noviembre y de acuerdo con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión: Pacientes en edad pediátrica de 18 meses a 19 años atendidos en la Consulta Externa o el Servicio de Hospitalización de este Centro Médico Nacional con diagnóstico de Epilepsia Refractaria de acuerdo a la definición de Berg, o pacientes sin diagnóstico de Epilepsia Refractaria a tratamiento pero que cumplan con la evolución clínica y definición de Berg.

Criterios de exclusión: Pacientes con Diagnóstico de Epilepsia Refractaria a Tratamiento con error diagnóstico inicial o en el tratamiento indicado, así como apego inadecuado al tratamiento e indicaciones médicas, pacientes con lesión anatómica estructural en cerebro evidenciada por Tomografía Axial Computada de cráneo, Resonancia Magnética de cráneo o algún otro método imagenológico complementario, pacientes con antecedente de Traumatismo Craneoencefálico, Síndromes genéticos que se acompañen de epilepsia, Esclerosis Hipocampal o alguna otra patología comórbida que traduzca evidencia en SNC y afecte la respuesta al tratamiento, pacientes cuyos padres no acepten firmar la hoja de consentimiento informado.

Con el propósito de obtener datos sociodemográficos y de la evolución clínica se aplicó un cuestionario directamente por el investigador. A todos los pacientes incluidos se les realizó un Video Electro Encefalograma (VEEG) para determinar la presencia de algún patrón electroencefalográfico común.

Para el estudio molecular se tomaron 3 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA, para la extracción de DNA por el siguiente método salino, previa identificación de las muestras con los datos del paciente ⁽²¹⁾:

1ª. fase

1. 500 ml de sangre total en un microtubo de 1.5 ml
2. Adicionar 500 ml de solución de lisis *
3. Mezclar en vortex
4. Incubar 30 min. a 4 grados C
5. Centrifugar a 14,000 RPM por 2 min.
6. Decantar el sobrenadante
7. Lavar con 1 ml de solución de lisis
8. Mezclar en vortex
9. Centrifugar a 14,000 RPM por 2 min.
10. Decantar el sobrenadante
11. Adicionar 1 ml de solución salina
12. Vortexear
13. Centrifugar a 14,000 RPM por 2 min.
14. Decantar el sobrenadante
15. Resuspender el botón en 570 ml de NaCl 5.0 mM
16. Vortexear
17. Adicionar 40 ml de SDS al 10%
18. Vortexear por 5 min.
19. Adicionar 200ml de NaCl saturado
20. Vortexear
21. Centrifugar a 14,000 RPM por 10 min.
22. Recuperar la fase líquida
23. Adicionar 600 ml de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1
24. Vortexear por 2 min.
25. Centrifugar a 14,000 RPM por 6 min.
26. Transferir la fase superior a un frasco con 5 ml de etanol absoluto frío (-20 grados C)
27. Almacenar toda la noche (o 2 hrs.) a -20 grados C

2ª. fase

1. Con la micropipeta tomar cuidadosamente el DNA y transferirlo a un microtubo de 0.5 ml que contiene 400 ml de etanol (al 70-75%)
2. Centrifugar a 14,000 RPM por 6 min
3. Decantar el etanol
4. Dejar secar el DNA a temperatura ambiente
5. Resuspender de acuerdo al botón con agua o con TE.

*Solución de lisis: cloruro de amonio
EDTA
Bicarbonato de sodio

A continuación se analizó la calidad del DNA extraído mediante un corrimiento electroforético del ácido nucleico en geles de agarosa al 1.5 % en solución amortiguadora TAE 1X. Cada corrimiento estuvo acompañado por un marcador de

peso molecular de 100 pb. Una vez concluido el corrimiento el gel se tiñó con bromuro de etidio y el DNA se visualizó por exposición de los geles a la luz ultravioleta.

La identificación de las mutaciones en el gen *SCN1A* se realizó mediante PCR (Polimerasa Chain Reaction) de punto final en un Termociclador Apollo Instrumentation ATC201, corrimiento electroforético y secuenciación confirmatoria. La amplificación del exón 26 del gen *SCN1A* se realizó en tres fragmentos, para lo cual se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos:

Región	Oligonucleótidos	Tamaño del fragmento
Exón 26a		589 pb
Sentido	AGG ACT CTG AAC CTT ACC TTG G	
Antisentido	TGT AGA TGT TCA CCA CAA CCA G	
Exón 26b		418 pb
Sentido	TGT GGG AAC CCA TGT GTT G	
Antisentido	CCA TGA ATC GCT CCT CGA TC	
Exón 26c		592 pb
Sentido	TGC TTT TAC AAA GCG GGT TC	
Antisentido	GTT TGC TGA CAA GGG GTC AC	

Las condiciones generales para la PCR, son: 200ng de DNA, 400 μ M de dNTP's 10 μ M de oligonucleótidos, buffer al 1X, cloruro de magnesio al 2 mM, DMSO al 5%, TAC Polimerasa 1 U y agua grado biología molecular, para llevar a un volumen final de 25 μ l. Previo calentamiento a 95°C por 3 minutos, desnaturalización a 94° C durante un minuto, 35 ciclos con una alineación a 60°C por un minuto, elongación a 72°C durante un minuto y medio y extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

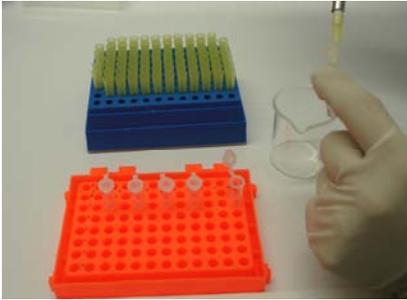
Los productos de PCR se colocaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio a una concentración de 2 μ g/ μ l y fueron separados en base al desplazamiento de la molécula (DNA) cargada en un campo eléctrico. A través de

este método fue posible observar en un transiluminador de luz ultravioleta, la amplificación de las 3 porciones del exón 26 del gen *SCN1A* de acuerdo al tamaño esperado (a:589 pb, b:418 pb y c:592 pb respectivamente). Después se purificaron los fragmentos amplificados por elusión, con el kit QIAquick QIAGEN. Se cuantificó la concentración del producto purificado de la PCR por electroforesis con ayuda de una escalera de peso molecular para continuar con la reacción de secuencia en un Secuenciador Beckman Coulter modelo CEQ 8000. Finalmente se calculó la reacción de secuenciación en base a los siguientes requerimientos:

REACTIVOS	VOLUMEN
DTCSKIT (recomendado por el proveedor)	8 μ l
OLIGONUCLEOTIDO SENTIDO (concentración 3.2 pmol)	0.32 μ l
DNA (concentración 20ng)	1 μ l
AGUA	10.68 μ l
VOLUMEN FINAL	20 μ l

Las condiciones de la reacción de secuencia son las siguientes:

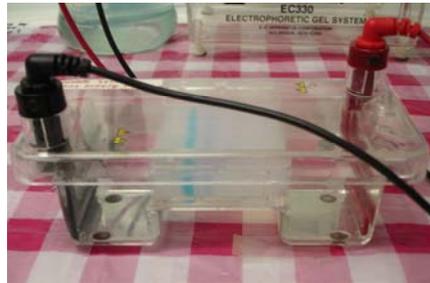
DESNATURALIZACION	96°C	20 SEGUNDOS	
ALINEAMIENTO	50°C	20 SEGUNDOS	30 CICLOS
EXTENSION	60°C	4 MINUTOS	



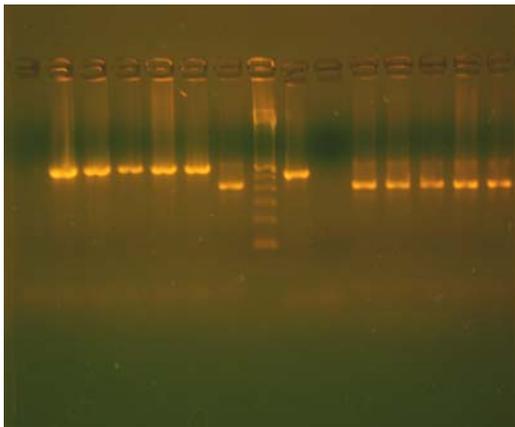
1. EXTRACCIÓN DE DNA



2. REACCION DE PCR



3. ELECTROFORESIS



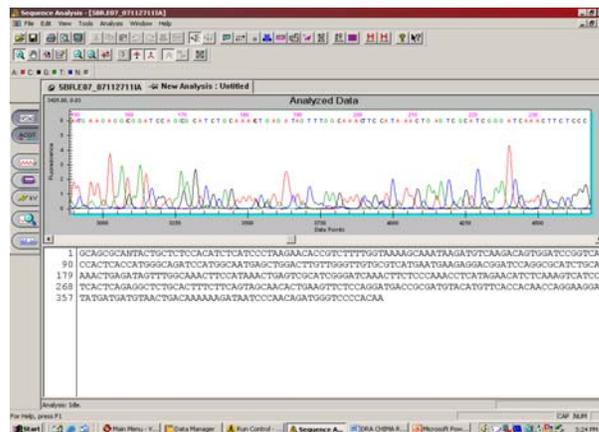
4. AMPLIFICACION



5. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS



6. SECUENCIACION



7. ANALISIS

RESULTADOS

Los resultados ahora presentados son derivados de la revisión del expediente clínico y electrónico, aplicación de una encuesta a los padres de los pacientes participantes directamente por el médico encargado de la realización del protocolo, así como de la exploración física que incluyó somatometría a cada uno de los pacientes. Este reporte actual corresponde a un total de 5 pacientes participantes. Datos generales y ficha de identificación. Obtuvimos la participación, hasta el momento, de 5 pacientes, 4 varones, 1 mujer. En cuanto a la edad de los pacientes, encontramos una mínima de 113 meses (9.4 años) y un máximo de 229 (19 años), con media de 148.2 meses (12.3 años). Todos fueron originarios de la Ciudad de México, excepto un paciente con lugar de nacimiento en Ucrania, pero con residencia en nuestro país y esta ciudad durante toda su vida, madre de origen mexicano y padre de origen africano.

Somatometría. Basándonos en tablas desarrolladas y publicadas en el año 2000 por el Centro Nacional para Estadísticas en Salud ⁽²²⁾, la talla fue normal en los 5 pacientes. Respecto al peso, 3 de los pacientes tuvieron peso normal y 2 presentaron peso anormal alto por arriba del percentil 97; de estos 2 pacientes, el primero de 9.4 años con IMC 27 kg/m²sc y el otro paciente, de 11.4 años de edad con índice de masa corporal de 28 kg/m²sc, por lo tanto también se encontraron arriba del percentil 97. Los 3 pacientes restantes presentaron un índice de masa corporal normal. Finalmente, en lo referente al perímetro cefálico todos se encontraron dentro de percentiles normales para su edad y sexo.

De los 5 pacientes participantes ninguno cuenta con antecedente Heredo familiar de epilepsia o Síndrome epiléptico o antecedentes de importancia en relación a enfermedades neurológicas. Respecto al tipo de epilepsia o Síndrome epiléptico, se encontró que dos de nuestros pacientes tienen diagnóstico de Epilepsia Parcial Motora Secundariamente Generalizada, uno Epilepsia de Lóbulo Temporal, y finalmente dos pacientes con Epilepsia Tónico Clónico Generalizada. En cuanto a la edad de inicio clínico de las crisis el menor de los pacientes inició a los 38

meses de edad (3.1 años) y el de mayor edad inició a los 111 meses (9.2 años) con una media de 72.4 meses (6 años). El paciente que inició a edad más temprana, correspondió al diagnóstico de Epilepsia de Lóbulo Temporal y el inicio más tardío a epilepsia parcial motora secundariamente generalizada. Uno de nuestros pacientes, la única mujer, con edad de inicio a los 54 meses (4.5 años) presentó como antecedente encefalitis viral una semana previa al inicio clínico de las crisis, el resto no tuvo aparentemente ningún factor agregado. En lo referente al patrón electroencefalográfico no se encontró ninguna característica en común entre los pacientes con Epilepsia Refractaria; las características electroencefalográficas de cada paciente, correspondieron principalmente a un bajo voltaje para la edad o la presencia de grafoelementos anormales de acuerdo a cada tipo de epilepsia o Síndrome epiléptico y no a un grafoelemento o característica común asociada a la refractariedad.

En relación al tratamiento inicial, en el momento de la primera valoración de los pacientes en nuestro servicio, solo uno de ellos tenía tratamiento con monoterapia (carbamazepina), uno con biterapia (carbamazepina y valproato de magnesio), y el resto tenían indicado para su tratamiento politerapia: uno con 3 fármacos y otros dos se manejaban con 6 fármacos. De los fármacos más empleados como tratamiento inicial encontramos que en 4 se emplearon valproato de magnesio y carbamazepina, en 2 se utilizó clobazam, topiramato y lamotrigina, y en uno levetiracetam, oxcarbamazepina, vigabatrina y fenitoína. En la totalidad de los pacientes durante su evolución se han realizado cambios en el tratamiento, tanto en su ajuste de dosis como en cambio de fármaco, encontrándose que los fármacos más empleados actualmente en el tratamiento son levetiracetam en los 5 pacientes, en 3 se emplea el clobazam y valproato de magnesio, en 2 pacientes se emplea lamotrigina y clonazepam, en un paciente es empleado la oxcarbamazepina, fenitoína y carbamazepina. Ninguno de los pacientes es actualmente tratado con topiramato ni vigabatrina. (tabla I)

La frecuencia inicial de las crisis convulsivas en nuestros pacientes, osciló entre un mínimo de 12 crisis al mes, a un máximo de 360 crisis, con una mediana de 146 crisis mensuales. El paciente con el mayor número de crisis correspondió a un paciente masculino con diagnóstico de epilepsia tónico clónico generalizada y la menor frecuencia de crisis también correspondió a paciente con mismo diagnóstico pero de sexo femenino. Encontramos que a la fecha actual, los pacientes presentan una evolución de su padecimiento con un mínimo de 18 meses, un máximo de 169 meses (14 años) con una media de 76.8 meses (6.4 años) de evolución. Tras dicho tiempo de evolución, encontramos que la frecuencia actual de las crisis presenta una mínima de 2 crisis y un máximo de 180 crisis mensuales, con una mediana mensual de 61 crisis. (gráfica 1) De los 2 pacientes con diagnóstico de epilepsia parcial motora secundariamente generalizada se encontró un promedio inicial de 105 crisis mensuales, con un promedio actual de 58 crisis. De los 2 pacientes del grupo con epilepsia tónico clónico generalizada encontramos tenían un promedio de 186 crisis de manera inicial con un promedio actual de 4.5 crisis mensuales. Finalmente, el paciente restante con epilepsia del lóbulo temporal observamos un incremento en la frecuencia de sus crisis de 150 inicialmente a 180 actualmente como promedio mensual, encontrándose dicho paciente actualmente en protocolo para colocación de estimulador vagal. (tabla II)

Del total de nuestros 5 pacientes, 3 desarrollaron en algún momento de su evolución efectos adversos al tratamiento, uno de los pacientes presentó insuficiencia hepática aguda, uno con Síndrome de Stevens Johnson y un paciente con dermatitis leve. (gráfica 2) El paciente con diagnóstico clínico, de laboratorio y por ultrasonido de insuficiencia hepática se relacionó con el fármaco oxcarbamazepina, el paciente que desarrolló Síndrome de Stevens Johnson se asoció a administración de lamotrigina y el que desarrolló dermatitis leve lo hizo durante el empleo de carbamazepina, lamotrigina y fenitoína en distintos tiempos de su evolución. Por lo tanto, la lamotrigina fue el fármaco asociado con los efectos adversos en 2 de los pacientes.

Respecto al análisis genético, se realizó secuenciación directa del exón 26 del gen *SCN1A* en los 5 pacientes, revelando 2 cambios en la secuencia del gen aparentemente no descritos hasta ahora en la literatura: el primero, localizado en la posición 5,445 del DNA codificante (cDNA) de *SCN1A*, la sustitución de G/A que condiciona un cambio aminoacídico sinónimo (Gli/Gli). El segundo polimorfismo se encontró en la posición 5,465 del cDNA, un cambio en el triplete GCC/GAA, que produce la codificación de un aminoácido diferente (Glu/Ala). (gráfica 3). Este último polimorfismo corresponde a una transversión que da como resultado la codificación de 2 aminoácidos hidrofóbicos neutros, lo que sugiere, que la estructura tridimensional de la molécula de la subunidad alfa del canal de sodio no se modifica, por lo que no podemos relacionarlo directamente con una alteración en la función de la proteína y por lo tanto, con la refractariedad en el control de la epilepsia. (gráfica 4).

DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos y analizando cada uno de los datos, podemos discutir diversos aspectos respecto al presente estudio, pero debemos mencionar en primer lugar, que el presente trabajo refleja una labor de selección estricta y el tiempo de reclutamiento fue corto, por lo que sólo fue posible incluir 5 pacientes.

La epilepsia es un trastorno que se presenta a cualquier edad y sin un específico predominio de sexo, en cuanto más tempranamente se presente la evolución puede ser menos específica o determinada, dependiendo de la causa o factor que la genere. En la muestra estudiada encontramos que hubo un predominio por el sexo masculino, sin embargo, no podemos establecer un franco predominio de la epilepsia refractaria a tratamiento por un género determinado, ya que nuestra muestra es pequeña como para establecer dicha conclusión. De hecho, aún en los estudios mas amplios realizados a nivel mundial, y publicados en la literatura no hay un predominio de género establecido en pacientes con diagnóstico de Epilepsia Refractaria a tratamiento. ^(12,13) En cuanto a la edad en nuestro grupo hubo un rango muy amplio, siendo el mayor de nuestros pacientes de 19 años, lo que en realidad dispersa nuestro rango de edad e incrementa la mediana de nuestro grupo, aunque valdría la pena comentar, que la edad de nuestro grupo coincide con la literatura mundial sobre el tema al existir un predominio de esta patología en pacientes mayores de 10 años de edad. ⁽⁸⁾

En relación a la edad de inicio no se encontró una asociación específica con el tipo de epilepsia o Síndrome epiléptico. Debemos mencionar que la media de inicio en nuestro grupo fue de 6 años y como se había mencionado esta edad temprana influye en una evolución de difícil control, lo que reviste una gran importancia el tratamiento inicial de los pacientes. Está establecido en las diversas publicaciones sobre el tema, que un paciente responderá a un primer antiepiléptico en más del 70% y la respuesta a un segundo antiepiléptico si no respondió al primero será en menos del 10%, los pacientes que no responden a un tratamiento inicial prescrito

su evolución será pobre. En este sentido debe considerarse además la elección adecuada dependiendo del tipo o tipos de crisis que presente el paciente. Los fármacos más empleados en nuestro grupo fueron valproato y carbamazepina, tal vez en virtud de ser los fármacos más conocidos en un primer nivel de atención. Sin embargo, destaca que sólo 1 de los pacientes fue manejado inicialmente con monoterapia, otro con biterapia (carbamazepina y valproato), y el resto de nuestros pacientes (3) fueron manejados con politerapia empleándose una amplia gama de antiepilépticos.

De acuerdo al fármaco empleado inicialmente y la necesidad de ajuste del tratamiento condicionada a la evolución de los pacientes, indica que dichos antiepilépticos no fueron seleccionados de manera inicial adecuadamente, aunque un punto importante a considerar es que en nuestro servicio de Neurología Pediátrica se emplean medicamentos antiepilépticos no accesibles en otros niveles de atención. De cualquier forma no se puede atribuir la evolución de dichos pacientes a una mala decisión inicial de tratamiento, debido a que en cada uno de los casos reúnen la definición de epilepsia refractaria a tratamiento. Aún con esta definición, encontramos que en 4 de nuestros pacientes hubo una mejoría clínica evidente con el tratamiento actual excepto en el paciente con diagnóstico de epilepsia de lóbulo temporal, por lo que de acuerdo a las publicaciones existentes respecto a la evolución y tipo de epilepsia, este paciente se encuentra actualmente en Protocolo para colocación de estimulador vagal. El patrón electroencefalográfico de los pacientes no presentó ningún factor en común asociado a la Epilepsia Refractaria, cada grafoelemento y hallazgo en el electroencefalograma correspondía en sí a las características del Síndrome Epiléptico o tipo de epilepsia que presentaba cada paciente, esto correspondiendo también a lo reportado en la literatura mundial, donde no hay un ritmo de fondo o grafoelemento común que presenten los pacientes con epilepsia refractaria, esto establecido en base a que el electroencefalograma detecta la actividad paroxística anormal de un grupo de neuronas, sin modificar su trazo por la etiología o factor que desencadena dicha actividad eléctrica.

Finalmente, algo a destacar es el hecho que 3 de nuestros pacientes desarrollaron efectos adversos al tratamiento. Sabemos por las publicaciones mundiales que algunos de los fármacos empleados favorecen la presencia de dichas reacciones adversas, sin embargo esta posibilidad se incrementa con el empleo de varios fármacos en politerapia y además con las dosis administradas de forma inicial. En este sentido en nuestros pacientes no podemos determinar la dosis administrada de los antiepilépticos, pero encontramos que 2 de los pacientes con reacción adversa eran manejados con 6 fármacos como parte del tratamiento, siendo uno de ellos el que desarrollo el síndrome de Stevens Johnson. El paciente que desarrolló dermatitis leve, era tratado con 3 antiepilépticos de manera no simultánea, por lo que consideramos en el caso de este paciente descartar la presencia de alguna alteración o polimorfismo a nivel hepático principalmente asociado al Citocromo P450 en los alelos CYP2C9 y 2C19, que lo haga un metabolizador lento y esto sea otra posible causa de la presencia tanto de la epilepsia refractaria al tratamiento como de datos de toxicidad. El fármaco más empleado para el manejo actual de nuestros pacientes con diagnostico de epilepsia refractaria a tratamiento, es el levetiracetam, que de acuerdo a la literatura corresponde como uno de los principales fármacos indicados en estos pacientes, lo cual coincide con la evolución observada en nuestros pacientes tras la modificación del tratamiento.

Se ha visto en los casos de epilepsia refractaria a tratamiento que la etiología se encuentra asociada a diferentes factores, uno de ellos, de mayor estudio en la actualidad es el factor genético. En base a la fisiopatología de la epilepsia los estudios recientes se han enfocado a la búsqueda de mutaciones en moléculas participantes en la despolarización neuronal, entre ellos receptores GABA, canales de potasio, sodio, cloro, principalmente. Por otra parte sabemos que la mayoría de los antiepilépticos tienen su mecanismo de acción en el canal de sodio, lo que nos llevó a la búsqueda de mutaciones en el gen *SCN1A* que codifica para la subunidad alfa del canal de sodio, unidad primordial en el funcionamiento de dicho

canal. De acuerdo a Claes et al ⁽²³⁾, existe una asociación de mutaciones en los canales de sodio determinadas por el gen *SCN1A* en crisis febriles plus y epilepsia mioclónica severa de la infancia, y aunque se sugiere un mismo mecanismo relacionado a la función de este canal iónico, no se han realizado estudios suficientemente amplios y concluyentes para establecer la asociación directa con Epilepsia Refractaria a tratamiento.

En este estudio, los resultados obtenidos demuestran que no hay una mutación en el exón 26 del gen *SCN1A* de la subunidad alfa del canal de sodio, pero sí un polimorfismo que se encuentra en todos los pacientes de nuestra muestra, que por una parte podría ser una variante característica de la población mexicana o bien un polimorfismo asociado a la epilepsia refractaria. Dado el periodo de tiempo, recursos humanos y financieros disponibles para la realización de este trabajo, sólo fue posible la secuenciación del exón 26 del gen *SCN1A* que codifica el segmento 5 y 6 del dominio IV de la subunidad alfa del canal de sodio donde sólo encontramos el polimorfismo descrito, por lo que no es posible descartar mutaciones en el resto de *SCN1A*. Recientemente Fujiwara y cols. ⁽²⁴⁾ publicaron la presencia de mutaciones de sentido equivocado en 5 de 30 pacientes con epilepsia refractaria tónico clónico generalizada de la infancia con mutaciones de sentido equivocado entre los segmentos 5 y 6 del dominio IV y en el segmento 3 del dominio IV del canal de sodio, ubicación similar a la encontrada en los pacientes con epilepsia mioclónica severa de la infancia, lo que sugiere que pudieran existir alteraciones genéticas similares en otros tipos de epilepsia, lo que nos lleva a pensar que el número de pacientes estudiados es pequeño y tal vez sea ésta la primera limitante para encontrar mutaciones. Por otra parte, los pacientes estudiados cuentan con antecedentes de historia familiar de epilepsia, anomalías neurológicas y electroencefalográficas a diferencia de los pacientes seleccionados en este estudio.

Se sabe que en enfermedades multifactoriales como la epilepsia influyen diversos factores en su etiología, clasificándose éstos en dos grandes grupos: los genéticos y los ambientales; en la actualidad la Medicina Genómica busca identificar polimorfismos en genes relacionados con la fisiopatología de enfermedades complejas y demostrar su asociación con un incremento en la susceptibilidad del padecimiento, variaciones en el curso clínico o diferencias en la respuesta al tratamiento en un grupo étnico. Por lo que los resultados obtenidos nos hace pensar que debe realizarse un estudio más amplio para poder demostrar si existe asociación directa entre los polimorfismos encontrados con la falta de respuesta al tratamiento en pacientes mexicanos con epilepsia refractaria.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio nos brindan un precedente para la realización de estudios posteriores, ya que encontramos la presencia de un polimorfismo en los 5 pacientes minuciosamente seleccionados, sin embargo esta modificación en la secuencia genómica, no cambia la estructura molecular de la proteína sintetizada y por lo tanto no podemos establecer con certeza que esto se relacione de manera directa con la refractariedad en la evolución clínica de nuestros pacientes con epilepsia. Además sólo se analizó un exón de *SCN1A* por lo que no es posible descartar la presencia de mutaciones en el resto de los exones.

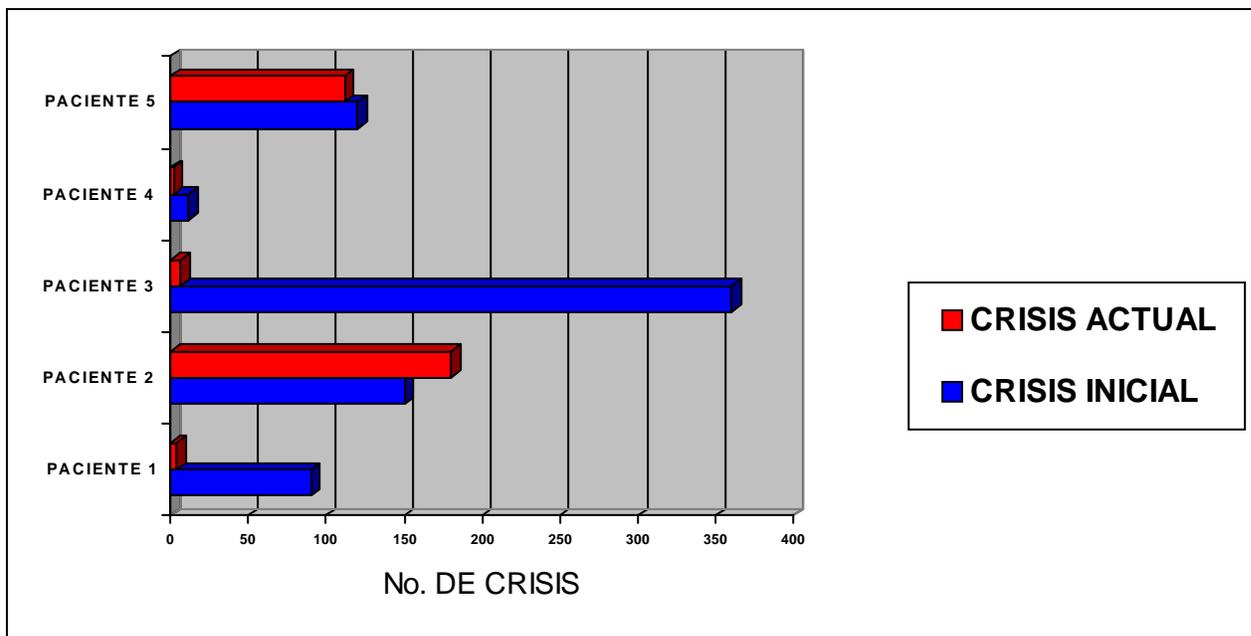
Por otro lado, en estos momentos no podemos definir si el polimorfismo encontrado forma parte de las características genéticas normales en la población mexicana, sin embargo los resultados obtenidos en el presente estudio nos ofrecen el inicio de la realización de proyectos a futuro para:

- 1) Identificar la frecuencia de los polimorfismos en la población Mexicana
- 2) Buscar si existe asociación de estos polimorfismos con la epilepsia de difícil control en una muestra representativa de pacientes comparada con pacientes con control adecuado de la epilepsia y con individuos sanos.

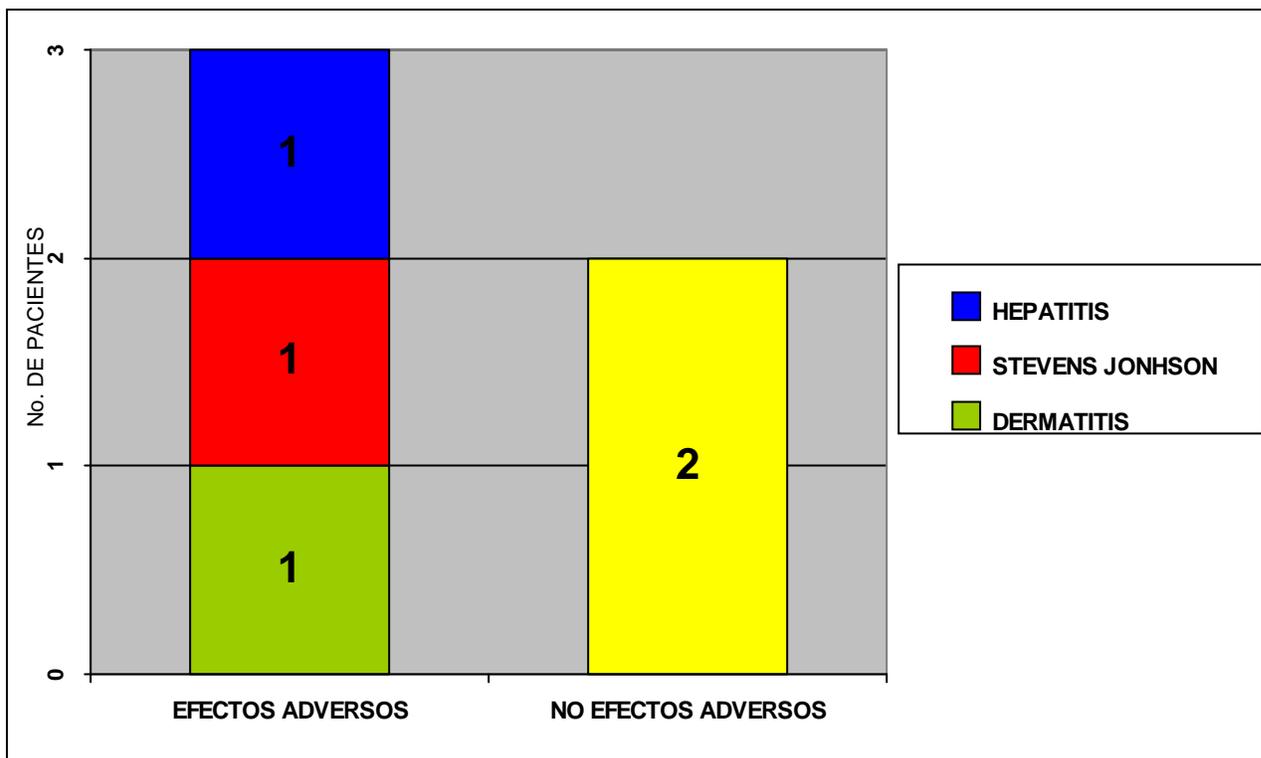
Lo anterior con el propósito de establecer un cambio en el tratamiento de manera inicial en quienes se encuentre el polimorfismo y realizar un tamizaje oportuno con la finalidad de favorecer la evolución clínica y un mejor control de los pacientes con epilepsia.

ANEXOS

GRAFICA No. 1. EVOLUCION CLINICA DE CRISIS CONVULSIVAS

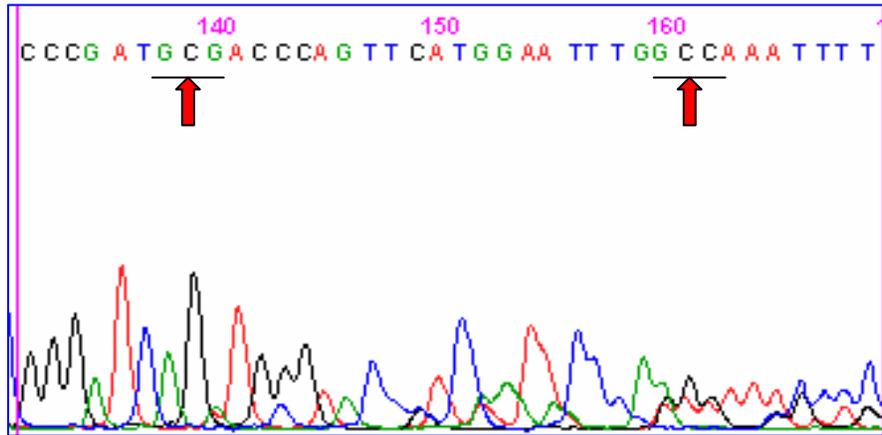


GRAFICA No. 2 EFECTOS ADVERSOS A TRATAMIENTO



GRAFICA No. 3 POLIMORFISMO ENCONTRADO EN PACIENTES CON EPILEPSIA REFRACTARIA

CCCG A TGCAACTCAGTTCATGGAATTTGAAAAATTA- TIPO SILVESTRE



GRAFICA 4. LOCALIZACION DE POLIMORFISMO EN CANAL DE SODIO DE NUESTRA POBLACIÓN ESTUDIADA

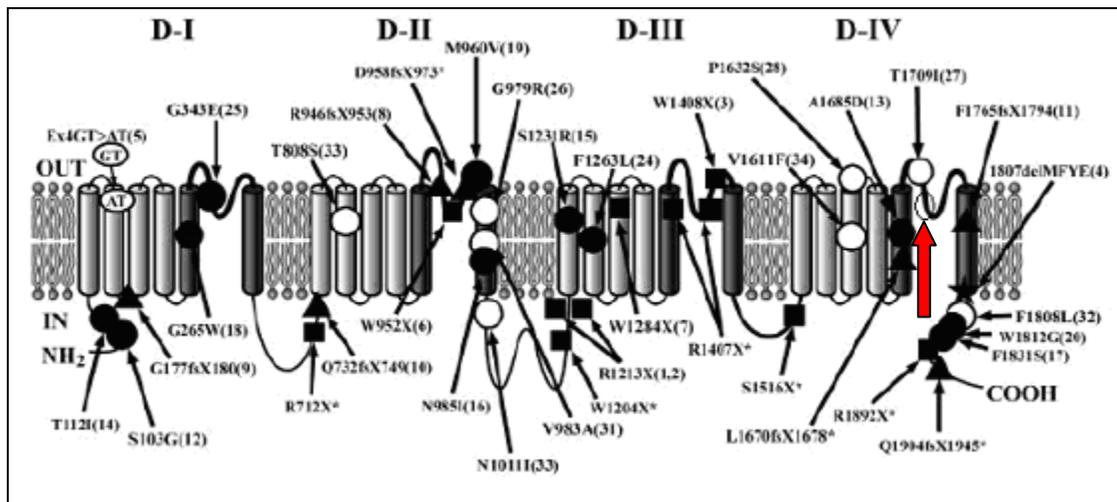


TABLA I. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EMPLEADO

FÁRMACO EMPLEADO	INICIAL	ACTUAL
VALPROATO DE MAGNESIO	4/5	3/5
CARBAMAZEPINA	4/5	1/5
FENITOINA	0/5	1/5
CLOBAZAM	2/5	3/5
OXCARBAZEPINA	1/5	1/5
VIGABATRINA	1/5	0/5
LAMOTRIGINA	2/5	2/5
LEVETIRACETAM	1/5	5/5
TOPIRAMATO	2/5	0/5
CLONAZEPAM	0/5	2/5

TABLA II. EVOLUCION DE CRISIS CLINICAS MENSUAL

TIPO DE CRISIS CLINICA	No. DE PACIENTES	FRECUENCIA INICIAL	FRECUENCIA ACTUAL
EPILEPSIA PARCIAL MOTORA SECUNDARIAMENTE GENERALIZADA	2	90, 120 (MEDIA 105)	4, 112 (MEDIA 58)
EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL	1	150	180
EPILEPSIA TONICO CLONICO GENERALIZADA	2	360, 12 (MEDIA 186)	7, 2 (MEDIA 4.5)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE I.S.S.S.T.E

México, D.F. _____

Por medio de la presente autorizo que mi hijo (a) _____
Participe en el proyecto de investigación titulado "EPILEPSIA REFRACTARIA A TRATAMIENTO Y SU RELACION CON MUTACIONES EN EL GEN DE LA SUBUNIDAD ALFA DEL CANAL DE SODIO (SCN1A)".

Registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" con el número: 223.2007

El objetivo de estudio es determinar la asociación de mutaciones en el gen SCN1A y la falta de respuesta al tratamiento en los pacientes con Epilepsia Refractaria.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

1. Responder de forma verbal cuestionario aplicado por el médico
2. Autorizar la obtención de una muestra sanguínea de 3 ml

DECLARO QUE SE ME HA INFORMADO AMPLIAMENTE SOBRE LOS POSIBLES RIESGOS, INCONVENIENTES Y MOLESTIAS. ENTIENDO QUE EL OBJETIVO DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN ES MEJORAR LA ATENCIÓN MEDICA Y NO NECESARIAMENTE INVOLUCRA UN BENEFICIO EN PARTICULAR PARA MI FAMILIAR.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaran a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento, en lo que considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del instituto.

El investigador principal me ha dado seguridad de que no se me identificará plenamente en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a la permanencia de mi representado (a) en el mismo.

El DNA obtenido de la muestra sanguínea se guardará en el Laboratorio de Medicina Genómica de este Centro Médico, bajo la responsabilidad de los investigadores relacionados al proyecto de investigación por un período de 2 años, ya que podría ser utilizado en otras investigaciones relacionadas con la Epilepsia.

NOMBRE Y FIRMA DE CONFORMIDAD DE AMBOS PADRES O TUTORES O DEL REPRESENTANTE LEGAL

NOMBRE, FIRMA, MATRICULA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

NUMERO TELEFONICO AL CUAL PUEDE COMUNICARSE EN CASO DE DUDAS Y PREGUNTAS RELACIONADAS CON EL ESTUDIO: 045 33 1250 7667.

Dr. Ramón Ernesto Jiménez Arredondo. Residente de Neurología Pediátrica.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Lares-Asseff I, Trujillo F. La Farmacogenética y su importancia en la Clínica. *Gaceta Médica de México*. 2001;(137): 227-36.
2. Vogel F. Moderne Probleme der Humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd*. 1959;(12):52-125.
3. Garrod AE- Inborn Errors of Metabolism. London: Henry Frowde 1909 London: Oxford University Press Reprint; 1963.
4. Motulsky AG. Drug Reaction, Enzymes and Biochemical Genetics. *J Am Med Assoc*. 1957;(165):835-37.
5. Vesell ES. Advances in Pharmacogenetics. *Prog Med Genet* 1973;(9):291-367.
6. Meyer UA. Genotype or Phenotype. The Definition of a Pharmacogenetic Polymorphism. *Pharmacogenetics*. 1991; (1):66-7.
7. Vogel F, Motulsky AG. Human Genetics, Problems and Approaches. New York, Springer 1986:435.
8. Guerrini R. Epilepsy in Children. *The Lancet*. 2006;(367):499-524.
9. Browne T, Holmes G. Epilepsy: Definitions and Background. *Handbook of Epilepsy*. Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. 2004:1-20
10. Engel J, Pedley TA. What Is Epilepsy?. *Epilepsy*. Lippincott Williams & Wilkins. 1999.
11. Arzimanoglou A, Guerrini R, Aicardi J. Epilepsy: Overview and Definitions. *Aicardi's Epilepsy in Children*. Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA.2004:1-6.
12. Berg AT, Shinnar S, Levy SR, Testa FM, Smith-Rapaport S, Beckerman S. Early Development of Intractable Epilepsy in Children: A Prospective Study. *Neurology*. 2001;(56):1445-1452.
13. Löscher W, Potschka H. Role of Multidrug Transporters in Pharmacoresistance to Antiepileptic Drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002; (301):7-14.
14. Arroyo S. y cols. Is Refractory Epilepsy Preventable?. *Epilepsia*. 2002;(43):437-444.
15. Bazil CW. New Antiepileptic Drugs. *Neurologist*. 2002;(8):71-81.
16. Begley DJ. ABC Transporters and The Blood-Brain Barrier. *Curr Pharm Design*. 2004;(10):1295-1312
17. Remy S. y cols. A Novel Mechanism Underlying Drug Resistance in Chronic Epilepsy. *Ann Neurol* 2003;(53):469-79.
18. Campos-Castelló J, Canelón M, García-Fernández M. Aspectos Clínicos de las Canalopatías Epilépticas. *Rev Neurol*. 2000;(30):S42-S46.
19. Köhling R. Voltage-Gated Sodium Channels in Epilepsy. *Epilepsia*. 2002;(43):1278-95.

20. Alzate D, Carrizosa J, Bedoya G. Mutaciones de los Canales Neuronales de Sodio y Cloro Asociadas a Epilepsia Generalizada con Convulsiones Febriles Plus. IATREIA. 2004; (17):115-23.
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
22. Fiorino K, Cox J. Nutrition and Growth. En: Robertson J, Shilkofski N. The Harriet Lane Handbook. 17 ed. Elsevier Mosby. United States of America. 2005: 585-98.
23. Claes L. y cols. De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene *SCN1A* Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. Am J. Hum Genet. 2001;(68):1327-32.
24. Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki E, Takahashi Y, Fukushima K, Watanabe M. y cols. Mutation of Sodium Channel α Subunit type (*SCN1A*) in Intractable Childhood Epilepsies with Frequent Generalized Tonic Clonic Seizures. Brain 2003; (126):531-546.