



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *EPM2A* EN UNA FAMILIA MEXICANA CON
ENFERMEDAD DE LAFORA DE FENOTIPO ATÍPICO Y DEL GEN *PPP1R3C*
COMO MODIFICADOR ATENUANTE DE LA ENFERMEDAD**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GABRIEL ARTURO LIMA VILLEDA

ASESOR: Dr. AURELIO JARA PRADO

COASESOR: Q.F.B. ROSALBA BONILLA SÁNCHEZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

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

Estudio molecular del gen EPM2A en una familia mexicana con Enfermedad de Lafora de fenotipo atípico y del gen PPP1R3C como modificador atenuante de la enfermedad

Que presenta el pasante: **Gabriel Arturo Lima Villeda**

Con número de cuenta: **305801447** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de Abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
SECRETARIO	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Sara Hernández Matilde	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

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

**Proyecto Apoyado por CONACYT
FONSEC 181359**

Agradecimientos

A mis Padres, por el amor, el apoyo y sus enseñanzas; porque me dieron todo para lograr ser la persona que soy ahora, por darme las herramientas y la libertad para crearme a mí mismo.

A Fernando, Brenda, Mónica, Natalia y Lizzouli, por todos esos momentos que siempre me regalan, por las bromas, las peleas, los regaños, los consejos, porque ustedes también me ayudaron y me siguen ayudando a crecer.

A Fernanda y Sandra, que han estado conmigo desde el inicio de la carrera apoyándome y compartiendo grandes momentos de alegría, satisfacción e incluso desesperación y desconcierto en este gran viaje que caminamos juntos.

Al Dr. Aurelio Jara, por darme la oportunidad de aprender bajo su tutela desde el servicio social hasta este momento y por permitirme aprender por mí mismo al intentar cosas diferentes en el laboratorio. También por todo el apoyo y la paciencia que me ha tenido.

A los chacales y chacaladies! saratustra, peque, bombero, incomodo, avenger, profeta, moztro, perro, empalador de manzanas, Ale, mamisol, Z, chispa, van sam, vago, candidato y de nuez al gato y a mi doki; por todos esos momentos de camaradería, estudio, congresos, diversos Fest's, chilaquiles y aforados.

A mis compañeros del labo: gabrriella y su conejo, quepza, ambarina, cesario, volviendo a citar al muppet y al gremlin, porque reímos, discutimos y aprendimos juntos esa brujería de la biología molecular, todo bajo amenaza de la tostada y el inframundo.

A todo el equipo de Neurogenética: el Doc, Adri, Lety, George, David, Vato y Gina, por sus enseñanzas, apoyo, bromas y amistad.

Finalmente a INVADER que ha estado presente en mi vida desde antes de iniciar la carrera y ha comprendido todas mis ausencias en los ensayos y reuniones; por darme ánimo, energía, felicidad y sobre todo DEATH METAL.

Resumen	6
1.- Antecedentes Enfermedad de Lafora	7
2.- Marco Teórico	9
2.1.- Metabolismo de Glucógeno	9
2.2.- Mecanismos moleculares de la enfermedad de Lafora	16
2.3.- Epilepsia, generalidades	17
2.4.- Enfermedad de Lafora.....	19
2.5.- Aspectos genéticos	21
3.- Objetivos.....	32
4.- Metodología	33
4.1.- Diagrama de flujo general	33
4.2.- Pacientes	34
4.3.- Controles.....	35
4.4.- Procedimiento.....	36
5.- Resultados y Discusión.....	48
6.- Conclusiones	57
7.- Referencias.....	58
Glosario de abreviaturas	64
Índice de Figuras	66
Índice de Tablas.....	65

Resumen

La Enfermedad de Lafora (EL) es un tipo de epilepsia mioclónica progresiva (EMP) que se manifiesta generalmente en la etapa final de la infancia y durante la adolescencia con mioclonías, ausencias, crisis tónico-clónicas y una progresión neurodegenerativa rápida. Los pacientes presentan acumulación intracelular de cuerpos de Lafora en sistema nervioso central, músculo y piel entre otros tejidos. Tiene un desenlace fatal aproximadamente 10 años después del inicio de la enfermedad.

La EL es causada por mutaciones en dos genes descritos; *EPM2A* codificante para Laforina y *NHLRC* codificante para Malina. Ambas proteínas interactúan en un complejo que regula la síntesis de glucógeno. La proteína PTG (codificada en el gen *PPP1R3C*) facilita la activación de la Glucógeno Sintasa, promoviendo la síntesis de glucógeno. Recientemente se reportaron dos variantes en PTG que probablemente estén relacionadas con un progreso lento de la enfermedad.

En la Clínica de Epilepsia del INNyN se detectó una familia con integrantes afectadas con EMP, el diagnóstico clínico e histopatológico indicaba EL pero no era definitivo ya que los pacientes presentaron un inicio tardío y progreso lento, además de pocos cuerpos de Lafora en la biopsia. Por lo tanto, se realizó el diagnóstico molecular a 7 integrantes de esta familia por medio la secuenciación completa de los genes *EPM2A* y *NHLRC1*. Posteriormente se analizó el gen *PPP1R3C* mediante secuenciación como modificador atenuante de la enfermedad.

Se encontraron las mutaciones p.R241X y p.G279C en el exón 4 del gen *EPM2A*. La mutación p.R241X ya se había reportado previamente en otros estudios, sin embargo, no existen reportes previos de la mutación p.G279C. Se descartó la posibilidad de que ésta mutación fuera un polimorfismo al no encontrarse en 100 sujetos sanos de origen mestizo-mexicano. Además se llevó a cabo el análisis *in silico* encontrando evidencia de su participación en el desarrollo de la enfermedad. En el análisis del gen *PPP1R3C* no se encontraron variantes.

Por medio de las técnicas de biología molecular y las herramientas bioinformáticas se determinó que las mutaciones p.R241X y p.G279C son las causantes de EL en los integrantes afectados en esta familia. Estas mutaciones en el exón 4 del gen *EPM2A* en pacientes de EL con inicio tardío y progresión lenta se contraponen a lo reportado hasta ahora en los estudios de asociación genotipo-fenotipo. En este estudio no se encontraron variantes en el gen *PPP1R3C*, por lo que se descarta como gen modificador atenuante de la enfermedad en esta familia y se propone la búsqueda y estudio de otros genes modificadores de la enfermedad.

1.- Antecedentes

En 1911, Gonzalo Rodríguez Lafora reportó un paciente de 17 años de edad con epilepsia mioclónica, en el que destacaban la presencia de mioclonias constantes y demencia progresiva, el cual murió a las 6 semanas en *status mioclonus* después del inicio del estudio. Posteriormente la autopsia reveló la presencia de cuerpos amiloides en las neuronas de corteza cerebral, tálamo, globo pálido y sustancia nigra. Dichas células, se encontraban degeneradas, a diferencia de las células gliales, las cuales estaban integras y no presentaban cuerpos amiloides (Lafora y Glueck, 1911).

En 1965, Schwarz y Yanoff documentaron 8 casos de epilepsia mioclónica progresiva hereditaria de tipo autosómico recesiva, con inicio de la enfermedad en la adolescencia, desenlace fatal y evidente actividad epiléptica en el electroencefalograma (EEG), histopatológicamente presentaban inclusiones intraneuronales llamándolos cuerpos de Lafora o poliglucosanos (Schwarz y Yanoff, 1965).

Los cuerpos de Lafora son el rasgo más distintivo de esta enfermedad y los pacientes los presentan en abundancia en todas las regiones cerebrales y en la mayoría de las neuronas. Los cuerpos de Lafora son el resultado de la acumulación intracelular de moléculas de glucógeno anormal insoluble, poco ramificado y altamente fosforilado. Estas características indican que se trata de una alteración en el metabolismo de glucógeno (Minassian, 2001).

En 1995, Serratosa y colaboradores estudiaron 9 familias con diagnóstico clínico e histopatológico de Enfermedad de Lafora (EL) y definieron que el locus 6q23–25 contenía al gen responsable de la enfermedad (Serratosa y Delgado-Escueta, 1995). En 1997, esta región se delimitó a 6q24 en biopsias de 39 pacientes con EL provenientes de España, Canadá, Estados Unidos, Palestina y Ecuador entre otros. (Sainz, *et al*, 1997) En 1999, se encontraron mutaciones puntuales y microdeleciones en un gen que denominaron *EPM2A* (por sus siglas en inglés *Epilepsy of Progressive Myoclonus type 2 gene A*), éste codifica para una fosfatasa de tirosina la cual nombraron como laforina (Serratosa, *et al* 1999).

En 2003, Chan y colaboradores, describen un segundo locus en 6p22, responsable de la enfermedad en 4 familias de origen Franco-Canadiense. En esta región encuentran mutaciones en un gen nuevo y fue nombrado *EPM2B* (*Epilepsy of Progressive Myoclonus type 2 gene B*) también llamado *NHLRC1* (*NHL Repeat Containing 1 gene*). Este gen codifica para una proteína con actividad de ubiquitina ligasa, la cual nombraron malina (Chan, *et al*, 2003).

Actualmente se han reportado cerca de 120 mutaciones asociadas a la enfermedad (The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database) en *EPM2A*

y en *NHLRC1* conjuntamente, todas ellas encontradas sólo en región codificante, pero no se descartan alteraciones en las regiones reguladoras (Ganesh, *et al*, 2002).

A partir de las mutaciones ya descubiertas y el diagnóstico clínico de los pacientes, se han realizado asociaciones genotipo-fenotipo que han mostrado pacientes con una misma mutación, incluso miembros de una misma familia, que presentan diferencias en la edad de inicio de la enfermedad (Singh y Ganesh, 2009).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son las mismas independientemente del gen alterado, sin embargo, en los estudios de asociación genotipo-fenotipo se ha observado que los pacientes con mutaciones en *NHLRC1* la enfermedad cursa con menor severidad y tienden a vivir más que aquellos pacientes con mutaciones en *EPM2A* (Singh, *et al*, 2006). También se han asociado mutaciones en el exón 1 del gen *EPM2A* con una forma de inicio temprano con déficit cognitivo (Ganesh, *et al*, 2002), por lo que se proponen subfenotipos en la enfermedad de Lafora (Singh y Ganesh, 2009).

A pesar del descubrimiento de la participación de mutaciones en los genes *EPM2A* y *NHLRC1* en la enfermedad de Lafora, se estima que estas sólo explican entre un 80-90% de todos los casos y el resto de los pacientes no presentan alteraciones en ninguno de ellos, por lo que se sospecha que al menos un tercer gen pudiera estar involucrado (Delgado-Escueta, 2007; Singh y Ganesh, 2009).

Adicionalmente, se han reportado pacientes con presencia de cuerpos de lafora que únicamente se manifiestan en cerebro y no en otros tejidos (Al Otaibi, *et al*, 2003). Existe un reporte de un paciente con mutaciones en el gen *NHLRC1* con una progresión muy rápida (Franceschetti, *et al*, 2006). En otro estudio se reportaron dos variantes en el gen *PPP1R3C* que pueden estar asociadas a una disminución en la severidad de la neurodegeneración y aumento en la supervivencia de los pacientes con EL (Guerrero, *et al*, 2011).

Estos y otros casos, dieron pauta para iniciar la búsqueda de otros factores modificadores de la enfermedad, entre ellos genes estrechamente relacionados a *EPM2A* y *NHLRC1* (Singh y Ganesh, 2012).

Hasta la fecha aún no se conocen con exactitud las funciones específicas de las proteínas laforina y malina, pero se sabe que están involucradas en el metabolismo del glucógeno, interactuando con la proteína de direccionamiento a glucógeno, la glucógeno sintasa, la enzima ramificadora entre otras. La alteración y desbalance de esta vía metabólica en la enfermedad de Lafora podría resultar en la acumulación de poliglucosanos en las células, con subsecuente desarrollo de crisis epilépticas, neurodegeneración y muerte (Singh y Ganesh, 2009; Ramachandran, *et al*, 2009).

2.- Marco Teórico

2.1.- Metabolismo de Glucógeno.

2.1.1.- Estructura del Glucógeno.

El glucógeno es un polímero de glucosa ramificado que almacena glucosa para su utilización cuando sea escasa. La polimerización primaria entre los residuos de glucosa es mediante enlaces α -1,4-glucosídicos y las ramificaciones con enlaces α -1,6-glucosídicos (Figura 1A).

Un modelo sugiere que la molécula de glucógeno consta de cadenas internas B, que normalmente contienen dos puntos de ramificación y cadenas externas A sin ramificar que en promedio cada una de estas cadenas tiene 13 residuos de glucosa, que se van acomodando hasta 12 niveles (Figura 1B) para alcanzar teóricamente, hasta ~ 55000 residuos de glucosa con una masa molecular de $\sim 10^7$ kDa y un diámetro de ~ 44 nm en su máximo tamaño. Sin embargo, el glucógeno que se encuentra en la naturaleza es un grupo de moléculas con diferentes tamaños, el número de residuos de glucosa por cadena es variable y las ramificaciones no se ubican siempre en el mismo punto (Roach, *et al*, 2012).

El glucógeno, también contiene trazas de fosfato en su estructura en una proporción de un grupo fosfato por cada $\sim 10\ 000$ residuos de glucosa, en forma de monoésteres en las posiciones C2 y C3. Cada molécula de glucógeno sufre numerosos ciclos de expansión y

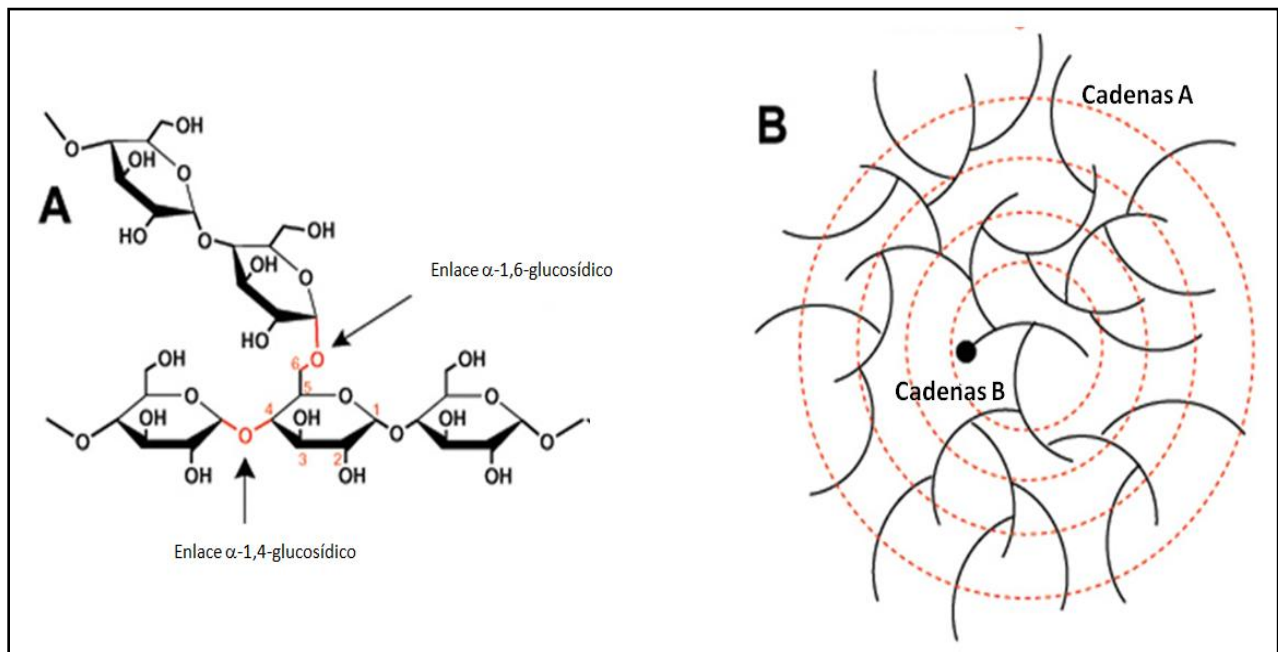


Figura 1 A) Esquema de enlaces glucosídicos en la molécula de glucógeno; B) Molécula de glucógeno con cadenas B internas ramificadas y cadenas A externas, las líneas punteadas rojas indican la organización de las cadenas en niveles concéntricos (Roach, *et al*, 2012).

contracción, lo que puede provocar ciertas aberraciones en su estructura, como cadenas muy largas de glucosa o la incorporación de cantidades excesivas de fosfato resultando en la formación de agregados de glucógeno insoluble, este fenómeno es normal en el envejecimiento de las células. Estos agregados se han descrito en tejido cerebral y se les llama *corpora amylacea* (Roach, *et al*, 2012).

Además, en los tejidos, las moléculas de glucógeno se encuentran asociadas a proteínas involucradas en su metabolismo como la glucogenina (GN), la glucógeno sintasa (GS), glucógeno fosforilasa (GP), la enzima desramificadora (DBE), y proteínas reguladoras como la fosforilasa cinasa (PHK), miembros de la proteína fosfatasa 1, la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), laforina malina y la proteína de direccionamiento a glucógeno (PTG). Todas estas proteínas involucradas en el metabolismo de glucógeno están estrechamente unidas a la molécula de glucógeno formando una “partícula de glucógeno” (Figura 2) (Roach, *et al*, 2012).

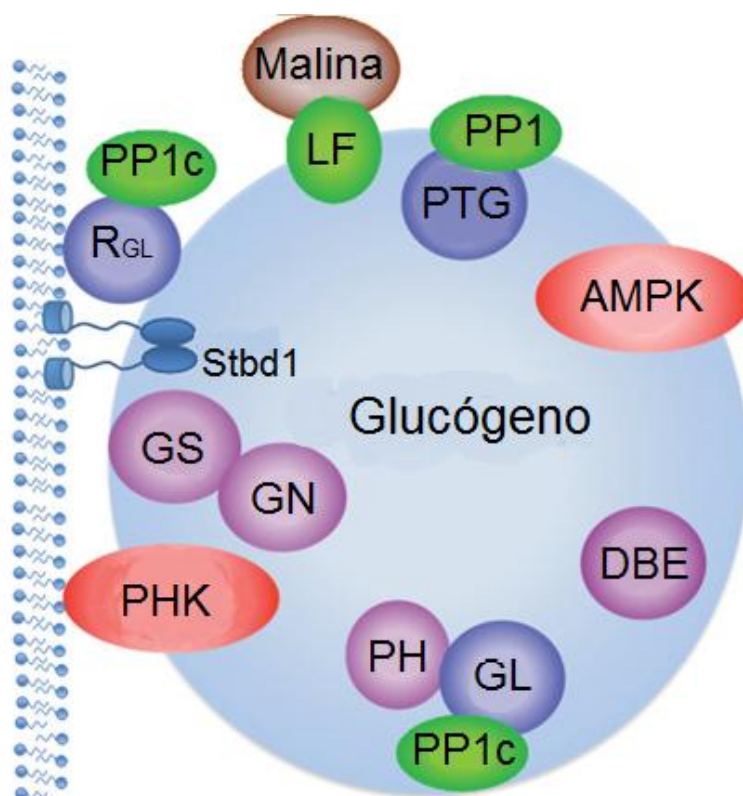


Figura 2 Interacción de una molécula de glucógeno con proteínas asociadas que participan en el metabolismo del glucógeno. (Roach, *et al*, 2012).

2.1.2.- Biosíntesis y degradación de glucógeno

El glucógeno es sintetizado y almacenado en gran parte por el músculo esquelético y el hígado; pero otros tejidos como el riñón, corazón, tejido adiposo y cerebro también son capaces de sintetizarlo, sin embargo, las neuronas no almacenan glucógeno y la neuroglía es la única con esta capacidad (Vilchez, *et al.*, 2007).

La biosíntesis inicia cuando la glucogenina (GN) transfiere glucosa a partir de UDP-glucosa a un residuo de tirosina en ella misma formando un enlace α -1,4-glucosídico, elongando el oligosacárido hasta una longitud de 10-20 residuos. El siguiente paso es la asociación de la GN y la glucógeno sintasa (GS), iniciando esta última la adición de residuos de glucosa con enlaces α -1,4; las ramificaciones son catalizadas por una enzima de ramificación (BE) que escinde un fragmento de 7 residuos de glucosa de una cadena en elongación en por lo menos 11 residuos y forma un enlace α -1,6 en un nuevo punto de ramificación (Figura 3) (Roach, *et al.*, 2012).

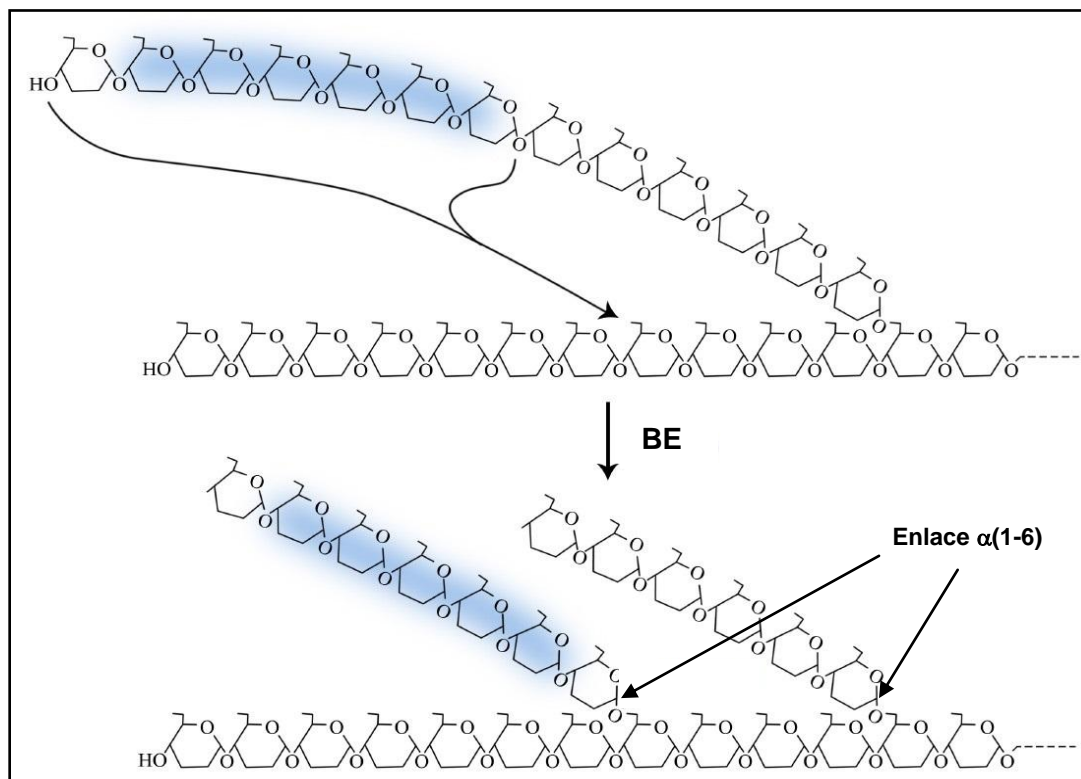


Figura 3 Formación de enlaces α (1-6) en puntos de ramificación en molécula de glucógeno por acción de la enzima ramificadora (BE) (Campbell y Farrell, 2004).

La degradación del glucógeno es llevada a cabo por la enzima glucógeno fosforilasa (GP) rompiendo los enlaces α (1-4) de hasta cuatro residuos separados de la ramificación sin la ayuda de la enzima desramificadora (DBE) la cual rompe enlaces α (1-6) produciendo glucosa-1-fosfato que es rápidamente convertida a glucosa-6-fosfato por isomerización,

catalizada por la enzima fosfoglucomutasa (PGM). En otra vía de degradación, el glucógeno es transferido al lisosoma e hidrolizado a glucosa libre por la α -glucosidasa lisosomal (Roach, *et al*, 2012).

El glucógeno contiene cantidades traza de fosfato en su estructura, en un rango promedio de 1 grupo fosfato por cada 500 a 1500 residuos de glucosa en las moléculas de glucógeno del músculo esquelético. Este fosfato está unido covalentemente en las posiciones C2 o C3 en forma de monoésteres de fosfato en las moléculas de glucosa (Figura 4) (Roach, 2011).

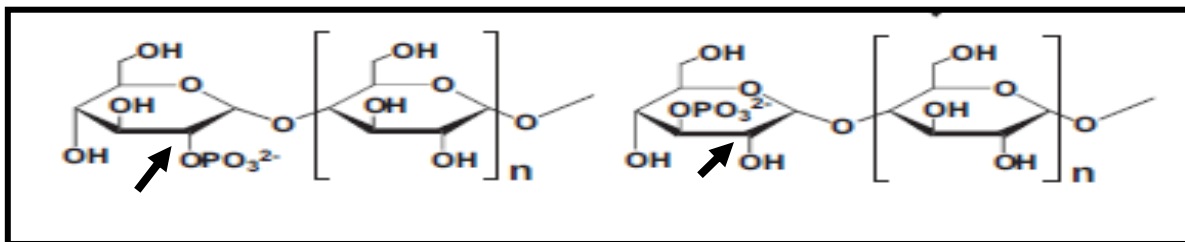


Figura 4 Monoésteres de fosfato en los residuos de glucosa del glucógeno, indicados por las flechas en las posiciones C2 y C3 (Tagliabracci, *et al*, 2011).

Esta incorporación de fosfato en la molécula de glucógeno, al parecer es el resultado de un error catalítico de la enzima GS, adicionando un grupo fosfato por cada $\sim 10\ 000$ residuos de glucosa. La diferencia entre la tasa de error y la cantidad promedio de grupos fosfato en una molécula de glucógeno se explica por la gran cantidad de veces en que el glucógeno es parcialmente degradado y re sintetizado (Tagliabracci, *et al*, 2011).

Recientemente se ha propuesto que existe un sistema de control de calidad en el metabolismo de glucógeno, en el que laforina tiene la función de remover el fosfato incorporado en la molécula de glucógeno (Figura 5), evitando su acumulación (Tagliabracci, *et al*, 2011). Sin embargo, la remoción del fosfato por acción de laforina *in*

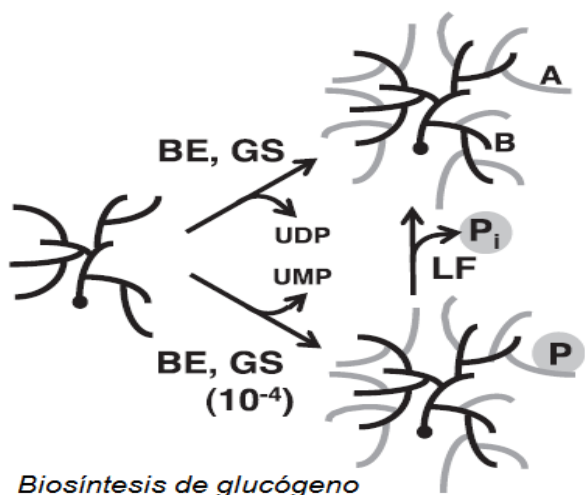


Figura 5 Actividad fosfatasa de Laforina sobre los monoésteres de fosfato que se incorporan a la molécula de glucógeno (Roach, *et al*, 2011).

vivo no tiene una eficiencia del 100%, por lo que se puede suponer que existen niveles tolerables de fosfato en las moléculas de glucógeno que no afectan la estructura y cuando ese umbral es superado el resultado es devastador, por lo que se dice que es un mecanismo de reparación y control de daños en el metabolismo de glucógeno (Roach, 2011).

2.1.3.- Regulación de la biosíntesis de glucógeno

El glucógeno es sintetizado por la GS y es regulada alostéricamente de forma positiva por la glucosa-6-fosfato y negativamente por fosforilación covalente reversible. La activación de la GS por la presencia de glucosa-6-fosfato puede superar el efecto inactivante que sufre la enzima mediante fosforilación (Roach, *et al*, 2012).

La inactivación de la GS, se lleva a cabo por una serie de fosforilaciones sucesivas en al menos nueve sitios por acción de tres enzimas: la proteína cinasa A (PKA), fosforilasa cinasa (PHK) y la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3). En este mecanismo, la adición de un grupo fosfato permite la adición de un segundo grupo fosfato (Obel, *et al*, 2012).

La defosforilación de la GS está mediada por la acción de una familia de proteínas fosfatasas asociadas a glucógeno (PP1G), las cuales poseen una subunidad catalítica proteína fosfatasa 1 (PP1) ligada a subunidades de direccionamiento a glucógeno, éstas últimas tienen como función, actuar como andamiaje proteínico para facilitar la interacción de la GS con glucógeno (Obel, *et al*, 2012).

La subunidad PTG de la proteína fosfatasa 1 se encarga de unir la molécula de glucógeno con la PP1; además se une directamente con la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa, incrementando el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno mediante la defosforilación que activa la GS e inactiva la GP (Greenberg, *et al*, 2006).

2.1.3.1.- Complejo Laforina-Malina

Laforina es una proteína que cuenta con un dominio fosfatasa de doble especificidad y que además es capaz de unirse al glucógeno a través de un dominio de unión a carbohidratos (Worby, *et al*. 2006).

La proteína malina contiene un dominio de ubiquitina ligasa tipo RING y cuenta con seis dominios NHL que sirven como sitio de unión a otras proteínas (Gentry, *et al*, 2005). Se sabe que ambas proteínas están involucradas en el metabolismo de glucógeno. (Ganesh, *et al*, 2006).

Las proteínas laforina y malina interactúan entre sí para formar un complejo involucrado en la eliminación de proteínas de vida corta, defectuosas o mal plegadas que son tóxicas para la célula por medio del sistema proteolítico de ubiquitina proteasoma (Garyali, *et al*, 2008).

Malina interactúa físicamente con laforina, de modo que laforina funciona como una proteína presentadora debido a que se une a otras proteínas como GS, DBE, y PTG; esta capacidad de laforina de unirse a PTG permite que malina pueda marcarla para su proteólisis eliminando el estímulo que PTG ejerce sobre la GS, disminuyendo en gran parte la síntesis y el almacenamiento del glucógeno (Worby, *et al*, 2008).

Laforina es capaz de activar a la GSK3 defosforilando a la serina en la posición 9 lo que conlleva a que esta última inactiva a la GS por fosforilación deteniendo la biosíntesis de glucógeno (Lohi, *et al.*, 2005).

Adicionalmente, la interacción del complejo laforina-malina al interactuar con PTG, también aprovecha el andamiaje proteínico que provee PTG para interactuar con las enzimas GS, DBE y marcarlas para su degradación (Vilchez, *et al*, 2007).

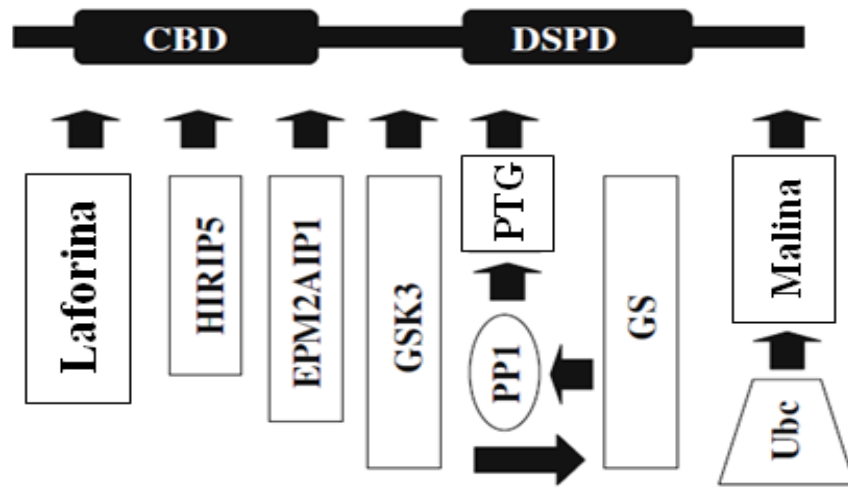


Figura 6 Esquema de interacciones de laforina con diversas proteínas. Laforina interactúa físicamente con ella misma, con GSK3, PTG y con malina. Malina aprovecha la unión con laforina para degradar a todas las demás proteínas que se unen a laforina. PTG se une a PP1 y está a su vez con GS. (Ganesh, *et al*, 2006)

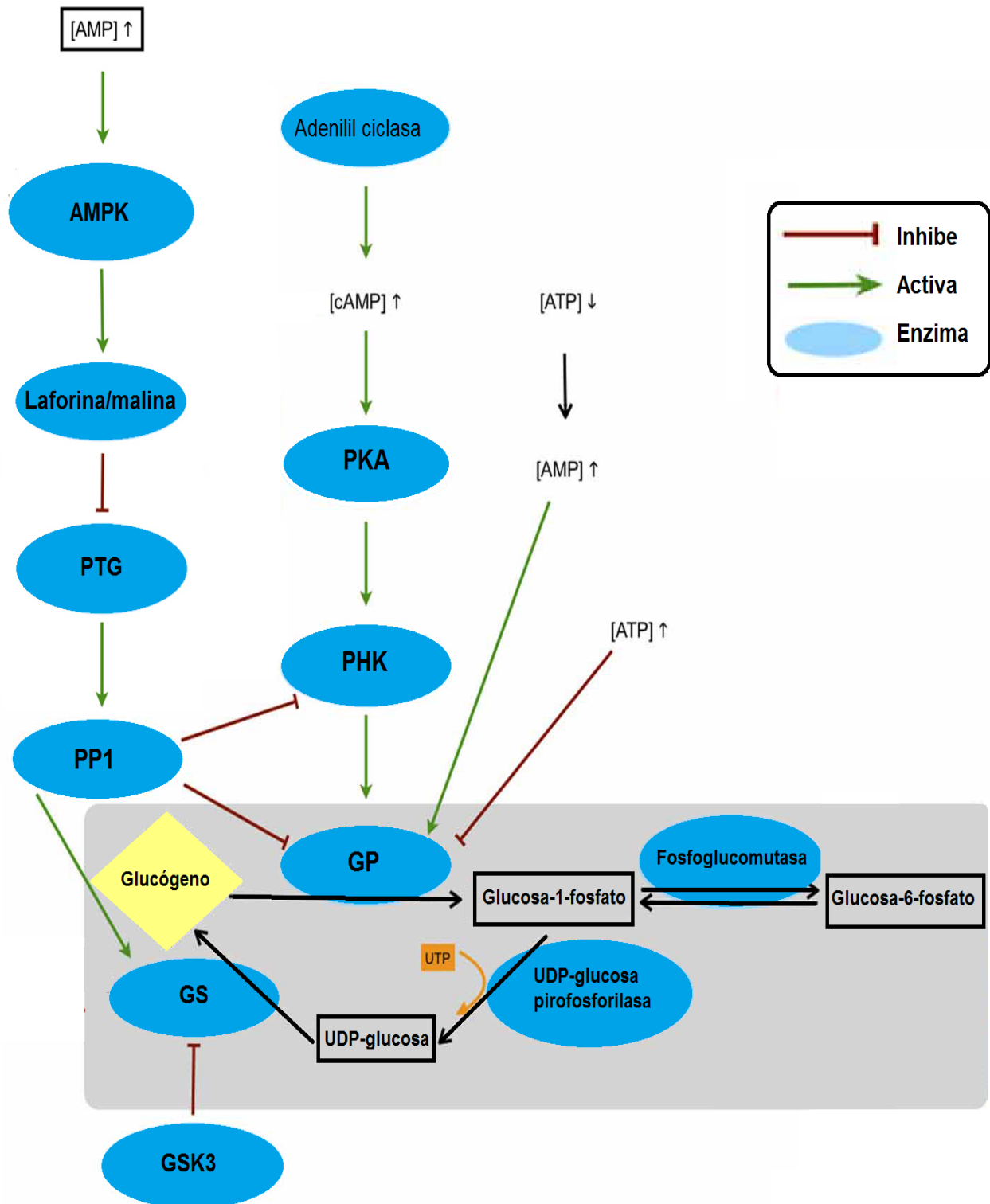


Figura 7 Metabolismo de Glucógeno. En el recuadro gris se esquematiza la biosíntesis y degradación del glucógeno con las principales enzimas involucradas; fuera del recuadro se esquematizan las principales enzimas reguladoras en esta vía (Modificado de Obel, et al. 2012)

2.2.- Mecanismos moleculares de la enfermedad de Lafora

En el SNC, las neuronas poseen la maquinaria metabólica para sintetizar glucógeno, sin embargo éste es almacenado y sintetizado casi exclusivamente en los astrocitos, que proveen de energía a las neuronas en forma de lactato. Si esta maquinaria que mantiene inactivada la síntesis de glucógeno en las neuronas es alterada, resulta en neurodegeneración por apoptosis (Vilchez, *et al.*, 2007).

Este fenómeno se debe a que en las neuronas existe una regulación muy estricta llevada a cabo por el complejo laforina-malina que evita la biosíntesis de glucógeno, por medio de ubiquitinación de la GS hiperfosforilada para su degradación por el sistema ubiquitina proteasoma, así como la degradación de PTG eliminando su efecto glucogenogénico sobre la GS (Vilchez, *et al.*, 2007).

La alteración de laforina en ratones Knockout (*epm2a^{-/-}*) resulta en la aparición de cuerpos de Lafora en cerebro, así como neurodegeneración progresiva, síntomas de comportamiento anormal, ataxia y epilepsia mioclónica (Ganesh y Delgado-Escueta, 2002).

Las mutaciones dentro del dominio DSP de laforina, eliminan la función de fosfatasa en esta proteína, evitando su capacidad para defosforilar al glucógeno, provocando alteraciones estructurales que resulten en la agregación intracelular de glucógeno insoluble, unido a proteínas como laforina, malina, GS y PTG el cual no es degradado eficientemente por la acción de las enzimas GP y DBE, acumulándose en forma de cuerpos de Lafora y desencadenando la neurodegeneración (Fernández-Sánchez, *et al.*, 2003).

Las mutaciones en el gen de laforina, pueden causar un mal plegamiento y la agregación de proteínas insolubles en las neuronas, elevando el estrés en el retículo endoplásmico y contribuyendo a la muerte celular (Liu, *et al.*, 2009).

Por otra parte, defectos en malina también están directamente involucrados en esta neurodegeneración; las mutaciones en los dominios RING de malina eliminan la actividad de ubiquitina ligasa, mientras que las mutaciones en los dominios NHL interrumpen la interacción con laforina, evitando así que las proteínas de esta vía metabólica sean degradadas provocando su agregación intracelular, y permitiendo la hiperactividad de la GS y PTG con su efecto glucogenogénico (Gentry, *et al.*, 2005).

2.3.- Epilepsia, generalidades

La epilepsia no es propiamente una enfermedad en sí misma, sino una variedad de desórdenes que reflejan una disfunción cerebral subyacente provocada por causas muy diversas. La palabra epilepsia se utiliza para nombrar un desorden cerebral caracterizado por la interrupción impredecible y recurrente de la función normal del cerebro. A estas interrupciones se les llama crisis epilépticas, que se definen como la ocurrencia transitoria de los signos y síntomas debido a una actividad neuronal excesiva anormal o sincrónica en el cerebro (Fisher, *et al*, 2005).

La liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) define epilepsia como un desorden cerebral caracterizado por una predisposición duradera de generar crisis epilépticas así como las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales propias de esta condición. Esta definición requiere que ocurra al menos una crisis epiléptica. Tabla 1(Fisher, *et al*, 2005).

2.3.1.- Epidemiología

Las Epilepsias son un grupo de desórdenes neurológicos muy comunes que se presentan en alrededor del 1% de la población general (Minassian, 2001). Dentro de este grupo de síndromes, las Epilepsias Mioclónicas Progresivas (EMPs) representan el 1% de todas los tipos de epilepsias (Minassian, 2001). Como parte de este grupo de epilepsias, se encuentra la EL para la cual no existen datos exactos de prevalencia, sin embargo ocurre a nivel mundial con una mayor frecuencia relativa en países como España, Francia, Italia, regiones de Asia central, India, Pakistán, África del norte y Medio Oriente, así como en poblaciones aisladas genéticamente de los Estados Unidos, Canadá y otras partes del mundo donde las uniones consanguíneas son muy frecuentes; en México no se tienen datos al respecto (Singh y Ganesh, 2009).

Tabla 1 Clasificación y descripción de los principales tipos de crisis epilépticas de acuerdo a la ILAE (Berg y Scheffer, 2011; Shorvon, 2009).

Crisis Generalizadas	Se originan rápidamente y están distribuidas bilateralmente	
	Tónica	Contracción muscular que causa extensión del cuello, músculos faciales, los ojos se voltean hacia arriba y puede haber elevación de los brazos en forma semiflexionada.
	Clónica	Sacudidas asimétricas e irregulares, con disminución o pérdida total de la conciencia.
	Tónico-clónica	Hay pérdida de la conciencia, que inicia como una crisis tónica con una duración de 10 a 30 segundos, seguida de la fase clónica que dura aproximadamente de 30 a 60 segundos, la fase final presenta flacidez muscular; este tipo de crisis son conocidas comúnmente como convulsiones clásicas.
	Atónica	Pérdida repentina del tono muscular, puede ser de un grupo de músculos o en todo el cuerpo, resultando en una caída. Son de corta duración y hay recuperación inmediata.
	Ausencias típicas	Pérdida súbita de la conciencia, se detiene toda la actividad motora, sin pérdida del tono muscular, la crisis termina súbitamente como inicio, el paciente reinicia actividades sin saber que tuvo una crisis.
	Ausencias atípicas	El paciente puede responder parcialmente, con disminución de actividad motora y no hay pérdida completa de la conciencia.
	Mioclónías	Contracciones breves de un músculo, grupo muscular o varios grupos musculares, sin pérdida de la conciencia.
Crisis Focales	Se originan en algún punto dentro de los límites de un hemisferio	
	Auras	Se nombraban crisis parciales simples a eventos clínicos como somatosensoriales (visuales, alucinaciones, sensación de quemadura), manifestaciones psíquicas (Alteraciones cognitivas, afectivas de la memoria, etc.).
	Motoras	Espasmos, sacudidas, disartria, paro respiratorio.
	Autonómicas	Cambios de coloración en la piel, presión sanguínea, ritmo cardíaco, etc.
	A nivel de conciencia	Cambios de coloración en la piel, presión sanguínea, ritmo cardíaco, etc.

2.4.- Enfermedad de Lafora

2.4.1.- Signos y síntomas

Las EMP son un síndrome epiléptico que puede ser de etiología muy diversa, de diagnóstico difícil en las etapas iniciales, mientras que sus fases tardías son inconfundibles, no obstante el diagnóstico diferencial de la causa de la EMP es difícil desde un enfoque puramente clínico, por lo tanto, en la actualidad el estudio molecular tiene una gran utilidad (Engel, *et al*, 2007).

Las características clínicas de las diferentes EMP son muy similares y se resumen a una triada: principalmente mioclonías (durante el movimiento, también las espontáneas y las sensibles a estímulos), crisis tónico-clónico generalizadas (que aumentan en severidad y en la dificultad de control), y neurodegeneración progresiva. La neurodegeneración y las crisis incontrolables son evidentes hasta etapas avanzadas, lo que dificulta el diagnóstico pudiendo confundirse con otras formas epilépticas de menor severidad (Schneider y Bhatia, 2012).

La EL tiene una edad de inicio en un rango de entre los 12 hasta los 18 años de edad, con casos excepcionales presentándose desde los 6 años (Banerjee, *et al*, 2011) o hasta los 21 años de edad, además se ha observado que la edad de inicio en pacientes afectados de una misma familia tienen una edad de inicio variable (Baykan, *et al*, 2005).

El primer síntoma es variable y puede no ser detectado en primera instancia por el desconocimiento de estos signos, siendo las crisis tónico-clónicas generalizadas las primeras referidas por los familiares al ser las que más llaman la atención, pudiendo presentar todas o sólo algunas de las diversas crisis epilépticas desde el inicio de la enfermedad (ver Tabla 1) (Minassian, 2001).

Al inicio de la enfermedad, las crisis pueden ser controladas con tratamiento antiepiléptico, pero conforme progresa la enfermedad el tratamiento se vuelve ineficaz y el control de las crisis se dificulta. Otros signos característicos son ataxia, disartria, confusión y alteraciones emocionales. Las mioclonías aumentan en frecuencia y pueden llegar a *status* mioclónico, pudiendo confundirse con una crisis tónico-clónica generalizada, pero sin pérdida de la conciencia.

Posteriormente a los pacientes se les dificulta caminar y requieren asistencia o uso de silla de ruedas. En la etapa final de la enfermedad, la demencia severa, las constantes mioclonías y crisis epilépticas conllevan a que el paciente se encuentre postrado en cama y necesite asistencia para todas sus necesidades básicas. Finalmente el paciente muere en *status epilepticus* o con neumonía por aspiración, esto es alrededor de 10 años después del inicio

de la enfermedad. Los aspectos clínicos más característicos de la enfermedad se resumen en la Tabla 2 (Serratosa y Giraldez, 2010).

Tabla 2. Principales signos clínicos en Enfermedad de Lafora (Serratosa y Giraldez, 2010).

Característica	Datos de referencia
Edad de inicio	12-18 años
Tipos de crisis que presenta	Mioclónías, Ausencias, Crisis Parciales, Crisis Tónico-Clónicas Generalizadas
Edad de inicio de deterioro cognitivo	Desde el inicio de la enfermedad o dentro de los primeros años del inicio de la enfermedad
Edad de inicio de ataxia	Desde el inicio de la enfermedad o dentro de los primeros años del inicio de la enfermedad
Edad de inicio de demencia	Se desarrolla rápidamente dentro de los primeros años
Edad de muerte	Alrededor de los 10 años después del inicio de la enfermedad
Causa de muerte	Usualmente mueren por complicaciones relacionados al deterioro neurológico como neumonía por aspiración y el <i>status epilepticus</i>

2.4.2.- Hallazgos histopatológicos

Un rasgo característico en esta enfermedad es la presencia de cuerpos de Lafora (LB por sus siglas en ingles) en cerebro, piel, hígado, en músculo cardiaco y esquelético. Aún no está bien establecido si los LB son los causantes del síndrome epiléptico y la neurodegeneración o simplemente son el producto de un defecto en una vía metabólica todavía desconocida. Además, no se presentan síntomas extra-neurológicos a pesar de encontrarse los LB en diversos órganos (Serratosa y Giraldez, 2010).

Los LB son moléculas aberrantes de glucógeno, formadas por cadenas largas de glucosa poco ramificadas que semejan almidón, con acumulación de grupos fosfato covalente, alterando aún más la estructura que confieren un carácter insoluble provocando su precipitación y agregación intracelular (Andrade, *et al*, 2007).

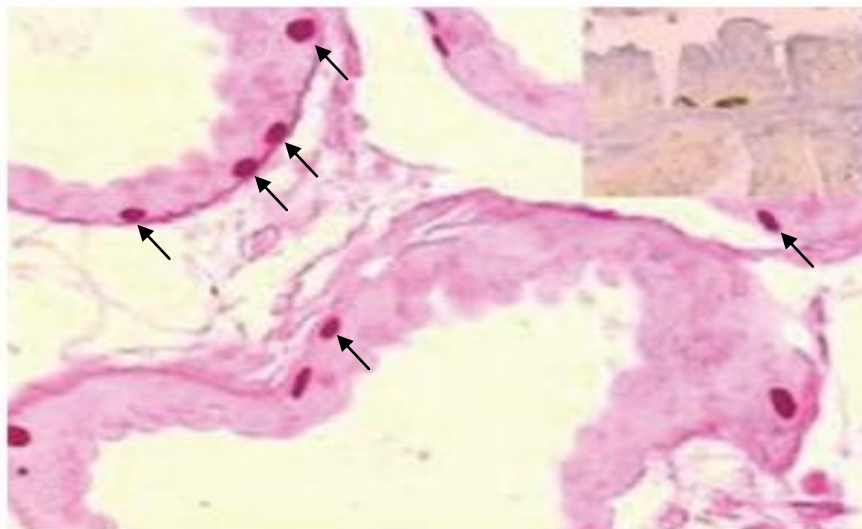


Figura 8 Biopsia de piel axilar con tinción PAS que muestra cuerpos de Lafora, indicados por las flechas (Satischandra y Sinha, 2010)

Se puede realizar el diagnóstico histopatológico tomando una biopsia de piel axilar y ser detectados en células sudoríparas ecrinas con una tinción PAS (Figura 8), haciendo de éste un método muy fácil de diagnóstico (Serratosa y Giraldez, 2010). Sin embargo este método puede tener un alto grado de falsos negativos, por lo tanto el estudio genético es hasta el momento el método preferido para el diagnóstico de esta enfermedad (Lohi, *et al*, 2007).

2.5.- Aspectos genéticos

La enfermedad de Lafora tiene un patrón de herencia autosómica recesiva causada por mutaciones en al menos dos genes descritos: *EPM2A* (Serratosa, *et al*, 1997) y el gen *NHLRC1* (Chan, *et al*, 2003). Los alelos mutados causantes de la enfermedad pueden ser de tipo homocigoto y heterocigotos compuestos.

2.5.1.- Heterogeneidad Genética

Se ha reportado que la proporción de pacientes con EL debido a mutaciones en *EPM2A* y *NHLRC1* es muy variable a nivel mundial: en España, la mayoría de los casos de EL son causadas por mutaciones en *EPM2A*, en la India la proporción es similar entre casos con mutaciones en *EPM2A* y *NHLRC1*, mientras que en Italia, Japón y Francia, el gen más comúnmente mutado es *NHLRC1* (Figura 9).

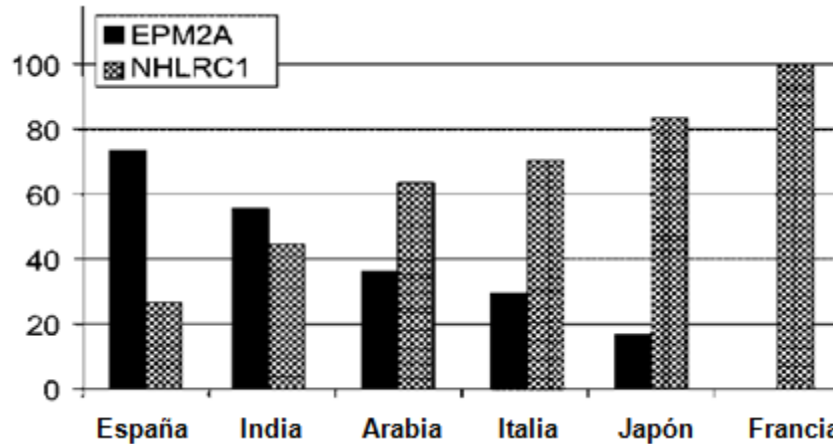


Figura 9 Espectro de mutaciones en *EPM2A* y *NHLRC1* por país (Ganesh, *et al*, 2009)

Sin embargo, alrededor del 10% de todos los casos con diagnóstico clínico e histopatológico de EL, no presentan mutaciones en *EPM2A* ni en *NHLRC1*, por lo que se creó que pudiera existir al menos un tercer locus involucrado en el desarrollo de EL (Delgado-Escueta, 2007).

Debido a la gran heterogeneidad genética, por las diversas mutaciones distribuidas a lo largo de los dos genes ya descritos, la posible existencia de al menos un tercer locus y las combinaciones de mutaciones para generar los genotipos heterocigotos compuestos, el método más confiable para el diagnóstico molecular es la secuenciación completa de *EPM2A* y *NHLRC1* (Singh y Ganesh, 2009).

2.5.2.-*EPM2A* (Epilepsy of Progressive Myoclonus type 2 A)

Está localizado en el cromosoma 6q24.3, consta de 4 exones y tiene un tamaño de 11055 pb (GENATLAS). Codifica para la proteína laforina, una proteína fosfatasa de doble especificidad con dos isoformas; la isoforma 1 está codificada en los exones 1, 2, 3 y exón 4 completo; la isoforma 2 está codificada por los exones 1, 2, 3 y por dos fragmentos pequeños que se desprenden del exón 4 por splicing alternativo (Figura 10) (Gómez-Garre, *et al*, 2000).

Contiene un dominio de unión a carbohidratos (CBD) en el extremo amino terminal, codificado en el exón 1 y parte del exón 2; en el extremo carboxilo terminal tienen un dominio fosfatasa de doble especificidad (DSP) codificado por parte del exón 3 y el exón 4 (Andrade, *et al*, 2007; Delgado-Escueta, 2007).

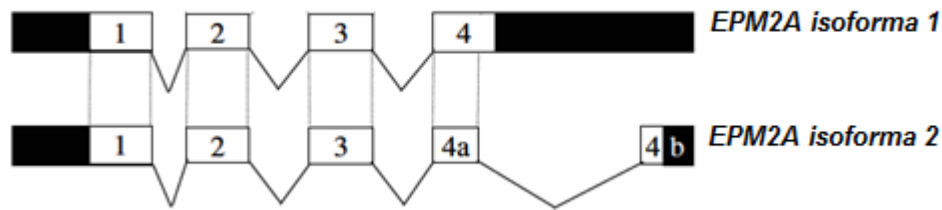


Figura 10 Organización genómica de *EPM2A*, (Ganesh, *et al*, 2006).

2.5.2.1.- Mutaciones en *EPM2A*

Actualmente, se han reportado sólo 4 SNPs no asociados a la enfermedad y 60 mutaciones asociadas a EL a lo largo de los 4 exones del gen *EPM2A*, cerca del 65% son sustituciones de un solo nucleótido que provocan cambio de codón en el mRNA. Las deleciones comprenden un 25% de las mutaciones y el 10% restante las conforman inserciones, deleciones/inserciones, e inserciones/sustituciones. En el exón 1 se han reportado 24 mutaciones, 9 mutaciones en el exón 2, 13 mutaciones en el exón 3 y 14 mutaciones en el exón 4. Todas las mutaciones encontradas se encuentran en la región codificante y no se ha encontrado ninguna en la región promotora ni en los sitios de splicing (The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database, 2013).

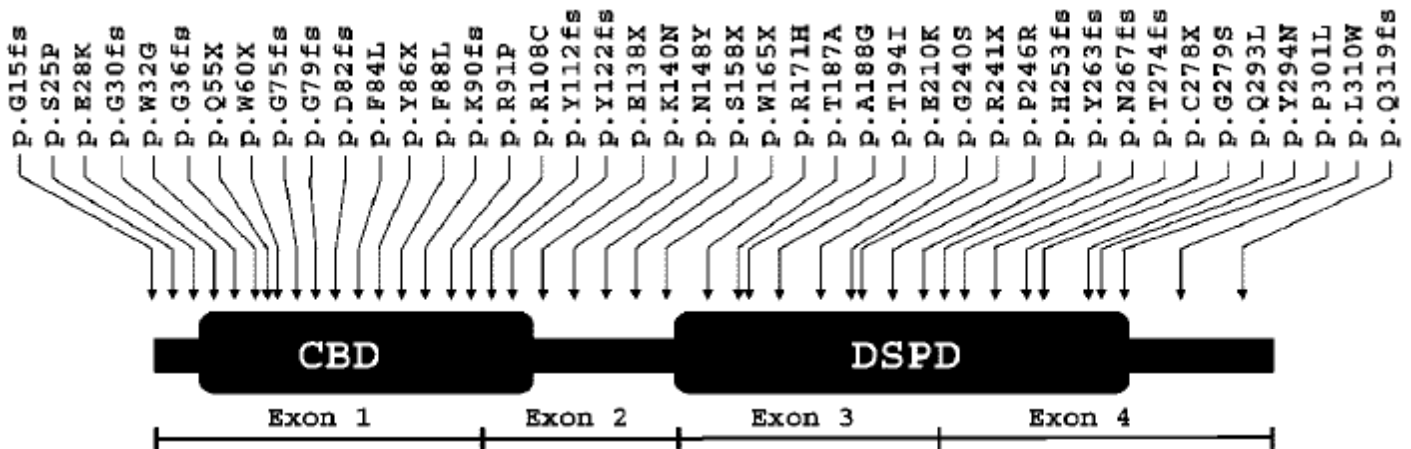


Figura 11 Organización de los dominios de laforina a lo largo de los 4 exones del gen *EPM2A*, la distribución de las mutaciones más comunes y su frecuencia (número de familias reportadas con determinada mutación) (Singh y Ganesh, 2009).

La gran heterogeneidad alélica en *EPM2A* sugiere que todas las mutaciones son eventos únicos por mutaciones *de novo*, a excepción de la mutación c.721C>T (p.R241X) que muestra un efecto fundador y eventos recurrentes en la población española, donde existe

mayor prevalencia de la enfermedad en esta región mediterránea. Otras mutaciones frecuentes son la delección homocigota del exón 2, y la mutación sin sentido c.835G>A (p.G279S) (Singh y Ganesh, 2009).

2.5.3.-Laforina

Esta proteína se expresa en todos los tejidos pero con una mayor expresión en músculo esquelético, hígado, riñón, corazón y cerebro. Tiene 2 isoformas: La isoforma 1 consta de 331 aminoácidos y se asocia a poliribosomas del retículo endoplásmico rugoso. La isoforma 2 con 317 aminoácidos se localiza en el núcleo (Ganesh, *et al*, 2002). Ambas isoformas tienen actividad como monómeros y además son capaces de formar homodímeros entre sí mismas y heterodímeros con la otra isoforma (Dubey y Ganesh, 2008).

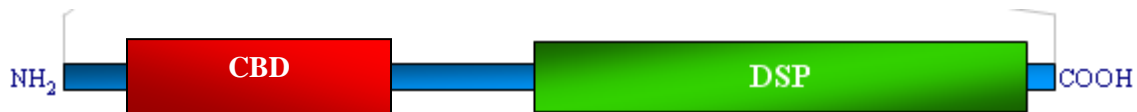


Figura 12 Representación de Laforina con el dominio CBD en el extremo amino terminal y el dominio DSP en el extremo carboxilo terminal. (The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database, 2013).

Contiene un dominio de unión a carbohidratos (CBD) de tipo CBM20 (Figura 12), comúnmente encontrado en enzimas de bacterias, hongos y plantas, sirve para unirse a carbohidratos complejos como amilopectina, glucógeno y poliglucosanos entre otros, sobre los cuales se lleva a cabo directamente la actividad enzimática, en el caso de laforina mediante el dominio DSP, que tiene actividad de fosfatasa y que actúa principalmente sobre este tipo de carbohidratos. (Worby, *et al*, 2006).

Se ha encontrado que la afinidad de laforina por poliglucosanos y amilopectina es mayor que su afinidad por glucógeno. (Chan, *et al*, 2004). Otros estudios indican que laforina es capaz de defosforilar y activar GSK3 lo que conlleva a la inactivación de la GS (Lohi, *et al.*, 2005).

La isoforma 1 en forma monomérica y en su forma homodimérica ha mostrado una intensa actividad de fosfatasa sobre sus sustratos, mientras que la isoforma 2 carece de actividad fosfatasa en monómero y homodímero, sin embargo actúa como un regulador de la isoforma 1 inhibiendo su actividad al formarse el heterodímero (Dubey y Ganesh, 2008).

Entre los dominios CBD y DSP existe una región que puede participar en la interacción de las isoformas de laforina y/o con otras proteínas como malina, GSK3, GS, PTG, HIRIP5, EPM2AIP1 (Delgado-Escueta, 2007).

El alineamiento múltiple de la secuencia de laforina con sus ortólogos en otras especies animales, han mostrado que 230 residuos de los 331 que componen a laforina, están invariablemente conservados durante la evolución y sugiere que tienen una función esencial en la proteína (Singh y Ganesh, 2009).

El linaje evolutivo de laforina muestra que se originó en descendientes de algas rojas primitivas, pero sólo se preservó en aquellos organismos que sintetizaran almidón (como algunos protistas) y en organismos que inhiben la producción de carbohidratos insolubles (todos los vertebrados); los organismos que no realizaran ninguna de estas dos funciones perdieron a laforina (Gentry, *et al.*, 2007).

En los protozoarios, la defosforilación de carbohidratos insolubles como el almidón debe ser necesaria para obtener energía de estos. En los vertebrados, laforina se encarga de defosforilar los carbohidratos complejos como el glucógeno, evitando que se acumulen agregados insolubles en forma de cuerpos de Lafora que puedan generar los signos patológicos de la EL (Gentry, *et al.*, 2007).

La incorporación de fosfato por un error catalítico de la GS se puede comparar a un error en la incorporación de una base mal apareada en la replicación del DNA por la DNAPolimerasa y al igual que esta vía metabólica, también puede tener mecanismos de reparación y en este caso laforina sería la enzima encargada de reparar el daño (Roach, 2011).

2.5.3.1.- Mutaciones en laforina

Las mutaciones sin sentido comprenden aproximadamente un 65% de las mutaciones en *EPM2A* y afectan siempre a los aminoácidos altamente conservados y se cree que resultan en pérdida de la función, proteínas truncas o degradación del mRNA, ya que el fenotipo resultante en los pacientes afectados es similar al que muestran pacientes con grandes deleciones del gen, cambios en el marco de lectura y codones de paro prematuros (Singh y Ganesh, 2009).

Se han realizado diversos ensayos para determinar el efecto de las mutaciones sin sentido en la proteína (Tabla 3) y se ha encontrado que afectan diversas funciones de laforina por ejemplo alterando su localización en la célula, pérdida o disminución de la actividad fosfatasa, disminución o pérdida de la capacidad de interactuar con otras proteínas o glucógeno y posiblemente también afecten el correcto plegamiento de laforina (Singh y Ganesh, 2009).

Tabla 3 Efecto de las mutaciones en la función de laforina (Dubey y Ganesh, 2008; Fernández-Sánchez, *et al.*, 2003; Ganesh, 2002; Singh, *et al.*, 2008; Solaz-Fuster *et al.*, 2008)

Mutación		Dominio afectado	Efecto en la función
Cambio en el nt	Cambio en el a.a.		
c.73T>C	p.S25P	CBD	-No se expresa la proteína en cultivo celular
c.82G>A	p.E28K	CBD	-No afecta la localización celular de laforina -No afecta afinidad por glucógeno o cuerpos de Lafora
c.94T>G	p.W32G	CBD	-Pierde afinidad por glucógeno y cuerpos de Lafora -Disminuye actividad fosfatasa -Disminuye interacción laforina-R5
c.252C>G	p.F84L	CBD	-Elimina afinidad por glucógeno -Disminuye actividad fosfatasa -Disminuye interacción laforina-R5
c.262T>C	p.F88L	CBD	-No afecta la localización celular de laforina -No afecta afinidad por glucógeno o cuerpos de Lafora
c.322C>T	p.R108C	CBD	-Disminuye actividad fosfatasa -Afecta localización celular -Disminuye interacción laforina-R5 -Disminuye interacción laforina-laforina -Afecta interacción con malina
c.512G>A	p.R171H	DSP	-Afecta localización celular y posible mal plegamiento de proteína
c.581C>T	p.T194I	DSP	-Afecta localización celular y posible mal plegamiento de proteína -Disminuye interacción laforina-R5 -Disminuye interacción laforina-laforina -Afecta interacción con malina
c.718G>A	p.G240S	DSP	-Disminuye interacción laforina-R5 -Disminuye interacción laforina-laforina
c.835G>A	p.G279S	DSP	-Afecta localización celular -Elimina afinidad por glucógeno -Disminuye actividad fosfatasa -Disminuye interacción laforina-R5
c.878>T	p.Q293L	DSP	-Afecta localización celular y posible mal plegamiento de proteína -Elimina afinidad por glucógeno -Disminuye actividad fosfatasa -Disminuye interacción laforina-R5 -Afecta interacción con malina
c.880T>A	p.Y294N	DSP	-Afecta localización celular y posible mal plegamiento de proteína -Elimina afinidad por glucógeno -Disminuye actividad fosfatasa -Disminuye interacción laforina-R5 -Afecta interacción con malina
c.902C>T	p.P301L	DSP	-Elimina afinidad por glucógeno -Disminuye actividad fosfatasa -Disminuye interacción laforina-R5 -Disminuye interacción laforina-laforina
c.929T>G	p.L310W	Fuera de DSP	-Afecta localización celular y posible mal plegamiento de proteína -Afecta la propiedad de heterodimerización entre las isoformas de laforina

2.5.4.-*NHLRC1* (*NHL Repeat Containing 1*)

También conocido como *EPM2B* (*Epilepsy of Progressive Myoclonus type 2 B*), *NHLRC1* está localizado en el cromosoma 6p22.3 y tiene un tamaño de 2.13kbp. Constituido por un exón que codifica a una ligasa de ubiquitina tipo E3 llamada malina (GENATLAS).

2.5.4.1.- Mutaciones en *NHLRC1*

Se han reportado 4 SNPs y 56 mutaciones en el gen *NHLRC1*, sustituciones de un nucleotido representan el 67%, las deleciones un 21% y las inserciones un 8%. De manera similar al gen *EPM2A*, sólo se han reportado mutaciones en la región codificante de *NHLRC1* (The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database, 2013).

2.5.5.- Malina

Es una proteína de 395 aminoácidos, que en el extremo amino terminal contiene el dominio Ring, con actividad ligasa de ubiquitina tipo E3 y en el extremo carboxilo terminal cuenta con 6 dominios repetidos NHL (Ilustración 10) (Romá Mateo, *et al*, 2011). El dominio ligasa de ubiquitina E3 tiene como función la ubiquitinación de proteínas para su degradación por medio del sistema ubiquitin proteasoma. (Hershko, *et al*, 1983). Los seis dominios repetidos de NHL sirven para interactuar con otras proteínas substrato para la ubiquitinación como laforina, proteína de direccionamiento a glucógeno (PTG) y la enzima desramificadora de glucógeno (DBE) (Gentry, *et al*, 2005 y Worby, *et al*, 2008).

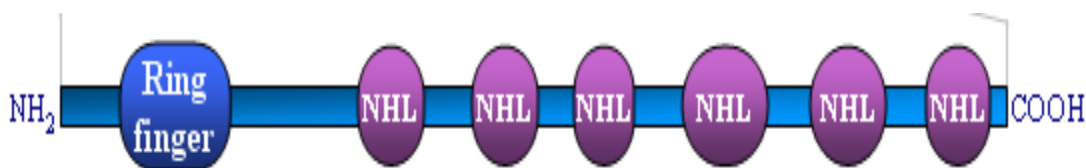


Figura 13 Representación de malina con el dominio Ring en el extremo amino terminal y seis repeticiones del dominio NHL en el extremo carboxilo terminal. (The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database, 2013).

La proteína malina a través de sus dominios NHL es capaz de formar un complejo con laforina y regular las concentraciones de esta última mediante poliubiquitinación para su degradación por el sistema ubiquitina proteasoma (Gentry, *et al*, 2005).

Se ha propuesto que la poliubiquitinación llevada a cabo por las ligasas de ubiquitina E3 como malina, también tenga otra función diferente a la degradación via ubiquitina proteasoma, en un mecanismo nuevo y desconocido. (Ikeda y Dikic, 2008)

2.5.5.1.- Mutaciones en Malina

El 67% de las mutaciones que se han encontrado en malina, corresponden a mutaciones sin sentido y de manera similar a laforina, todas las mutaciones encontradas afectan aminoácidos conservados en todas las proteínas ortólogas de malina, excepto p.C160R (c.478T4C) que se encuentra conservado sólo en la mayoría de los ortólogos (Singh y Ganesh, 2009). Las mutaciones sin sentido afectan la interacción de malina con otras laforina, su localización celular y la actividad de ubiquitina ligasa sobre otras proteínas (Singh y Ganesh, 2009).

2.5.6.- Estudios de correlación genotipo-fenotipo

Aún no se han podido caracterizar fenotipos bien definidos en EL y la variedad de mutaciones en los genes *EPM2A* y *NHLRC1* dificultan la tarea, además se cree que existen otros factores modificadores de la enfermedad tanto ambientales como genéticos. Un ejemplo muy claro es el hecho que se han reportado pacientes afectados por la misma mutación que muestran diferencias en la edad de inicio de la enfermedad e incluso esta diferencia es evidente en pacientes afectados de una misma familia. (Gómez-Abad, *et al*, 2007).

Sin embargo, se han propuesto subfenotipos en los cuales se ha encontrado una relación entre las mutaciones y algunas características clínicas en diversos pacientes.

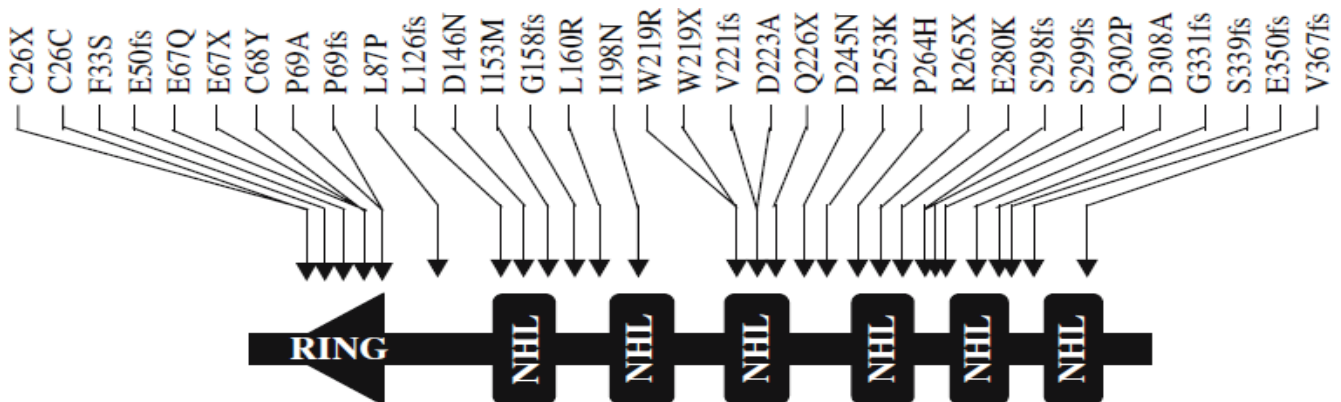


Figura 14 Localización de las mutaciones más comunes en malina y su frecuencia (número de familias reportadas con determinada mutación) (Singh & Ganesh, 2009).

Los pacientes con EL afectados por mutaciones en *NHLRC1* muestran un progreso de la enfermedad homogéneo cuando los factores ambientales tienen poca variación, por ejemplo la edad de inicio y de muerte en pacientes con la misma mutación es muy similar, no siendo así en el caso de pacientes afectados por mutaciones en *EPM2A* (Turnbull, *et al*, 2008).

2.5.6.1.- Enfermedad de Lafora Clásica

El subtipo clásico se refiere a la forma que se describe en la sección 2.3.3. Se ha asociado generalmente con mutaciones en parte del exón 2, el exón 3 y principalmente el exón 4 del gen *EPM2A* que afectan al dominio DSP de laforina. Entre las mutaciones que se han relacionado con este subfenotipo están p.R241X, p.R171H, y p.G279S entre las más comúnmente encontradas (Ganesh, 2002)

2.5.6.2.- Enfermedad de Lafora con Deficit Cognitivo de Inicio Temprano.

El segundo subfenotipo descrito, es el déficit cognitivo de inicio temprano, que se diferencia de la forma clásica por presentar dificultades en el aprendizaje durante la niñez y manifestando el síndrome epiléptico entre los 8 y 13 años, con crisis visuales y alucinaciones más frecuentes que en el subtipo clásico, dificultando el diagnóstico de EL en estas etapas confundiendo se con otras epilepsias.

Esta forma de EL está asociada a mutaciones en el exón 1 y parte del exón 2 del gen *EPM2A*, afectando el dominio CBD de laforina. Las mutaciones más comunes y que se han asociado a este subfenotipo son p.Q55X, p.Y86X y p.R108C (Singh y Ganesh, 2009).

2.5.6.3.- Enfermedad de Lafora con Inicio Tardío y Progresión Lenta.

Los pacientes con este subtipo de EL presentan los mismos signos y síntomas que una forma clásica, sin embargo la edad de inicio puede ser hasta después de los 20 años y la muerte hasta después de los 30 años (Ganesh, *et al*, 2006).

A este subfenotipo sólo se han relacionado pacientes afectados por mutaciones en el gen *NHLRC1* y no parecen estar limitadas a un dominio específico en laforina, por ejemplo c.D146N, y p.P69A (Singh y Ganesh, 2009).

2.5.7.- Otros aspectos genéticos

2.5.7.1.- Gen *PPP1R3C*

El gen *PPP1R3C*, con un tamaño de 5.16kbp está localizado en el cromosoma 10q23-q24. Constituido por dos exones codifica para la proteína de direccionamiento a glucógeno (PTG) (GENATLAS).

2.5.7.2.- Polimorfismos en *PPP1R3C*

A la fecha se han identificado cerca de 160 SNPs a lo largo del gen *PPP1R3C*, y dos de estas variantes, c.746A>G y c.-50T>C, han tenido relevancia en el estudio de la Enfermedad de Lafora. La variante c.746 A>G provoca la sustitución de asparagina por serina en la posición 549 (p.N249S), esta variante fue detectada en una paciente de 43 años con diagnóstico clínico e histopatológico de EL, por lo que se relacionó con un fenotipo de menor severidad. Posteriormente, estudios funcionales de la proteína mutante p.N249S, mostraron que no era capaz de defosforilar eficientemente a GS disminuyendo significativamente su efecto glucogenogénico y por lo tanto la acumulación de glucógeno. Además no interfería con su capacidad para interactuar con el complejo laforina-malina y podía ser degradado por este (Guerrero, *et al*, 2011).

La variante c.-50 T>C se encuentra localizada en la región promotora del gen y el estudio *in vitro* reveló que tenía un efecto de disminución en la expresión de PTG y sugiere que también resulte en menor síntesis y acumulación de glucógeno (Guerrero, *et al*, 2011).

2.5.7.3.- Proteína de direccionamiento a glucógeno (PTG)

Es una proteína de 292 aminoácidos, tiene la función de subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 (PP1) y se expresa en diversos tejidos que son sensibles a la insulina, como el cerebro, músculo esquelético, hígado y tejido adiposo (Gasa, *et al*, 2000).

PTG tiene la capacidad de unirse a diversas proteínas mediante sitios distintos: PP1 se une a PTG mediante un sitio que se encuentra entre los residuos 58-70, la molécula de glucógeno se une a un sitio entre los residuos 145-159 mientras que los sustratos de PP1 se interactúan con un sitio entre los residuos 221 y 231.. En este sentido, GS, GP y PHK interactúan con PTG en el mismo sitio de unión a sustratos de PP1, por lo que no se pueden unir al mismo tiempo (Figura 15). También se ha demostrado que laforina se une a PTG en este mismo sitio y se ha sugerido sea también sustrato de PP1, de modo que podría estar regulada por PP1 a través de PTG (Fernandez-Sanchez, *et al.*, 2003).

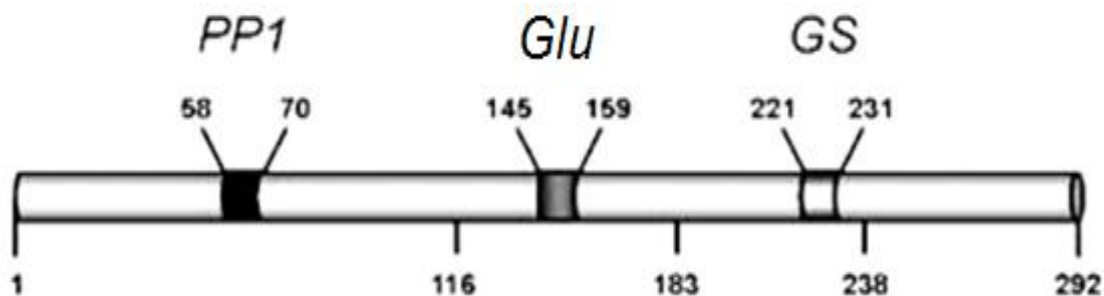


Figura 15 Esquema de PTG que muestra el sitio de interacción con PP1, con el glucógeno (Glu) y con sustratos de PP1, en la imagen ejemplificado por GS (Fernandez-Sanchez, et al., 2003).

La subunidad PTG de la proteína fosfatasa 1, funciona como andamio proteínico y está encargada de unir a la molécula de glucógeno con la PP1. PTG regula a PP1 al dirigirla hacia la molécula de glucógeno y al mismo tiempo se une y colocaliza con PP1 a otras proteínas que son sustrato de PP1 como la GS y la PHK. (Brady, *et al.*, 1997) Éste sería otro punto de regulación en el metabolismo de glucógeno, incrementando el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno por la defosforilación que activa la GS e inactiva la GP (Greenberg, *et al.*, 2006).

3.- Objetivos

- **Objetivo General:**

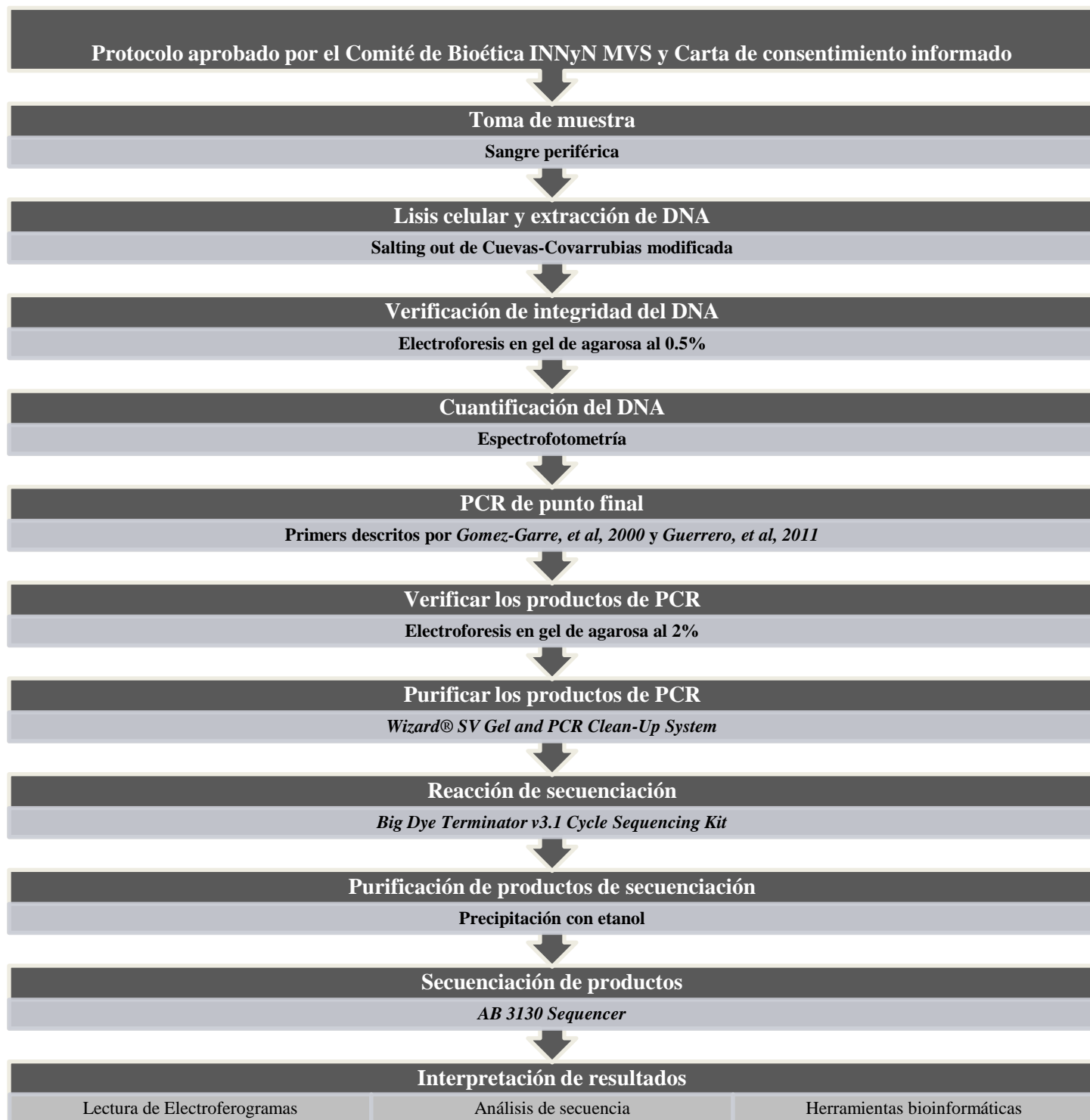
- Realizar el estudio molecular en una familia con probable enfermedad de Lafora por medio de la PCR de punto final y secuenciación directa de los genes *EPM2A* y *NHLRC1* para confirmar el diagnóstico de EL y del gen *PPP1R3C* como un posible gen modificador de la enfermedad.

- **Objetivos Particulares:**

- Amplificar y secuenciar los genes *EPM2A* y *NHLRC1* en 7 integrantes de una familia con probable enfermedad de Lafora con un fenotipo atípico mediante PCR de punto final y secuenciación directa de electroforesis capilar para establecer el diagnóstico molecular de la enfermedad.
- Amplificar y secuenciar dos fragmentos del gen *PPP1R3C* en 7 integrantes de esta familia por medio de PCR de punto final y secuenciación directa, para determinar si la presencia de las variantes c.746A>G y c.-50T>C, o nuevas variantes son modificadores atenuantes de la severidad y retraso en el progreso de la enfermedad de Lafora en esta familia.

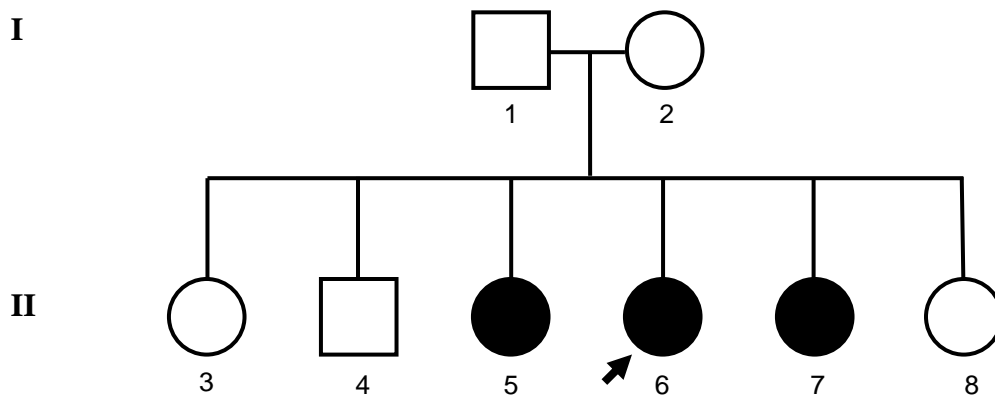
4.- Metodología

4.1.- Diagrama de flujo general



4.2.- Pacientes

Para este trabajo se estudió una familia de 8 integrantes, conformada por ambos padres y 6 hijos como se muestra en el siguiente árbol genealógico:



El caso índice (II-6) fue diagnosticado con epilepsia mioclónica progresiva a los 21 años de edad en la Clínica de Epilepsia de INNyN MVS. En el diagnóstico histopatológico la biopsia de piel mostró cuerpos de Lafora (figura 16).

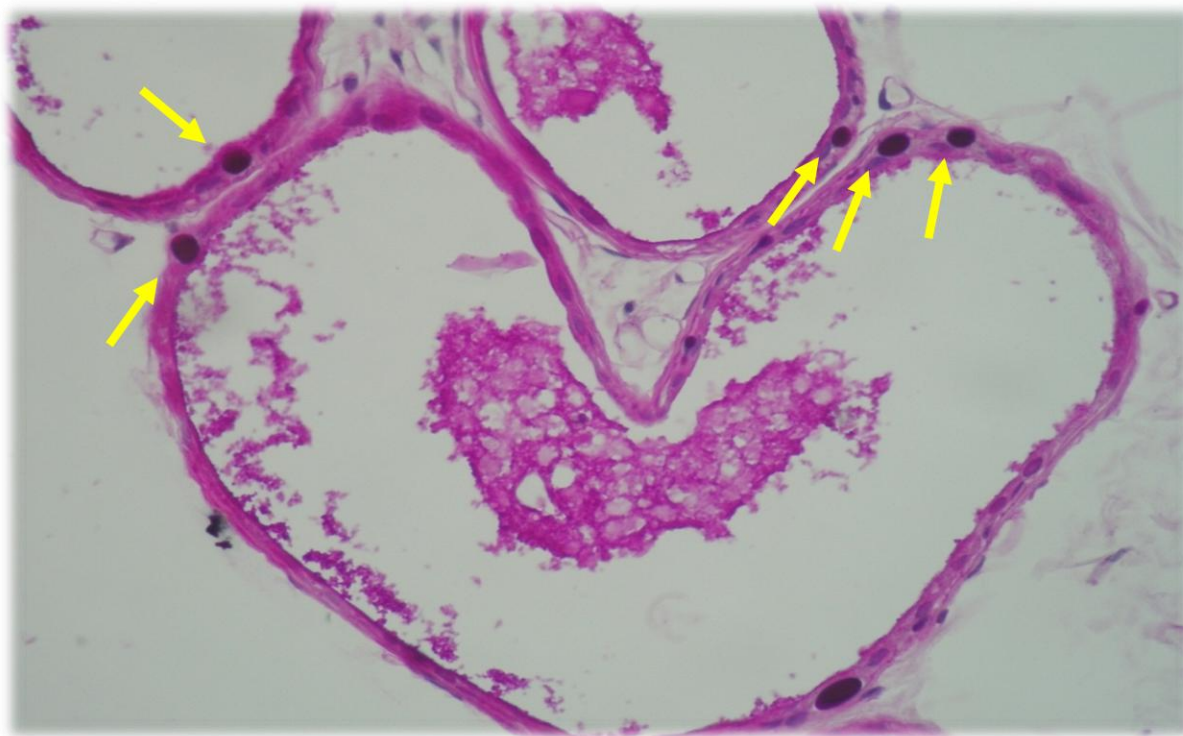


Figura 16 Biopsia de piel axilar con tinción PAS del caso índice, las flechas señalan cuerpos de inclusión PAS+ identificados como cuerpos de Lafora

Posteriormente dos hermanas (II-5 y II-7) comenzaron a presentar signos clínicos de la enfermedad. Ambos padres y dos hermanos (II-4 y II-8) asintomáticos al momento del diagnóstico del caso índice, La hermana mayor (II-3) no se pudo estudiar. Se hizo un estudio clínico a la familia y se proporcionaron los datos contenidos en la tabla 4.

Tabla 4 Datos clínicos de la familia estudiada

Fam.	Edad de inicio	Edad actual	Síntomas	Emb	EEG	IRM	Biopsia tinción PAS
Caso Índice II-6	21	33	CTCG, MS, Aus, Atx, Dem	2	Actividad epileptica de polipunta onda 2-4Hz	Normal	Cuerpos de inclusión PAS+
II-4	----	35	----	----	NR	----	----
II-5	25	34	MS, CTCG, deterioro cognitivo moderado	1	Actividad epileptica de polipunta onda 2-2.5Hz	Normal	Cuerpos de inclusión PAS+
II-7	28	37	MS	2	NR	NR	----
II-8	----	27	----	2	Ondas lentas de 2.5-4hz	NR	----
I-2	----	----	CTCG en remisión	----	NR	----	----
I-1	----	----	----	----	NR	----	----

Abreviaturas: **Fam:** familiar, **CTCG:** crisis tónico-clónicas generalizadas, **MS:** mioclonías, **Aus:** ausencias, **Atx:** ataxia, **Dem:** demencia, **Emb:** embarazos.

Las características clínicas de la familia sugerían que se trataba de una epilepsia mioclónica progresiva, probablemente enfermedad de Lafora, sin embargo era dudoso el diagnóstico debido al inicio tardío y la evolución lenta de la enfermedad, por lo que es referida al Departamento de Genética y Biología Molecular del INNyN MVS para llevar a cabo el diagnóstico molecular.

4.3.- Controles

Se utilizaron muestras de DNA de 100 de sujetos sanos para descartar que las mutaciones encontradas en los pacientes fueran polimorfismos.

Los sujetos estudiados como controles son de origen mestizo-mexicano, con un rango de edad de 19-23 años, edad promedio de 21.19 años. Todos ellos firmaron carta de consentimiento informado.

4.4.- Procedimiento

4.4.1.- Aprobación del protocolo por Comité de Bioética y Carta de consentimiento informado

Este protocolo de investigación fue previamente sometido a aprobación por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía para garantizar que no se violaran los derechos humanos de los pacientes y los sujetos controles. La información proporcionada por los pacientes y controles, así como los resultados derivados del estudio fueron utilizados de manera confidencial, adecuada y con fines de investigación únicamente. Todos los sujetos estudiados firmaron una carta de consentimiento informado, donde se explica en términos generales como se utilizarán estos datos y con qué fin.

4.4.2.- Toma de muestra

La familia es originaria del estado de Guanajuato, en la localidad de Puerto Nieto. Se realizó una toma de sangre periférica a todos los integrantes de la familia y sujetos control en tubos de vacío tipo Vacutainer con ACD (citrato – dextrosa).

4.4.3.- Lisis celular y extracción de DNA

Se llevó a cabo de acuerdo a la Técnica de Cuevas-Covarrubias modificada de Buffone G J, 1985; Miller S A, 1988; Maniatis F, 1982.

Esta técnica utiliza buffer de lisis TTS (Tris – Triton – Sacarosa) para obtener los linfocitos libres de eritrocitos de la muestra de sangre periférica. Después se realiza una lisis de linfocitos con SDS al 10% y *salting out* de proteínas con NaCl saturado. Las proteínas precipitadas son separadas por extracción orgánica con una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). El DNA de la fase acuosa es precipitado con etanol absoluto y lavado con etanol al 70%. Finalmente el DNA se seca por centrifugación al vacío y es resuspendido en agua inyectable.

4.4.4.- Verificación de integridad del DNA

Al DNA genómico extraído se realiza una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.5 % con buffer TBE al 0.5x, posteriormente se tiñe con bromuro de etidio y se visualiza en un transiluminador de luz UV para verificar si hay degradación del material genético. Se debe observar una sola banda de alto peso molecular sin barrido en el carril, lo que indica que el DNA no se encuentra degradado.

4.4.5.- Cuantificación de DNA

Se utilizó espectrofotometría en un equipo tipo nanodrop. El equipo fue calibrado de acuerdo a las especificaciones del fabricante utilizando un blanco de agua destilada antes de realizar las mediciones. Para una medición se depositaban 2.5µl de la muestra en el lector. El espectrofotómetro realiza lecturas a longitudes de onda de 260nm y 280nm por medición y se realizaban tres mediciones por muestra para obtener un promedio de la concentración y la pureza.

La lectura a 260nm se realiza para la cuantificación del DNA, ya que el DNA absorbe a esta longitud de onda. Las proteínas absorben a una longitud de onda de 280nm, por lo que esta lectura se realiza para obtener la pureza del DNA, mediante una relación entre la absorbancia de una muestra a 260nm y su absorbancia a 280nm. El resultado de este cociente debe estar en un rango de 1.8 a 2.0 para una muestra con buena pureza. Comúnmente también se utiliza la relación 260:230 para determinar si el DNA está contaminado con otros compuestos orgánicos o algunas sales. Idealmente este rango debe ser superior a 1.5 y máximo 1.8.

Al obtener la concentración de la muestra de DNA se realizaron diluciones de las muestras a una concentración de 100ng/µl según la siguiente fórmula

$$\text{Vol de muestra calculado } [\mu\text{l}] = \frac{(100\text{ng}/\mu\text{l}) (50\mu\text{l})}{\text{concentración de la muestra } [\text{ng}/\mu\text{l}]}$$

El volumen calculado se lleva a un volumen total de 50µl con agua inyectable.

4.4.6.- PCR de punto final

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica de biología molecular que sirve para amplificar fragmentos específicos de DNA en relativamente poco tiempo. Esta reacción requiere de dos oligonucleótidos, cebadores o *primers* de entre 17 y 30 pb que se localizan en los extremos del fragmento que se desea amplificar. Cada uno de ellos se unirá a una cadena de DNA distinta y a partir de ahí la polimerasa se localiza en el extremo 3' del *primer* e inicia la reacción añadiendo nucleótidos en sentido 5' a 3'. Este proceso consta de tres etapas, desnaturalización, alineación y polimerización o extensión:

- 1.- Desnaturalización: sirve para separar las dos cadenas del DNA que se desea amplificar, para este paso usualmente se utilizan temperaturas de 94 o 95°C.
- 2.- Alineación en la cual se ajusta la temperatura óptima en la que el cebador hibrida con la secuencia complementaria. Generalmente esta temperatura puede variar, encontrándose

idealmente en un rango entre 45-60°C dependiendo del porcentaje de CG y TA en el *primer*.

3.- Extensión o elongación de la cadena en el que se lleva la reacción a la temperatura óptima para la actividad de la polimerasa. La polimerasa más comúnmente usada es Taq polimerasa y tiene su pico máximo de actividad a 72°C. El tiempo de la extensión depende del tamaño del fragmento a amplificar y depende de la velocidad de la polimerasa para añadir nucleótidos a la cadena. La velocidad de la Taq polimerasa es de entre 500 a 1000pb min⁻¹.

Estas tres etapas son consecutivas en este orden desnaturalización-alineación-extensión y todo el proceso se llama ciclo. Generalmente se utilizan de 20 a 30 ciclos de PCR para amplificar fragmentos de DNA en cantidad suficiente para una gran diversidad de técnicas de biología molecular

La reacción debe contener desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), iones Mg²⁺, buffer de pH, una polimerasa, en este caso se utilizó Taq polimerasa. Estos componentes se encuentran ya mezclados en un reactivo llamado Master Mix. Los *primers* son añadidos dependiendo del fragmento que se desea amplificar, DNA genómico de la muestra de interés y agua estéril libre de nucleasas y proteasas para ajustar el volumen de la reacción y la concentración óptima de los componentes de la mezcla (Reece, 2004).

También se pueden utilizar aditivos en la PCR como el dimetilsulfóxido (DMSO), el cual ayuda a desestabilizar la doble hélice y evitar que se formen estructuras secundarias en las cadenas de DNA que puedan competir con los sitios de hibridación de los *primers*, logrando así mayor especificidad en las reacciones de PCR. (Hardjasa, 2010).

Por medio de esta técnica se amplificaron los cuatro exones del gen *EPM2A*, el único exón del gen *NHLRC1* en 4 fragmentos y los dos fragmentos del gen *PPP1R3C* en la familia afectada por EL. Únicamente se amplificó el exón 4 del gen *EPM2A* en los sujetos control.

4.4.6.1.- Descripción de Primers

- Para los cuatro exones del gen *EPM2A* se utilizaron los primers descritos por Gómez-Garre, *et al.* 2000.

Exón	Primer Forward	Primer Reverse	Tamaño del producto
1	5' TCGCCTTCCGCTTTGGG3'	5' AGGGACGCGGGCAAAAAGC3'	431pb
2	5' GTATCAGCTGCTTGAGGATA3'	5' CTTGTCCTACTTCTATGCCTA3'	291pb
3	5' CTACATGTTTTATGCAGCTCC3'	5' ATTTATTCCATTTCTACCATTTCAT3'	431pb
4	5' GGCGGTATCTGGTGGTTTAG3'	5' GGCTCCTTAGGGAAATCAGG3'	377pb

- Para los cuatro fragmentos del gen *NHLRC1* se utilizaron los primers descritos por Chan, *et al.* 2003.

Exón	Primer Forward	Primer Reverse	Tamaño del producto
1	5' TGACCATGACTGTGACCGTGA3'	5' GCTGAGCCCAGGAGCTCTATG3'	365pb
2	5' GGTGCTGCACCTCATAGAGCT3'	5' GACAACCACATGGCAGTCGTT3'	316pb
3	5' ATGTCACCATCACCAACGACT3'	5' AGGTATCCACTTGGCCGACAA3'	393pb
4	5' TCAAGTATGCAGCTTGTCGGC3'	5' AACAATTCATTAATGGCAGCACTAGTG3'	351pb

- Para los dos fragmentos del gen *PPP1R3C* se utilizaron los primers descritos por Guerrero, *et al.*, 2011.

Frag.	Primer Forward	Primer Reverse	Tamaño del producto
1	5' GTGCTTGGGAGCAGATAAGC 3'	5' GAACCTACCTGGTGCAGCTC 3'	400pb
2	5' CTTACCCCTGTCATTCCAA 3'	5' CTCGGACTGCCAAAGATTGT 3'	291pb

4.4.6.2.- Mezcla de Reacción

- Las condiciones de la mezcla de reacción de la PCR de los 4 exones del gen *EPM2A* y los cuatro fragmentos del gen *NHLRC1* se realizó como sigue:

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)	Concentración final
Master Mix	2x	10	1x
Primer Forward	100ng/µl	1	5ng/µl
Primer Reverse	100ng/µl	1	5ng/µl
DMSO	-----	1	5%
Agua	-----	6	-----
DNA genómico	100ng/µl	1	5ng/µl
Volumen total		20	

- Para la mezcla de reacción de la PCR de los 2 fragmentos del gen *PPP1R3C* fue la siguiente:

Reactivo	Concentración	Volumen (μl)	Concentración final
Master Mix	2x	10	1x
Primer Forward	100ng/μl	1	5ng/μl
Primer Reverse	100ng/μl	1	5ng/μl
Agua	-----	7	-----
DNA genómico	100ng/μl	1	5ng/μl
Volumen total		20	

4.4.6.3.- Gradiente de temperatura de alineación

Para determinar la T_m de cada par de *primers* se realizó un gradiente de temperatura.

Se preparaban 12 reacciones de PCR ajustándose a un volumen final de 5μl y manteniéndose la proporción de reactivos como se describe en la sección 4.4.6.2 utilizándose una misma muestra de DNA control para todas las reacciones de cada par de *primers*.

Se determinó la temperatura teórica de alineación de cada par de *primers* de acuerdo a la ecuación: $T_m = 2AT + 4GC$. En un termociclador se realizó un gradiente de temperatura que comprendiera la T_m teórica para determinar la T_m óptima experimental.

El programa de PCR que se utilizó fue el que se encuentra predeterminado en el termociclador y se ajustó el tiempo en la etapa de extensión de acuerdo al fragmento. En cada uno de los 12 pozos del termociclador se establecieron diferentes temperaturas de T_m a las que serán sometidas las 12 reacciones de PCR para cada par de *primers* respectivamente.

Como ejemplo se presenta el gradiente del exón 1 del gen *EPM2A*:

- Mezcla de reacción:

Reactivo	Concentración	Volumen (μl)	Concentración final
Master Mix	2x	2.5	1x
Primer Forward	100ng/μl	0.25	5ng/μl
Primer Reverse	100ng/μl	0.25	5ng/μl
DMSO	-----	0.25	5%
Agua	-----	1.5	-----
DNA genómico	100ng/μl	0.25	5ng/μl
Volumen total		5	

Tm teórica *primer Forward EPM2A exón 1*: 5' TGCGCTTCCGCTTTGGG3'

○ $Tm = 2(6) + 4(11) = 56^{\circ}C$

Tm teórica *primer Reverse EPM2A exón 1*: 5' AGGGACGCGGGCAAAAAGC3'

○ $Tm = 2(7) + 4(12) = 62^{\circ}C$

Se seleccionó un gradiente de temperatura de 56 a 62 °C y se verificó en una electroforesis en gel de agarosa al 2%, con un marcador de peso molecular (Figura 17).

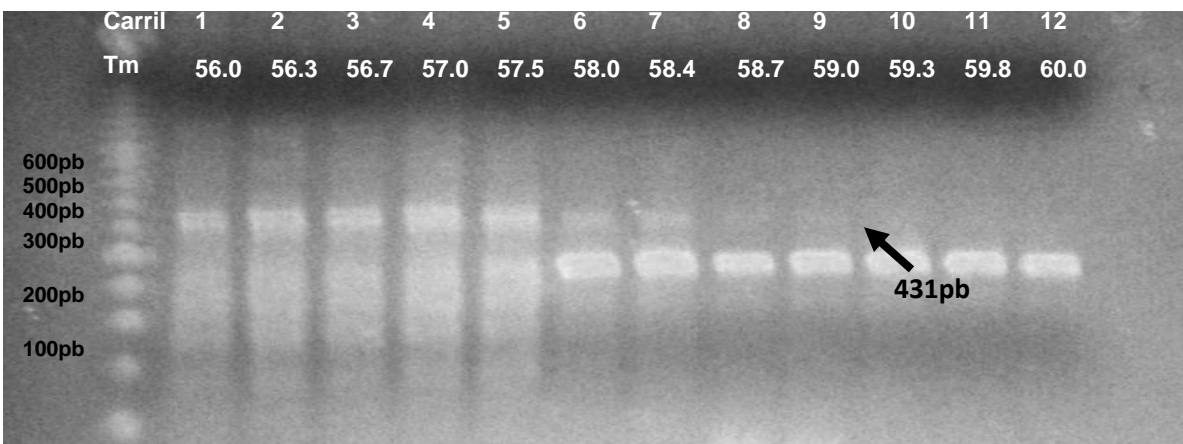


Figura 17 Gradiente de Tm para el exón 1 del gen *EPM2A*. Los carriles 1-7 muestran barrido en la amplificación que demuestra alineamientos inespecíficos, la Tm elegida fue la del carril 9 correspondiente a 59°C ya que a esta temperatura se han minimizado los amplicones inespecíficos

4.4.6.4.- Condiciones utilizadas en los ciclos de PCR

- Gen *EPM2A* Exón 1

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	59	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	45 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *EPM2A* Exón 2

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	52	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	30 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *EPM2A* Exón 3

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	55	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	45 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *EPM2A* Exón 4

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	57	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	45 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *NHLRC1* fragmento 1

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	59	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	45 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *NHLRC1* fragmento 2

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	52	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	30 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *NHLRC1* fragmento 3

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	55	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	45 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *NHLRC1* fragmento 4

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	57	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	45 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *PPP1R3C* exón 1

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	64	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	30 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

- Gen *PPP1R3C* exón 2

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	
Desnaturalización	95	30 segundos	
Alineación	60	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72	30 segundos	
Elongación final	72	7 minutos	

4.4.7.- Verificación de Productos de PCR

Se utilizó electroforesis para verificar que se haya llevado a cabo la reacción de PCR en todas las muestras amplificadas. La electroforesis fue horizontal en gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 0.5x utilizándose un marcador de peso molecular para identificar al fragmento amplificado. Se dejó correr aproximadamente 40 minutos a 100 V. El gel de agarosa fue teñido en una solución de bromuro de etidio y fue visualizado en transiluminador UV. (Figura 18)

Las muestras que mostraban amplicones inespecíficos fueron cortadas del gel con ayuda de una navaja de bisturí para garantizar que los fragmentos inespecíficos no interfirieran con la secuenciación del fragmento deseado.

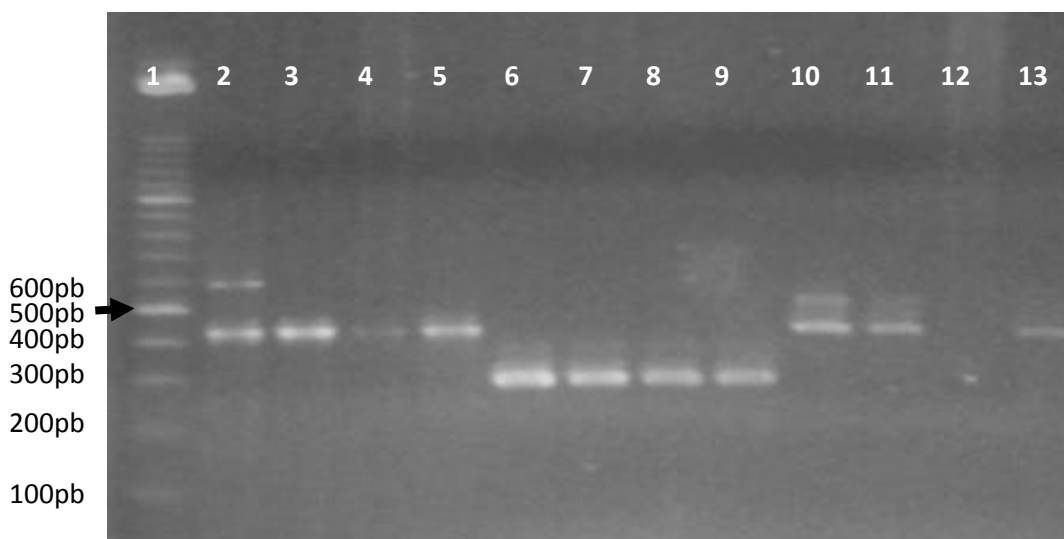


Figura 18 Fragmentos amplificados de los exones 1, 2 y 3 del gen *EPM2A*; en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular; los carriles 2-5 contienen fragmentos amplificados del exón 1 (431pb); los carriles 6-9 contienen fragmentos del exón 2 (291pb); los carriles 10, 11 y 13 contienen fragmentos del exón 3 (431pb). En los carriles 2, 6, 7, 10 y 11 muestran amplicones inespecíficos. En el carril 13 la muestra no amplificó.

4.4.8.- Purificación de Productos de PCR

Todos los productos de PCR fueron purificados mediante el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* para obtener únicamente los fragmentos deseados de DNA amplificados para su secuenciación.

Este kit utiliza unas columnas en donde se agrega la muestra con productos de PCR a purificar y con ayuda del reactivo *Membrane binding solution* los fragmentos de DNA se unen a la membrana contenida en la columna. El remanente de la solución era removida por centrifugación y posteriormente el DNA adsorbido en la membrana de la columna era lavado dos veces con el reactivo *Membrane washing solution* el cual remueve *primers*, sales y dNTP's no incorporados dejando intacto el DNA adsorbido en las membranas. Finalmente se eluye el DNA de la membrana con 25µl de agua inyectable.

Los fragmentos que fueron cortados del gel de agarosa eran purificados con el mismo kit, pero se agregaba el reactivo *Membrane binding solution* al corte de agarosa y se incubaba a 60°C hasta fundir la agarosa. Posteriormente la muestra fundida era agregada a las columnas y se seguía el mismo procedimiento anterior.

4.4.9.- Reacción de Secuenciación

Para la secuenciación de los fragmentos amplificados se utilizó el kit comercial *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* que está basado en una reacción de Sanger.

Este método de secuenciación se basa en la incorporación de una mezcla de 2',3' di-desoxinucleótidos trifosfatados (ddNTP's) marcados con un fluoróforo y dNTP's en una reacción de PCR. Durante esta reacción se replica sólo una de las dos cadenas del DNA

molde y la incorporación de los ddNTP's resulta en cadenas de distintos tamaños al detenerse la elongación de la cadena por la falta del grupo OH- en la posición 3' del ddNTP's. Cada ddNTP está marcado con un fluoróforo distinto, por lo que cada fragmento que termine con un ddNTP diferente emitirá fluorescencia a una longitud de onda distinta.

Los fragmentos obtenidos en esta reacción de secuenciación son sometidos a una electroforesis capilar que separará cada uno de estos fragmentos por su tamaño y la longitud de onda que emita el fluoróforo de los ddNTP's incorporados al final de cada fragmento será detectado e interpretado por el equipo de secuenciación dando como resultado un electroferograma con picos de distintos colores que representan a cada una de las bases que se encuentren en la secuencia de DNA.

4.4.9.1.- Mezcla de reacción para llevar a cabo la secuenciación

La reacción de secuenciación de los 4 exones amplificados del gen *EPM2A* y los 4 fragmentos del gen *NHLRC1* se realizó como sigue:

Reactivo	Volumen (μl)
Big Dye	1
Primer Forward	1
Buffer de secuencia	3.5
DMSO	1
Agua	11
Producto de PCR	2.5
Volumen total	20

La mezcla de reacción para la reacción de secuenciación de los 2 fragmentos amplificados del gen *PPP1R3C* fue la siguiente:

Reactivo	Volumen (μl)
Big Dye	1
Primer Forward	1
Buffer de secuencia	3.5
Agua	12
Producto de PCR	2.5
Volumen total	20

4.4.9.2.- Condiciones de los ciclos de PCR para la reacción de secuencia

Las muestras preparadas para secuenciar cada uno de los 4 exones del gen *EPM2A*, los cuatro fragmentos del gen *NHLRC1* y los dos fragmentos del gen *PPP1R3C* se sometieron a las siguientes condiciones en un termociclador:

	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	96	30 segundos	
Desnaturalización	95	10 segundos	
Alineación	50	10 segundos	25 ciclos
Elongación	60	4 minutos	
Elongación final	72	1 minuto	

4.4.10.- Purificación de productos de secuenciación

Los productos obtenidos por la reacción de secuenciación se purificaron mediante precipitación alcohólica.

En esta técnica a la reacción de secuenciación se añade isopropanol al 75% y se dejó reposar 40 minutos, seguido de una centrifugación a 11000 r.p.m. durante 20 minutos. Posteriormente se lavo con etanol al 75% y se centrifugo a 11000 r.p.m. durante diez minutos. La muestra se secó por centrifugación al vacío y se resuspendieron en formamida.

4.4.11.- Secuenciación de Productos

Las muestras resuspendidas fueron cargadas en placas de 96 pozos y desnaturalizadas durante 5 minutos a 95°C, posteriormente se dejaron enfriar gradualmente hasta alcanzar la temperatura del ambiente.

Las muestras fueron analizadas en el secuenciador automático *AB Prism 3130 Sequencer* de Applied Biosystems.

4.4.12.- Interpretación de Resultados

4.4.12.1.- Lectura de Electroferogramas

Los electroferogramas fueron comparados manualmente con las secuencias reportadas en la base de datos *e!Ensemble* (<http://www.ensembl.org>) para los tres genes estudiados en busca de variantes.

4.4.12.2.- Análisis bioinformático

Se realizó un análisis en el software *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) para predecir el posible impacto que tiene el cambio de un aminoácido sobre la función y estructura de la proteína.

Se utilizó el software *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para alineamientos múltiples de la secuencia de la proteína y compararla con sus ortólogos en otras especies para saber el grado de conservación de los aminoácidos a lo largo de la evolución.

5.- Resultados y Discusión

Por los datos clínicos que presentaba la paciente y por lo reportado en la bibliografía acerca de que los pacientes con mutaciones en el gen *NHLRC1* presentan un inicio tardío y progresión lenta de la enfermedad, se comenzó a estudiar este gen, (Tabla 5), sin embargo no se encontraron mutaciones.

Tabla 5 lectura de electroferogramas del gen *NHLRC1*

PACIENTE	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Fragmento 4
II-6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
II-8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
II-5	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
II-7	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
II-4	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
I-1	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
I-2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL

Al estudiar el gen *EPM2A*, se encontraron dos mutaciones en el exón 4 del gen *EPM2A*, c.721C>T que corresponde al cambio de una citosina por una timina en la posición 721 del gen y la mutación c.835G>T, que corresponde al cambio de una guanina por una timina en la posición 835 del gen. Por lo cual, se analizaron las muestras de los familiares de la paciente, encontrándose a tres hermanas (dos de ellas afectadas con las mismas características clínicas y a una hermana que no se valoró clínicamente pero presentaba un electroencefalograma anormal) con la mismas mutaciones. Además, se encontró a un hermano y a la madre portadores de la mutación c.835G>T y al padre con la mutación c.721C>T (Tabla 6).

Tabla 6 Lectura de electroferogramas del gen *EPM2A*

PACIENTE	Exón 1	Exón 2	Exón 3	Exón 4
II-6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	c.721C>T / c.835G>T
II-8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	c.721C>T / c.835G>T
II-5	NORMAL	NORMAL	NORMAL	c.721C>T / c.835G>T
II-7	NORMAL	NORMAL	NORMAL	c.721C>T / c.835G>T
II-4	NORMAL	NORMAL	NORMAL	c.835G>T
I-1	NORMAL	NORMAL	NORMAL	c.721C>T
I-2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	c.835G>T

Para el gen *PPP1R3C* no se encontraron las variantes c.746A>G, c.-50T>C y tampoco nuevas variantes (Tabla 7).

Tabla 7 Resultados de electroferogramas del gen *PPP1R3C*

Paciente	Fragmento 1	Fragmento 2
II-6	Normal	Normal
II-8	Normal	Normal
II-5	Normal	Normal
II-7	Normal	Normal
II-4	Normal	Normal
I-1	Normal	Normal
I-2	Normal	Normal

Se consultó la base de datos (The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutaton and Polymorphism Database, 2013). En donde se encuentran reportadas todas las mutaciones en diferentes poblaciones de los genes *EPM2A* y *NHLRC1*, con el propósito de conocer si eran mutaciones nuevas las encontradas en el exón 4 del gen *EPM2A*. Se encontró que la variante c.721C>T (Figura 19) corresponde a la mutación p.R241X en laforina, se encontró que ya fue reportada en diversos estudios (Minassian, *et al.* 1998; Serratosa, *et al.* 1999; Ganesh, *et al.* 2002).

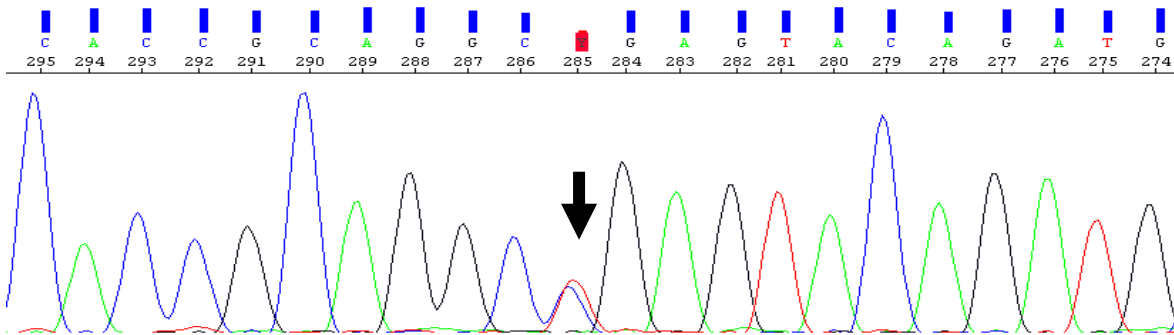


Figura 19 Electroferograma que muestra la mutación c.721C>T en estado heterocigoto indicada por la flecha. Electroferograma obtenido con el software Sequencing Analysis 5.3.

El cambio de citosina por timina en la posición 721 del gen, genera un cambio en el codón CGA el cual codifica para el aminoácido arginina, cambiando al codón TGA el cual corresponde a un codón de paro.

```

EPM2A      711 CACCGAAGGCCGAGTACAGATG
Laforina   237 --T--E--G--R--V--Q--M-
    
```

La mutación p.R241X ha sido previamente reportada en familias de origen español y provoca un paro prematuro que resulta en una proteína trunca con pérdida completa de la función (Singh y Ganesh, 2009). Esta mutación se dice que tiene una alta prevalencia debido a un efecto fundador y a mutaciones recurrentes, esta última se apoya en la

evidencia que esta mutación pueda tener distintos orígenes filogenéticos y esta posición pudiera ser un sitio hot spot (Gómez-Garre, 2000).

La mutación c.835G>T (Figura 20) corresponde a una mutación no sinónima que provoca un cambio de glicina por cisteína en la posición 279 de laforina (p.G279C).

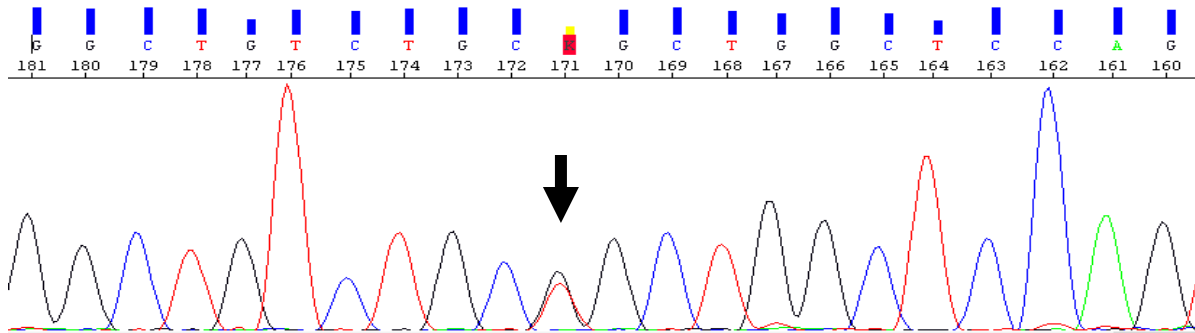


Figura 20 Electroferograma que muestra la mutación c.835G>T en estado heterocigoto indicada por la flecha. Electroferograma obtenido con el software Sequencing Analysis 5.3.

```

EPM2A      825 GGCTGTCTGC GGCTGGCTCCAG
Laforina   275 --A--V--C--G--W--L--Q-
  
```

La mutación p.G279C es una mutación que no se había reportado previamente en otras poblaciones, por lo que aún no se tienen estudios del efecto que esta mutación tiene en la proteína, sin embargo, la posición 279 del aminoácido nos indica que se ubica en el dominio DSP de laforina.

Al no existir reportes previos ni análisis funcionales de la mutación p.G279C en la función de laforina, llevamos a cabo un análisis *in silico* con el programa *Polyphen-2*, el cual nos permite determinar el posible efecto sobre la estructura y la función que provoca el cambio de un aminoácido por otro en la proteína. La mutación p.G279C reveló que es posiblemente dañina. (Figura 21)

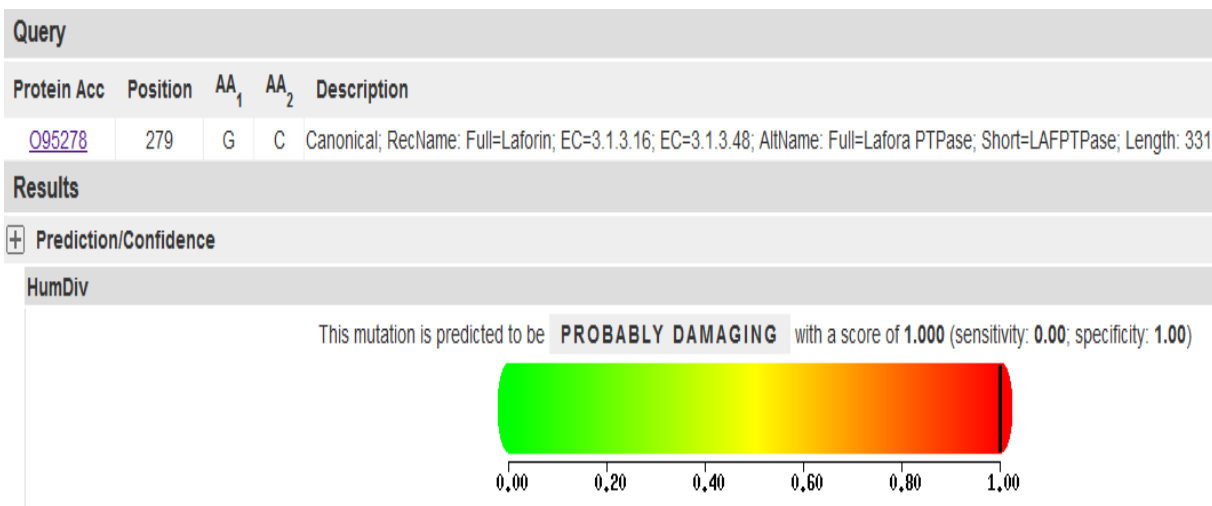


Figura 21 Resultados del análisis en Polyphen-2 del posible efecto del cambio de aminoácido p.G279C en laforina muestra que es probablemente dañina.

El alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína con las de otras especies que llevó a cabo la herramienta Polyphen-2, muestra que la glicina en la posición 279 de laforina se encuentra conservada en la mayoría de los organismos analizados, excepto *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Physcomitrella patens*, *Acaryochloris marina* y *Ostreococcus lucimarinus* (el alineamiento se muestra en la Tabla 8).

Esta herramienta bioinformática comparó ortólogos de laforina mediante un alineamiento múltiple automático de secuencia en diversos organismos como son mamíferos, aves, reptiles, peces, nemátodos, plantas y organismos unicelulares como protozoarios, algas y bacterias. En los únicos organismos que no se encuentra conservada la glicina de esa posición es en nemátodos, plantas, protozoarios, algas y bacterias, por lo que podemos pensar que la función de laforina en estos organismos es diferente a la función en vertebrados.

Tabla 8 Alineamiento múltiple de laforina que realizó Polyphen-2

<i>Homo sapiens</i>	VQMLPQAVCLLHALLEKGHIVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVMGWNLRKVQYFLMAKRPVAV--YIDEALARAQE
<i>Sus scrofa</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVRGWNRRKVQYFLLAKRPVAV--YIDEDALARAEE
<i>Rattus norvegicus</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLHYVIGWSLRKVQYFIMAKRPVAV--YIDEALAAQAQQ
<i>Mus musculus</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLHYVIGWNLRKVQYFIMAKRPVAV--YIDEDALAAQAQQ
<i>Loxodonta africana</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVQGWSPRKLQYFLVSKRPVAV--YIDEDALAAQAEH
<i>Monodelphis domestica</i>	VQMLPQAVCLLHGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLKYVMGWNLRKVQYFLMSKRPVAV--YIDEALARAEE
<i>Gallus gallus</i>	IQMLPQAVCLLHGLLQNGHTVYVHCNAGVGRSTAAVS	G	WLKYVMGWSLRKVQYFLASRRPVA--YIDEALIRAED
<i>Anolis carolinensis</i>	VQMLPQAVCLLHGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLKYVLGWNLRKVQYFVASRRAAV--YIDEALVRAEE
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVMGWNLRKVQYFLMAKRPVAV--YIDEDALTRAEA
<i>Cricetulus griseus</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLHYVIGWSLRKVQYFIMAKRPVAV--YIDEALAAQAQE
<i>Myotis lucifugus</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLHYVLGWLKRKVQYFLVAKRPVAV--YIDEDALARAQE
<i>Cavia porcellus</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQFVVGWNLRKVQYFLMAKRPVV--YIDEALTRAQE
<i>Xenopus laevis</i>	IRMLPQAVYLLFGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	FLMYVIGWSLRKVQYFLASRRPVA--YIDEEMINAQE
<i>Xenopus tropicalis</i>	IRMLPQAVYLLFGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	FLMYVIGWSLRKVQYFLASRRPVA--YIDEEMINAQE
<i>Takifugu rubripes</i>	IRMLPQAVFLLYGGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	LLMYVLGWSMRKVQYFVAARRPAV--YIDEALVKAQT
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	VQMLPQAVHLLHGLLRNGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLKYVKGWNVRKVQYFVMTKRPVAV--YIDEALDRAEE
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	VRMLPQAVFLLHGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	LLVYVLGWSLRKAQYFVAARRPAV--YIDEALVQAQA
<i>Oreochromis niloticus</i>	IRMLPQAVFLLHGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	LLMYVLGWTLRKVQYFVAARRPAV--YIDEALVKAEA
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	IRMLPQAVFLLYGGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	LLMYVLGWSMRKVQYFVAARRPAV--YIDEALIKAQT
<i>Danio rerio</i>	IQMLPQAVFLLFGLLENGHSVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	LLMYVFGWKLKRKVQYFLTARRAAV--YIDEALLRARD
<i>Meleagris gallopavo</i>	IQMLPQAVCLLHGLLQNGHTVYVHCNAGVGRSTAAVS	G	WLKYVMGWSLRKVQYFLASRRPVA--YIDEALIRAED
<i>Taeniopygia guttata</i>	IQMLPQAVCLLHGLLQNGHTVYVHCNAGVGRSTAAVS	G	WLRYVMGWSLRKVQYFLASRRPVA--YIDEALNRAEE
<i>Heterocephalus glaber</i>	VQMLPQAVCLLHMLLENGHTVYVHCNAGVGRSAAAVC	G	WLQYVMGWNLRKVQYFLMAKRPVAV--YIDEALGRAQE
<i>Equus caballus</i>	VQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVMGWNLRKVQYFLMAKRPVV--YIDEDA--AGQD
<i>Sarcophilus harrisi</i>	VQMLPQAVCLLHSLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLKYVMGWNMRKVQYFLMSKRPVAV--YIDEALTRAEE
<i>Nematostella vectensis</i>	IENLPQGVYLLHGLLNNGHRVYVHCNAGVGRSTAIVC	G	FLMYVLHWSLAKVQYNYCSKRPVA--FIDGRALITAEK
<i>Branchiostoma floridae</i>	VGVLPAAVYKWLWELKGTGHVYVYCNAGIIRSVLIVC	G	YLYYVLGWPYRVMYVHVCVSRPVA--CVDQDIIILQAEK
<i>Trichinella spiralis</i> *	RILLPQALYLLQSLVSNRHRVYVHCNAGIGRAASLAV	A	YLIHAKRMS TREAEY TLLSKRPKI-----
<i>Toxoplasma gondii</i> *	KIAVANAFLLLGLFQSGHSVYVHCNAGVGRSVAAC	A	FLCFVAVGLDLRKNFLICARRPVA--YDWEKAMKYGIG
<i>Neospora caninum</i> *	KIAVANAFLLLGLVKSQHSVYIHCNAGVGRSVAAC	A	FLCFVAVGLDLRKNFLICARRPVA--YDWEKAMKYGIS
<i>Physcomitrella patens</i> *	SLMLPVAVRLNLSLIGRMKVYVHCTAGINRATLTTV	G	HLTFVQMDLEDAVALVKS CRPVAHPYID-----
<i>Acaryochloris marina</i> *	EEQFDQALKILNRWQRKGVVYVHCLAGVGRSASVCC	L	YVAQKQGLGLEDAIAFV-----
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> *	AKMLPEAVRKLAAFQAMGKRTYVHCTAGINRASLTVV	G	YLTFVKMFDLEAALHAVRTSRPQANPYVVSWEIARAR-

Alineamiento de laforina realizado por Polyphen-2; la glicina en la posición 279 se encuentra marcada por un recuadro vertical; las especies que no conservan este aminoácido están sombreadas; las especies que muestran mayor variabilidad en la secuencia de aminoácidos se marcan con un asterisco.

Se realizó manualmente el alineamiento múltiple de la secuencia de laforina en el software *Clustal Omega*, con proteínas ortólogas en 10 especies de vertebrados.

<i>Homo sapiens</i>	EGRVQMLPQAVCLLHALLEKGHIVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVMGWNLRKVQYFLMA
<i>Pan troglodytes</i>	EGRVQMLPQAVCLLHALLEKGHIVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVMGWNLRKVQYFLMA
<i>Macaca mulatta</i>	EGRVQMLPQAVCLLHALLEKGHIVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLFQYVMGWNLRKVQYFLMA
<i>Mus musculus</i>	EGRVQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLHYVIGWNLRKVQYFIMA
<i>Rattus norvegicus</i>	EGRVQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLHYVIGWSLRKVQYFIMA
<i>Bos Taurus</i>	EGRVQMLPQAVCLLHALLEKGHIVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVMGWNLRKVQYFLVA
<i>Canis lupus familiaris</i>	EGRVQMLPQAVCLLHALLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	WLQYVMGWNLRKVQYFLMA
<i>Gallus gallus</i>	EGRVQMLPQAVCLLHGLLQNGHTVYVHCNAGVGRSTAAVS	G	WLKYVMGWSLRKVQYFLAS
<i>Xenopus laevis</i>	EGRVQMLPQAVYLLFGLLENGHTVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	FLMYVIGWSLRKVQYFLAS
<i>Ictalurus punctatus</i>	EGRVQMLPQAVYLLYGLLENGHSVYVHCNAGVGRSTAAVC	G	LLMYVLGWSLRKVQYFLVA

En el alineamiento que realizamos tomamos en cuenta únicamente especies vertebradas que son evolutivamente más cercanas al humano y el resultado muestra que el residuo de glicina en la posición 279 se encuentra conservado durante la evolución. Estos resultados nos indican que el aminoácido pudiera ser muy importante para la función de laforina y un cambio tiene efectos negativos en la actividad de la proteína (Singh y Ganesh, 2009).

Previamente se reportó una mutación en la posición 279 con un cambio de glicina por serina (c.835G>T) y también se cree que es un sitio hot spot (Gómez-Garre, *et al.*, 2000). El estudio funcional de la proteína mutante p.G279S indica que afecta el dominio fosfatasa, disminuyendo su actividad y anula la capacidad de unirse a glucógeno o poliglucosanos por lo que podemos pensar que la sustitución p.G279S previamente en otros pacientes y la sustitución p.G279C encontrada en esta familia tiene un efecto similar (Fernández-Sánchez, *et al.*, 2003).

Finalmente, se buscó la mutación p.G279C en 100 sujetos sanos como controles de origen mestizo-mexicano, sin embargo no se encontró en ninguno de ellos y tampoco se encontraron nuevos SNP's por lo que descarta a p.G279C como polimorfismo, ya que a lo largo de todos los estudios en el gen *EPM2A* desde el descubrimiento de su participación en el desarrollo de EL en 1997 hasta la fecha, sólo se han encontrado 4 SNPs y sólo uno de ellos (c.163C>A) resulta en un cambio de aminoácido (p.Q55K) sin alterar la función de laforina, (The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutation and Polymorphism Database, 2013). Además el residuo de glutamina en la posición 55 no se encuentra conservado en todas las especies.

La mutación p.G279C modifica el dominio DSP de laforina y si este dominio es alterado, podría afectar su capacidad para eliminar el exceso de fosfato que se acumula durante los numerosos ciclos de biosíntesis y degradación del glucógeno, disminuyendo su solubilidad resultando en acumulación y la formación de cuerpos de Lafora (Roach, 2011).

Otro estudio, ha propuesto que la actividad fosfatasa de laforina también tenga como sustratos a otras proteínas involucradas en el metabolismo de glucógeno, entre ellas GSK3 que puede inactivar a la GS evitando la acumulación de glucógeno (Lohi, *et al.*, 2005).

Las mutaciones sin sentido en laforina también han mostrado tener efectos sobre el correcto plegamiento de la proteína y su alteración tendría un gran impacto sobre la interacción con otras proteínas como malina, GSK3 y PTG. También afectaría la interacción laforina-laforina disminuyendo en gran medida la actividad fosfatasa que tiene en homodímero (Dubey y Ganesh, 2008).

Las mutaciones afectarían la función del complejo laforina-malina y por lo tanto sería incapaz de eliminar proteínas defectuosas o de vida corta, que terminarían acumuladas en el citoplasma de las neuronas y se ha sugerido que esta agregación de proteínas está relacionada con muerte celular (Delgado-Escueta, 2007).

La población Mestizo Mexicana esta formada por una mezcla de nativos Americanos con Españoles principalmente, por lo cual no es sorprendente encontrar la mutación R241X en esta familia y esto apoyaría la hipótesis de un efecto fundador propuesto por Ganesh (2002).

La presencia de dos alelos mutantes distintos en los pacientes afectados conforman un genotipo heterocigoto compuesto y esta forma se ha reportado frecuentemente en otros pacientes con EL, sin diferencia en la presentación de la enfermedad con respecto a los pacientes con genotipo homocigoto (Delgado-Escueta, 2007).

Sin embargo, en la familia estudiada se observa que hay tres pacientes afectados por EL que presentaban un fenotipo atípico de EL, con una edad de inicio de la enfermedad que fue variable: a los 21 años en el caso índice (II-6), a los 25 y 28 años en dos hermanas (II-5 y II-7 respectivamente), además otra hermana (II-8) con actividad epiléptica en el EEG que aún no tiene síntomas de la enfermedad pero se espera que presente otros signos de la enfermedad en el futuro. El caso índice a la edad de 33 años ya muestra signos de ataxia y demencia moderada, pero que no es incapacitante, a diferencia de lo que se esperaría dentro de los primeros años de la enfermedad, además se puede pensar que por la evolución lenta en estos pacientes, el desenlace fatal de la enfermedad se retrase aún más (Serratos y Giraldez, 2010).

El caso índice (II-6) y las pacientes II-8, II-5 y II-7 (hermanas) tienen un genotipo heterocigoto compuesto. El padre (I-1) es portador de la mutación p.R241X y los familiares I-2 y II-4 (madre y hermano respectivamente) son portadores de la mutación p.G279C. El árbol genealógico con los genotipos se muestra en la figura 22.

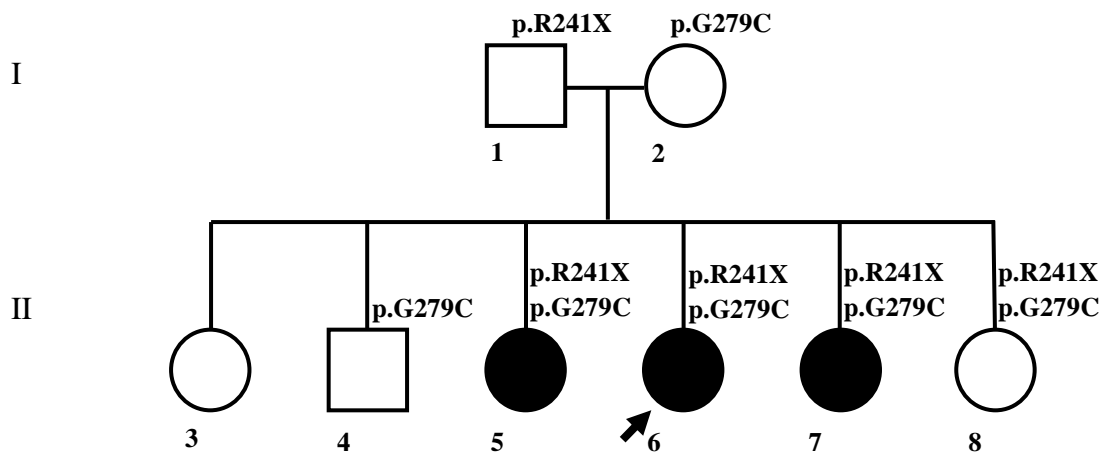


Figura 22 Arbol genealógico con genotipos

Esta edad de inicio variable entre miembros de una misma familia, se ha reportado en otros casos de EL y nos sugiere que el mecanismo patológico es muy complejo (Baykan, *et al.*, 2005). Además la edad de inicio en todos los hermanos fue por arriba de los 21 años y se considera tardía con respecto a la edad de inicio típico, presentándose en un rango de entre los 12 a los 18 años de edad (Banerjee, *et al.*, 2011).

El genotipo heterocigoto compuesto p.R241X / p.G279C debería corresponder con un fenotipo de EL tipo clásica. Sin embargo tiene mayor similitud con un fenotipo de inicio tardío y progresión lenta, que está asociado a mutaciones en el gen *NHLRC1* (Singh y Ganesh, 2009).

Esta discrepancia se podría explicar por la participación de genes modificadores de la enfermedad y el más representativo hasta la fecha podría ser el gen *PPP1R3C* que codifica para PTG. El gen *PPP1R3C* surgió como el primer candidato responsable de un aminoramiento en la severidad de la enfermedad (Singh y Ganesh, 2012).

Decidimos buscar variantes o mutaciones en el gen *PPP1R3C* como gen modificador en el curso de la enfermedad en esta familia teniendo como antecedente un estudio en ratones DKO para laforina y se encontró que PTG disminuye la acumulación de cuerpos de Lafora y también la neurodegeneración llevando a una mejoría considerable de la epilepsia mioclónica progresiva en estos ratones (Turnbull, *et al.*, 2011).

El grupo de Guerrero y colaboradores reportó dos variantes en *PPP1R3C* que se relacionan con dos pacientes de EL por mutaciones en el gen *NHLRC1*, que tenían un subfenotipo de inicio tardío y progresión lenta (Guerrero, *et al.*, 2011).

Sin embargo, la secuenciación de *PPP1R3C* en la familia estudiada reveló que no son portadores de ninguna variante nueva, por lo que deben existir otros genes que interactúen directamente con *EPM2A* y sean responsables de retrasar el inicio de la enfermedad y aminorar la severidad de los síntomas en esta familia.

La interrupción de la interacción con malina podría resultar en hiperactividad glucogenogénica de PTG y GS por la incapacidad de degradarlas vía ubiquitina proteasoma (Worby, *et al.*, 2008).

Consultamos el software bioinformático y base de datos STRING 9.1 que nos permite ver la red de interacciones intergénicas de *EPM2A* y encontramos que además de interactuar con *NHLRC1* y *PPP1R3C*, también tiene interacción con otros genes cuyas proteínas tienen actividad muy estrechamente relacionada entre sí para regular el metabolismo de glucógeno como el gen *PRKAB2* de la cinasa dependiente de AMP (AMPK), el gen *GSK3B* de la subunidad 3 β de la glucógeno sintasa cinasa y el gen *EPM2AIP1* que codifica para una proteína de interacción con laforina de función aún desconocida, entre otros. (<http://string-db.org/>) Todos estos genes podrían ser estudiados posteriormente como posibles genes

modificadores de la enfermedad de Lafora en esta u otras familias que presenten fenotipos diferentes a los reportados. (Figura 23)

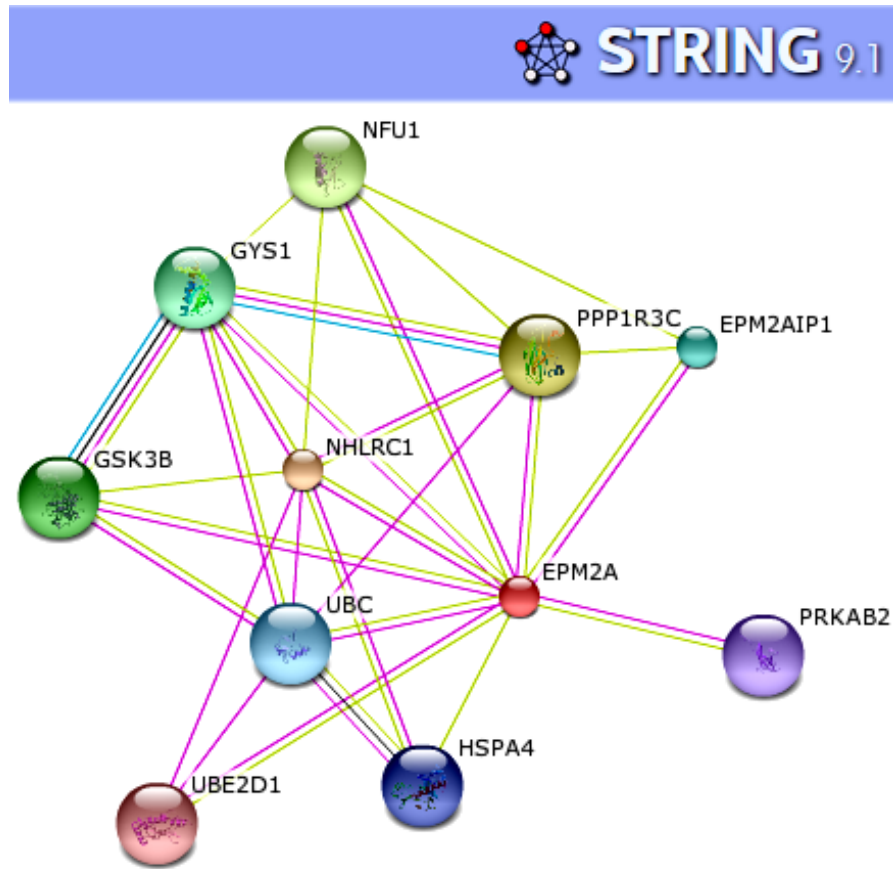


Figura 23 Red de interacciones del gen *EPM2A* que se conocen hasta el momento.(<http://string-db.org/>)

6.- Conclusiones

- Se determinó que la enfermedad de Lafora de inicio tardío y progresión lenta en esta familia es causada por mutaciones en el exón 4 del gen *EPM2A*, lo cual contradice a lo encontrado en estudios previos de asociación genotipo-fenotipo.
- El genotipo de los integrantes afectados en esta familia es de tipo heterocigoto compuesto por las mutaciones p.R242X y p.G279C.
- La mutación p.G279C fue originada en esta familia por un posible efecto hot spot y modifica el dominio DSP de laforina con efectos negativos sobre su actividad como fosfatasa y también sobre las interacciones con otras proteínas.
- La mutación p.R241X que se había reportado previamente en otras familias produce una proteína trunca con pérdida completa de la función. El origen de la mutación en esta familia podría ser debido a un efecto fundador por un posible ancestro de origen español.
- No se encontraron polimorfismos ni mutaciones en el gen *PPP1R3C*, por lo que se descarta su participación como gen modificador de la enfermedad en esta familia y se propone seguir la búsqueda de genes modificadores.
- Es el primer estudio Molecular de la Enfermedad de Lafora en México

7.- Referencias

- Al Otaibi, S., Minassian, B., Ackerley, C., Logan, W., & Weiss, S. (2003). Unusual Presentation of Lafora's Disease. *J Child Neurol*, 18, 499-501.
- Andrade, D. M., Turnbull, J., & Minassian, B. (2007). Lafora disease, seizures and sugars. *Acta Myol*, XXVI, 83-86.
- Banerjee, M., Kumar, A., Ghosh, M., & Chakraborty, S. (2011). Lafora Disease: Progressive Myoclonic Epilepsy. *Child and Newborn J*, 15 (4), 127-129.
- Baykan, B., Striano, P., Gianotti, S., Bebek, N., Gennaro, E., Gurses, C., y otros. (2005). Late-onset and Slow-progressing Lafora Disease in Four Siblings with EPM2B Mutation. *Epilepsia*, 45 (10), 1695-1697.
- Berg, A., & Scheffer, I. (2011). New concepts in classification of the epilepsies: Entering the. *Epilepsia*, 52 (6), 1058-1062.
- Berge, M., Serratosa, J., & Delgado-Escueta, A. (1999). Genetic locus heterogeneity in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Ann Neurol*, 45 (2), 262–265.
- Brady, M., Printen, J., Mastick, C., & Saltiel, A. (1997). Role of Protein Targeting to Glycogen (PTG) in the Regulation of Protein Phosphatase-1 Activity. *J Biol Chem*, 272 (32), 20198–20204.
- Campbell, M., & Farrell, S. (2004). *Bioquímica* (4a ed.). México, Distrito Federal: Thomson.
- Chan, E., Bulman, D., Paterson, A., Turnbull, J., Andermann, E., & Andermann, F. (2003). Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22. *J Med Genet*, 40, 671-675.
- Chan, E., Young, E., Ianzano, L., Munteanu, I., Zhao, X., & Delgado-Escueta, A. (2003). Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet*, 35, 125 - 127.
- Chan, E. M., Ackerley, C. A., Lohi, H., Ianzano, L., Cortez, M. A., Shannon, P., y otros. (2004). Laforin preferentially binds the neurotoxic starch-like polyglucosans, which form in its absence in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Gen*, 13 (11), 1117-1129.
- Delgado-Escueta, A. V. (2007). Advances in Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci*, 7, 428–433.
- Dubey, D., & Ganesh, S. (2008). Modulation of functional properties of laforin phosphatase by alternative splicing reveals a novel mechanism for the EPM2A gene in Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Gen*, 17 (19), 3010-3020.

Engel, J. (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, *42*, 796-803.

Engel, J., Pedley, T. A., Aicardi, J., Moshé, S., & Dichter, M. (2007). *Epilepsy: A Comprehensive Textbook* (Vol. 2). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Fernández-Sánchez, M. E., Criado-García, O., Heath, K. E., García-Fojeda, B., Medraño-Fernández, I., Gómez-Garre, P., y otros. (2003). Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation. *Hum Mol Gen*, *12* (23), 3161–3171.

Fisher, R., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., y otros. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, *46* (4), 470-472.

Franceschetti, S., Gambardella, A., Canafoglia, L., Striano, P., Lohi, H., Gennaro, E., y otros. (2006). Clinical and Genetic Findings in 26 Italian Patients with Lafora Disease. *Epilepsia*, *47* (3), 640-643.

Ganesh, S., & Delgado-Escueta, A. (2002). Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Hum Mol Gen*, *11* (11), 1251-1262.

Ganesh, S., Delgado-Escueta, A., Suzuki, T., Franceschetti, S., Riggio, C., Avanzini, G., y otros. (2002). Genotype–phenotype correlations for EPM2A mutations in Lafora’s progressive myoclonus epilepsy: exon 1 mutations associate with an early-onset cognitive deficit subphenotype. *Hum Mol Gen*, *11* (11), 1263–1271.

Ganesh, S., Puri, R., Singh, S., Mittal, S., & Dubey, D. (2006). Recent advances in the molecular basis of Lafora’s progressive myoclonus epilepsy. *J Hum Genet*, *51*, 1-8.

Ganesh, S., Suzuki, T., & Yamakawa, K. (2002). Alternative splicing modulates subcellular localización of laforin. *Biochem Biophys Res Commun*, *295* (5), 1134-1137.

Garyali, P., Siwach, P., Singh, P., Puri, R., Mittal, S., Sengupta, S., y otros. (2009). The malin–laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin–proteasome system. *Hum Mol Gen*, *18* (4), 688-700.

Gasa, R., Jensen, P., Berman, H., Brady, M., DePaoli-Roach, A., & Newgard, C. (2000). Distinctive Regulatory and Metabolic Properties of Glycogen-targeting Subunits of Protein

Phosphatase-1 (PTG, GL, GM/RGI) Expressed in Hepatocytes. *J Biol Chem*, 275 (34), 26396–26403.

GENATLAS. (s.f.). Recuperado el 5 de agosto de 2013, de <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?symbol=EPM2A>

Gentry, M. S., Worby, C. A., & Dixon, J. E. (2005). Insights into Lafora disease: Malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *PNAS*, 102 (24), 8501-8506.

Gentry, M., Downen III, R., Worby, C., Mattoo, S., Ecker, J., & Dixon, J. (2007). The phosphatase laforin crosses evolutionary boundaries and links carbohydrate metabolism to neuronal disease. *J Cell Biol*, 178 (3), 477-488.

Gómez-Abad, C., Gómez-Garre, P., Gutierrez-Delicado, E., Saygi, S., Michelucci, R., Tassinari, A., y otros. (2005). Lafora disease due to EPM2B mutations. *Neurology*, 64 (6), 982-986.

Gómez-Abad, C., Afawi, Z., Korczyn, A., Misk, A., Shalev, S., Spiegel, R., y otros. (2007). Founder Effect with Variable Age at Onset in Arab Families with Lafora Disease and EPM2A Mutation. *Epilepsia*, 48 (5), 1011–1014.

Gómez-Garre, P., Sanz, Y., Rodríguez de Córdoba, S., & Serratosa, J. (2000). Mutational spectrum of the EPM2A gene in progressive myoclonus epilepsy of Lafora: high degree of allelic heterogeneity and prevalence of deletions. *E J Hum Genet*, 8, 946-954.

Greenberg, C., Danos, A., & Brady, M. (2006). Central Role for Protein Targeting to Glycogen in the Maintenance of Cellular Glycogen Stores in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Cell Biol*, 26 (1), 334-342.

Guerrero, R., Vernia, S., Sanz, R., Abreu-Rodríguez, I., Almaraz, C., García-Hoyos, M., y otros. (2011). A PTG Variant Contributes to a Milder Phenotype in Lafora Disease. *PLoS ONE*, 6 (6), e21294.

Hardjasa, A., Ling, M., Ma, K., & Yu, H. (2010). Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method. *J Exp Microbiology Immunol*, 14, 161-164.

Hershko, A., Heller, H., Elias, S., & Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, 258 (13), 8206-8214.

Ikeda, F., Dikic, I., (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. *EMBO Rep*. 9(6), 536–542.

- Lafora, G., & Glueck, B. (1911). Contribution to the histopathology and pathogenesis of myoclonic epilepsy. *Bull Gov Hosp Insane*, 3, 96–111.
- Liu, Y., Wang, Y., Wu, C., Liu, Y., & Zheng, P. (2009). Deletions and missense mutations of EPM2A exacerbate unfolded protein response and apoptosis of neuronal cells induced by endoplasmic reticulum stress. *Hum Mol Gen*, 18 (14), 2622–2631.
- Lohi, H., Ianzano, L., Zhao, X.-C., Chan, E., Turnbull, J., Scherer, S., y otros. (2005). Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Gen*, 14 (18), 2727–2736.
- Magistretti, P., & Allaman, I. (2007). Glycogen: a Trojan horse for neurons. *Nat Neurosci*, 10 (11), 1341–1342.
- Minassian, B. A. (2001). Lafora's Disease: Towards a Clinical, Pathologic, and Molecular Synthesis. *Pediatr Neurol*, 25 (1), 21–29.
- Minassian, B., & Delgado-Escueta, A. (1998). Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet*, 20, 171 - 174.
- Minassian, B., Serratos, J., & Delgado-Escueta, A. (1997). Lafora progressive myoclonus epilepsy: narrowing the chromosome 6q24 locus by recombinations and homozygosities. *Am J Hum Genet*, 61 (5), 1205–1209.
- Moreno, D., Towler, M., Hardie, G., Knecht, E., & Sanz, P. (2010). The Laforin–Malin Complex, Involved in Lafora Disease, Promotes the Incorporation of K63-linked Ubiquitin Chains into AMP-activated Protein Kinase B Subunits. *Mol Biol Cell*, 21, 2578–2588.
- Obel, L. F., Müller, M. S., Walls, A., Sickmann, H., Bak, L., Waagepetersen, H., y otros. (2012). Brain glycogen — new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front Neuroenergetics*, 4.
- Ramachandran, N., Girard, J.-M., Turnbull, J., & Minassian, B. A. (2009). The autosomal recessively inherited progressive myoclonus epilepsies and their genes. *Epilepsia*, 50, 29–36.
- Reece, R. (2004). *Analysis of genes & genomes*. Florence, Italy: Wiley.
- Roach, P. (2011). Are there errors in glycogen biosynthesis and is laforin a repair enzyme? *FEBS Letters*, 3216–3218.
- Roach, P., DePaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., & Tagliabracci, V. S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochemistry Journal*, 441, 763–787.

Roger, J., Bureau, M., Dravet, C., & Genton, P. (2005). *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood, and Adolescence* (4a ed.). Montrouge, France: John Libbey Eurotext.

Romá Mateo, C., Moreno, D., Vernia, S., Rubio, T., Bridges, T. M., Gentry, M. S., y otros. (2011). Lafora disease E3-ubiquitin ligase malin is related to TRIM32 at both the phylogenetic and functional level. *BMC Evol Biol*, *11* (225).

Sainz, J., Minassian, B., Serratosa, J., Gee, M., Sakamoto, L., Iranmanesh, R., y otros. (1997). Lafora progressive myoclonus epilepsy: narrowing the chromosome 6q24 locus by recombinations and homozygosities. *Am J Hum Genet*, *61* (5), 1205–1209.

Satishchandra, P., & Sinha, S. (2010). Progressive myoclonic epilepsy. *Neurol India*, *58* (4), 514-522.

Schneider, S., & Bhatia, K. (2012). *Marsden's Book of Movement Disorders*. New York: Oxford University Press.

Schwarz, G., & Yanoff, M. (1965). Lafora's Disease: Distinct Clinico-Pathologic Form of Unverricht's Syndrome. *Arch Neurol*, *12* (2), 172-188.

Serratosa, J. (1999). A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora Type (EPM2). *Hum Mol Gen*, *8* (2), 345-352.

Serratosa, J., & Delgado-Escueta, A. (1995). The gene for progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type maps to chromosome 6q. *Hum Mol Gen.*, *4* (9), 1657-1663.

Serratosa, J., & Giraldez, B. G. (2010). *Atlas of Epilepsies* (Vol. 2). (C. P. Panayiotopoulos, Ed.) London: Springer.

Shorvon, S. (2009). *Epilepsy*. New York: Oxford University Press.

Singh, H., Sethi, I., Francheschetti, S., Riggio, C., Avanzini, G., y otros. (2006). Novel NHLRC1 mutations and genotype–phenotype correlations in patients with Lafora's progressive myoclonic epilepsy. *J Med Genet*, *43* (9).

Singh, S., & Ganesh, S. (2009). Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy: A Meta-analysis of Reported Mutations in the First Decade following the Discovery of the EPM2A and NHLRC1 Genes. *Hum Mutat*, *30* (5), 715–723.

Singh, S., & Ganesh, S. (2012). Role of genetic modifiers in Lafora progressive myoclonus epilepsy—a neurodegenerative disorder with defects in carbohydrate metabolism. *BMC Proc*, *6*, 43.

Tagliabracci, V., Heiss, C., Karthik, C., Contreras, C., Glushka, J., Ishijara, M., y otros. (2011). Phosphate Incorporation during Glycogen Synthesis and Lafora Disease. *Cell Metab*, 274-282.

Turnbull, J., DePaoli-Roach, A., Zhao, X., Cortez, M., Pencea, N., Tiberia, E., y otros. (2011). PTG Depletion Removes Lafora Bodies and Rescues the Fatal Epilepsy of Lafora Disease. *PLoS Genetics*, 7 (4), e1002037.

Turnbull, J., Kumar, S., Ren, Z.-P., Muralitharan, S., Naranian, T., Ackerley, C., y otros. (2008). Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy: Disease Course Homogeneity in a Genetic Isolate. *J Child Neurol*, 23, 240-242.

The Lafora Progressive Myoclonus Epilepsy Mutaton and Polymorphism Database. (19 de Abril de 2013). Recuperado el 30 de Octubre de 2013, de projects.tcag.ca/lafora/

Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Valles, J., & García-Fojeda, B. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci*, 10, 1407 - 1413.

Williams, S., Slatko, B., & McCarrey, J. (2007). *Laboratory investigations in molecular biology*. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett.

Worby, C. A., Gentry, M. S., & Dixon, J. E. (2006). Laforin: A dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J Biol Chem*, 281 (41), 30412–30418.

Worby, C. A., Gentry, M. S., & Dixon, J. E. (2008). Malin Decreases Glycogen Accumulation by Promoting the Degradation of Protein Targeting to Glycogen (PTG). *J Biol Chem*, 283 (7), 4069-4076.

Yokoi S, Austin J, Witmer F, Sakai M.(1968). Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). I. Isolation and preliminary characterization of Lafora bodies in two cases. *Arch Neurol*; 19:15-33.

I. Glosario de abreviaturas

AMPK	Cinasa dependiente de AMP
Atx	Ataxia
Aus	Ausencias
BE	Enzima ramificadora (Branching Enzyme)
CBD	Dominio de unión a carbohidratos (Carbohydrate Binding Domain)
CBM20	Carbohydrate Binding Module 20
CTCG	Crisis Tónico-Clónicas Generalizadas
DBE	Enzima desramificadora (Debranching Enzyme)
ddNTPs	di-desoxi nucleótidos trifosfatados
Dem	Demencia
DKO	Doble Knock Out
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxi-nucleótidos trifosfatados
DSP	Fosfatasa de especificidad dual (Dual Specificity Phosphatase)
EEG	Electroencefalograma
EL	Enfermedad de Lafora
Emb	Embarazo
EMPs	Epilepsias Mioclónicas Progresivas
EPM2AIP1	Proteína de interacción con laforina (EPM2A interacting protein I)
GN	Glucogenina
GP	Glucógeno fosforilasa (Glycogen Phosphorylase)
GS	Glucógeno sintasa (Glycogen Synthase)
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3 (Glycogen Synthase Kinase 3)
ILAE	Liga Internacional Contra la Epilepsia (International League Against Epilepsy)
IRM	Imagen de Resonancia Magnética
KO	Knock Out
LB	Cuerpos de Lafora (Lafora Bodies)
LF	Laforina
Ms	Mioclónías
PGM	Fosfoglucomutasa (Phosphoglucomutase)
PHK	Fosforilasa cinasa (Phosphorylase Kinase)
PKA	Proteína cinasa A (Protein Kinase A)
PP1	Proteína fosfatasa 1 (Protein Phosphatase 1)
PP1G	Familia de proteínas fosfatasas 1
PTG	Proteína de direccionamiento a glucógeno (Protein Targeting to Glycogen)
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)
TBE	Buffer de electroforesis Tris - Ácido bórico - EDTA
TTS	Buffer de lisis Tris - Tritón - Sacarosa

II. Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación y descripción de los principales tipos de crisis epilépticas de acuerdo a la ILAE.....	18
Tabla 2. Principales signos clínicos en Enfermedad de Lafora.....	20
Tabla 3 Efecto de las mutaciones en la función de laforina.....	26
Tabla 4 Datos clínicos de la familia estudiada.....	35
Tabla 5 lectura de electroferogramas del gen <i>NHLRC1</i>	48
Tabla 6 Lectura de electroferogramas gen <i>EPM2A</i>	48
Tabla 7 Resultados de electroferogramas gen <i>PPP1R3C</i>	49
Tabla 8 Alineamiento múltiple de laforina que realizó Polyphen-2.....	52

III. Índice de Figuras

Figura 1 A) Esquema de enlaces glucosídicos en la molécula de glucógeno; B) Molécula de glucógeno con cadenas B internas ramificadas y cadenas A externas	9
Figura 2 Interacción de una molécula de glucógeno con proteínas asociadas	10
Figura 3 Formación de enlaces α (1-6)	11
Figura 4 Monoésteres de fosfato en los residuos de glucosa del glucógeno	12
Figura 5 Actividad fosfatasa de Laforina sobre los monoésteres de fosfato	12
Figura 6 Esquema de interacciones de laforina con diversas proteínas	14
Figura 7 Metabolismo de Glucógeno	15
Figura 8 Biopsia de piel axilar con tinción PAS que muestra cuerpos de Lafora	21
Figura 9 Espectro de mutaciones en <i>EPM2A</i> y <i>NHLRC1</i> por país	22
Figura 10 Organización genómica de <i>EPM2A</i>	23
Figura 11 Organización de los dominios de laforina a lo largo de los 4 exones del gen <i>EPM2A</i>	23
Figura 12 Representación de Laforina	24
Figura 13 Representación de malina	27
Figura 14 Localización de las mutaciones más comunes en malina y su frecuencia	28
Figura 15 Esquema de PTG que muestra el sitio de interacción.....	31
Figura 16 Biopsia de piel axilar con tinción PAS del caso índice	34
Figura 17 Gradiente de Tm para el exón 1 del gen <i>EPM2A</i>	41
Figura 18 Fragmentos amplificados de los exones 1, 2 y 3 del gen <i>EPM2A</i>	44
Figura 19 Electroferograma que muestra la mutacion c.721C>T	49
Figura 20 Electroferograma que muestra la mutacion c.835G>T.....	50
Figura 21 Resultados del análisis en Polyphen-2.....	51

Figura 22 Arbol genealógico con genotipos	53
Figura 23 Red de interacciones del gen <i>EPM2A</i>	53