



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *GABRB3* EN
PACIENTES MESTIZO-MEXICANOS CON EPILEPSIA
DE AUSENCIAS DE LA NIÑEZ”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA
SARA BERENICE ENRÍQUEZ BOLIO**

**ASESOR: DR. AURELIO JARA PRADO
COASESORA: Q.F.B. ROSALBA BONILLA SÁNCHEZ**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2017



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**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa 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: **Tesis y Examen Profesional**

Estudio molecular del gen GABRB3 en pacientes mestizo-mexicanos con Epilepsia de Ausencias de la Niñez.

Que presenta la pasante: **Sara Berenice Enriquez Bolio**
Con número de cuenta: **305834014** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica**

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 09 de Noviembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Azucena Lee Mendoza	

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

LMCF/mmgm*

DEDICATORIA

A Dios, mi Abba

A mi Papi, mi gran héroe,

A mi mami, la mejor mujer,

A mi Anita, mi amiga y hermana,

A toda mi hermosa familia.

A mis amigos.

***Mi embrión vieron tus ojos,
Y en tu libro estaban escritas todas aquellas cosas
Que fueron luego formadas,
Sin faltar una de ellas.***

Salmos 139:16

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi todo, gracias por los sueños y anhelos que depositaste en mi para hacerlos realidad, y así mostrar un poco de quien eres tú. Gracias por tu amor.

A mi papi, Braulio, gracias por todo lo que haces por nosotras; te agradezco por tu trabajo, tu esfuerzo día a día, gracias por tu amor, perseverancia, integridad, sabiduría, por ser un gran hombre y mi gran ejemplo, gracias por ser mi superhéroe, porque siempre me apoyas en cada proyecto y sueño que tengo, gracias papi, porque mucho de esta tesis y de lo que he logrado ha sido gracias a ti, a la libertad y a la confianza que siempre me brindas. Gracias por tus ánimos, por todas tus enseñanzas y por darme las herramientas para llegar a cumplir mis sueños.

A mi mami, Bibiana, gracias por ser esa hermosa mujer, que lo ha dado todo por su familia, incluso cuando estás cansada o enferma, gracias por dar más de lo que puedes, porque sé que no ha sido fácil para ti, pero lo has hecho; gracias por ser la mejor mami del mundo, por tus consejos, tu apoyo, tu valentía, tu sabiduría, pero sobre todo, gracias por amarme de la manera que sólo tú puedes hacerlo, gracias porque siempre has creído en mí, y parte de este trabajo es tuyo también, porque siempre me animaste a terminar y concluir, no sólo este trabajo, sino todo lo demás en la vida.

A Anita, gracias por ser una gran amiga, mi hermanita, porque me has enseñado muchas cosas, eres un gran ejemplo de superación y de que cuando se quiere algo, se consigue, gracias por ser parte fundamental de este trabajo, de mi vida, gracias por tus consejos, ánimos y todo el apoyo que me has brindado siempre.

A mi familia, gracias por tanto amor, por estar ahí siempre que los necesito. A mi abue Margarita Aguilar, que siempre cuidó de mí y me enseñó tanto. Gracias a mi tía Angie, por tantas cosas que diste, consejos, apoyo, amor y porque siempre creíste en mí. A ellas, a quienes extraño en gran manera, y a quienes me hubiera gustado estuvieran presentes para ver mi trabajo terminado, honro la forma en cómo vivieron sus vidas, y lo que cada una hizo por mi y sus seres queridos. A mi Abue Margarita Bolio, gracias por ser la abue más amorosa del mundo y por tu gran fe. A mi tío Fer, gracias por todo tu apoyo. A mi tío Francisco, que junto mi tía Angie, siempre fue y es un apoyo y ejemplo para mí. A

mis tíos y tías: Gil y Juan, Magos, Angie, Conchy, Luz, Rosy, Santy, Maguitos. Gracias por todo, por su apoyo y cuidado. A mis primos, Ale, Fernanda, Lalo, Armando, Irving, Dani, Tania, Emmanuel, Clau, Nando, Chepo, Elenita, Rafa-Blanca, Migue-Ana, Gerardo, Vic y Gil; son los mejores, siempre, gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de esta gran Universidad, la mejor. A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por darme la oportunidad de estudiar en la última generación (35) de Químico Farmacéutico Biólogo, por todos los recursos brindados a lo largo de mi carrera: laboratorios, maestros, materiales, reactivos, etc, sobre todo por enseñarme el verdadero valor del conocimiento, y darme a los mejores amigos. Gracias por cada uno de los excelentes maestros que tuve a lo largo de la carrera que transmitieron sus conocimientos, por su apoyo para mi desarrollo profesional, en especial a la maestra Ana Laura, y Rosalba, gracias por todo.

Al Instituto Nacional de Neurocirugía y Neurología, por los recursos financieros, materiales, que brindaron para la realización de este trabajo, y por su gran Departamento de Genética (¡arriba!)

A mi tutor, el Doc Aurelio, gracias por su infinita paciencia, su total apoyo y el conocimiento que aportó para la realización de este trabajo. Gracias Doc!

A mi co- asesora Rosalba Bonilla, por todo el apoyo y conocimiento recibido para la terminación de este trabajo. A mi jurado, la Maestra Ma. Esther, Dra. Sandra, Azucena y Tais, gracias por sus correcciones y enseñanzas.

A todas las personas que hicieron esta etapa más divertida y amena, entre risas, comida y Congresos, gracias al Depto. de Genética, al Doc Aurelio, Yorch, Adri, Lety, David, Vato (Xime), Migue, Eli, Gina, Sr. Gabino, Nancy. A mis amigos y compañeros de tesis: a Peque, por haber estado tantos años conmigo; a Ambar, por ser la mejor hija, ser una verdadera amiga, y junto con Peque, hacer un Congreso tan divertido; a Tustro, por tu invaluable apoyo, ayuda en este trabajo y por hacer esos viajes más ligeros; a Quepsi, por ser auténtica y real con las personas, por tu amistad y risas compartidas; a Arrale y Gabriela, por ser tan geniales, por su amistad, por su apoyo y ayuda en el laboratorio,

son las mejores siempre; a César y Uriel; gracias por su amistad, y por lo que cada uno contribuyó en hacer un ambiente más amigable y genial en el Departamento.

A mis amigos los “chacales”, que siempre se mostraron amigos y chacales en todo momento, y por ser parte de esta generación, al Incómodo, por ser muy incómodo; a Bladi, por ser muy genial, por tus tortas y manzanas, que eran mi desayuno y comida, a Toñito, por ser muy buena onda y recibimos en su depa; a Mao, por tus ocurrencias, sentido del humor y también por prestarnos el depa; a Moztrito, por enseñarme el buen camino y por tus consejos; a Gaby, por ser honorable y sincero, por ser un gran amigo y una persona confiable; y a Óscar por ser sincero y ser un gran amigo; a Sam, por ser bien genial y ñoño en toda la carrera; al Z (Hugo) por ser ñoño también, por los jugos y no tener nivel; a René por ser la onda siempre; al Fuerza (Gerardo), por su eterna sonrisa; a Atsl, por ser mi mejor amigo y compañero en la Universidad y que espero algún día volver a ver; a Iván (panes), por ser amigo y compañero de TKD; a Luis F (perro) por ser muy divertido. A las precesas: Marisol por ser bien genial e incómoda también; a Fer y San; son muy divertidas y ocurrentes, siempre haciendo reír, por ser buenas amigas y hacer tantas locuras juntas y con nosotros, gracias San por ser la organizadora de todo, incluso esa ida a la Marquesa; gracias a todos por la creación del folder, por sus frases épicas y momentos tan geniales; a Peque, por ser mi siempre amiga, por todas esas horas juntas en clase y en Laboratorio, por la comida, por ser mi equipo siempre en tantos años; a Iván (Mari) por ser un gran amigo y equipo en la universidad; a Raque, una de mis más grandes amigas, por tu amistad y también ser mi equipo en tantos años, a Clau, Lupita y Sandra, gracias por todos los buenos momentos, risas y ocurrencias; a Karenuchis, por ser bien genial, por ser mi compañera en la escuela, en TKD y tocho; a Fare, por ser ruda-linda conmigo, y por tu amistad tan genial.

A las personas que he encontrado en Jesús, por su amor, por sus oraciones, a los Prs. Agustín y Sara Enríquez; a Anelle y Sid Cruz, a Maye y Mario Cárdenas; a Benja y Vale Enríquez; gracias a cada uno de ustedes por marcar e influenciar mi vida con su ejemplo, pasión, amor y servicio; gracias por todo su apoyo en cumplir este sueño. A todas esas personas tan geniales que han sido un soporte y apoyo en este proceso, a Pris, gracias por no dejarme; a Toñito, gracias por creer en mí y animarme a terminar.



TRABAJO REALIZADO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA "MANUEL VELASCO SUÁREZ" CON EL APOYO DEPOR CONACYT
PROYECTO 181359

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Definición de Epilepsia	2
2.2 Epidemiología	2
2.2.1 Clasificación de las Epilepsias en base a su etiología	3
2.2.2 Clasificación Síndromes Epilépticos	4
2.2.3 Epilepsias Idiopáticas Generalizadas	6
2.3 Epilepsia de Ausencias de la Niñez	6
2.3.1 Epidemiología de EAN	7
2.3.2 Tratamiento	7
2.3.3 Pronóstico	7
2.3.4 Episodios de Ausencias	7
2.3.5 Características clínicas de la Epilepsia de Ausencias de la Niñez	7
2.4 Sinapsis	9
2.5 Generalidades de los neurotransmisores	10

2.5.1	Acción de los neurotransmisores.....	10
2.6	Ácido gamma amino butírico (GABA).....	12
2.6.1	Síntesis de GABA	13
2.6.2	Neuronas gabaérgicas	17
2.6.3	Receptores gabaérgicos	17
2.7	Mecanismos celulares y moleculares involucrados en la epileptogénesis en las Epilepsias de Ausencias Idiopáticas.....	17
2.7.1	Receptor GABA _A	20
2.8	Antecedentes genéticos	21
2.8.1	<i>GABRB3</i>	24
3.	OBJETIVO	28
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.	HIPÓTESIS.....	28
5.	METODOLOGÍA	29
5.1	Diagrama general.....	29
5.2	Muestras biológicas.....	30
5.2.1	Pacientes.....	30
5.2.2	Controles.....	30
5.3	Toma de muestra.....	30
5.4	Lisis y extracción de DNA.....	30
5.5	Cuantificación de DNA total, determinación de su pureza y elaboración de diluciones. 31	
5.6	Integridad del DNA genómico mediante Electroforesis.....	32
5.7	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
5.7.1	Primers para amplificar el exón 1a y región 5'UTR del promotor del gen <i>GABRB3</i> .34	

5.7.2	Mezcla de reacción para la PCR de punto final de la región 5' UTR del promotor del gen <i>GABRB3</i> y el Exón 1a.	35
5.7.3	Temperatura de alineación (T _m). Gradiente de temperatura.	35
5.7.3.1	T _m teórica	35
5.7.3.2	Mezclas de reacción para el gradiente de temperatura mediante PCR de punto final para la región del promotor del gen <i>GABRB3</i> y el Exón 1a.	36
5.7.3.3	Electroforesis de un gradiente de temperatura.	37
5.8	Purificación de productos de PCR	38
5.9	Verificación de lo purificados de PCR.	38
5.10	PCR para la reacción de secuenciación	38
5.11	Purificación de los productos de PCR de Secuenciación	40
5.12	Secuenciación automatizada.....	40
RESULTADOS		41
5.15	Cuantificación e Integridad del DNA genómico.....	41
5.16	PCR y Secuenciación	41
5.16.1	Condiciones de PCR para los exones y región del promotor del gen <i>GABRB3</i>	41
5.17	Purificación de productos de PCR mediante el kit	43
5.18	Verificación de purificados de PCR	43
5.19	PCR para la reacción de secuenciación	44
5.22	Frecuencias alélicas y genotípicas en casos y controles.....	45
ANÁLISIS DE RESULTADOS		51
5.24	Mutación P11S (rs25409)	51
5.24.1	Secuencia FASTA de la proteína <i>GABRB3</i>	52
5.25	Análisis <i>in silico</i>	52
5.25.1	Estudio con <i>PolyPhen-2 v2.2.2r398</i> de la mutación P11S	52

7.2.2 Estudio en SIFT (Predicciones SIFT)	52
7.2.3 Análisis en “MutationTaster”	53
8. DISCUSIÓN.....	55
8.1 Análisis estadístico	56
8.1.2 Análisis de interacción de haplotipos con covarianza de género.....	58
9. CONCLUSIONES	65
10. REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Síndromes Electroclínicos (agrupados por edad de inicio)	5
Tabla 2	Otras Epilepsias Agrupadas por Especificidad del Diagnóstico y de Causa desconocida	6
Tabla 3	Tipos y subtipos de receptor para neurotransmisores del SNC: ligandos y sus principales efectos	12
Tabla 4	Asociación y análisis de mutaciones de los genes candidatos para Epilepsias Idiopáticas de Ausencias	21
Tabla 5	Mutaciones asociadas a Epilepsia de Ausencia de la Niñez	23
Tabla 6	Secuencias de los primers (Forward y Reverse) diseñados de 5' a 3'. En donde la Región UTR 5' del promotor se dividió en 2 partes (Parte 1 y Parte 2).	34
Tabla 7	Ejemplo de la mezcla de reacción de PCR para un producto de amplificación de 212 pares de bases, correspondientes al amplicón del Exón 1a. Mezcla para 25 reacciones	35
Tabla 8	Secuencia 5' → 3', pb y Tm teórica de la región 5' UTR del promotor → Exón 1a (Parte 1)	35
Tabla 9	Ejemplos de las mezclas de reacciones de PCR para conocer la temperatura óptima de alineamiento, con y sin DMSO	36
Tabla 10	Ejemplo de la mezcla de la reacción de PCR de Secuenciación	39
Tabla 11	Condiciones de la PCR de Secuenciación	39
Tabla 12	Condiciones de la PCR para la Región 5' UTR → Exón 1 ^a	42
Tabla 13	Condiciones de la PCR para el Exón 1 ^a	42
Tabla 14	Resultados de la secuenciación de la región 5' UTR y del Exón 1a, de los 35 pacientes en estudio y los controles	45
Tabla 15	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs7171660 C/T en pacientes y controles.	45
Tabla 16	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4363842 (T/C) en pacientes y controles	45
Tabla 17	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4906901 (T/G) en pacientes y controles.	45
Tabla 18	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs20317 (G/C) en pacientes y controles.	46
Tabla 19	Resultados de las predicciones en SIFT	47
Tabla 20	Resumen del análisis en Mutation Taster	48
Tabla 21	Análisis en MutationTaster para los sitios de splicing.	49
Tabla 22	Resumen de las características de la proteína GABRB3 en MutationTaster.	49
Tabla 23	Análisis en MutationTaster para conocer el grado de conservación de la proteína.	50
Tabla 24	Análisis estadístico para los polimorfismos de la región 5'UTR del promotor en pacientes y controles.	56
Tabla 25	Análisis de Haplotipos	58
Tabla 26	Asociación de Haplotipos. Estimación de frecuencias de haplotipos (n=122)	58
Tabla 27	Interacción de clasificación-cruzada de género y Haplotipo (análisis crudo n=122)	58
Tabla 28	Haplotipos presentes en géneros (análisis crudo n=122)	59
Tabla 29	Géneros presentes en los haplotipos (análisis crudo n=122)	59
Tabla 30	Comparación de haplotipos de los polimorfismos reportados por Urak, 2006 y Tanaka , <i>et al</i> , 2012	59
Tabla 31	Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs7171660 (C/T) estudiado en la Región 5' del gen <i>GABRB3</i> , y su comparación con otras poblaciones.	60
Tabla 32	Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs4906901 (T/G) estudiado en la Región 5' del gen <i>GABRB3</i> , y su comparación con otras poblaciones	61
Tabla 33	Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs4363842 T/C estudiado en la Región 5' del gen <i>GABRB3</i> , y su comparación con otras poblaciones.	62
Tabla 34	Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs20317 (C/G) estudiado en la Región 5' del gen <i>GABRB3</i> , y su comparación con otras poblaciones.	63
Tabla 35	Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs25409 (C/T) estudiado en la región Exón 1a del gen <i>GABRB3</i> , y su comparación con otras poblaciones.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de las crisis que se presentan en varios síndromes de Epilepsia	4
Figura 2	Mecanismos de las crisis generalizadas	4
Figura 3	Electroencefalograma del funcionamiento normal del cerebro.	8
Figura 4	Electroencefalograma de un paciente que muestra una crisis de ausencia, con un patrón electroencefalográfico característico con complejos punta-onda lenta generalizados y bilaterales a frecuencia de 3Hz	8
Figura 5	Sinapsis neuronal	9
Figura 6	Fases del potencial de acción	10
Figura 7	Estructura química del aminoácido ácido gama butírico	14
Figura 8	Esquema de una sinapsis GABA-érgica, dando entrada a Cl ⁻	14
Figura 9	Reacción química de la síntesis de GABA.	15
Figura 10	Síntesis y metabolismo del GABA.	15
Figura 11	Formas activas de la vitamina B ₆ , sus formas de coenzima	16
Figura 12	Elementos celulares de la red talámica y cortical involucrada en la generación de punta-onda.	18
Figura 13	Composición del Receptor GABA _A ; cinco subunidades de siete subunidades de subfamilias forman un canal heteropentamérico permeable a Cl ⁻	20
Figura 14	Representación esquemática del receptor GABA _A , mostrando la localización de mutaciones identificadas asociadas a diferentes tipos de epilepsia	24
Figura 15	Ideograma del cromosoma 15, y algunos genes que se encuentran en la región 15q12	25
Figura 16	Gen <i>GABRB3</i> ; así como sus isoformas 1 y 2 alternativas del transcrito	26
Figura 17	Péptido señal	27
Figura 18	Diagrama general de la metodología utilizada	29
Figura 19	Pasos de la PCR. Desnaturalización	33
Figura 20	Pasos de la PCR. Alineamiento	33
Figura 21	Pasos de la PCR. Elongación	33
Figura 22	Pasos de la PCR. Amplificación exponencial	34
Figura 23	Electroforesis en un Gel de Agarosa 0.5% con TBE 0.5X, de un gradiente de temperatura correspondiente a la región del promotor (región 5' UTR→ Exón 1a)	37
Figura 24	Estructuras químicas de los ddNTPs.	39
Figura 25	Electroforesis de DNA genómico de muestras controles, en un gel de Agarosa al 0.5% con TBE 0.5X	41
Figura 26	Electroforesis en gel de agarosa 1.5%, donde se ubica en el gel el amplicón del exón 1a de 212 pb.	42
Figura 27	Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% en TBE 0.5X de la purificación de algunos productos de PCR, correspondientes al fragmento de la parte1 de la región 5'UTR.	43
Figura 28	Electroferograma del cambio de un nucleótido C por T de un paciente (abajo) correspondiente a la mutación P11S y un control (arriba)	44
Figura 29	Resultado en PolyPhen: Mutación aparentemente benigna. Con una puntuación de 0.137 (sensibilidad: 0.92; especificidad: 0.86)	46
Figura 30	Resultado en PolyPhen. Esta mutación se prevé que sea benigna, con una puntuación de 0.51 (sensibilidad: 0.93; especificidad: 0.63)	46
Figura 31	Mapa de la región 5' del gen <i>GABRB3</i> ,	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	Ácido cítrico / Citrato /Dextrosa
ADNFLE	Epilepsia frontal nocturna autosómica dominante
AMP_c	Adenosín Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosín TriFosfato
BECTS	Epilepsia benigna con puntas centrotemporales
BFNE	Epilepsia neonatal familiar benigna
BNS	Crisis neonatales benignas
BZ	Benzodiacepina
CAE	Epilepsia ausencia infantil (Childhood absense epilepsy)
CCDV	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
CDS	Secuencia codificante
CSWS	Encefalopatía epiléptica con punta onda continua durante el sueño
DAG	Diacilglicerol
ddNTP's	Dideoxinucleótidos trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EAN	Epilepsia de Ausencias de la Niñez
EEG	Electroencefalogramas
EME	Encefalopatía mioclónica temprana
EMJ/ JME	Epilepsia mioclónica juvenil
FS+	Crisis febriles plus
GABA	Ácido gamma amino butírico
GAD	Ácido glutámico-descarboxilasa;
GAD	Glutamato descarboxilasa
GAT	Transportador de GABA
GEFS+	Epilepsia Generalizada con crisis febriles plus
GIRK₂	Canal de K ⁺ rectificador de la corriente de entrada, acoplado a proteína G
IGEs	Epilepsias Idiopáticas Generalizadas
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia
IP₃	inositol 1,4,5-trifosfato
ISPS	Potenciales postsinápticos inhibitorios
JAE	Epilepsia ausencia juvenil
LKS	Síndrome de Landau-Kleffner
MEI	Epilepsia mioclónica de la infancia (del lactante)
mGlur	Receptor metabotrópico de glutamato
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NMDA	N-metil-D-aspartato
nRT	Núcleo Reticular Talámico
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PLP	Fosfato de piridoxal
PME	Epilepsias mioclónicas progresivas
SD	Síndrome de Dravet
SDS	Dodecil sulfato sódico
SMEI	Epilepsia Mioclónica Grave de la infancia
SNC	Sistema Nervioso Central
SNPs	Polimorfismo de un solo nucleótido
TBE	Trizma ® base/ Ácido Bórico/ EDTA
TCG	Tónico Clónico Generalizado
Tm	Temperatura de alineación
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometan
TTS	Tris /Tritón / Sacarosa
UTR	Región no traducida (Untranslated region / Untranslated Trailer)
VGAT	Transportador vesicular de GABA

RESUMEN

La Epilepsia de Ausencias de la Niñez (EAN) es el síndrome de epilepsias pediátricas más común, presentándose en un 10-17% de los niños. Así como las demás Epilepsias Idiopáticas Generalizadas (IGEs), no están precedidas u ocasionadas por otros trastornos, sino que está causada por factores genéticos complejos, sin embargo las crisis de ausencias pueden estar asociadas con otros subtipos de IGEs. Los episodios de ausencias se caracterizan por alteración breve del estado de consciencia, ocurren de forma abrupta y terminan súbitamente. En los pacientes con EAN se presentan ataques epilépticos no convulsivos, episodios de ausencias, que se caracterizan por la breve (5-20 seg) y súbita pérdida de la conciencia. Las mutaciones o variaciones en el gen *GABRB3* que codifica para la subunidad $\beta 3$ del receptor $GABA_A$, se han visto asociadas con EAN. En 2008, Tanaka, *et al*, realizan un estudio molecular en familias mexicanas con EAN en donde reportan 3 mutaciones en la región codificante del gen *GABRB3*: c.31C>T (P11S), c.44C>T (S15F) y c.G962>A (G32R) asociadas a proteínas maduras alteradas y 45 pacientes australianos con EAN encontrando una asociación significativa de un haplotipo en común con la relación del a EAN, notando una reducción del nivel transcripcional del gen *GABRB3*. En base a esto, se propone como objetivo en este estudio realizar un estudio molecular de la región 5' UTR de la región promotora y del exón 1a del gen *GABRB3* para conocer si existe una asociación de mutaciones y/o variaciones de esta región del gen y la enfermedad en estudio en población mexicana, por lo cual se estudiaron 35 pacientes de origen mestizo-mexicano diagnosticados con Epilepsia de Ausencias de la Niñez que acuden a la Clínica de Epilepsia en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez y 87 controles como población sana. Se secuenció la región 5' UTR y el exón 1a, los resultados fueron: 1 caso con la mutación P11S y 4 polimorfismos en la región 5' UTR: rs7171660 C/T, rs4363842 T/C, rs4906901 (T/G) y rs20317 (G/C). Se analizan estadísticamente las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos encontrados y se realiza un análisis de asociación de haplotipos en pacientes y controles. En cuanto a estos polimorfismos no se encontró alguna asociación entre pacientes y control. La EAN al ser una enfermedad heterogénea, propone la búsqueda de otros factores genéticos que se asocien a la etiología de la enfermedad, como buscar polimorfismos que sirvan como biomarcadores de riesgo.

1. INTRODUCCIÓN

La Epilepsia de Ausencias de la Niñez es la forma más común de las Epilepsias Idiopáticas de Ausencias junto con la Epilepsia de Ausencias Juvenil; y así como las demás Epilepsias Idiopáticas Generalizadas (IGEs), no están precedidas u ocasionadas por otros trastornos, sino que está causada por factores genéticos complejos, sin embargo las crisis de ausencias pueden estar asociados con otros subtipos de IGEs, como la Epilepsia Mioclónica Juvenil (Blumenfeld, 2011).

Los receptores GABA_A son los principales mediadores de rápida transmisión de la sinapsis inhibitoria en el sistema nervioso central y repetidamente ha sido documentado en jugar un rol importante en modelos animales con Epilepsia (Kang y Macdonald, 2009).

Como se menciona en este estudio, la mayoría de las mutaciones reportadas en las subunidades del receptor GABA (como la subunidad B3) alteran el tráfico y la expresión de la subunidad, y otras, la función del canal iónico.

En el 2008, Tanaka, *et al*, realizaron un estudio en pacientes con ausencias de la niñez, en el cual incluyeron diversas pruebas, entre ellas estudios moleculares, *in silico*, *in vitro*, en el cual encontraron 3 mutaciones en el gen *GABRB3*: P11S, S15F, G32R, en 4 de 48 pacientes con Epilepsia de Ausencia de la niñez, alrededor del 8% de los pacientes, con ancestría indio-americana y español-europea, y sólo la mutación P11S presente en una familia mexicana.

En este estudio molecular se busca la asociación de las mutaciones y/o variaciones en el gen *GABRB3* en pacientes mexicanos con Epilepsia de Ausencias de la Niñez que acuden a la Clínica de Epilepsia del INNyN.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de Epilepsia

Epilepsia proviene del griego, *Επιληψία*, que significa intercepción (El Sahili y Hernández, 2010).

Existen diversas definiciones de la Epilepsia, una de las más aceptadas y que ayuda a una mejor comprensión de éste padecimiento es la que define a la “Epilepsia como una condición o un grupo de condiciones que implican trastornos transitorios en la función cerebral, causadas por descargas neuronales anormales y que se caracteriza por convulsiones recurrentes” (Lu, 2009).

2.2 Epidemiología

La Epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos más comunes que afectan alrededor del 0.5-1% de la población mundial (Hausser, 1994).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2012) en el mundo hay aproximadamente 50 millones de personas con algún tipo de Epilepsia, en donde el 80% de los pacientes derivan de países en vías de desarrollo. En estos países, el riesgo de muerte prematura se ve aumentado de dos a tres veces en personas afectadas que en la población general.

Se reportó en un estudio epidemiológico realizado en población urbana, suburbana y rural de México, una prevalencia de Epilepsia de 10-20 personas por 1000 habitantes, afectando a más de un millón de mexicanos, en especial a la población infantil. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez en el 2011, la Epilepsia fue la principal causa de consulta de primera vez (Martínez, 2014).

Los pacientes con epilepsia responden al tratamiento aproximadamente en un 70% de los casos, pero tres cuartas partes de los afectados que viven en países en vías de desarrollo no reciben el tratamiento que necesitan. Además las personas afectadas con Epilepsia y sus familias suelen ser víctimas de estigmatización y discriminación en muchas partes del mundo (OMS, 2012).

Las causas de la Epilepsia son diversas, la clasificación de la enfermedad en cuanto a su etiología, ha variado con el paso del tiempo, debido en gran parte a la integración de ciencias y nuevas tecnologías, que se ha venido dando en los últimos años, como lo es la

Biología Molecular, Inmunología, Genética, Bioquímica, entre otras; que en conjunto con la clínica ayudan al médico a dar un diagnóstico más certero.

2.2.1 Clasificación de las Epilepsias en base a su etiología

En base a la Liga Internacional en Contra de la Epilepsia y tipo de causa subyacente:

- I. Genética (Idiopática): La Epilepsia es el resultado directo de una causa genética, idealmente un gen y los mecanismos deben ser identificados (Berg, 2011). Esta clasificación viene a sustituir el término de Epilepsia Idiopática. Las Epilepsias Genéticas refieren a síndromes previamente clasificados como Epilepsias idiopáticas Generalizadas (IGEs) (Kang y Macdonald, 2009). En este trabajo se hace referencia a Epilepsia Idiopática.
- II. Estructural/metabólica: La epilepsia es el resultado secundario de una condición ya sea, estructural o metabólica. Los términos estructural y metabólica fueron combinados para separar el concepto de genética; y también porque los dos son a menudo inseparables (Berg, 2011). Aunque muchas veces las condiciones estructurales y metabólicas tiene un fondo genético, éste término reemplaza al término sintomático.
- III. Causa desconocida: Simple y directo, esta etiqueta indica la ignorancia y que una mayor investigación es necesaria para identificar la causa de la epilepsia (Berg, 2011).

La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) ha clasificado las crisis en:

- a) Crisis generalizadas, Ocurren y afectan rápidamente a redes distribuidas bilateralmente (ambos hemisferios)
- b) Crisis focales, si las crisis ocurren y afectan rápidamente a redes limitadas a un hemisferio cerebral, bien localizadas o ampliamente distribuidas, o
- c) Desconocidas, ya que no existe suficiente evidencia como para clasificarlas en generalizadas o focales (Berg, 2010).

A continuación se muestra un cuadro sinóptico con la clasificación de las crisis que pueden llegarse a presentar en varios síndromes de Epilepsia.

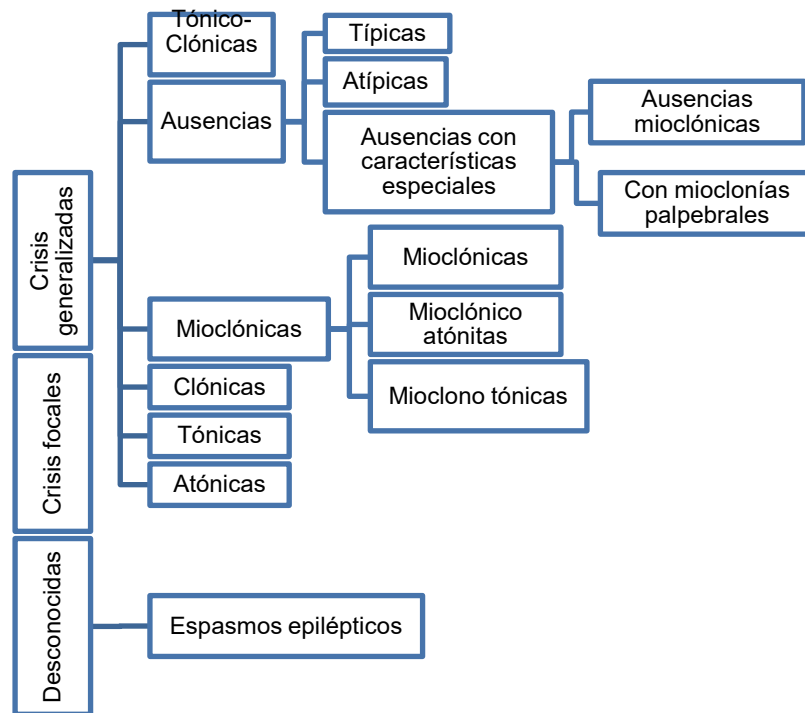


Figura 1. Clasificación de las crisis que se presentan en varios síndromes de Epilepsia.

Modificado de Berg, 2010.

Crisis generalizadas						
Crisis	Ausencia	Mioclónía	Tónica	Clónica	TCG	Atonia
Mecanismo	Excitatorio-Inhibitorio rítmico	Excitatorio Fragmentado	Excitatorio Sostenido	Inhibitorio Fragmentado	Excitatorio + Inhibitorio	Inhibitorio Sostenido

*TCG. Tónico Clónico Generalizado.

Figura 2. Mecanismos de las crisis generalizadas. Tomado de Medina, 2004

2.2.2 Clasificación Síndromes Epilépticos

Existen diversas clasificaciones de estos síndromes, a continuación se presenta la clasificación en base a La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, 2011), quien ha agrupado a los síndromes epilépticos, conforme a la edad de inicio:

Tabla 1. Síndromes Electroclínicos (agrupados por edad de inicio) (Modificado de: Berg, 2011).

<p>Periodo neonatal</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Epilepsia neonatal familiar benigna (BFNE) ▪ Encefalopatía mioclónica temprana (EME) ▪ Síndrome de Ohtahara
<p>Lactancia</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Epilepsia de la infancia (del lactante) con crisis focales migratorias ▪ Síndrome de West ▪ Epilepsia mioclónica de la infancia (del lactante) (MEI) ▪ Epilepsia benigna de la infancia (del lactante) ▪ Epilepsia benigna de la infancia (del lactante) familiar ▪ Síndrome de Dravet ▪ Encefalopatía mioclónica en trastornos no progresivos
<p>Infancia</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Crisis febriles plus (FS+) (puede empezar en la lactancia) ▪ Síndrome de Panayiotopoulos ▪ Epilepsia con crisis mioclónicas atónicas (previamente astáticas) ▪ Epilepsia benigna con puntas centrotemporales (BECTS) ▪ Epilepsia frontal nocturna autosómica dominante (ADNFLE) ▪ Epilepsia occipital de la infancia de inicio tardío (tipo Gastaut) ▪ Epilepsia con ausencias mioclónicas ▪ Síndrome de Lennox-Gastaut ▪ Encefalopatía epiléptica con punta onda continua durante el sueño (CSWS) ▪ Síndrome de Landau-Kleffner (LKS) ▪ <u>Epilepsia ausencia infantil o de la niñez (CAE)</u>
<p>Adolescencia - Edad adulta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia ausencia juvenil (JAE) • Epilepsia mioclónica juvenil (JME) • Epilepsia con crisis generalizadas tónico-clónicas únicamente • Epilepsias mioclónicas progresivas (PME) • Epilepsia autosómica dominante con características auditivas (ADEAF) • Otras epilepsias familiares del lóbulo temporal
<p>Relación menos específica con la edad</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia familiar focal con focos variables (infancia a edad adulta) • Epilepsias reflejas

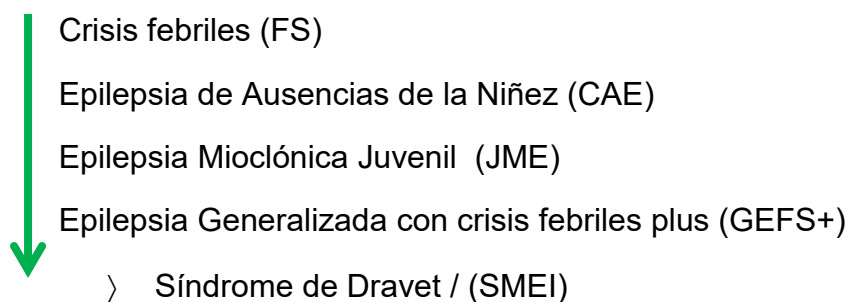
Así como otros síndromes que no entran en ninguna de estas categorías; se pueden distinguir primero por la presencia o ausencia de una condición conocida estructural o metabólica (supuesta causa) y luego por la forma primaria de inicio de las crisis (generalizadas vs focales).

Tabla 2. Otras Epilepsias Agrupadas por Especificidad del Diagnóstico y de Causa desconocida.
Modificado de Berg, 2011.

<p>Constelaciones distintivas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia temporal mesial con esclerosis del hipocampo (MTLE with HS) • Síndrome de Rasmussen • Crisis gelásticas con hamartoma hipotalámico • Epilepsia hemiconvulsión-hemiplejía
<p>Epilepsias atribuidas a y organizadas según causas estructurales-metabólicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Malformaciones del desarrollo cortical (hemimegalencefalia, heterotopias, etc) • Síndromes neurocutáneos (complejo esclerosis tuberosa, Sturge-Weber, etc) • Tumor, infección, trauma, angioma, lesiones perinatales, accidentes cerebrovasculares, etc.
<p>Epilepsias de causa desconocida</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Crisis neonatales benignas (BNS) 2. Crisis febriles (FS)

2.2.3 Epilepsias Idiopáticas Generalizadas

Las Epilepsias Idiopáticas Generalizadas (IGEs), también conocidas como Epilepsias genéticas, ya que se cree que derivan de un defecto genético (mutaciones); representan el 20% de las epilepsias. Esto ocurre con mayor frecuencia en gente joven (Willie, 2010). En éstas se incluyen diferentes síndromes epilépticos que varían en severidad clínica (Kang y Macdonald, 2009):



2.3 Epilepsia de Ausencias de la Niñez

La Epilepsia de Ausencias de la Niñez es uno de los síndromes más frecuentes entre las Epilepsias Idiopáticas Generalizadas (Tanaka, *et al*, 2008). Siendo a su vez el síndrome de epilepsias pediátricas más común, y se presenta en un 10-17% de los niños (Martínez, 2014).

2.3.1 Epidemiología de EAN

- Se reporta una incidencia de 2-8/100,000 menores de 16 años. La prevalencia es de 0.1-0.7/1000 personas
- La edad de inicio de la enfermedad es de los 4-8 años, con un pico entre los 6 y 7 años de edad.

Predominio de género por afección 2 veces mayor en niñas que en niños, a pesar de que la incidencia es igual en ambos sexos (Martínez, 2014).

2.3.2 Tratamiento

El tratamiento farmacológico incluye antiepilépticos como valproato, lamotrigina y etosuximida, siendo los fármacos de primera opción para este padecimiento la etosuximida y el valproato sódico controlan el 80% de las crisis de ausencias (Martínez, 2014).

2.3.3 Pronóstico

Del 2.8 al 7.5% se ha visto que progresa a EMJ. El 65% de los niños con EAN tienen remisión y la mitad de aquellos que no remiten evolucionarán a EMJ. El 33 al 50% desarrollará Crisis Tónico Clónicas Generalizadas en la adolescencia (Martínez, 2014).

2.3.4 Episodios de Ausencias

Estos se caracterizan por alteración breve del estado de consciencia, con mínimo fenómeno motor, ocurren de forma abrupta y terminan súbitamente. Son reveladas con facilidad por la hiperventilación. Inician en edad escolar (Martínez, 2014).

Se han reportado diferentes tipos de episodios de ausencias (Berg, 2010):

- Típicas
- Atípicas
- Con características especiales:
 - Ausencias mioclónicas
 - Ausencias con mioclonías palpebrales

2.3.5 Características clínicas de la Epilepsia de Ausencias de la Niñez

En los pacientes con EAN se presentan ataques epilépticos no convulsivos, episodios de

ausencias, que se caracterizan por la breve (5-20 seg) y súbita pérdida de la conciencia. Son sincrónicos generalizados y bilaterales (Blumenfeld, 2005).

Los electroencefalogramas (EEG) demuestran los típicos picos y ondas de 3 Hz, que con más frecuencia son más prominentes durante la hiperventilación. Los pacientes no son responsables durante los episodios y no tienen memoria de estos breves eventos (Willie, 2010). Por otro lado Tanaka, *et al*, 2008, reporta que pueden llegar a ocurrir hasta 200 ataques por día (picnoléptico).

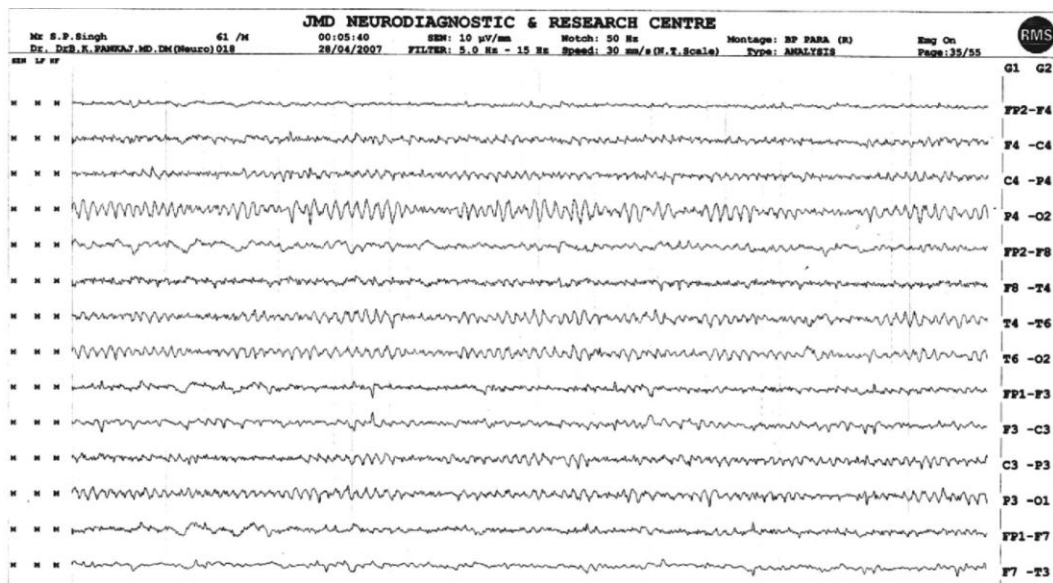


Figura 3. Electroencefalograma del funcionamiento normal del cerebro. Tomado de Pankaj, 2009.

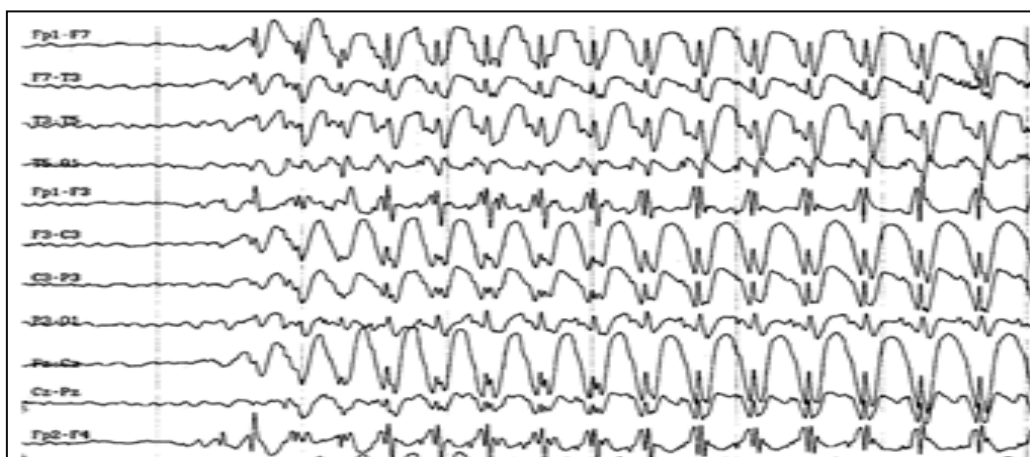


Figura 4. Electroencefalograma de un paciente que muestra una crisis de ausencia, con un patrón electroencefalográfico característico, con complejos punta-onda lenta, generalizados y bilaterales a frecuenciaia de 3Hz. Disponible en:<http://www.epilepsiamexico.gob.mx/info-pacientes/utilidad-eg.html>

La Epilepsia de Ausencias Juvenil, por otra parte, se caracteriza por ataques de ausencia no picnoléptica, que ocurren principalmente después de 10 años de edad. A diferencia de la EAN, estos ataques están asociados frecuentemente con otros síntomas epilépticos, como convulsiones tónico-clónicas generalizadas y mioclonías (Yalçin, 2011). El 80% de las ausencias remiten con el tratamiento, aunque pueden desarrollar crisis tónico-clónicas generalizadas (Villarejo, 1998). Las ausencias, como se mencionó, tienen una expresión dependiente de la edad, comenzando en la niñez (4-8 años) y con frecuencia desaparecen espontáneamente a mediados de la adolescencia (Marini, *et al*, 2003).

Para entender algunos de los mecanismos celulares y moleculares que intervienen en la epileptogénesis de la EAN, es necesario abordar algunos temas básicos.

2.4 Sinapsis

El sistema nervioso se conforma de un gran número de neuronas vinculadas entre sí formando una red de comunicación entre ellas. El sitio en el que dos neuronas llegan a estar próximas una a la otra, dando lugar a una comunicación interneuronal funcional se denomina sinapsis, la mayoría de las neuronas pueden constituir conexiones sinápticas con otras 1000 neuronas o más, y pueden recibir hasta 10 000 conexiones desde otras

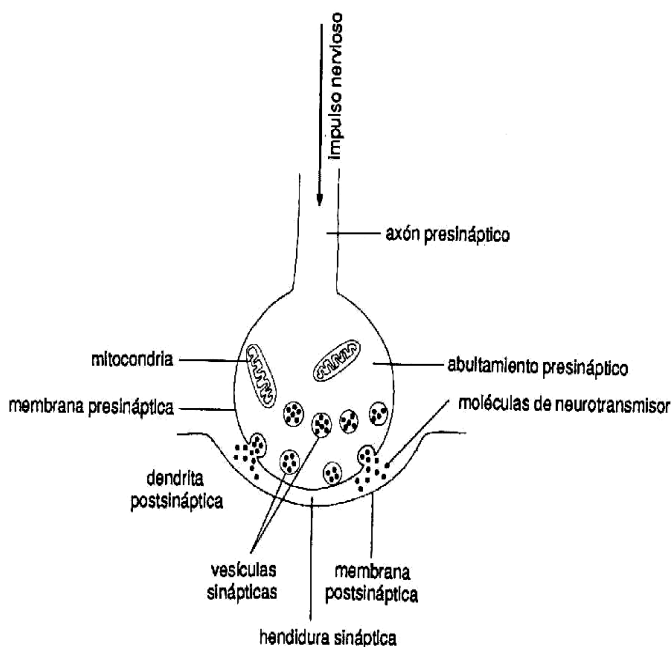


Figura 5. Sinapsis neuronal. González, 2012.

En las sinapsis las vesículas presinápticas y las mitocondrias desempeñan un papel clave en la liberación de sustancias neurotransmisoras. Las vesículas contienen la sustancia neurotransmisora que se libera en la hendidura sináptica; las mitocondrias proporcionan ATP para la síntesis del nuevo neurotransmisor (Snell, 2007).

neuronas (Snell, 2007). En la sinapsis nerviosa se diferencian tres partes (Aige, 2010):

- a) Célula neuronal presináptica, que puede estar formada por la porción terminal del axón de la primera neurona.
- b) Una hendidura sináptica, que es el espacio intercelular entre las neuronas.
- c) Célula neuronal postsináptica, que es frecuentemente la dendrita o el cuerpo celular de la segunda neurona.

2.5 Generalidades de los neurotransmisores

Como neurotransmisores actúan diferentes sustancias de bajo peso molecular, que pertenecen químicamente a clases muy diferentes. Aminoácidos (glutamato, glicina, ácido γ -aminobutírico), derivados de aminoácidos (catecolamina, histamina, serotonina), acetilcolina y ATP (Müller-Esterl, 2008).

2.5.1 Acción de los neurotransmisores

Los canales de iones de las células diana regulados por neurotransmisores convierten las señales químicas en señales eléctricas, de modo que se origina un potencial (post) sináptico (Müller-Esterl, 2008). Todos los neurotransmisores son liberados de las terminaciones nerviosas por la llegada de un impulso nervioso (potencial de acción).

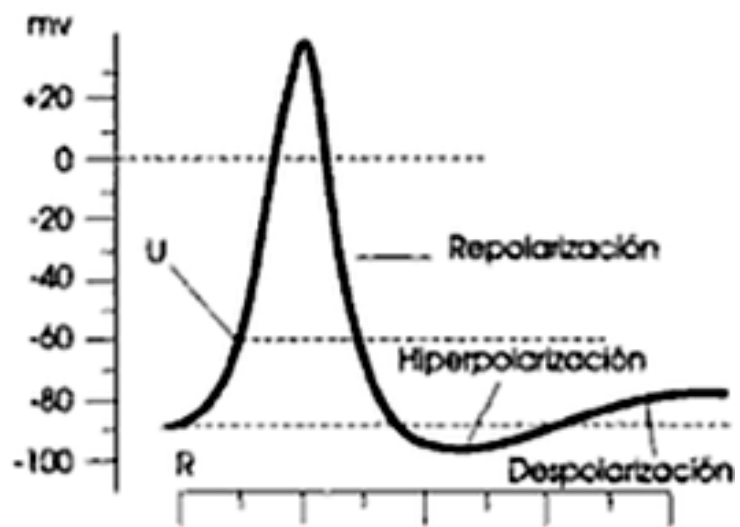


Figura 6. Fases del potencial de acción. R: reposo; U: umbral. Modificado de Cardinali, 1992.

Lo que hace que ingresen iones calcio, causando que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana presináptica. De ahí los neurotransmisores escapan hacia la hendidura sináptica por exocitosis, una vez allí se difunden a través de la hendidura hacia la membrana postsináptica, donde su objetivo es elevar o disminuir el potencial de reposo de esa membrana durante un lapso breve, los receptores en la membrana postsináptica se unen al neurotransmisor y sufren un cambio conformacional inmediato, el cual puede dar lugar a la abertura de un canal iónico, originando un potencial postsináptico excitador breve o un potencial postsináptico inhibitorio breve; o bien, en otros receptores al unirse a la sustancia transmissora se activa un sistema de segundos mensajeros, mediante un transductor molecular, una proteína G, los cuales tienen una fase latente más prolongada y la duración en la respuesta puede ser de varios minutos (Snell, 2007), esto depende del tipo de receptor celular de membrana para el neurotransmisor del tipo ionotrópico o metabotrópico (Kolman, 2005).

En el sistema nervioso central actúan diversos neurotransmisores, entre ellos la acetilcolina y el glutamato, estimulando en la sinapsis excitadora. Otros neurotransmisores como el GABA o la glicina actúan inhibiendo, dando lugar a la sinapsis inhibitoria; estos abren canales de cloruro regulados por ligandos, de tal manera que el flujo de entrada de Cl^- en las células diana causa una hiperpolarización local. Se origina un potencial postsináptico inhibitorio, que actúa contrariamente a la formación de potenciales de acción (Müller-Esterl, 2008).

En la Tabla 3 se muestran los principales neurotransmisores del SNC.

Tabla 3. Tipos y subtipos de receptor para neurotransmisores del SNC: ligandos y sus principales efectos.
Modificada de Kalant, 2002

Neurotransmisor	Subtipos de receptor	Efectos celulares
Clásico		
Acetilcolina	Muscarínico (M ₁₋₅)	M _{1,3,5} : ↑IP ₃ / DAG (excitador) M _{2,4} : ↓AMP _C , ↑K ⁺ (conductancia) inhibidor
	Nicotínico	↑Na ⁺ , ↑K ⁺ y ↑Ca ²⁺ conductancia (excitador)
Serotonina	5-HT _{1A, 1B, 1D}	↓AMP _C , ↑K ⁺ (conductancia) inhibidor
	5-HT _{1C}	↑IP ₃ / DG (excitador)
	5-HT ₂	
	5-HT ₃	↑Na ⁺ , ↑K ⁺ y ↑Ca ²⁺ conductancia (excitador)
Histamina	5-HT ₄	↑AMP _C (excitador)
	H ₁	↑IP ₃ / DG (excitador)
	H ₂	↑AMP _C (excitador)
Dopamina	H ₃	↓AMP _C (inhibidor) autorreceptor
	D _{1,5}	↑AMP _C (excitador)
D _{2,3,4}		
Adrenalina y noroadrenalina	α _{1A, 1B, 1C}	α _{1A} : ↑Ca ²⁺ conductancia (excitador) α _{1B, 1C} : ↑IP ₃ / DG (excitador)
	α _{2A, 2B, 2C}	α ₂ : ↓AMP _C , ↓Ca ²⁺ conductancia (inhibidor)
	B _{1,2,3}	↑AMP _C (excitador)
Aminoácidos		
Glutamato y Aspartato	NMDA	↑Na ⁺ , ↑K ⁺ conductancia (excitador)
	NO NMDA	
	Ciantao	
	Quisqualato/ MPAA	
	L-AP4	↓AMP _C (inhibidor)
GABA	ACPD	↑IP ₃ / DG (excitador)
	GABA _A	↑Cl ⁻ conductancia (inhibidor)
Glicina	GABA _B	↑K ⁺ y ↑Ca ²⁺ conductancia
	Receptor de glicina	↑Cl ⁻ conductancia (inhibidor)
Péptidos		
Opiodes	μ	↓AMP _C , ↓Ca ²⁺ y ↑K ⁺ (conductancia) inhibidor
	Δ	
	K	
Vasopresina	V ₁	↑IP ₃ / DG (excitador)
	V ₂	↑AMP _C (excitador)
Oxitocina	--	↑IP ₃ / DG (excitador)
Colecistocinina	CCC _A	↑IP ₃ / DG (excitador)
	CCC _B	
Angiotensina	All _α	↑AMP _C , ↑GMP _C (excitador)
	All _β	

2.6 Ácido gamma amino butírico (GABA)

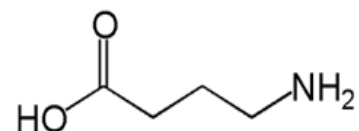


Figura 7. Estructura química del aminoácido ácido gamma butírico

El ácido gamma amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (Bustamante Zuleta, 2007).

Los primeros estudios de que la pérdida del GABA estaba asociada a las crisis epilépticas en seres humanos fueron realizados por Coursin en 1954, quien describió que los niños que tenían una dieta con déficit de fosfato de piridoxal (cofactor de síntesis de GABA) desarrollaban crisis epilépticas; corrigiendo dicho déficit las crisis se detenían (Coursin, 1954). Posteriormente Van Gelder en 1972 describió una reducción del GABA y aspartato en la corteza de los pacientes epilépticos (Van Gelder, 1972). Después se fueron acumulando evidencias que llevaron a desarrollar la hipótesis de que la actividad gabaérgica juega un importante papel en la patogénesis de la Epilepsia (Villarejo, 1998).

2.6.1 Síntesis de GABA

GABA se sintetiza en el interior de la neurona, de ahí pasa a la hendidura sináptica. El GABA se almacena en estructuras pequeñas llamadas vesículas sinápticas. Así al llegar el estímulo nervioso a la terminal del axón el contenido de las vesículas, pasa a través de la membrana de la terminación sináptica (membrana presináptica) y el neurotransmisor GABA es liberados en la sinapsis y se fija a su receptor $GABA_A$ que se encuentra en la membrana postsináptica (Zuleta, 2004).

Los astrocitos absorben el GABA y el ácido glutámico secretado por las terminaciones nerviosas, de tal manera que limitan la diseminación de estos neurotransmisores liberados en la sinapsis (Snell, 2007).

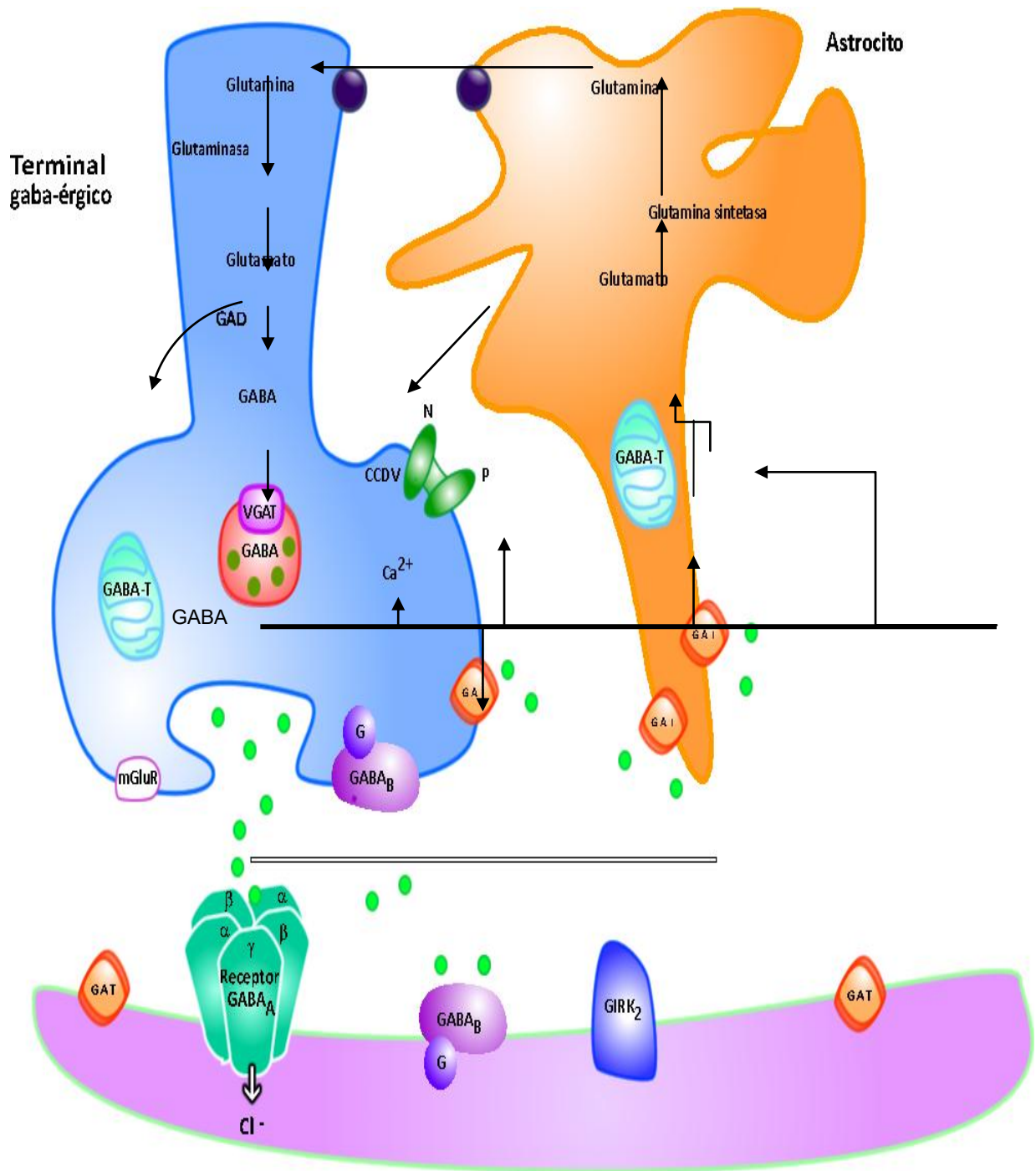


Figura 8. Esquema de una sinapsis GABAérgica, dando entrada a Cl^- . Los canales y los receptores GABA se indican mediante rectángulos. CCDV: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de los tipos N y P; GABA-T: GABA-transaminasa; GAD: ácido glutámico-decarboxilasa; GAT: Transportador de GABA, GIRK₂: canal de K^+ rectificador de la corriente de entrada, acoplado a proteína G; mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato; VGAT: Transportador vesicular de GABA. Modificada de Lorenzo-Velázquez, 2008.

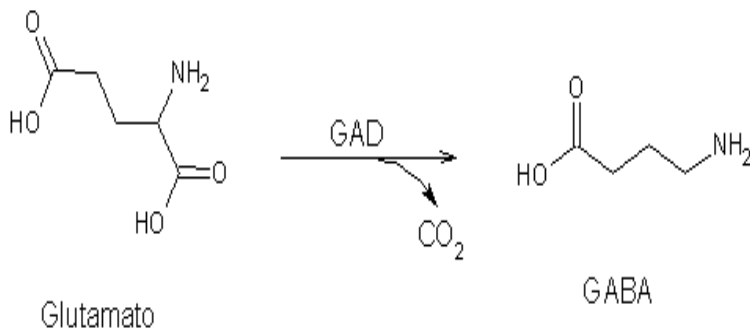


Figura 9. Reacción química de la síntesis de GABA. Modificado de <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/nerves-sp.php>

El GABA se sintetiza a partir del glutamato que se toma de la sangre circulante por medio de la enzima glutamatodecarboxilasa (GAD), la cual requiere fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor (Escobar y Pimienta, 2006).

El GABA no puede cruzar la barrera hematoencefálica (Snell, 2007), por lo cual se sintetiza dentro de las neuronas del SNC; y en el cerebro a partir de la glucosa circulante (Alcaraz, 2001):

El GABA no puede cruzar la barrera hematoencefálica (Snell, 2007), por lo cual se sintetiza dentro de las neuronas del SNC; y en el cerebro a partir de la glucosa circulante (Alcaraz, 2001):

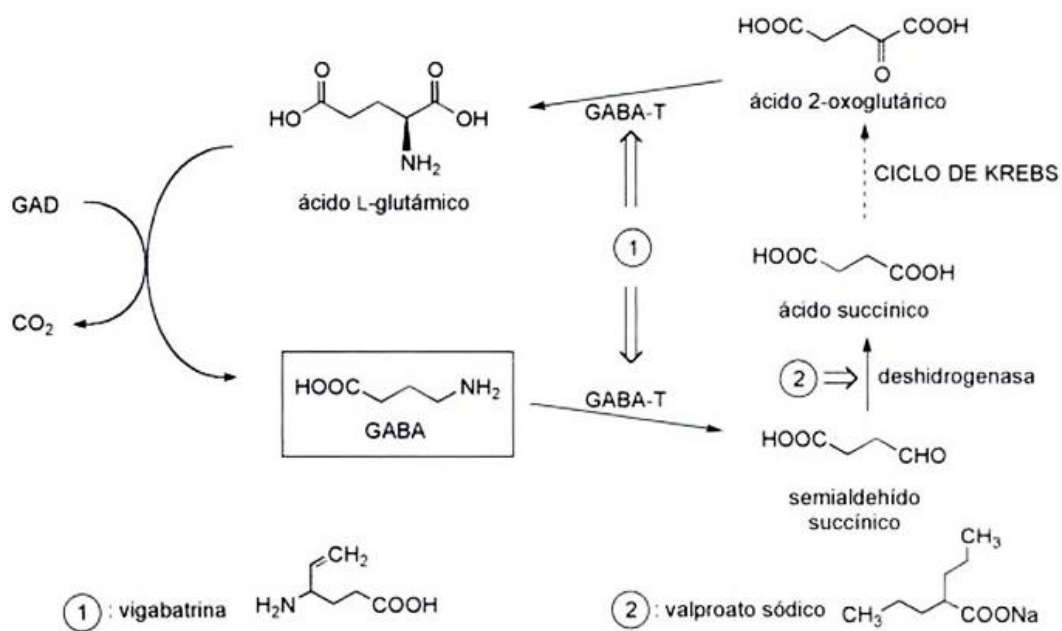


Figura 10. Síntesis y metabolismo del GABA. (Tomado de: Delgado, Minguillón y Joglart, 2003)

El fosfato de piridoxal (PLP) es la forma activa de la Vitamina B₆, que también se puede presentar en forma de fosfato de piridoxamina. El fosfato de piridoxal es una coenzima que actúa como catalizador interviniendo en varias reacciones del metabolismo de los aminoácidos (Melo y Cuamatzi, 2007).

- Transaminación
- Descarboxilación
- Racemización

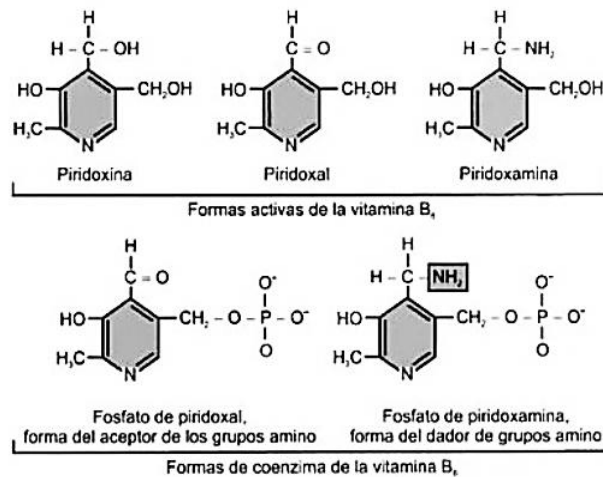


Figura 11. Formas activas de la vitamina B₆, sus formas de coenzima. Tomado de Melo y Cuamatzi, 2007.

El mecanismo de acción del fosfato de piridoxal parece radicar en formar una aldimina (base de Schiff entre el aminoácido sustrato y el grupo aldehído del mismo fosfato) con eliminación de una molécula de agua. El Nitrógeno del anillo de piridina actúa como sumidero de electrones, dando carbaniones que estabilizan al proporcionar el anillo, una extensa deslocalización de carga, lo que caracteriza al fosfato de piridoxal como catalizador. Después da lugar a una imina, que se hidroliza. Dependiendo del tipo de imina se determina la especificidad de la apoenzima, que cataliza así reacciones de racemización, descarboxilación, desaminación y otras reacciones en la cadena lateral del aminoácido sustrato (Melo y Cuamatzi, 2007).

Entre las múltiples funciones del fosfato de piridoxal, se encuentra su participación en el metabolismo de algunos neurotransmisores (Escobar y Pimienta, 2006).

La vitamina B₆ se encuentra en los alimentos en forma de piridoxal y piridoxamina en sus formas 5'fosfato, y como piridoxina en forma de 5'glucosido y su biodisponibilidad depende del tipo de alimento y su manipulación. La piridoxina está en forma libre en los alimentos y en el intestino se capta como glucósido de manera directa o como producto de una hidrólisis por enzimas intraluminales junto con la microflora. Las tres formas (piridoxal, piridoxamina y piridoxina) se absorben en el yeyuno, de ahí se entra a la ruta metabólica mediante fosforilación (Melo y Cuamatzi, 2007).

La vitamina B₆ es captada por el hígado, donde la fosfatasa alcalina hidroliza las formas fosforiladas y pasa a los hepatocitos por un proceso de facilitación y difusión para entrar mediante fosforilación a una ruta metabólica (Melo y Cuamatzi, 2007).

2.6.2 Neuronas gabaérgicas

El GABA está distribuido en toda la corteza cerebral, los ganglios basales y el cerebelo donde actúa como neurotransmisor inhibitorio (Zuleta, 2004).

El GABA es liberado por interneuronas locales de trayecto corto, como: las células en cesto del cerebelo y el hipocampo, células de Purkinje del cerebelo, por células granulares del bulbo olfatorio y las células amacrinas de la retina. En algunos casos se transmite en partes de mayor longitud, como en vías eferentes que parten del estriado y se proyectan al globo pálido y a la zona reticulada de la sustancia nigra (Lorenzo-Velázquez, 2008).

2.6.3 Receptores gabaérgicos

Se han identificado al menos 3 tipos de receptores para el neurotransmisor GABA: los receptores GABA_A (complejo macromolecular), GABA_B (inhibe a nivel presináptico, la liberación de diversos neurotransmisores), GABA_C (parecen hallarse sobre todo en retina) (Fernández-Teruel, 2008).

- Los receptores ionotrópicos:
 1. **GABA_A**, estos son un complejo macromolecular (Fernández-Teruel, 2008).
 2. **GABA_C**, se localizan principalmente en retina (Fernández-Teruel, 2008).

Ambos son canales de cloruro mediados por ligando, también son la diana de numerosos psicofármacos (Müller-Esterl, 2008). También se localiza en la pituitaria y médula espinal (Lorenzo-Velázquez, 2008).

- Los receptores metabotrópicos:
 3. **GABA_B**, pertenecen a la clase de receptores acoplados a proteína G, que se activan por un mecanismo de Canales de K⁺ (Müller-Esterl, 2008).

2.7 Mecanismos celulares y moleculares involucrados en la epileptogénesis en las Epilepsias de Ausencias Idiopáticas.

Experimentos en modelos animales revelaron que el tálamo y la corteza se encuentran implicados en la generación de picos y en la descarga de ondas lentas (Avoli y Gloor, 1982).

Blumenfeld, 2005; describe tres componentes principales de una red talamocortical:

1. Neuronas de relevo talamocorticales, las cuales transfieren entradas de un gran número de fuentes de neuronas piramidales en las capas III-IV y V-VI de la corteza a través de conexiones sinápticas excitadoras.
2. Células piramidales de la capa VI de la corteza que envían de vuelta las entradas excitadoras al tálamo.
3. Interneuronas inhibitorias gabaérgicas en el núcleo reticular del tálamo (NRT), que reciben entradas excitatorias de los axones colaterales de las vías tálamo-corticales y corticotalámicas recíprocas. Cuando se activa, estas neuronas gabaérgicas envían entradas inhibitorias al tálamo y también el uno al otro, pero no la corteza.

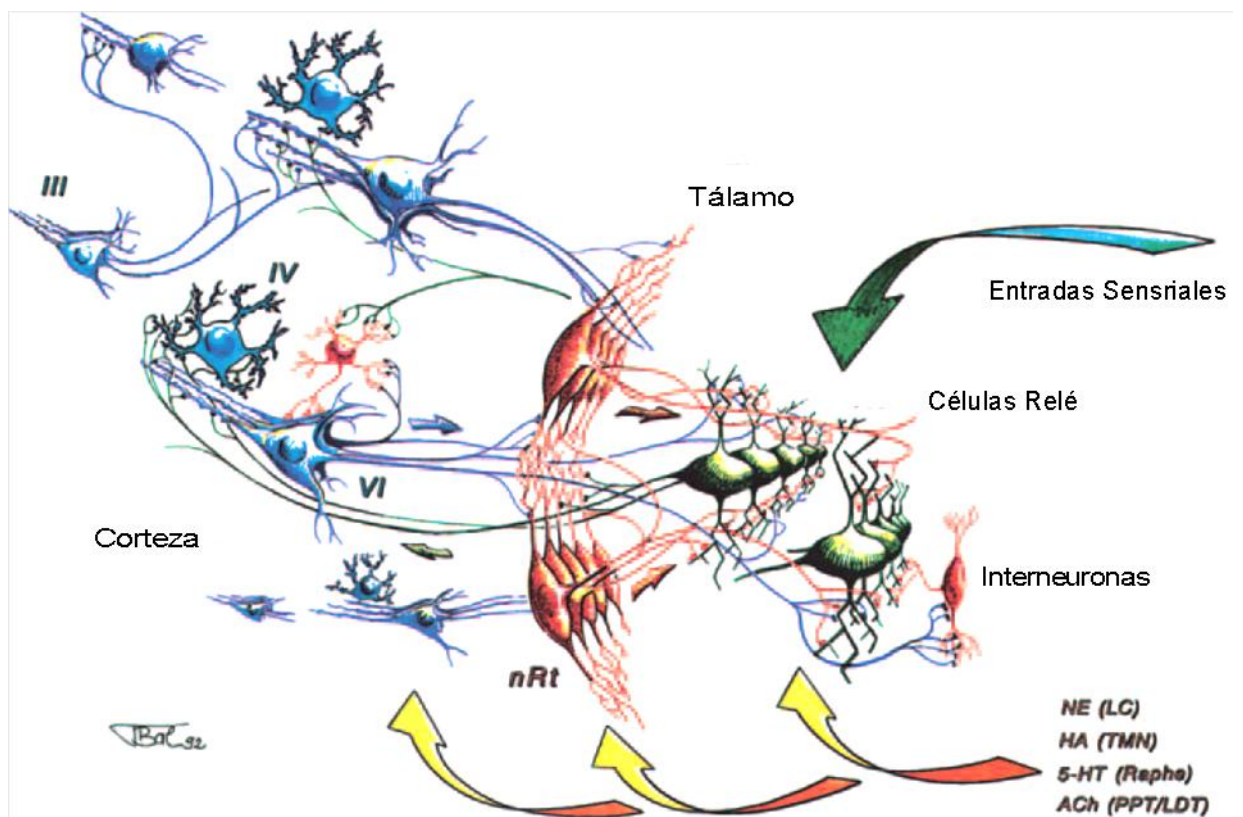


Figura 12. Elementos celulares de la red talámica y cortical involucrada en la generación de punta-onda. Entradas sensoriales y otras, logran retransmitir a células talamocorticales (verde) situadas en el tálamo. Las células talamocorticales envían conexiones excitatorias a las capas corticales III-IV, así como a las dendritas de las células piramidales de la capa V - VI (azul). Las células piramidales corticales, especialmente de la capa VI envían proyecciones excitatorias recíprocas de nuevo a los mismos núcleos talámicos específicos. Neuronas Gabaérgicas inhibitorias (rojo) se encuentran en toda la corteza y el tálamo, pero forman una capa casi pura de células gabaérgicas en el núcleo reticular talámico (nRT). Los axones colaterales de las vías tálamo-cortical recíprocas (verde) y corticotalámico (azul) envían proyecciones a las neuronas excitadoras del nRT a medida que pasan a través de este núcleo. A su vez, las neuronas del nRT envían proyecciones inhibitorias gabaérgicas a áreas recíprocas del tálamo, pero no la

corteza. Las neuronas nRT también están conectadas entre sí a través de una sinapsis inhibitoria Gabaérgica, así como por uniones gap. Tomada de Bal, Von Krosig y McCormick, 1994.

Cuando el circuito talamocortical funciona correctamente, se producirá una ráfaga de oscilaciones sincronizadas con una frecuencia de aproximadamente 10 Hz. En este circuito, las neuronas talamocorticales inducen potenciales postsinápticos excitatorios en las neuronas gabaérgicas del nRT vía receptores de NMDA y no NMDA (Yalçin, 2011).

Los canales de calcio de bajo umbral en las neuronas nRT, son activados conduciendo a la apertura de los canales de Na^+ , iniciando los potenciales de acción (Yalçin, 2011).

La activación de estas neuronas inhibitorias, inducen potenciales postsinápticos inhibitorios (ISPS) en las neuronas tálamo-corticales vía receptores GABA_A . Esta fase inhibidora suprime la ráfaga de disparo en el circuito por un tiempo. Durante este estado hiperpolarizado, los canales de calcio de bajo umbral en las neuronas tálamo-corticales se recuperan de la inactivación. Los canales de calcio se abren, despolarizando la membrana, haciendo que la célula quede disponible para la siguiente ráfaga de potenciales de acción (Yalçin, 2011).

Sin embargo la actividad anormal en este circuito interrumpiría los ciclos alternados de actividad excitatoria e inhibitoria, conduciendo a descargas de punta onda de 3-4 Hz. Es decir, si existe un aumento de la actividad excitatoria en la corteza o en la región talamocortical podría llevar a una ráfaga prolongada de neuronas nRT disparadas, causando prolongados potenciales postsinápticos inhibitorios, mediado por receptores GABA_B vía proteína G, acoplados a canales de K^+ en la región tálamo-cortical. Durante este largo estado de hiperpolarización, los canales de calcio abiertos, inician varios potenciales de acción en cada ciclo, lo que resulta en picos paroxísticos y descargas de ondas lentas (Yalçin, 2011).

Además para la posible actividad anormal en la corteza y en las regiones talamocorticales, se sugiere el mecanismo que explica la generación de descargas de punta onda anormales. Por ejemplo, la pérdida de la inhibición mediada por el receptor GABA_A entre las células reticulares talámicas, causa que éstas células produzcan prolongados potenciales postsinápticos inhibitorios (ISPS) en células talamocorticales mediadas por receptores GABA_B y el aumento del bajo límite de calcio (Yalçin, 2011).

2.7.1 Receptor GABA_A

Éstos receptores inhibitorios son pentámeros formados por el ensamble de múltiples subtipos de subunidades ($\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 3$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$, δ , ϵ , π , θ and $\rho 1$ - $\rho 3$) que forman un canal iónico de Cloro y con mayor frecuencia contiene dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ ó δ (Sieghart y Sperk, 2002).

Los receptores GABA_A median tanto la transmisión sináptica inhibitoria y varios fármacos antiepilépticos incluyendo benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides, actúan potenciando al receptor GABA_A (Sieghart y Sperk, 2002).

El enlace del neurotransmisor GABA se da en la interfase entre las subunidades α y β provocando la apertura del canal, lo que permite la afluencia de Cl⁻ hacia el interior de la célula. El enlace con las benzodiazepinas (BZ) ocurre en la interfase entre la subunidad α (1,2,3, ó 5) y γ , potencializa a GABA induciendo el flujo de Cl⁻ (Jacob, Moss y Jurd, 2008).

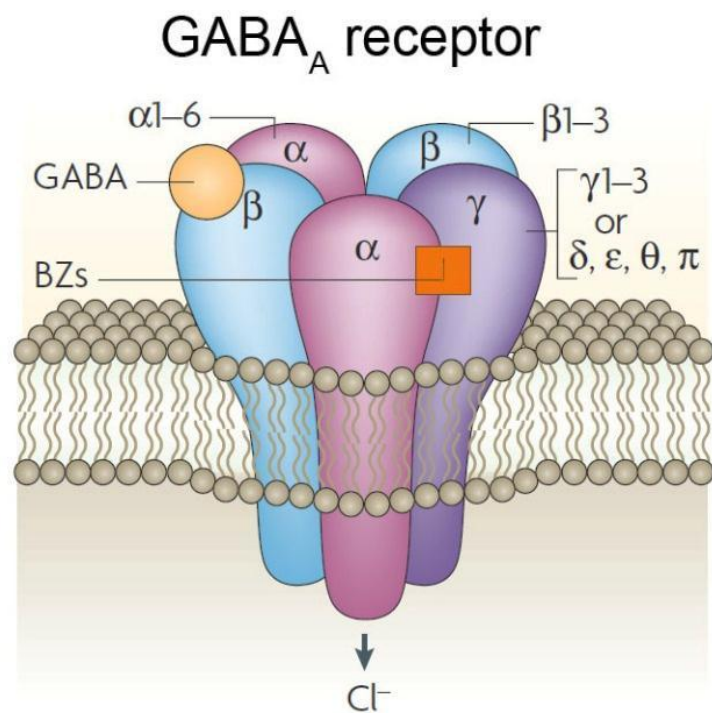


Figura 13. Composición del Receptor GABA_A; cinco subunidades de siete subunidades de subfamilias forman un canal heteropentamérico permeable a Cl⁻. Tomado de: Jacob et al., Nature reviews, Neuroscience, 2008.

2.8 Antecedentes genéticos

Tabla 4. Asociación y análisis de mutaciones de los genes candidatos para Epilepsias Idiopáticas de Ausencias. Modificada de Yağın, 2011.

Gen	Proteína	Mutación DNA/ Análisis de asociación	Mutación en Proteína	Características clínicas y de los pacientes/ Referencia	Estudio funcional
GABRG2	Subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA _A	C.245G>A	R43Q	Pacientes con EAN con crisis febriles en una gran familia	Corrientes reducidas del receptor GABA _A
		IVS6 + 2T >G	--	Pacientes con EAN con crisis febriles	Probable proteína truncada
GABRA1	Subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA _A	975delC	Codón de paro prematuro	Pacientes con EAN	Ninguna corriente del receptor GABA _A
GABRB3	Subunidad $\beta 3$ del receptor GABA _A	Asociación significativa de un haplotipo en común	--	45 pacientes australianos con EAN	Reducción del nivel transcripcional del gen GABRB3
		c.31C>T	P11S	Familias mexicanas con EAN con ancestros indios-americanos y europeos españoles	Proteínas maduras alteradas, topología, ensamble, y localización subcelular de receptores GABA
		c.44C>T	S15F		
		c.G962>A	G32R		
CACNA1A	Subunidad $\alpha 1A$ de los canales P/Q	573C>T	R1820stop	1 paciente con un severo fenotipo de crisis de ausencias y ataxia	Reducción de la corriente de Ca ²⁺
		439G>A	E147K	En una familia con crisis de ausencias y ataxia	Reducción de la función del Canal de Ca ²⁺
CACNA1G	Subunidad $\alpha 1G$ de los canales LVA	c.1709C>T	A570V	Un paciente japonés con un caso esporádico de EMJ, y con historia cercana EAN	Incremento de la corriente de Ca ²⁺ e inactivación de tasas de decaimiento más rápido.
		c.3295G>A	A1099T		Ninguna alteración en la corriente de Ca ²⁺
		c.3728C>A	R1243Q		
CACNA1H	Subunidad $\alpha 1H$ de los canales LVA	562C>A	F161L	Pacientes chinos con EAN	Incremento de la actividad del canal tipo T.
		923G>A	E282K		
		1445T>A	C456S		
		1574G>A	G499S		
		2022C>T	P648L		
		2310G>A	R744Q		
		2322C>T	A748V		
		47152C>T	P314S	Pacientes chinos con EAN	Predicción del cambio el sitio potencial de fosforilación.
		48684C>T	P492S		Predicción del cambio del estado de carga del canal y sitio de fosforilación.
		47247C>T	N345N		Predicción de alteración del sitio potencial de splicing.
		49067A>G	L602L		Predicción de afectación al sitio de unión del factor transcripcional.

<i>CACNA1H</i> (continuación)	Subunidad $\alpha 1H$ de los canales LVA (continuación)	Asociación significativa del polimorfismo rs2745150 en el intrón 11	S619S	100 Pacientes chinos con EAN	Predicción del cambio del sitio potencial de splicing.
		Asociación significativa del polimorfismo rs9934839 en exón 9 y un haplotipo	--	218 pacientes con EAN	Predicción el cambio del sitio de unión transcripcional.
<i>CACNG3</i>	Subunidad $\gamma 3$ del canal de calcio dependiente de voltaje	Una fuerte asociación de 3 polimorfismos comunes r4787924, rs965830, rs2214437	--	217 trios de EAN y 65 genealogías nucleares con origen caucásico	--
<i>ME2</i>	Enzima málica 2	Asociación de haplotipo de 9 polimorfismos	--	68 Pacientes con EAJ con CTCG	--
<i>GLUD1</i>	Glutamato deshidrogenasa	833C>T	R221C	3 Niños en la misma familia con epilepsia de ausencias con mioclónicas fotosensible y HI/HA	Disminución de los niveles de GABA en pacientes comparados con controles
<i>JRK / JH8</i>	JRK Homólogo desigual (ratón)	c.1367C>T	T456M	Pacientes con EAN que evolucionaron a EMJ	--
<i>LGI4</i>	Glioma inactivada 4, rica en leucina	Asociación de un polimorfismo (c.1914GC>AT)	--	42 pacientes con EAN	--

EAN. Epilepsia de Ausencia de la Niñez

EAJ. Epilepsia de Ausencia Juvenil.

EMJ. Epilepsia Mioclónica Juvenil

Canales LVA. Canales Activados por bajo voltaje.

HI/HA. Hiperinsulinismo / Hiperamoniemia

Las mutaciones o variaciones en los genes *GABRA1*, *GABRB3*, *GABRG2*, *GABRD* de las subunidades del receptor GABA_A se han visto asociadas con varios síndromes epilépticos (Kang y Macdonald, 2009), entre ellos EAN (Tanaka, *et al*, 2008). La mayoría de las mutaciones presentan un modo de herencia autosómica dominante. Éstas incluyen mutaciones: cambio de sentido (missense), sin sentido (nonsense) y cambio en el marco de lectura en regiones codificantes (frameshift), así como mutaciones en regiones no codificantes (Kang y Macdonald, 2009).

Tabla 5. Mutaciones asociadas a Epilepsia de Ausencia de la Niñez (Kang y Macdonald, 2009).

Mutaciones cambio de sentido. Causan alteraciones en el tráfico (paso de iones a través del canal) y/o defectos en la activación del canal.	
GABRA1	A322D (Cossette, <i>et al</i> , 2002).
GABRB3	P11S (Tanaka, <i>et al</i> , 2008). S15F (Tanaka, <i>et al</i> , 2008). G32R (Tanaka, <i>et al</i> , 2008).
GABRG2	R43Q (Wallace, <i>et al</i> , 2001). R138G (Audenaert, 2006). K289M (Baulac, 2001).
GABRD	E177A (Dibbens, 2004). R220C (Dibbens, 2004). R220H (Dibbens, 2004).
Mutaciones o polimorfismos en el promotor GABRB3.	
Reducción de la unión del activador transcripcional neuro-específica y la transcripción	

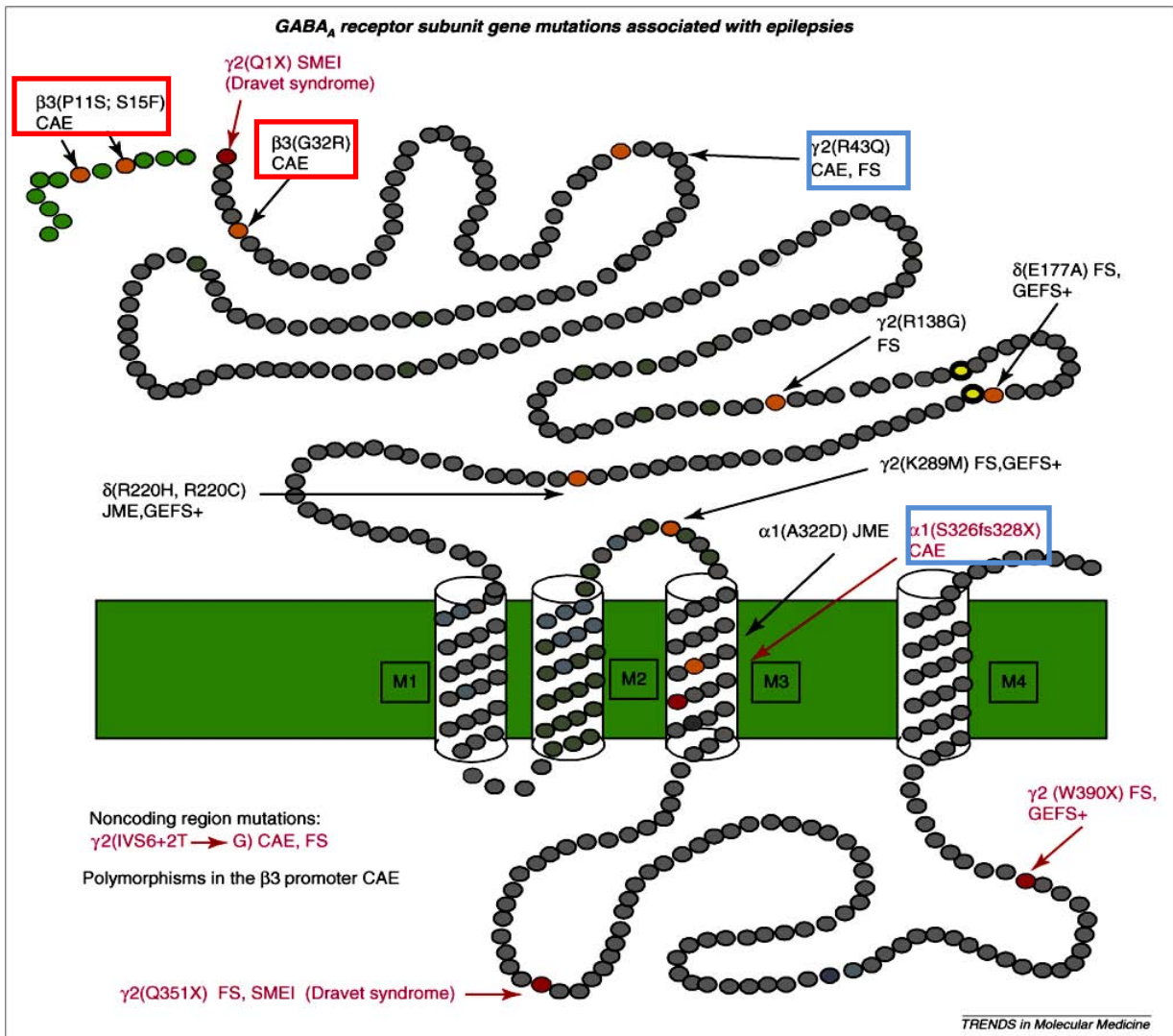


Figura 14. Representación esquemática del receptor GABA_A, mostrando la localización de mutaciones identificadas asociadas a diferentes tipos de epilepsia. Tomado de Kang y Macdonald, 2009

2.8.1 GABRB3

Entre los principales constituyentes neuronales del receptor GABA_A se encuentra la subunidad β 3, mientras en el cerebro adulto muestra un patrón de expresión relativamente restringido, durante el desarrollo es el más abundante y mayormente expresado en forma normal en el cerebro, lo que indica que la dosis génica de *GABRB3* juega un papel importante en el desarrollo temprano. (Wisden, Laurie, Monyer y Seeburg, 1992).

Este gen codifica para la subunidad β 3 del receptor GABA_A, este receptor se encuentra acoplado a un canal iónico dependiente de ligando. La proteína está formada por 13 subunidades distintas de un canal de cloruro, que sirve como receptor para el ácido gamma-aminobutírico. Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 15. Se ha reportado que mutaciones en este gen pueden estar asociadas con la patogénesis del

síndrome de Angelman, síndrome de Prader-Willi, y autismo. Por splicing alternativo, se codifican isoformas distintas. Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI, 2014. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2562>)

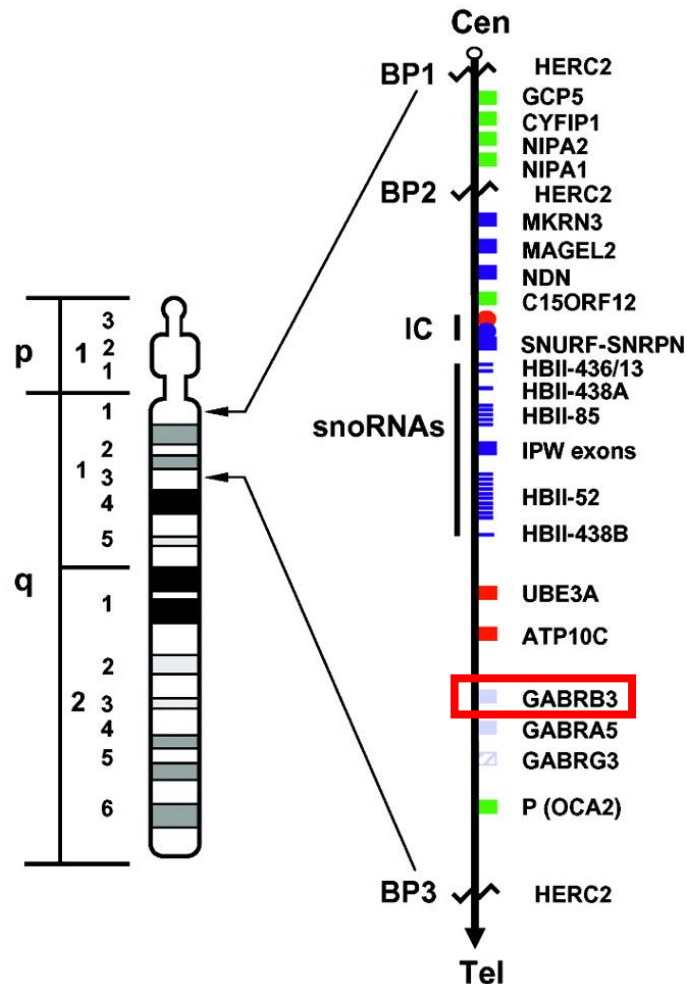


Figura 15. Ideograma del cromosoma 15, y algunos genes que se encuentran en la región 15q12.

Modificado de NCBI, 2014 (Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2562>)

El gen *GABRB3* en humano tiene 10 exones (Glatt, 1997) y contiene 2 promotores río arriba de los primeros exones alternativos, exón 1a y exón 1 (Kirkness, 1993). Ambos exones alternativos codifican para el péptido señal (Urak, Feucht, Fathi, Hormik y Fuchs 2006).

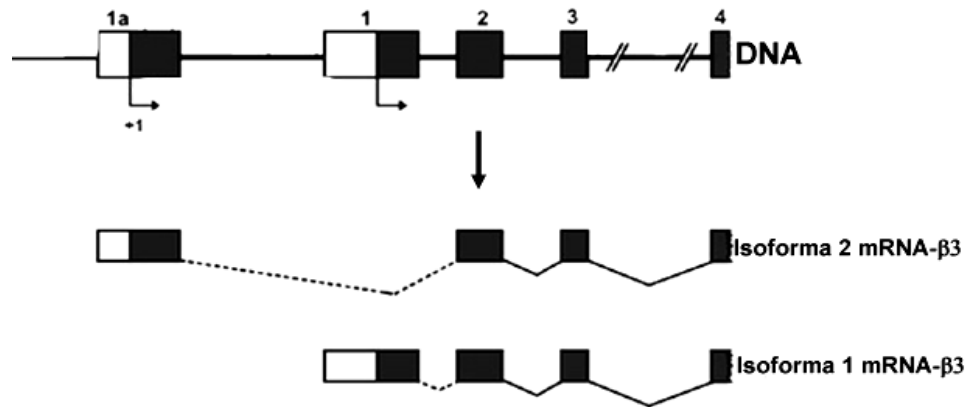


Figura 16. Gen *GABRB3*; así como sus isoformas 1 y 2 alternativas del transcrito.

Modificada de Urak, *et al*, 2006.

La hipótesis del péptido señal por Blobel y Dobberstein, señala que los polipéptidos que están destinados a ser secretados, cuando se sintetizan en polirribosomas contiguos a la membrana del Retículo Endoplásmico; y están asignados al exterior de la membrana, obtienen una región hidrofóbica (péptido señal) en el polipéptido incipiente. Esto cumple con dos funciones:

- Fijarse a los polirribosomas de forma estable, debido a las interacciones hidrófobas.
- Conducir al polipéptido en formación hacia el exterior, mediante canales hidrofóbicos de la membrana. Cuando el polipéptido ha atravesado la membrana, actúa una peptidasa asociada al péptido señal, lo que da lugar a la proteína madura (Jiménez-Sánchez y Guerrero, 1982).

Los péptidos señal más comunes en células eucariotas cuentan con unos 20-25 aminoácidos, llevan carga positiva en el dominio aminoterminal (Arg, Lys), y principalmente aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Ala, Val, Ile, Phe). Las principales secuencias señal se desprenden co-traduccionalmente; los péptidos señal permanecen en la membrana del retículo endoplásmico, donde son degradados proteolíticamente (Müller-Sterl, 2008).

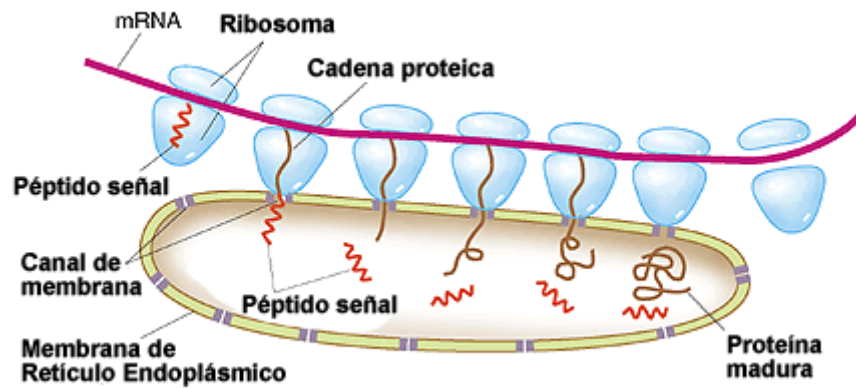


Figura 17. Péptido señal. Modificada de: Blobel, G., 1999. Esta imagen muestra la hipótesis de la señal, la cual explica que las proteínas que se van a exportar fuera de la célula son sintetizadas por ribosomas, asociadas con el retículo endoplásmico. La información genética del DNA se transfiere a través de ARN mensajero (mRNA). Esta información determina cómo los aminoácidos construyen la proteína. En primer lugar, se forma un péptido señal como parte de la proteína, con la ayuda de proteínas de unión, el péptido señal direcciona el ribosoma a un canal en el retículo endoplásmico; luego la cadena de proteínas en crecimiento penetra en el canal, y el péptido señal es escindido. La proteína completada se libera en el lumen del retículo endoplásmico y la proteína es transportada posteriormente fuera de la célula.

Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1999/press.html)

3. OBJETIVO

Realizar el estudio molecular de la región 5' UTR de la región promotora y del exón 1a del gen *GABRB3* mediante técnicas moleculares de PCR de punto final y secuenciación de Sanger automatizada en pacientes mexicanos con Epilepsia de Ausencias de la Niñez que acuden a la Clínica de Epilepsia en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, para conocer si existe una asociación de mutaciones y/o variaciones de esta región del gen y la enfermedad en estudio.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar los exones del gen *GABRB3* mediante PCR de punto final, en los pacientes con EAN.
- Secuenciar el gen *GABRB3* mediante secuenciación de Sanger automatizada, en los pacientes con EAN.
- Analizar los electroferogramas para buscar mutaciones o variantes causales de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Sí la Epilepsia de Ausencias de la Niñez es una enfermedad relacionada con alteraciones en el receptor para GABA, entonces mutaciones o variaciones en el gen *GABRB3*, que codifica para la subunidad $\beta 3$ de este receptor, estarán involucradas con la etiología de este padecimiento.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama general

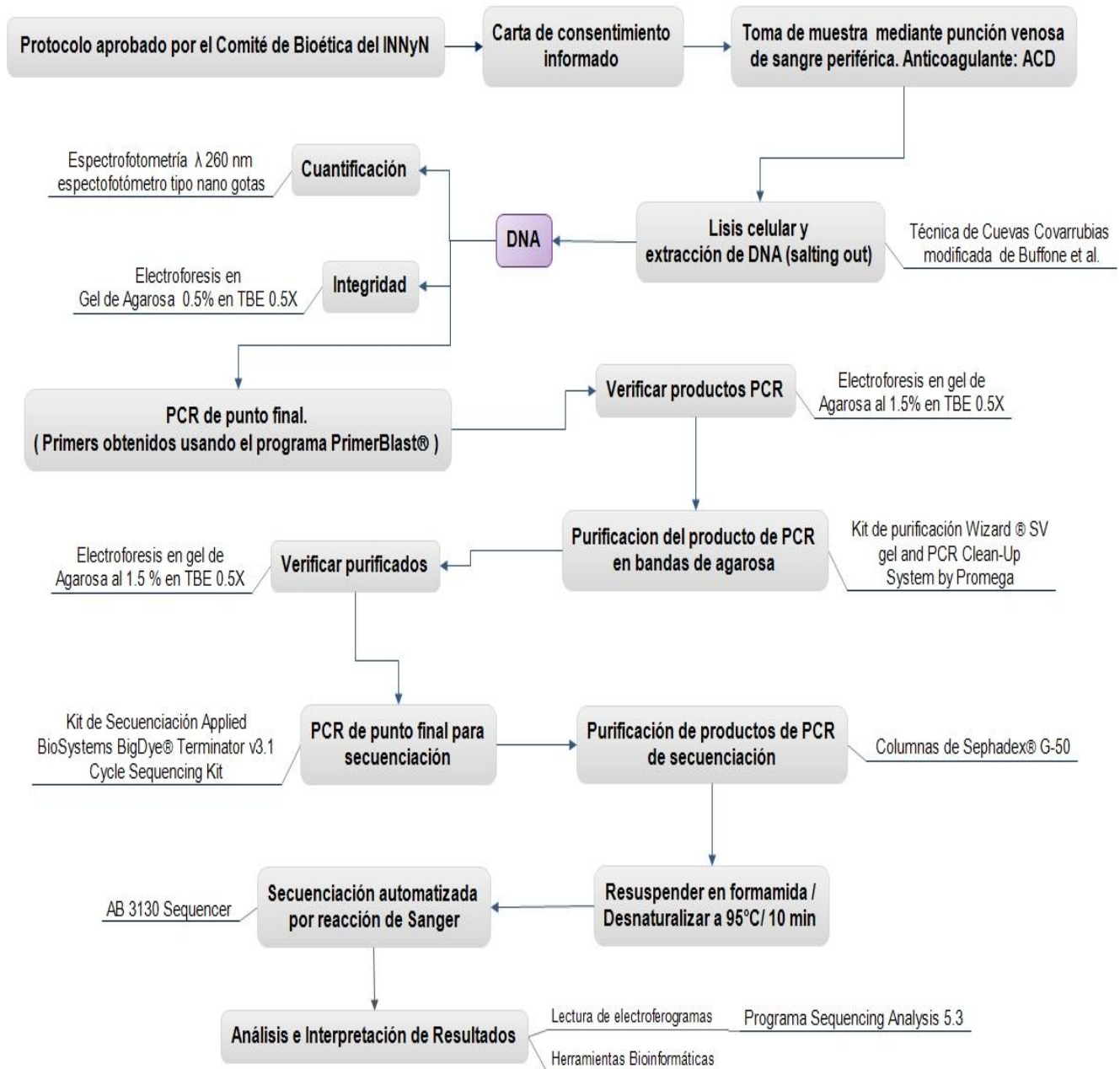


Figura 18. Diagrama general de la metodología utilizada.

El protocolo fue aprobado por el Comité Científico y Ética en Investigación del INNyNMVS.

5.2 Muestras biológicas

5.2.1 Pacientes

Se utilizaron para este estudio 35 pacientes de origen mestizo-mexicano mexicanos (17 mujeres y 18 hombres, con un rango de edad de 14-59 años) diagnosticados con Epilepsia de Ausencias de la Niñez, que acuden a la Clínica de Epilepsia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Todos tuvieron que firmar Carta de Consentimiento Informado.

5.2.2 Controles

Se utilizaron en este estudio una población de 87 controles (33 mujeres y 54 hombres con un rango de edad 19-65 años), mestizo mexicana, población sana que no padece epilepsia, y sin antecedentes de esta, en familiares de primer grado.

Todos tuvieron que firmar la Carta de Consentimiento Informado.

Se estudiaron 87 controles (33 mujeres y 54 hombres con un rango de edad 19-65 años), población mestizo mexicano, representando a una población sana, que no padecen epilepsia, en ninguna de sus formas, y sin antecedentes con epilepsia en familiares de primer grado. Todos firmaron Carta de Consentimiento Informado.

5.3 Toma de muestra

Se toma una muestra de aproximadamente 20mL de sangre periférica mediante punción venosa con tubos tipo Vacutainer® con un anticoagulante ACD (Ácido Cítrico/ Citrato/ Dextrosa).

5.4 Lisis y extracción de DNA

Para la lisis de DNA se utiliza la técnica descrita por Cuevas Covarrubias modificada por Buffone y Darlington; y col.

Transferir la sangre a tubos cónicos de 15 ml y agregar 3 veces el volumen de amortiguador TTS (Tris 10 mM, Tritón 1% y Sacarosa), el Tritón, es un detergente no iónico que solubiliza las proteínas, sin propiedades antimicrobianas, absorbe en la región UV a 275nm ($\lambda_{\text{máx}}$), la sacarosa sirve para desestabilizar la envoltura celular mediante un

choque osmótico y el TRIS es un reactivo que escinde enlaces disulfuro (presente en proteínas) en solución acuosa.

Realizar de 2 a 3 lavados con TTS centrifugando a 4000 rpm/6 minutos, hasta obtener un botón blanco, que son los linfocitos.

Transferir a un tubo colector de 1.5ml, en donde se llevará a cabo la extracción.

Agregar 570 μ l de NaCl mM, agitar durante 2 min.

Agregar 30 μ l de SDS al 10%, agitar durante 5 min.

Agregar 200 μ l de NaCl saturado y agitar durante 10 min.

Centrifugar a 14000 rpm/15 min a 4°C, en este paso las sales crean un medio hipertónico, lo que provoca que estallen las células y los núcleos, quedando libre las fibras de cromatina.

Decantar el sobrenadante en tubos colectores de 1.5ml con 600 μ l de cloroformo / alcohol isoamílico (49:1), mezclar suavemente durante 10min y centrifugar a 14000 rpm/15 min a 4°C. En este paso se busca quitar impurezas del DNA.

Tomar la fase superior y transferir a un otro tubo de 1.5 ml y se agrega 1 ml aprox. de etanol absoluto frío, este paso es para precipitar el DNA, debido a su insolubilidad en alcoholes. Agitar suavemente hasta precipitar el DNA, centrifugar a 11000rpm/10 min a 4°C.

Decantar el sobrenadante y agregar al botón etanol al 70%, centrifugar en las mismas condiciones, esto es con el fin de lavar el DNA; finalmente secar el botón de DNA en una centrífuga al vacío durante 30 min y resuspender en agua estéril en un baño a 50°C.

5.5 Cuantificación de DNA total, determinación de su pureza y elaboración de diluciones.

Realizar la cuantificación de DNA mediante espectrofotometría utilizando el rango de luz UV, esto debido a que los anillos presentes en las bases nitrogenadas del DNA tienen una absorbancia máxima a 260 nm.

Colocar 2.5 μ l de la muestra en el lector del Espectrofotómetro (Jenway's Genova Nano Spectrophotometer) y realizar 3 lecturas de la muestra y registrar los resultados.

Para determinar la pureza, utilizar la relación DNA/Proteínas. La cantidad de proteínas residuales en la extracción se determina midiendo la absorbancia a 280nm. Un DNA con buena calidad y pureza es aquel cuya relación A_{260}/A_{280} es de 1.8 - 2.0. de esta forma se obtiene un valor promedio de la Concentración y Pureza por muestra.

Realizar diluciones de las muestras a una concentración de 100ng/ μ l, diluyendo con agua inyectable estéril a un volumen de 50 μ l.

5.6 Integridad del DNA genómico mediante Electroforesis.

Posteriormente para verificar la integridad del DNA genómico extraído realizar una electroforesis horizontal en gel de Agarosa al 0.5% (Lodish y col, 2006).

Mezclar de 2.5-3 μ l de DNA genómico extraído con 2 μ l de buffer de carga, y colocarla mezcla en un pozo del gel, el buffer de carga está constituido por azul de bromofenol y xilencianol como colorantes que migran a la misma velocidad que una cadena DNA de 300pb a 4Kpb, y ayuda en la visualización de la migración del DNA a través de la red de fibrillas del gel, también contiene glicerol que por su alta densidad ayuda a su estabilidad en el pozo del gel de agarosa.

Aplicar una corriente eléctrica a 100V, debido a que el DNA tiene una carga negativa migrará desde el cátodo (polo negativo) hacia el ánodo (polo positivo), utilizar como Solución Buffer el TBE 0.5% (Trizma ® base, Ácido Bórico, EDTA).

Finalmente para la tinción de los geles de Agarosa, teñir con una solución de Bromuro de Etidio, el cual es un colorante fluorescente intercalante de DNA, sumergir el gel durante 2-5 segundos y colocarlo en un transiluminador de luz UV. El DNA se debe observar de una coloración rosado-anaranjado.

El DNA íntegro se aprecia por una banda bien definida sin dejar un barrido en su carril del gel.

5.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez que tenemos el DNA disuelto en agua estéril, mezclar el DNA, el par de primers (forward y reverse), la polimerasa Taq, dNTP's y buffer (MgCl₂).

Se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es una amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante ciclos repetidos de síntesis dirigidas por primers (iniciadores o cebadores), los cuales se alinean

a sitios específicos de la región requerida de DNA. Por medio de esta técnica amplificar la región 5' UTR del promotor y el exón 1a.

El mecanismo, se divide en 3 pasos:

- La desnaturalización. Se da la separación de las cadena de DNA, ocurre alrededor del los 94-95°C.

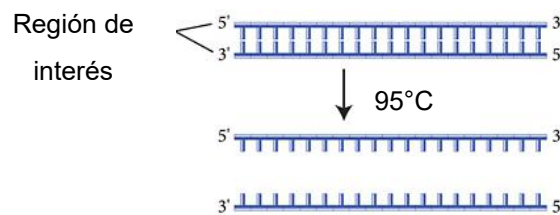


Figura 19. Pasos de la PCR. Desnaturalización. Modificado de: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>. Fecha de consulta: 30 de Marzo del 2014

- El alineamiento. Cada cadena de DNA sirve de molde para generar una nueva, con ayuda de los oligonucleótidos (dNTP's) que son complementarios de la secuencia y se unen por los extremos 3' del sitio blanco.

Éstos se unen a las cadenas molde de forma específica.

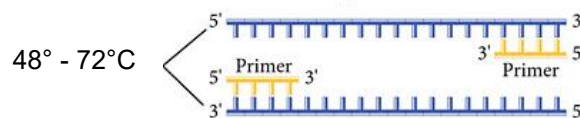


Figura 20. Pasos de la PCR. Alineamiento. Modificado de: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>. Fecha de consulta: 30 de Marzo del 2014

- Elongación. La síntesis de DNA se comienza a partir de la posición de cada iniciador, cebador o primer, se utiliza una DNA polimerasa termorresistente (*Taq* polimerasa) que trabaja entre 70-75°C para generar una copia complementaria de la cadena de DNA base.

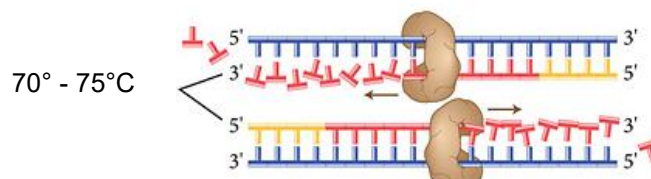


Figura 21. Pasos de la PCR. Elongación. Modificado de: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>. Fecha de consulta: 30 de Marzo del 2014

- El proceso se repite, a lo cual se le conoce como ciclos, finalmente se incrementa en forma exponencial el fragmento de DNA base.

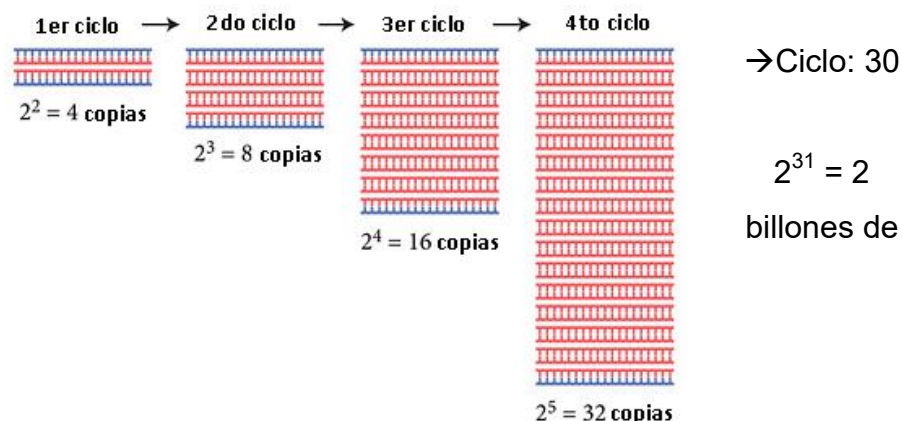


Figura 22. Pasos de la PCR. Amplificación exponencial. Modificado de:

<https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>. Fecha de consulta: 30 de Marzo de 2014).

5.7.1 Primers para amplificar el exón 1a y región 5'UTR del promotor del gen *GABRB3*

Los primers se diseñaron usando el programa PrimerBlast®, la cual es una herramienta bioinformática en donde se puede verificar la especificidad con la secuencia blanco, entre otros parámetros. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Se elaboraron por medio de la empresa Invitrogen®.

Tabla 6. Secuencias de los primers (Forward y Reverse) diseñados de 5' a 3'. En donde la Región 5' UTR del promotor se dividió en 2 partes (Parte 1 y Parte 2).

Región		Secuencia 5' → 3'	Tamaño (pb)
5' UTR del promotor	Parte 1	Forward: CAGAACACAAAACGAGCTTGATG Reverse: CTGAGCCCTTTCTGCTCACA	474
	Parte 2	Forward: CAGTCTCCAAGTCTGGCTGG Reverse: CCGACGGTGCCTGCAGAA	474
Exón 1a		Forward: TAGGGGCGGGGATCCCTGCGT Reverse: TCCCGACGGTGCCTGCAGAAC	212

5.7.2 Mezcla de reacción para la PCR de punto final de la región 5' UTR del promotor del gen *GABRB3* y el Exón 1a.

Tabla 7. Ejemplo de la mezcla de reacción de PCR para un producto de amplificación de 212 pares de bases, correspondientes al amplicón del Exón 1a. Mezcla para 25 reacciones.

Reactivo	Concentración [ng/μL]	Volumen por cada reacción	No. De reacciones + 0.5 (control negativo)= 25.5 reacciones
DNA genómico	50	2 μL	--
Primer Forward	50	1 μL	25.5 μL
Primer Reverse	50	1 μL	25.5 μL
Master Mix Qiagen® (Taq polimerasa, dNTP's, MgCl ₂)	--	10 μL	255 μL
H ₂ O	--	6 μL	153 μL
Volumen total:		20 μL	459 μL

5.7.3 Temperatura de alineación (T_m). Gradiente de temperatura.

En el paso de alineación se unen los primers con la secuencia blanco, este paso se da entre los 40° - 65° C, y va a depender de la longitud y la secuencia de los primers. En el paso de alineamiento se busca que los primers se unan a la secuencia diana con alta especificidad y se puedan hibridar con la secuencia blanco. Para esto es necesario buscar la temperatura a la que los primers se unen de manera específica y generan el amplicón deseado.

5.7.3.1 T_m teórica

En algunos casos los primers diseñados cuentan con una Temperatura de alineación teórica (T_m). También existen fórmulas útiles para calcular esta temperatura, la ecuación más simple para calcular la T_m está dada por la Regla de Wallace:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

En donde A, G, C, y T corresponde al número del nucleótido presente.

Tabla 8. Secuencia 5' → 3', pb y T_m teórica de la región 5' UTR del promotor → Exón1a (Parte 1).

Región	Secuencia 5' → 3'	Tamaño (pb)	T _m (°C)
Promotor (parte 1) Región 5' UTR → Exón1a	Forward: CAGAACACAAAAACGAGCTTGATG Reverse: CTGAGCCCTTTCTGCTCACA	474	59.56 59.96

Cálculo de la Tm teórica la región 5' UTR del promotor →Exón1a (Parte 1).

Para forward:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

$$T_m = 2(11+3) + 4(5+5)$$

$$T_m = 68$$

Para reverse:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

$$T_m = 2(3+6) + 4(3+8)$$

$$T_m = 62$$

Los principales factores que influyen a este valor son: la concentración de MgCl₂, del DNA, la longitud del amplicón, la secuencia, la presencia de DMSO, formamida u otros agentes desnaturalizantes. Por eso es necesario realizar un gradiente de temperatura para conocer la Tm óptima para cada fragmento de DNA amplificar.

5.7.3.2 Mezclas de reacción para el gradiente de temperatura mediante PCR de punto final para la región del promotor del gen *GABRB3* y el Exón 1a.

Tabla 9. Ejemplos de las mezclas de reacciones de PCR para conocer la temperatura óptima de alineamiento, con y sin DMSO.

SIN DMSO			
Reactivo	Concentración [ng/μL]	Volumen / reacción	No. De reacciones + 1 (control negativo) = 13 reacciones
DNA genómico	50	0.8 μL	10.4 μL
Primer Forward	50	0.4 μL	5.2 μL
Primer Reverse	50	0.4 μL	5.2 μL
Master Mix Qiagen® (Taq polimerasa, dNTP's, MgCl ₂)	--	4 μL	52 μL
H ₂ O	--	2.4 μL	31.2 μL
Volumen total:		8 μL	104 μL
CON DMSO 5%			
DNA genómico	50	0.8 μL	10.4 μL
Primer Forward	50	0.4 μL	5.2 μL
Primer Reverse	50	0.4 μL	5.2 μL
Master Mix Qiagen® (Taq polimerasa, dNTP's, MgCl ₂)	--	4 μL	52 μL
DMSO al 5%	--	0.4 μL	5.2 μL
H ₂ O	--	2 μL	26 μL
Volumen total:		8 μL	52 μL

5.7.3.3 Electroforesis de un gradiente de temperatura.

Conocida la T_m teórica, establecer un intervalo de 3-5°C por arriba y por debajo de esta, manejar 12 temperaturas, las cuales equivalen al número de lugares que el termociclador tiene para realizar el gradiente. Como se observa en siguiente Figura, existen varias temperaturas a las cuales se obtiene el amplicón deseado. En este caso escoger la temperatura en donde la banda se vea más intensa y sin degradado.

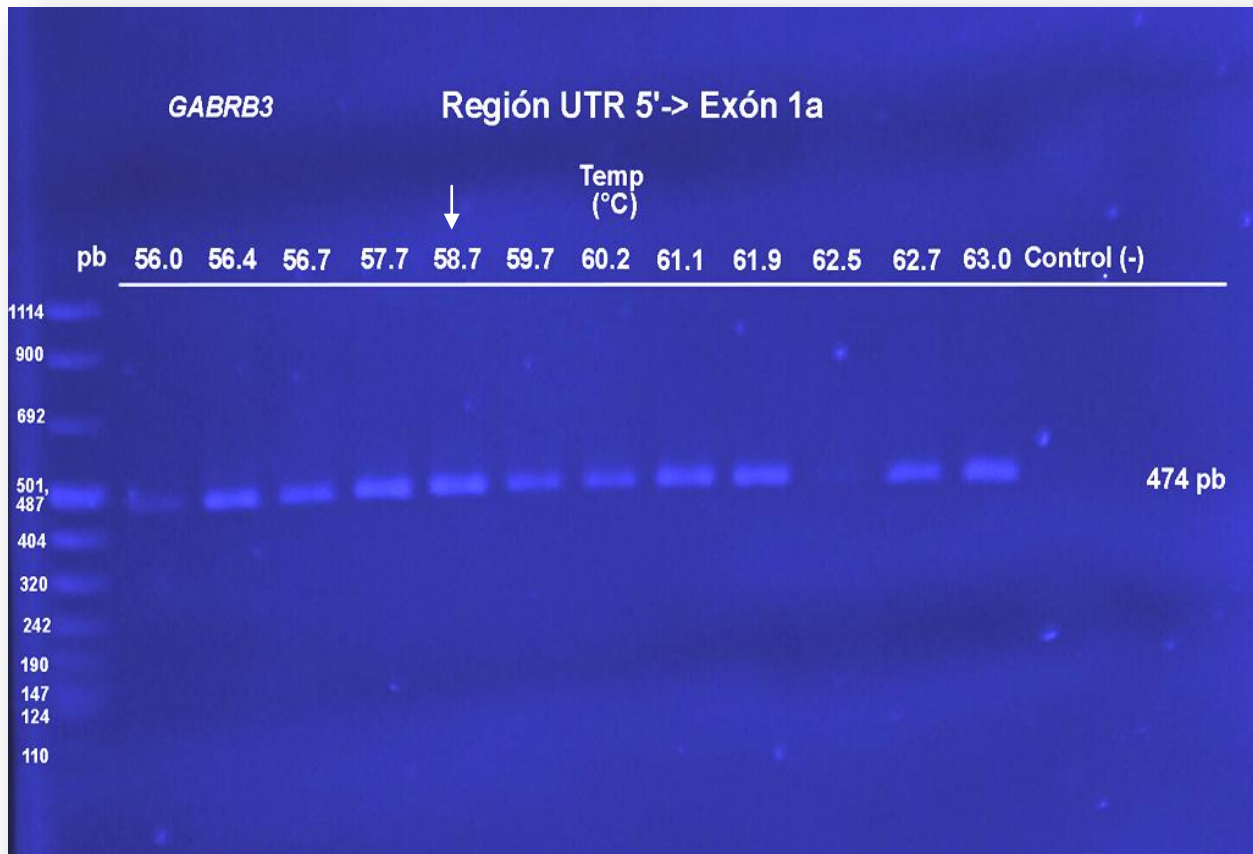


Figura 23. Electroforesis en un Gel de Agarosa 0.5% con TBE 0.5X, de un gradiente de temperatura correspondiente a la región del promotor (región 5' UTR → Exón 1a).

En este caso utilizar la temperatura de 58.7°C, ya que a esta temperatura se observa que se obtiene un buen amplicón, se aprecia que hay una mejor cantidad de DNA, y vemos que a partir de los 62.5°C existe una incertidumbre si a esa temperatura o más alta se pueda tener el amplicón deseado.

5.8 Purificación de productos de PCR

Hay técnicas para purificar productos de PCR de punto final, esto se realiza cuando, al realizar la PCR y verificar los productos, se hacen presentes otros subproductos, que se notan como dobles o más bandas, DNA degradado, o sales.

Eliminar estos subproductos con el fin de trabajar solamente con el fragmento deseado. Para purificar el producto de PCR, utilizar el Kit de purificación, a partir de la reacción o del la banda de agarosa que contiene el fragmento de DNA.

5.9 Verificación de lo purificados de PCR.

Realizar una electroforesis en Agarosa 1.5% con TBE 0.5X a 100V para verificar que los productos de PCR se hayan purificado, y esté aún presente la muestra.

5.10 PCR para la reacción de secuenciación

A partir del producto de PCR ya purificado, proceder a realizar la PCR para la reacción de secuenciación mediante el método de terminación de la cadena que diseñó Frederick Sanger.

El primer paso es obtener cadenas simples de polinucleótidos.

Llevar a cabo la reacción de PCR con un cebador solamente (forward o reverse). Generar fragmento de polinucleótidos que terminan en posiciones que corresponden a cada uno de los cuatro nucleótidos (Voet, 2007).

Los dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) análogos a los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), encargados de formar enlaces fosfodiéster nuevos, realizan una labor similar sólo que el ddNTP no permite la síntesis debido a la ausencia del grupo 3'-OH.

El resultado es una solución con fragmentos de DNA cuyo último nucleótido está marcado, todos de diferente longitud, que al ser separados por electroforesis revelarán la ubicación de los nucleótidos.

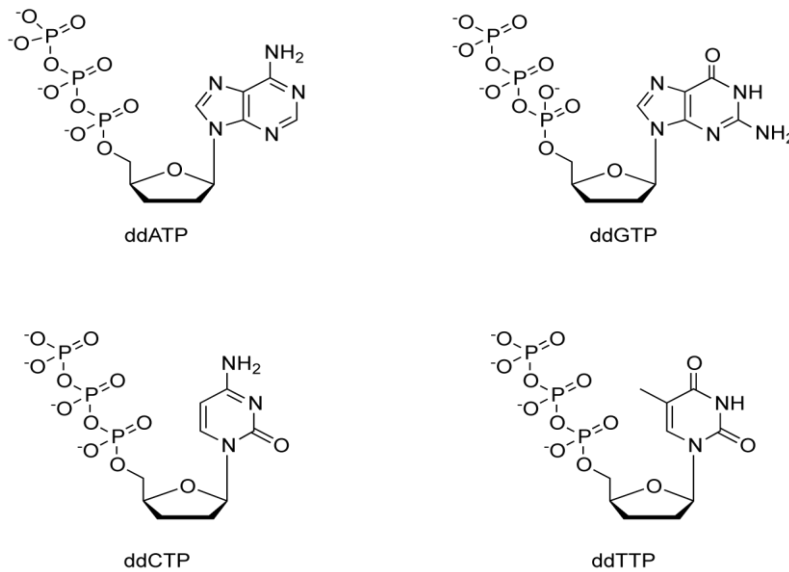


Figura 24. Estructuras químicas de los ddNTPs, éstas están libres del grupo -OH en la posición 3' del azúcar. (Disponible en: <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>. Fecha de consulta: 09 Abril 2013)

5.10.1 . Condiciones de la PCR de secuenciación.

Para la reacción de secuenciación mezclar DNA purificado, un oligonucleótido (Forward o Reverse), BigDye® (ddNTPs), Buffer 5x (polimerasas y sales,) y agua.

Tabla 10. Ejemplo de la mezcla de la reacción de PCR de Secuenciación.

Reactivo	Concentración [ng/μL]	Volumen / reacción	No. De reacciones = 10 reacciones
DNA amplificado y purificado	50	5 μL	--
Primer Forward o Reverse	50	1 μL	10 μL
BigDye ®	--	1 μL	10 μL
Buffer 5x	--	3.5 μL	350 μL
H ₂ O	--	9.5 μL	95 μL
Volumen total:		20 μL	465 μL

Tabla 11. Condiciones de la PCR de Secuenciación.

Desnaturalización	96° C	30 seg	1 ciclo
Desnaturalización	95° C	10 seg	25 ciclos
Alineamiento	50° C	10 seg	
Elongación	60° C	4 min	
Enlongación	72° C	1 min	1 ciclo

5.11 Purificación de los productos de PCR de Secuenciación

Purificar los productos de la PCR de secuenciación, con el fin de eliminar los residuos de la reacción.

Realizar la purificación mediante la filtración en las columnas con Sephadex® G-50 Superfine.

Secar por vacío el purificado obtenido en un tubo tipo eppendorf®, y resuspender con 14µL de formamida.

5.12 Secuenciación automatizada

Los fragmentos amplificados se separan por electroforesis capilar.

Cargar en una placa de 96 pozos las muestras con formamida. Desnaturalizar por 5 minutos a 95°C y enfriar a temperatura ambiente. Las muestras se detectaron por el secuenciador *AB Prism 3130 Sequencer*® de Applied Biosystems.

5.13 Lectura y análisis de electroferogramas

Leer y analizar los electroferogramas obtenidos con el programa *Sequencing Analysis* 5.3.

5.14 Análisis Bioinformático

Se utilizan distintas herramientas bioinformáticas, tales como PolyPhen, MutationTaster y Análisis en SIFT; así como las herramientas que ofrece *Ensemble*.

RESULTADOS

Se analizaron las muestras de los 35 pacientes de origen mestizo-mexicano mexicanos diagnosticados con Epilepsia de Ausencias de la Niñez, que acuden a la Clínica de Epilepsia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. De estos fueron 17 mujeres y 18 hombres, con un rango de edad de 14-59 años. Y a la población de 87 controles de origen mestizo-mexicano, que representa una población sana que no padece epilepsia y no tiene antecedentes familiares de primer grado con esta. Siendo 33 mujeres y 54 hombres con un rango de edad 19-65 años.

5.15 Cuantificación e Integridad del DNA genómico.

El DNA se cuantificó obteniéndose valores hasta 600 ng/μl. Las muestras se encontraron dentro del rango aceptable para la pureza (1.8 – 2.0). Las diluciones tuvieron una concentración final de 50 ng/μl.

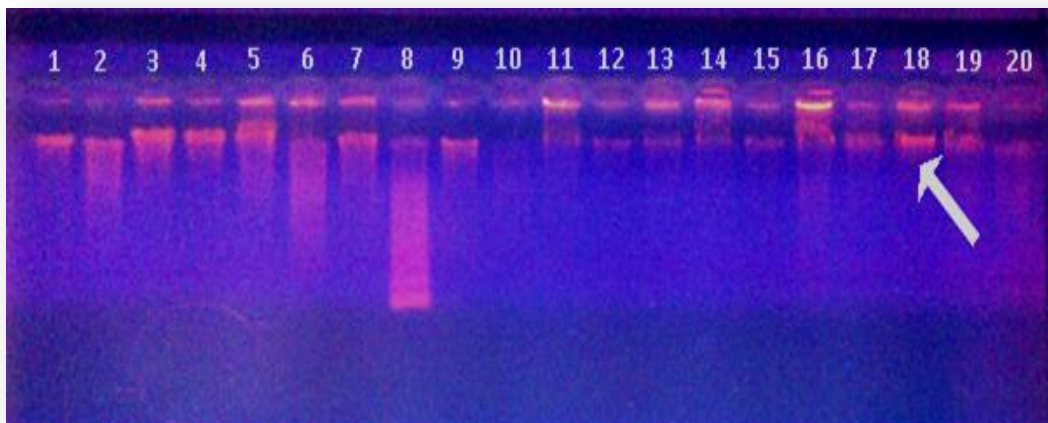


Figura 25. Electroforesis de DNA genómico de muestras de control, en un gel de Agarosa al 0.5% con TBE 0.5X. El gel muestra impurezas que tiene el DNA, como sales residuales del proceso de extracción, las cuales se quedan en la mayoría de los pozos. En el pozo 8 se observa un DNA degradado. Mientras que en el pozo 18 el DNA íntegro se muestra como una banda bien definida.

5.16 PCR y Secuenciación

5.16.1 Condiciones de PCR para los exones y región del promotor del gen *GABRB3*.

Después de realizar los gradientes para los tres fragmentos, se obtienen las siguientes condiciones para cada uno.

Tabla 12. Condiciones de la PCR para la Región 5' UTR → Exón 1a

Región 5' UTR	Parte 1			Parte 2		
Desnaturalización	95° C	10 min	1 ciclo	95° C	10 min	1 ciclo
Desnaturalización	95° C	30 seg	35 ciclos	95° C	30 seg	35 ciclos
Alineamiento	58.7° C	30 seg		61.5° C	30 seg	
Elongación	72° C	40 seg		72° C	40 seg	
Elongación	72° C	7 min	1 ciclo	72° C	7 min	1 ciclo

Tabla 13. Condiciones de la PCR para el Exón 1a

Desnaturalización	95° C	10 min	1 ciclo
Desnaturalización	95° C	30 seg	32 ciclos
Alineamiento	58.7° C	30 seg	
Elongación	72° C	1 min	
Elongación	72° C	10 min	1 ciclo

A continuación se observa en la Figura 26, que al utilizar la temperatura de 58.7°C, se obtienen buenos amplicones, aún cuando exista DNA muy degradado.

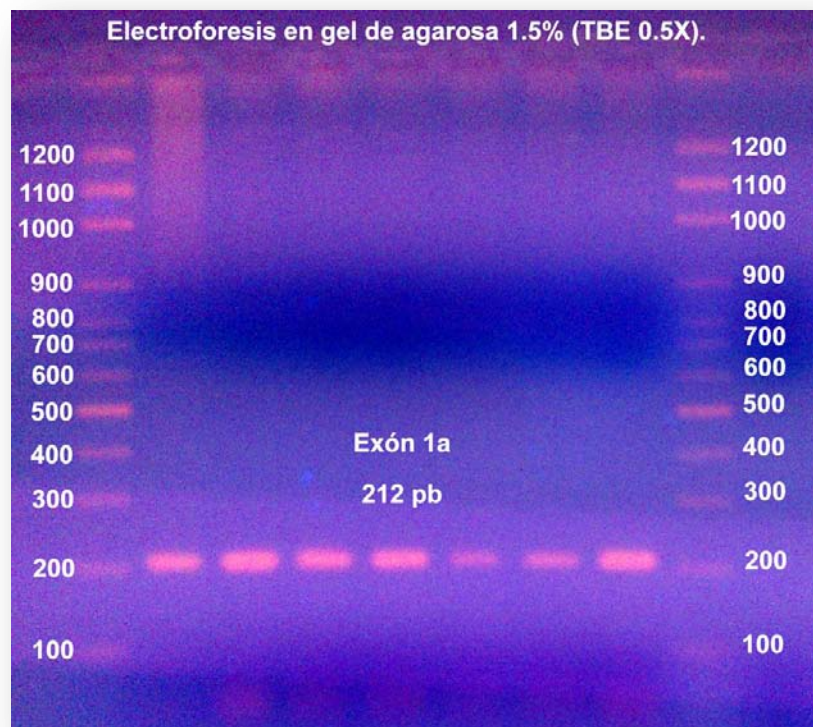


Figura 26. Electroforesis en gel de Agarosa 1.5% con TBE 0.5X, donde se ubica en el gel el amplicón del exón 1a de 212 pb.

5.17 Purificación de productos de PCR mediante el kit

Se obtuvieron fragmentos inespecíficos derivados de la PCR, los cuales interfieren en la reacción de Secuenciación, aunado a esto es necesario eliminar los restos de primers, DNA genómico que no amplificó, mediante la purificación, en este trabajo se realizó la purificación por columna, usando el producto de PCR contenido en una banda de agarosa.

El kit utilizado fue: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

5.18 Verificación de purificados de PCR

Igualmente se verificaron los purificados de la reacción de PCR mediante una electroforesis en gel de Agarosa 1.5% /TBE 0.5X.

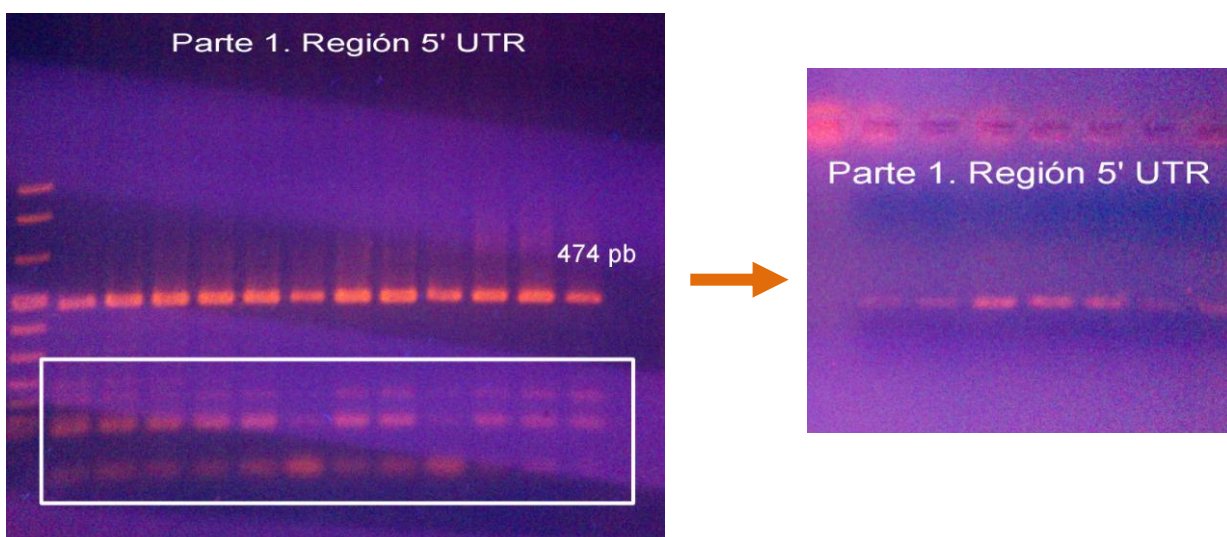


Figura 27. Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% en TBE 0.5X de la purificación de algunos productos de PCR (derecha), correspondientes al fragmento de la parte 1 de la región 5'UTR. En la Figura de la izquierda se observan en la zona inferior del gel, los subproductos inespecíficos de la PCR, restos de primers y de DNA genómico que no amplificó.

En la Figura 27, cuando se amplifica un fragmento de PCR quedan algunos residuos de primer o de DNA que no amplificó, y al purificar, se eliminan todos esos componentes inespecíficos que afectan o interfieren en la reacción de secuenciación. Después de la purificación se aprecia una banda bien definida (derecha), lo que indica que la muestra sigue presente y la purificación se llevó a cabo.

5.19 PCR para la reacción de secuenciación

Se realiza una PCR de secuenciación para las muestras de controles y pacientes.

5.20 Purificación de Productos de PCR de secuenciación

Los productos de reacción de al PCR de secuenciación, se purificaron mediante columnas con Sephadex® Superfine.

5.21 Resultados de la Secuenciación

5.21.1 Electroferograma del cambio C/T en el Exón 1a

Se detecta un cambio de un nucleótido C por T en el exón 1a. la muestra corresponde a un paciente, una mujer de 57 años.

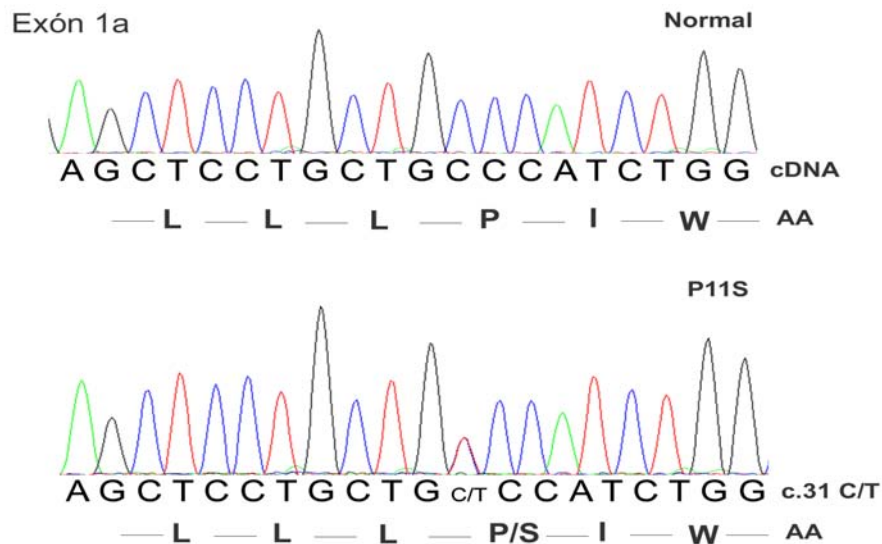


Figura 28. Electroferograma del cambio de un nucleótido C por T de un paciente (abajo) correspondiente a la mutación P11S y un control (arriba).

Esta mutación se presentó sólo en 1 de 35 pacientes. Y ausente en la población control. Como podemos ver en al siguiente tabla, se registraron otras variantes (polimorfismos) encontradas en las regiones analizadas mediante el programa Sequencing Analysis 5.3.

Tabla 14. Resultados de la secuenciación de la región 5' UTR y del Exón 1a, de los 35 pacientes en estudio y los controles.

Polimorfismo	Región 5' UTR- Exón 1 ^a									Exón 1 ^a			
	rs7171660		rs4363842		rs4906901		rs20317			rs20318		P11S	
Cambio de nt	T/T	C/T	C/C	T/C	T/T	G/T	C/C	G/C	G/G	C/C	T/C	T/T	C/T
Pacientes (35)	33	2	33	2	33	2	10	21	4	9	21	5	1
Controles (87)	85	2	85	2	87	0	38	24	25	24	39	24	0

A partir de ahí se obtuvieron las frecuencias fenotípicas y alélicas de cada polimorfismo en pacientes y en el grupo control.

5.22 Frecuencias alélicas y genotípicas en casos y controles.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs7171660 C/T en pacientes y controles.

	n (%)	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		T/T	C/T	C/C	T	C
Pacientes	35 (100)	33 (0.943)	2 (0.057)	0	0.971	0.029
Controles	87 (100)	85 (0.977)	2 (0.023)	0	0.989	0.011

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4363842 (T/C) en pacientes y controles.

	n (%)	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		T/T	T/C	C/C	T	C
Pacientes	35 (100)	0	2 (0.057)	33 (0.943)	0.971	0.029
Controles	87 (100)	0	2 (0.023)	85 (0.977)	0.989	0.011

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4906901 (T/G) en pacientes y controles.

	n (%)	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		G/G	T/T	T/G	T	G
Pacientes	35 (100)	0	33 (0.943)	2 (0.057)	0.971	0.029
Controles	87 (100)	0	87 (100)	0	1.000	0

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs20317 (G/C) en pacientes y controles.

	n (%)	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		C/C	G/C	G/G	C	G
Pacientes	35 (100)	10 (0.286)	21 (0.6)	4 (0.114)	0.414	0.586
Controles	87 (100)	24 (0.275)	38 (0.436)	25 (0.287)	0.494	0.506

Después de obtener las frecuencias genotípicas y alélicas, se analizó estadísticamente cada polimorfismo para saber si existía alguna diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de pacientes y el grupo control.

5.23 Análisis *in silico*

Con respecto a la mutación P11S, encontrada en 1 paciente, se realizó un análisis *in silico*, con diferentes herramientas bioinformáticas: *PolyPhen-2 v2.2.2r398*, SIFT, MutationTaster.

5.23.1 Resultados del análisis en *PolyPhen-2 v2.2.2r398* de la mutación P11S

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) es una herramienta que predice el posible impacto de una sustitución de aminoácido en la estructura y función de una proteína humana utilizando consideraciones físicas y comparativas directas.

(Disponible en: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)

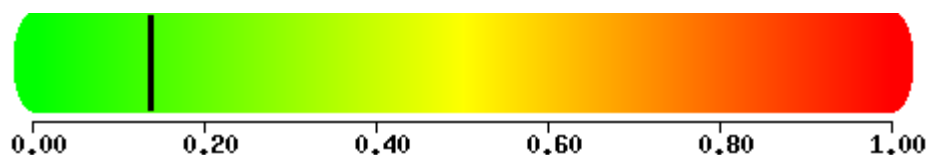


Figura 29. Resultado en PolyPhen: Mutación aparentemente benigna. Con una puntuación de 0.137 (sensibilidad: 0.92; especificidad: 0.86)

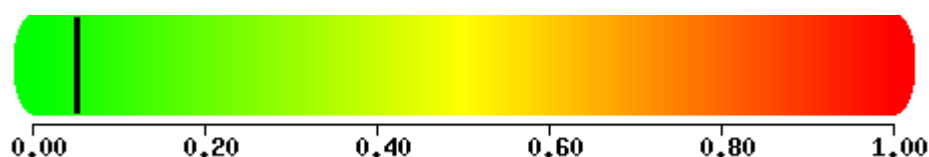


Figura 30. Resultado en PolyPhen. Esta mutación aparentemente se prevé que sea benigna, con una puntuación de 0.51 (sensibilidad: 0.93; especificidad: 0.63)

5.23.2 Resultados en SIFT

(http://sift.jcvi.org/sift-bin/retrieve_enst.pl)

SIFT Human Protein proporciona predicciones para los transcritos Ensembl con un número ENSP (ENSP00000299267) y el resultado que arroja es: Mutaciones toleradas / no toleradas, para las sustituciones de aminoácidos seleccionadas. Si no se proporcionan sustituciones, entonces se muestran todas las sustituciones. Los resultados de SIFT predicen si una sustitución de un aminoácido afecta la función de la proteína

Tabla 19. Resultados de las predicciones en SIFT

Ensemble ID	ENSP	Pos	Ref	Subst	Predicción	Puntuación SIFT	# Secs.
ENSP00000299267 P11S	ENSP00000299267	11	P	S	Tolerada	0.88	70

5.23.3 Resultados del análisis MutationTaster

MutationTaster, es un software libre basado en internet, que se encuentra en línea, el cual nos ayuda a una rápida evaluación del algún causante potencial de una enfermedad, que involucre alteraciones en la secuencia de DNA. Esta herramienta, integra información desde diferentes bases de datos biomédicas, y usa herramientas de análisis establecidas. Los análisis comprenden: Conservación evolutiva, cambios en el sitio de splicing, pérdida de la función de la proteína, y cambios que podrían afectar la cantidad de mRNA. Los resultados de las pruebas son evaluadas por un clasificador “Bayes”, el cual predice el potencial de enfermedad de una alteración. Una consulta común está hecha en menos de 0.3 segundos (Schwarz, Rödelberger, Schuelke y Seelow, 2010).

P11S “MutationTaster”

- Predicción: Polimorfismo
- Modelo: simple_aae
- Probabilidad de predicción: **0.9999999915106**
- Cambio en la secuencia de aminoácidos
- Las características de la proteína (podría) verse afectada
- Cambios en el sitio de empalme

Tabla 20. Resumen del análisis en Mutation Taster

Cuestión analizada	Resultado del análisis	
Localización de la alteración	chr15:27018841G>A (C/T)	
Péptido UniProt	P28472	
Tipo de alteración	Cambio de una sola base	
Región de la alteración	CDS (secuencia codificante)	
Cambios en el DNA	c.31C>T cDNA.95C>T g.165846C>T	
Cambios AA	P11S Score: 74 (Rango: 0-215).	
Frameshift	No	
Características reguladoras	DNasa1, abrir la cromatina, Sitio hipersensible a DNasa1 H3K9ac, Histona, Histona 3 Lisina 9 Acetilación H3K4me3, Histona, Histona 3 Lisina 4 Tri-Metilación H3K27me3, Histona, Histona 3 Lisina 27 Tri-metilación asociado al promotor, función reguladora, Promotor como función reguladora	
phyloP / phastCons	phyloP	phastCons
(flanqueando)	0.588	0.076
	1.308	0.097
(flanqueando)	-0.09	0.095
Longitud de la proteína	Normal	
Secuencia de AA alterado	Si	
Posición del codón de terminación wt / CDS mu	1422/1422	
Posición (AA) del codón de terminación en la secuencia de AA wt / mu	474/ 474	
Posición del codón de terminación wt / cDNA mu	1486 / 1486	
Posición de inicio ATG en wt / cDNA mu	65 / 65	
Cromosoma	15	
Hebra	-1	
Último límite intrón / exón	1145	
Límite teórico NMD en CDS	31	
Posición cDNA	95	
Posición gDNA	165846	
Posición cromosómica	27018841	
Fragmento de la secuencia cDNA original	GGCTCCTGGAGCTCCTGCTGC CCATCTGGCTCTCCTGGACC	
Fragmento de la secuencia cDNA alterado	GGCTCCTGGAGCTCCTGCTGT CCATCTGGCTCTCCTGGACC	

MutationTaster utiliza un programa de predicción de sitios de splicing, llamado NNSPLICE del Proyecto Genoma de Drosophila Berkeley (la versión basada en la web está disponible en http://fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Este programa se utiliza para analizar posibles cambios en los sitios de splicing. Con este fin, un fragmento de secuencia de alrededor de 60 bases (alteración de 30 bases upstream y downstream) en su forma mutada y normal, se crean y se presentan en NNSPLICE. Si existe algún cambio en la secuencia mutada, ya sea que el sitio actual de splicing se vuelva más fuerte, es

decir que se aumente; o que se vuelva más débil, es decir que disminuya; que se active un sitio adicional de splicing, por ejemplo que se gane, o por lo contrario que el sitio de splicing esté completamente perdido (Disponible en: <http://www.mutationtaster.org/info/documentation.html>).

Tabla 21. Análisis en MutationTaster para los sitios de splicing. Se comparan y analizan las secuencias wild type (wt) y la mutada (mu).

Sitios de splicing				
Efecto	Posición gDNA	Puntuación	Secuencia de detección	Límite exón – intrón
Aumentó ligeramente ACC	165852	wt: 0.8901 mu: 0.9297 (Leve cambio)	wt: TGGAGCTCCTGCTG <u>CCCATCTGGCTCTC</u> CTGGACCCTGGGG mu: TGGAGCTCCTGCTG <u>ICCATCTGGCTCTC</u> CTGGACCCTGGGG	atct GGCT
Aumentó ACC	165854	wt: 0.33 / mu: 0.54	wt: GAGCTCCTGCTG <u>CCCATCTGGCTCTCCT</u> GGACCCTGGGGAC mu: GAGCTCCTGCTG <u>ICCATCTGGCTCTCCT</u> GGACCCTGGGGAC	ctgg CTCT

En la Tabla 22, se mencionan las características de la proteína GABRB3, la mutación P11S está dentro de los primeros 25 aminoácidos, y nos indica que el cambio produciría una pérdida en la formación del péptido señal.

Tabla 22. Resumen de las características de la proteína GABRB3 en MutationTaster.

Inicio (aa)	Fin (aa)	Característica	Detalles	Cambio
1	25	SEÑAL	Potencial.	Pérdida
26	245	TOPO_DOM	Extracelular (Probable).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
33	33	CARBOHID	Unión-N (GlcNAc...) (Potencial).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
105	105	CARBOHID	Unión-N (GlcNAc...) (Potencial).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
161	161	DISULFID	Por similitud	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
174	174	CARBOHID	N-linked (GlcNAc...) (Potencial).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
175	175	DISULFID	Por similitud	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
246	267	TRANSMEM	Helicoidal; (Probable).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
271	293	TRANSMEM	Helicoidal; (Probable).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
305	327	TRANSMEM	Helicoidal; (Probable).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
328	450	TOPO_DOM	Citoplasmática (Probable).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)
451	472	TRANSMEM	Helicoidal; (Probable).	Podría perderse (downstream del sitio de empalme alterado)

Esta información, sólo nos reafirma que la mutación P11S cae dentro de la formación del péptido señal.

Tabla 23. Análisis en MutationTaster para conocer el grado de conservación de la proteína. Niveles de proteína para cambios no sinónimos

Especies	Aa	Alineamiento
Humano	11	MCSGLLELLL P YOWLSWTLGTRGS
Mutado	11	MCSGLLELLL S YOWLSWTLGTRGS
Mmusculus ENSMUSG00000033676	11	MCSGLQLLLL P YOWLSWTLGTRG
Xtropicalis ENSXETG00000024288	16	VPYOLYOSMVCSTQ
Ptroglydotes ENSPTRG00000006831	--	NA
Mmulatta ENSMMUG00000004314	--	NA
Fcatus ENSFCAG00000011945	--	NA
Ggallus ENSGALG00000016745	--	NA
Trubripes ENSTRUG00000007550	--	NA
Drerio ENSDARG00000023771	--	NA
Dmelanogaster FBgn0010240	--	NA
Celegans ZC482.1	--	NA

Observamos que el aminoácido P, se encuentra en sólo algunas especies, lo que nos podría indicar que su grado de conservación no sea muy alto.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Parte del transcrito amplificado, corresponde a la isoforma 2 de la proteína de la subunidad β_3 del receptor GABA_A. En el 2012, Tanaka , *et al*, reportaron que en la región del promotor, se encontraban variaciones que se asociaban a la enfermedad, y en el 2008, Tanaka , *et al*, reportan la mutación P11S, en el exón 1a, presente en una familia de origen mexicano, y se asocia con el desarrollo de la enfermedad.

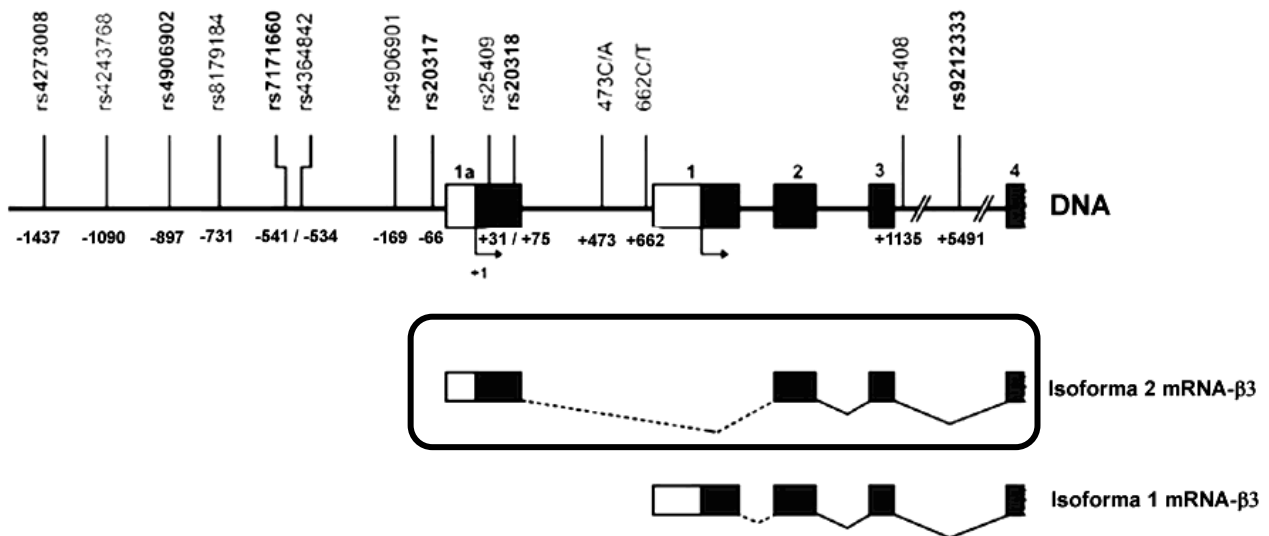


Figura 31. Mapa de la región 5' del gen *GABRB3*, mostrando los exones e intrones, la posición de algunos polimorfismos, numerados del sitio de inicio de transcripción del exón 1a; así como sus isoformas 1 y 2 alternativas del transcrito (Tomada y modificada de Urak, *et al*, 2006)

5.24 Mutación P11S (rs25409)

Esta mutación está relacionada con la formación del péptido señal, ya que el cambio se da dentro de los primeros aminoácidos. Este cambio se encuentra en la región codificante, lo cual a nivel de proteína nos produce un cambio de un aminoácido. Prolina por Serina. Esta mutación estuvo presente en forma heterocigota solamente en 1 paciente y ausente en los 100 controles. A continuación se muestra la secuencia de la proteína normal.

5.24.1 Secuencia FASTA de la proteína GABRB3.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/608785291?report=fasta>)

```
>gi|522838289|ref|NP_001265560.1| gamma-aminobutyric acid receptor
subunit beta-3 isoform 3 [Homo sapiens]
MYFQQYWRDKRLAYSIGIPLNLTLDNRVADQLWVPDTYFLNDKKSFVHGVTVKNRMIRLHPDGTVLYGLRI
TTTAACMMDLRRYPLDEQNCTLEIESYGYTTDDIEFYWRGGDKAVTGVERIELPQFSIVEHRLVSRNVVF
ATGAYPRLSLSFRLKRNIGYFILQTYMPSILITILSWVSFWINYDASAARVALGITTVLTMTTINTHLRE
TLPKIPYVKAIDMYLMGCFVVFVFLALLEYAFVNYIFFGRGPQRQKLAEKTAKAKNDRSKSESNRVDAGH
NILLTSLEVHNEMNEVSGGIGDTRNSAISFDNSGIQYRKQSMMPREGHGRFLGDRSLPHKKTHLRRSSQL
KIKIPDLTDVNAIDRWSRIVFPFTFSLFNLVYWLYYVN
```

ENSP00000299267

Proteína	Posición	AA ₁	AA ₂
Isoforma 2 de la subunidad beta-3 del receptor ácido Gamma-aminobutírico.	11	P	S

Se realizaron análisis con herramientas bioinformáticas para predecir el impacto o los probables cambios de las variantes encontradas, así como de una mutación ya reportada.

5.25 Análisis *in silico*

5.25.1 Estudio con *PolyPhen-2 v2.2.2r398* de la mutación P11S

En este caso el cambio de Prolina a Serina el resultado que arrojó fue que se prevé que la mutación sea benigna (Disponible en: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>).

7.2.2 Estudio en SIFT (Predicciones SIFT).

Predicción del cambio P11S, en la proteína ENSP00000299267
(http://sift.jcvi.org/sift-bin/retrieve_enst.pl)

La predicción en SIFT está basada en el grado de conservación de los residuos de aminoácidos en un alineamiento de secuencias derivadas de secuencias estrechamente relacionadas, recolectadas a través de PSI-BLAST. SIFT puede ser aplicado a polimorfismo no sinónimos, o mutaciones de sentido erróneo.

La mutación P11S arroja un resultado **como tolerado**.

7.2.3 Análisis en “MutationTaster”

Como se observa en resultados, la mutación P11S, es un polimorfismo. Dependiendo de la naturaleza de la alteración, MutationTaster, escoge entre 3 diferentes modelos de predicción. Los cuales ya sea que se clasifiquen en:

- “Silenciosas (No sinónimas o intrónicas)” (without_aae model)
- “Sustitución/inserción/Delección de un solo aminoácido” (simple_aae model)
- “Cambios mas complejos en la secuencia de aminoácidos” (complex_aae model)

La que arroja es una mutación con un modelo simple, es decir, cambio de un aminoácido (a) por otro (e). Afectando este cambio en la secuencia de aminoácidos, este cambio podría afectar a las características de la proteína. Y hay una probabilidad que existan cambios en el sitio de empalme (splicing) (Disponible en: <http://www.mutationtaster.org/info/documentation.html>).

Score: Es el grado de diferencia entre el aminoácido original y el nuevo. Este puntaje es tomado a partir de “la matriz de sustitución de aminoácidos” (Grantham Matrix) la cual toma en cuenta las características de aminoácidos y puntúa las sustituciones de acuerdo al grado de diferencia entre el original y el nuevo aminoácido

phyloP y PhyloCons (Grado de conservación), ambos son métodos para determinar el grado de conservación de un nucleótido dado.

phastCons: Sus valores van de 0 a 1 y reflejan la probabilidad de que cada nucleótido pertenezca a un elemento conservado, basado en alineamientos múltiples de secuencias genómicas de 46 especies. Entre más cercano este a 1, es más probable que sea un nucleótido conservado, se observa que el resultados fue de 0.097 lo cual indica que no es un aminoácido tan conservado.

phyloP: En contraste, tiene valores de -14 a +6 , medidas de conservación por separado, en columnas individuales, ignorando los efectos de sus “vecinos”. Por otra parte, no sólo puede medir la conservación, sino también la aceleración. Los sitios previstos para estar conservados son asignados puntajes positivos, mientras sitios previstos para ser de rápida evolución son asignados con puntajes negativos, en este caso el valor fue de 1.308 lo que nos indica un valor positivo, lo que indica un sitio conservado.

El resultado de longitud de la proteína fue normal, al igual, no arrojó ningún cambio de la posición del codón de terminación, ni la posición de inicio ATG, dando alterado la secuencia del AA,

MutationTaster determina la posición de este cambio relativo en el sitio de splicing en el límite del intrón/exón: Es decir, si una pérdida o disminución de un sitio de splicing ocurre en el límite del intrón/exón o en el límite exón/intrón esto será tomado por un cambio "real" del sitio de splicing. Se descartará la pérdida/disminución de los sitios de splicing distantes del límite del exón-intrón (Disponible en: <http://www.mutationtaster.org/info/documentation.html>).

Se muestra una ganancia de un nuevo sitio de splicing, si la puntuación de seguridad del sitio de splicing recién creado es superior a 0.3, en este caso si existe un ligero aumento, pero no se considera que exista un nuevo sitio de splicing. Un aumento en el sitio de splicing ya existente se mostrará si el cambio en la puntuación de confianza es mayor que 10%, lo cual tampoco ocurre. (Disponible en: <http://www.mutationtaster.org/info/documentation.html>).

8. DISCUSIÓN

Las dos mutaciones, P11S y S15F, se encuentran involucradas en la formación del péptido señal. Como se explicó anteriormente, el receptor GABA_A es una glicoproteína de membrana formado por cinco subunidades, la primera mitad del polipéptido (codificado en las secuencias del exón 2 al 7) forma un dominio hidrofílico glicosilado extracelular, muchas partes de este dominio están implicadas en la función del receptor, entre ellas sitios alostéricos modulados por unión. La última mitad del polipéptido (codificado en las secuencias del exón 7 al 9) contienen 4 secuencias hidrofílicas que forman 4 dominios transmembranales (Tanaka, *et al*, 2008).

Tanaka, *et al*, (2008) mencionan que las mutaciones P11S y S15F (exón 1a), no afectan en los sitios de unión, pero en su lugar, influyen en la maduración de la proteína, topología, ensamble, y localización subcelular del receptor GABA_A.

Además en el estudio electrofisiológico, las mutaciones P11S y S15F causaron una reducción en la densidad de corriente del receptor GABA_A, cuando expresaron receptores como $\alpha 1\beta 3\text{-v}2\text{S}$ (P11S) $\gamma 2\text{S}$ o $\alpha 1\beta 3\text{-v}2$ (S15F) $\gamma 2\text{S}$ comparándose con los receptores wild-type $\alpha 1\beta 3\text{-v}2\gamma 2\text{S}$. Estas dos mutaciones en el péptido señal de la subunidad $\beta 3\text{-}\gamma 2$, P11S y S15F, causan reducciones en el receptor. Aunque en el estudio de Tanaka, *et al*, las familias estaban clasificadas bajo el espectro de epilepsias generalizadas con crisis febriles, o epilepsia mioclónica juvenil, todos tuvieron como fenotipo las crisis de ausencias en la niñez, lo que sugiere fuertemente que el receptor GABA_A puede ser una importante molécula patogénica para la epilepsia de ausencias de la niñez, así como que las mutaciones, entre ellas, P11S, tenían un papel muy importante en las crisis de ausencias (Tanaka, *et al*, 2008).

En el análisis *in silico* que realizaron en 2008 Tanaka, *et al*, predijeron que el sitio de anclaje era el mismo para la mutación P11S que el wild-type, a diferencia de los resultados del análisis en el programa MutationTaster.

El mecanismo celular de las crisis de ausencias indica la participación de los canales iónicos en la patogénesis de las epilepsias ausencias; el análisis genético, realizado en pacientes con EAN como en modelos animales, ha mostrado en ambos: mutaciones y alelos de susceptibilidad en genes que codifican para las subunidades de los receptores de GABA y canales de Ca²⁺. El hecho de que la mayoría de estas variaciones son poco frecuentes restringe a pocos pacientes, por lo tanto, los componentes de los factores

genéticos complejos involucrados en el desencadenamiento de las crisis de ausencia aún no están del todo claro (Yalçin, 2011).

8.1 Análisis estadístico

A continuación se llevó a cabo un análisis de cada polimorfismo, mediante una herramienta bioinformática, llamada **SNPStats**, el cual es un software simple, que se ha diseñado para analizar estudios de asociación genético-epidemiológicos utilizando SNPs. Para cada polimorfismo seleccionado, podemos obtener las frecuencias alélicas y genotípicas, Prueba de Hardy-Weinberg, análisis de asociación con una variable de respuesta basada en la regresión lineal o logística, múltiples modelos de herencia: co-dominantes, dominantes, recesivos, sobre-dominante y aditivo, análisis de las interacciones (gen-gen o genes y medio ambiente). Si varios polimorfismos son seleccionados, obtendremos estadísticas vinculación desequilibrio, estimación de las frecuencias de haplotipos, análisis de asociación de haplotipos con la respuesta, análisis de las interacciones (haplotipos-covarianza). (Disponible en: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>).

Las pruebas exactas para el equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos estudiados, resultaron que las poblaciones se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg.

Tabla 24. Análisis estadístico para los polimorfismos de la región 5'UTR del promotor en pacientes y controles.

Polimorfismo	Pacientes (n=35)	Control (n=87)	OR	IC 95%	Valor P
rs7171660					
Genotipo					
T/T	33 (0.943%)	85 (0.977%)	0.3917	(0.039 – 3.891)	0.1975
T/C	2 (0.057%)	2 (0.023%)	2.553	(0.1783 – 36.57)	0.3242
Alelos					
T	68 (0.97%)	172 (0.99%)	0.397	(0.04 – 3.877)	0.198
C	2 (0.03%)	2 (0.01%)	1	(0.070-14.16)	0.6902
rs4363842					
Genotipo					
C/C	33 (0.943%)	85 (0.977%)	0.3917	(0.039 – 3.891)	0.1975
T/C	2 (0.057%)	2 (0.023%)	2.553	(0.1783 – 36.57)	0.3242
Alelos					
C	68 (0.97%)	172 (0.99%)	0.397	(0.04 – 3.877)	0.198
T	2 (0.03%)	2 (0.01%)	1	(0.070-14.16)	0.6902
rs4906901					
Genotipo					
T/G	2 (0.057%)	0	NA	NA	NA

T/T	33 (0.943%)	87 (100%)	NA	NA	NA
Alelos					
T	68 (0.97%)	174 (100%)	NA	NA	NA
G	2 (0.03%)	0	NA	NA	NA
rs20317					
Genotipo					
C/C	10 (28.6%)	24 (27.6%)	1.05	(0.42-2.5)	0.452
G/C	21 (60%)	38 (43.7%)	1.92	(0.86-4.36)	0.055
G/G	4 (11.4%)	25 (28.7%)	0.032	(0.07-1.05)	0.032
Alelos					
C	41 (0.59%)	86 (0.49%)	1.444	(0.8244 – 2.55)	0.099
G	29 (0.41%)	88 (0.51%)	0.6923	(0.3922 – 1.213)	0.099

NA: No aplica debido a que sólo se obtuvieron en Pacientes.

Aunque pareciera que habría una asociación entre controles y pacientes para el genotipo G/G. Al realizar el análisis estadístico no se encontró una diferencia significativa entre pacientes y controles. Lo que se sugiere es aumentar el número de pacientes y controles.

En 2006, Urak, *et al*, realizaron el análisis bioinformático para los haplotipos encontrados en el promotor *GABRB3*, dentro de ellos el polimorfismo rs20317, hallando que este polimorfismo está localizado dentro de los sitios consenso para la unión al factor de transcripción.

El polimorfismo 20317 localizado en la posición -66, genera un intercambio de C (haplotipo 1) a G (haplotipo 2), resultando de una pérdida potencial de la unión del factor transcripcional de ubiquitina c-Myb.

En 2012 Tanaka, *et al*, realizaron un estudio en donde las frecuencias alélicas de este polimorfismo no obtuvieron asociación estadísticamente significativa con la enfermedad al comparar pacientes con controles, al igual que en la muestra de población mexicana analizada en este estudio no se encontró ninguna asociación con este polimorfismo, concordando con lo reportado con Tanaka, *et al* (2012).

Después de realizar el análisis por cada polimorfismo encontrado, se realizó un análisis de haplotipos. Un haplotipo es un grupo de alelos dentro de un mismo cromosoma, y cualquier individuo hereda dos haplotipos de sus progenitores (Mark y Saunders, 2005).

Tabla 25. Análisis de Haplotipos. Estimación de frecuencias de haplotipos (n=122)

Haplotipo	rs7171660	rs4363842	rs4906901	rs20317	Total	Grupo caso	Grupo control	Frecuencia Acumulativa
1	T	C	T	C	0.5123	0.5857	0.4828	0.5123
2	T	C	T	G	0.4713	0.3857	0.5057	0.9836
3	C	T	G	G	0.0082	0.0286	NA	0.9918
4	C	C	T	C	0.0041	NA	0.0057	0.9959
5	C	T	T	C	0.0041	NA	0.0057	1
6	C	T	G	C	0	0	NA	1

En este caso encontramos un haplotipo presente en el grupo de casos (3), y ausente en el grupo control. Así como dos haplotipos presentes en el grupo control (4 y 5) y ausente en el grupo de casos. Esto aunque llama la atención, estadísticamente no es significativo, y sería necesario aumentar el tamaño de la muestra.

Tabla 26. Asociación de Haplotipos. Estimación de frecuencias de haplotipos (n=122)

	rs7171660	rs4363842	rs4906901	rs20317	Frecuencia	OR (95% CI)	Valor de P
1	T	C	T	C	0.5123	1	---
2	T	C	T	G	0.4713	1.51 (0.84 - 2.70)	0.17
Raro	*	*	*	*	0.0164	0.52 (0.07 - 4.20)	0.54
Valor de P de la asociación global de haplotipos: 0.23							

8.1.2 Análisis de interacción de haplotipos con covarianza de género

Tabla 27. Interacción de clasificación-cruzada de género y Haplotipo (análisis crudo n=122)

Haplotipo	Frecuencia	Hombre	Mujer
		OR (95% CI)	OR (95% CI)
TCTC	0.5123	1	1.56 (0.41 - 5.95)
TCTG	0.4713	2.17 (1.00 - 4.71)	1.36 (0.48 - 3.83)
Raro	0.0164	1.33 (0.10 - 16.98)	0.00 (-Inf - Inf)
Valor-P de la interacción: 0.16			

Tabla 28. Haplotipos presentes en géneros (análisis crudo n=122)

Haplotipo	Frecuencia	Hombre	Mujer
		OR (95% CI)	OR (95% CI)
TCTC	0.5123	1	1
TCTG	0.4713	2.17 (1.00 - 4.71)	0.87 (0.34 - 2.19)
Rare	0.0164	1.33 (0.10 - 16.98)	0.00 (-Inf - Inf)

Tabla 29. Géneros presentes en los haplotipos (análisis crudo n=122)

Haplotipo	Frecuencia	hombre	Mujer
		OR (95% CI)	OR (95% CI)
TCTC	0.5123	1	1.56 (0.41 - 5.95)
TCTG	0.4713	1	0.62 (0.27 - 1.44)
Rare	0.0164	1	0.00 (-Inf - Inf)

Tabla 30. Comparación de haplotipos de los polimorfismos reportados por Urak, *et al*, 2006 y Tanaka, *et al*, 2012 (Urak, *et al*, 2006 / Tanaka, *et al*, 2012).

Este estudio										
1	2	3	4	5	6	rs7171660	rs4363842	rs4906901	rs20317	
						T	C	T	C	
						T	C	T	G	
						C	T	G	G	
						C	T	T	C	
						C	T	G	C	
Urak, <i>et al</i> , 2006										
		rs4273008	rs4906902	rs7171660				rs20317	rs20318	rs3212333
1		G	T	T				C	G	G
2		G	C	T				G	A	C
3		G	C	T				C	A	C
4		T	T	C				C	G	C
Tanaka, <i>et al</i> , 2012										
	rs4243768		rs4906902	rs7171660	rs4363842	rs4906901	rs20317			
1						T	C			
2						T	G			
3	A		T	T	C	T	C			
4	A		C	T	C	T	G			
5	G		T	C	T	G	C			

En las tablas siguientes se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas de los distintos polimorfismos estudiados en los 87 controles con otras poblaciones; así como de la mutación **rs25409**.

Tabla 31. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs7171660 (C/T) estudiado en la Región 5' del gen *GABRB3*, y su comparación con otras poblaciones.

Población	n (%)	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		T/T	C/T	C/C	T	C
Africana (YRI)	118 (100)				0.720	0.280
Americana (Norteamérica) ^{II}	120 (100)				0.958	0.042
Asiática ^{III}	120				1	0
Mexicana ^{IV}	87 (100)	85 (0.977)	2 (0.023)		0.989	0.011
1000 Genomas ^V						
Africanos caribeños en Barbados		0.625	0.323	0.052	0.786	0.214
AFR. Africana		0.558	0.389	0.053	0.753	0.247
AMR. Americana		0.856	0.13	0.014	0.921	0.079
ASN. Asiática		0.998	0.002		0.999	0.001
ASW. Americanos con ancestros africanos en USA		0.59	0.377	0.033	0.779	0.221
BEB. Bengali. Blangadesh		0.988	0.012		0.994	0.006
CDX. Chinos Dai en Xishuangbanna. China		1			1	
CEU. Residentes en Utah con ancestros del norte y oeste europeos.		0.929	0.071		0.965	0.035
CHB. Chinos Han Beijing		1			1	
CHS. Chinos Han Sureste China		1			1	
CLM. Colombianos. De Medellín. Colombia		0.851	0.128	0.021	0.915	0.085
ESN. Esan en Nigeria		0.505	0.444	0.051	0.727	0.273
EUR. Europea		0.893	0.105	0.002	0.945	0.055
FIN. Finlandés. Finlandia		0.879	0.111	0.01	0.934	0.066
GBR. Británicos en Inglaterra y Escocia		0.923	0.077		0.962	0.038
GIH. Indio Guharati de Houston.		0.961	0.039		0.981	0.019
GWD. Gambianos en la división occidental de Gambia.		0.54	0.416	0.044	0.748	0.252
IBS. Población ibérica en España.		0.841	0.159		0.921	0.079
ITU. Indios Telugu de Reino Unido		1			1	
JPT. Japoneses en Tokio, Japón.		1			1	
KHV. Kinh en la ciudad Ho Chi Minh, Vietnam.		0.99	0.01		0.995	0.005
LWK. Luhya en Webuye, Kenia		0.606	0.333	0.061	0.773	0.227
MSL. Mende en Sierra Leona		0.553	0.388	0.059	0.747	0.253
MXL. Ascendencia mexicana de Los Angeles USA		0.891	0.094	0.016	0.938	0.062
PEL. Peruanos de Lima Perú.		0.929	0.071		0.965	0.035
PJL. Punjabi de Lahore, Pakistán		0.948	0.052		0.974	0.026
PUR. Puerto Riqueños de Puerto Rico.		0.779	0.202	0.019	0.88	0.12
SAS. Surasiáticos		0.973	0.027		0.987	0.013
STU. Sri Lankanos Tamil de Reino Unido.		0.971	0.029		0.985	0.015
TSI. Toscanos en Italia		0.897	0.103		0.949	0.051

Tabla 32. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs4906901 (T/G) estudiado en la Región 5' del gen *GABRB3*, y su comparación con otras poblaciones.

Población	n (%)	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		G/G	T/T	T/G	T	G
Mexicana	87 (100)	0	87 (100)	0	1.000	0
1000 Genomas ^{VI} Población						
Africanos caribeños en Barbados		0.052	0.656	0.292	0.198	0.802
AFR. Africana		0.047	0.578	0.375	0.234	0.766
AMR. Americana		0.014	0.865	0.121	0.075	0.925
ASN. Asiática			1			1
ASW. Americanos con ancestros africanos en USA		0.033	0.59	0.377	0.221	0.779
BEB. Bengali. Blangadesh			0.988	0.012	0.006	0.994
CDX. Chinos Dai en Xishuangbanna. China			1			1
CEU. Residentes en Utah con ancestros del norte y oeste europeos.			0.929	0.071	0.035	0.965
CHB. Chinos Han Beijing			1			1
CHS. Chinos Han Sureste China			1			1
CLM. Colombianos. De Medellín. Colombia		0.021	0.851	0.128	0.085	0.915
ESN. Esan en Nigeria		0.051	0.505	0.444	0.273	0.727
EUR. Europea		0.002	0.893	0.105	0.055	0.945
FIN. Finlandés. Finlandia		0.01	0.879	0.111	0.066	0.934
GBR. Británicos en Inglaterra y Escocia			0.923	0.077	0.038	0.962
GIH. Indio Guharati de Houston.			0.961	0.039	0.019	0.981
GWD. Gambianos en la división occidental de Gambia.		0.044	0.558	0.398	0.243	0.757
IBS. Población ibérica en España.			0.841	0.159	0.079	0.921
ITU. Indios Telugu de Reino Unido			1			1
JPT. Japoneses en Tokio, Japón.			1			1
KHV. Kinh en la ciudad Ho Chi Minh, Vietnam.			1			1
LWK. Luhya en Webuye, Kenia		0.051	0.626	0.323	0.212	0.788
MSL. Mende en Sierra Leona		0.047	0.612	0.341	0.218	0.782
MXL. Ascendencia mexicana de Los Angeles USA		0.016	0.891	0.094	0.062	0.938
PEL. Peruanos de Lima Perú.			0.929	0.071	0.035	0.965
PJL. Punjabi de Lahore, Pakistán			0.948	0.052	0.026	0.974
PUR. Puerto Riqueños de Puerto Rico.		0.019	0.808	0.173	0.106	0.894
SAS. Surasiáticos			0.975	0.025	0.012	0.988
STU. Sri Lankanos Tamil de Reino Unido.			0.98	0.02	0.01	0.99
TSI. Toscanos en Italia			0.897	0.103	0.051	0.949
YRI. Yoruba en Ibadan, Nigeria		0.046	0.519	0.435	0.264	0.736

Tabla 33. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs4363842 T/C estudiado en la Región 5' del gen *GABRB3*, y su comparación con otras poblaciones.

Población	n (%)	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica
-----------	-------	-----------------------	--------------------

		T/T	T/C	C/C	T	C
Africana YRI ^{viii}	118 (100)				0.271	0.729
Americana (Norteamérica) ^{viii}	120 (100)				0.033	0.967
Asiática ^x	120				0	1
Mexicana	87 (100)		2 (0.023)	85 (0.977)	0.011	0.989
1000 Genomas x Población						
Africanos caribeños en Barbados		0.052	0.323	0.625	0.214	0.786
AFR. Africana		0.053	0.389	0.558	0.247	0.753
AMR. Americana		0.014	0.13	0.856	0.079	0.921
ASN. Asiática			0.002	0.998	0.001	0.999
ASW. Americanos con ancestros africanos en USA		0.033	0.377	0.59	0.221	0.779
BEB. Bengalí. Blangadesh			0.012	0.988	0.006	0.994
CDX. Chinos Dai en Xishuangbanna. China				1		1
CEU. Residentes en Utah con ancestros del norte y oeste europeos.			0.071	0.929	0.035	0.965
CHB. Chinos Han Beijing				1		1
CHS. Chinos Han Sureste China				1		1
CLM. Colombianos. De Medellín. Colombia		0.021	0.128	0.851	0.085	0.915
ESN. Esan en Nigeria		0.051	0.444	0.505	0.273	0.727
EUR. Europea		0.002	0.105	0.893	0.055	0.945
FIN. Finlandés. Finlandia		0.01	0.111	0.879	0.066	0.934
GBR. Británicos en Inglaterra y Escocia			0.077	0.923	0.038	0.962
GIH. Indio Guharati de Houston.			0.039	0.961	0.019	0.981
GWD. Gambiaños en la división occidental de Gambia.	0.044	0.416	0.54	0.252	0.748	
IBS. Población ibérica en España.		0.159	0.841	0.079	0.921	
ITU. Indios Telugu de Reino Unido				1		1
JPT. Japoneses en Tokio, Japón.				1		1
KHV. Kinh en la ciudad Ho Chi Minh, Vietnam.			0.01	0.99	0.005	0.995
LWK. Luhya en Webuye, Kenia	0.061	0.333	0.606	0.227	0.773	
MSL. Mende en Sierra Leona	0.059	0.388	0.553	0.253	0.747	
MXL. Ascendencia mexicana de Los Angeles USA	0.016	0.094	0.891	0.062	0.938	
PEL. Peruanos de Lima Perú.		0.071	0.929	0.035	0.965	
PJL. Punjabi de Lahore, Pakistán			0.052	0.948	0.026	0.974
PUR. Puerto Riqueños de Puerto Rico.	0.019	0.202	0.779	0.12	0.88	
SAS. Surasiáticos		0.027	0.973	0.013	0.987	
STU. Sri Lankanos Tamil de Reino Unido.		0.029	0.971	0.015	0.985	
TSI. Toscanos en Italia		0.103	0.897	0.051	0.949	
YRI. Yoruba en Ibadan, Nigeria		0.065	0.426	0.509	0.278	0.722

Tabla 34. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs20317 (C/G) estudiado en la Región 5' del gen *GABRB3*, y su comparación con otras poblaciones.

Población	n (%)	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		C/C	C/G	G/G	C	G
Mexicana	87 (100)	24 (0.275)	38 (0.436)	25 (0.287)	0.494	0.506
ACB. Africanos caribeños en Barbados			0.021	0.979	0.01	0.99
AFR. Africana			0.014	0.986	0.007	0.993
AMR. Americana		0.153	0.369	0.478	0.337	0.663
ASN. Asiática		0.075	0.464	0.46	0.308	0.692
ASW. Americanos con ancestros africanos en USA			0.066	0.934	0.033	0.967
BEB. Bengalí. Blangadesh		0.035	0.442	0.523	0.256	0.744
CDX. Chinos Dai en Xishuangbanna. China		0.086	0.366	0.548	0.269	0.731
CEU. Residentes en Utah con ancestros del norte y oeste europeos.		0.071	0.293	0.636	0.217	0.783
CHB. Chinos Han Beijing		0.049	0.505	0.447	0.301	0.699
CHS. Chinos Han Sureste China		0.076	0.495	0.429	0.324	0.676
CLM. Colombianos. De Medellín. Colombia		0.074	0.372	0.553	0.261	0.739
ESN. Esan en Nigeria				1		1
EUR. Europea		0.032	0.306	0.662	0.185	0.815
FIN. Finlandés. Finlandia		0.03	0.333	0.636	0.197	0.803
GBR. Británicos en Inglaterra y Escocia		0.022	0.319	0.659	0.181	0.819
GIH. Indio Guharati de Houston.		0.097	0.408	0.495	0.301	0.699
GWD. Gambianos en la división occidental de Gambia.			0.018	0.982	0.009	0.991
IBS. Población ibérica en España.		0.019	0.28	0.701	0.159	0.841
ITU. Indios Telugu de Reino Unido		0.069	0.333	0.598	0.235	0.765
JPT. Japoneses en Tokio, Japón.		0.106	0.519	0.375	0.365	0.635
KHV. Kinh en la ciudad Ho Chi Minh, Vietnam.		0.061	0.424	0.515	0.273	0.727
LWK. Luhya en Webuye, Kenia				1		1
MSL. Mende en Sierra Leona			0.012	0.988	0.006	0.994
MXL. Ascendencia mexicana, de Los Angeles USA		0.172	0.422	0.406	0.383	0.617
PEL. Peruanos de Lima Perú.		0.318	0.4	0.282	0.518	0.482
PJL. Punjabi de Lahore, Pakistán		0.073	0.375	0.552	0.26	0.74
PUR. Puerto Riqueños de Puerto Rico.		0.077	0.308	0.615	0.231	0.769
SAS. Surasiáticos		0.065	0.387	0.548	0.259	0.741
STU. Sri Lankanos Tamil de Reino Unido.		0.049	0.382	0.569	0.24	0.76
TSI. Toscanos en Italia		0.019	0.308	0.673	0.173	0.827
YRI. Yoruba en Ibadan, Nigeria				1		1

Tabla 35. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs25409 (C/T) estudiado en la región Exón 1a del gen *GABRB3*, y su comparación con otras poblaciones.

Población	n (%)	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
		C/C	C/T	T/T	T	C
Mexicana ^{xi}	87 (100)	87 (1)			0	1
1000 Genomas ^{xii}						
Africanos caribeños en Barbados		96 (1)	0	0	1	0
AFR. Africana		661 (1)				
AMR. Americana		343 (0.988)	4 (0.012)		0.006	0.994
ASN. Asiática		504 (1)			1	
ASW. Americanos con ancestros africanos en USA		61 (1)			1	
BEB. Bengalí. Blangadesh		86 (1)			1	
CDX. Chinos Dai en Xishuangbanna. China		93 (1)			1	
CEU. Residentes en Utah con ancestros del norte y oeste europeos.		98 (0.990)	1 (0.010)		0.995	0.005
CHB. Chinos Han Beijing		103 (1)			1	
CHS. Chinos Han Sureste China		105 (1)			1	
CLM. Colombianos. De Medellín. Colombia		94 (1)			1	
ESN. Esan en Nigeria		99 (1)			1	
EUR. Europea		497 (0.988)	6 (0.012)		0.994	0.006
FIN. Finlandés. Finlandia		99 (1)				
GBR. Británicos en Inglaterra y Escocia		89 (0.978)	2 (0.022)		0.989	0.011
GIH. Indio Guharati de Houston.		103 (1)			1	
IBS. Población ibérica en España.		106 (0.991)	1 (0.009)		0.995	0.005
ITU. Indios Telugu de Reino Unido		102 (1)			1	
JPT. Japoneses en Tokio, Japón.		104 (1)			1	
KHV. Kinh en la ciudad Ho Chi Minh, Vietnam.		99 (1)			1	
MSL. Mende en Sierra Leona		85 (1)			1	
MXL. Ascendencia mexicana de Los Angeles USA		63 (0.984)	1 (0.016)		0.992	0.008
PEL. Peruanos de Lima Perú.		84 (0.988)	1 (0.012)		0.994	0.006
PJL. Punjabi de Lahore, Pakistán		96 (1)			1	
PUR. Puerto Riqueños de Puerto Rico.		102 (0.981)	2 (0.019)		0.990	0.010
SAS. Surasiáticos		489 (1)			1	
STU. Sri Lankanos Tamil de Reino Unido.		102 (1)			1	
TSI. Toscanos en Italia		105 (0.981)	2 (0.019)		0.991	0.009

9. CONCLUSIONES

1. Se realizó la secuenciación de la región 5' UTR del gen *GABRB3*, una región altamente polimórfica y sin aparente relación con la Epilepsia de Ausencias de la Niñez.
2. Se confirma en 1 caso que la mutación P11S, previamente reportada, está asociada con la Epilepsia de Ausencias de la Niñez.
3. En cuanto a los polimorfismos encontrados en la región 5'UTR, no se encontró asociación entre casos y controles. Al ser una enfermedad heterogénea, obliga a la búsqueda de otros factores genéticos (otros genes, mutaciones y polimorfismos) que se asocien a la etiología de la enfermedad y buscar polimorfismos que sirvan como biomarcadores de riesgo,
4. La región polimórfica es similar a lo reportado a poblaciones asiáticas.

10. REFERENCIAS

- Aige, V. (2010). "Anatomía descriptiva y anatomía clínica del sistema nervioso en el perro y el gato y Resonancia magnética. Biofísica e interpretación en la patología del sistema nervioso central en veterinaria". Barcelona, España: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Alcaraz, V. (2001). "Estructura y función del sistema nervioso". 2ª ed. México. México: El manual moderno.
- ATDBIO. [En línea] 2013 [Fecha de consulta: 15 Diciembre 2013]. Disponible en: <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>
- Audenaert, D., et al. (2006). A novel *GABRG2* mutation associated with febrile seizures. *Neurology*, 82, 687-690
- Avoli M, Gloor P. (1982) Interaction of cortex and thalamus in spike and wave discharges of feline generalized penicillin epilepsy. *Exp Neurol* 77: 386-402
- Bal, T., Von Krosigk M., McCormick DA. (1994). From cellular to network mechanisms of a thalamic synchronized oscillation. In: Buzsaki G., Llinas R., Singer W., Berthoz A., Christen Y., eds. *Temporal coding in the brain. Research and perspectives in neurosciences: Springer-Verlag*: 129.143
- Barkovich AJ, K. R. (2005). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* 65: 1873-1887.
- Baulac, S. (2001). First genetic evidence of GABA_A receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 28: 46-48.
- Berg, A. B. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, 51(4): 676–685.
- Berg, A. S. (2011). New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia* 52(6): 1058-1062.
- Blumenfeld, H. (2005). Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia* 46 (9): 21-33
- Blobel Günter. (1999). Nobel Prize in Physiology or Medicine. "Proteins have intrinsic signals that govern their transport and localization in the cell". [En línea]. [Fecha de consulta: 26 Noviembre 2013]. Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1999/press.html
- Bustamante Zuleta, E. (2007). "El sistema nervioso. Desde las neuronas hasta el cerebro humano". Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Cardinali, D. (1992). "Manual de neurofisiología". Madrid, España: Díaz de Santos.
- Cossette, P. & et al (2002). Mutation in *GABRA1* in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 31: 184-189.
- Coursin DB. (1954). Convulsive seizures in infants with pyridoxine-deficient diet. *JAMA* 154: 406-408.
- Delgado Cirilo, A., Minguillón Llombart, C., & Joglart Tamargo, J. (2003). "Introducción a la Química Terapéutica". 2ª ed. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Dibbens, L. (2004). *GABRD* encoding a protein for extra-or-perisynaptic GABA_A receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum. Mol. Genet.* 13: 1315-1319.

- El Sahili, L., Álvarez, A. y Hernández Y. (2010). "Psicología Clínica. Trastornos neurológicos, hormonales y psicológicos". Guanajuato. México: Universidad de Guanajuato.
- Escobar, M. I., y Pimienta, H. J. (2006). "Sistema nervioso". Cali. Colombia: Universidad del Valle.
- Fernández-Teruel, A. (2008). "Farmacología de la conducta: de los psicofármacos a las terapias psicológicas". Barcelona, España: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Genecards [fecha de consulta: 30 Julio 2013]. Disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GABRB3>.
- Glatt, K. G. (1997). Structure and organization of *GABRB3* and *GABRA5*. **Genomics** 41: 63-69.
- González, Carlos. *Fisiología del impulso nervioso*. [En línea] Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 2012 [fecha de consulta: 20 Octubre 2013]. Disponible en: <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/6to/membr-casos/Fisiol-impulso-nerv.html>
- Hausser, W. (1994). The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. **Epilepsia** 35 (Suppl. 2) :S1-S6.
- Jacob, T. C., Moss, S. J., & Jurd, R. (2008). GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nature Reviews Neuroscience** 9: 331-343.
- Jiménez-Sánchez A., Guerrero R., (1982). "Genética Molecular Bacteriana". Barcelona. España: Reverté.
- Kalant, H., Roschlau, W. (2002). "Principios de Farmacología". 6ª ed. México. México: Oxford University Press Harla Mexico.
- Kang, J.-Q., y Macdonald, R. L. (2009). Making sense of nonsense GABA_A receptor mutations associated with genetic epilepsies. **Cell Press Review. Trend in Molecular Medicine** 15 (9): 430-438.
- King, M. [En línea]. 2016 [Fecha de consulta: 15 Abril 2016] Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/nerves-sp.php>
- Kirkness, E. a. (1993). A strong promoter element is located between alternative exons of a gene encoding the human gamma-aminobutyric acid-type A receptor b3 subunit (*GABRB3*). **J. Bio. Chem** 268: 4420-4428.
- Kolman, J., Rohm. K-H. (2005) Bioquímica. Texto y atlas. 3ª ed. Madrid: Médica Panamericana.
- Lodish, H. (2006). Biología celular y molecular. 5ª ed. Buenos Aires. Argentina: Médica Panamericana.
- Lorenzo-Velázquez, B. (2008). "Farmacología Básica y Clínica". 18ª ed. Madrid. España: Médica Panamericana.
- Lu, Y. W. (2009). Genes associated with idiopathic epilepsies: a current overview. **Neurological Research** 31: 135-143.
- Mark, T., Saunders, M., (2005). The immune response: Basic and Clinical Principles. USA: Academic Press.
- Martínez, I., Hernández, L. (2014). "Epilepsia". Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. D.F. México.
- Medina, C. (2004). "Epilepsia: aspectos clínicos y psicosociales". 20ª ed. Bogotá. Colombia: Médica Internacional.
- Melo, V. y Cuamatzi, O. (2007). "Bioquímica de los Procesos Metabólicos". 2a ed. México, México: Reverté.
- Marini, C., Harkin, L.A., Wallace, R.H., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F. (2003). Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with GABAA receptor mutation. **Brain** 126: 230-246.

- Müller-Esterl, W. (2008). "Bioquímica. Fundamentos pra Medicina y Ciencias de la Vida". Barcelona. España: Reverté.
- NCBI. PrimerBlast ®. [En línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- NCBI. [En línea]. Disponible <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2562>
- New England BioLabs. [En línea]. [fecha de consulta: 30 Marzo del 2014] Disponible en: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>
- OMS. [En línea] 2012-2013. [Fecha de consulta: 15 Noviembre 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>
- Pankhaj B.K., Annals of Neurosciences, Primary nocturnal headache - case report. Annals of Neurosciences. 16. [En línea] 2009. [Fecha de consulta: 18 Noviembre 2015]. Disponible en: <http://annalsofneurosciences.org/journal/index.php/annal/article/view/60/997>
- Programa Prioritario de Epilepsia (PPE) del Sector Salud.* [En línea] 2006-2013 [Fecha de consulta: 15 Noviembre 2013]. Disponible en: <http://www.epilepsiamexico.gob.mx/que-es.htm>
- Schwarz, J., Rödelsperger, C., Schuelke, M., & Seelow, D., (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods*. 7(8) 575-576
- Schwarz, J., MutationTaster . [En línea]. 2014 [fecha de consulta: 17 Noviembre del 2014] Disponible en: <http://www.mutationtaster.org/info/documentation.html>
- Sieghart, W., y Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Curr. Top. Med. Chem* 2: 795-816.
- Snell, R. (2007). "Neuroanatomía clínica". 6ª ed. Madrid. España: Médica Panamericana.
- Tanaka, M., Olsen, R. W., Medina, M. T., Schwartz, E., Alonso, M. E., Duron, R. M., Castro-Ortega, R., Martínez-Juárez, I.E., Pascual Castroviejo I., Machado-Salas, J., Silva, R., Bailey, J.N., Bai, D., Ochoa, A., Jara-Prado, A., Pineda, G., Macdonald, R.L. y Delgado-Escueta, A.V. (2008). Hyperglycosylation and Reduced GABA Currents of Mutated *GABRB3* Polypeptide in Remitting Childhood Absence Epilepsy. *The American Journal of Human Genetics* 82: 1249-1261.
- Urak, L., Feucht, M., Fathi, N., Hormik, K., & Fuchs, K. (2006). A *GABRB3* promoter haplotype associated with childhood absence epilepsy impairs transcriptional activity. *Human Molecular Genetics* 15(16): 2533-2541.
- Van Gelder NM. (1972). Amino acid content of epileptogenic human brain: focal versus surrounding regions. *Brain Res* 40: 385-393
- Villarejo, F. O. (1998). "Tratamiento de la Epilepsia". Madrid, España: Díaz de Santos.
- Voet, D. (2009). "Fundamentos de Bioquímica: La vida a un nivel molecular". 2ª ed. China: Médica Panamericana.
- Wallace, R., *et al.* (2001). Mutant GABA_A receptor gamma2-subunit in chikdhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* 28: 983-987
- Wyllie, E. (2010). "Wyllie's Treatment of Epilepsy. Principles and practice". 5a ed. USA: Lippincott Williams y Wilkins.
- Wisden, W., Laurie, D., Monyer, H., & Seeburg, P. (1992). The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *The Journal of Neuroscience* 12(3), 1040-1062.

Yalçın, Ö. (2011). Genes and molecular mechanisms involved in the epileptogenesis of idiopathic absence epilepsies. *Seizure* 21: 79- 86.

Zuleta, E. (2004). *El sistema nervioso. Desde las neuronas hasta el cerebro humano*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.

Referencias de la Tablas 23-26 De Frecuencias genotípicas y alélicas:

ⁱ Yoruba. Oeste de África http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss226807384

ⁱⁱ Norteamérica. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss236718849

ⁱⁱⁱ Este de Asia. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss243117443

^{iv} En este estudio

^v 1000 Genomas http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=15:27018912-27019912;source=dbSNP;v=rs7171660;vdb=variation;vf=4997062

^{vi} 1000 Genomas http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=15:27018540-27019540;source=dbSNP;v=rs4906901;vdb=variation;vf=3783004#343958_tablePanel

^{vii} Yoruba. Oeste de África http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss226807383

^{viii} Norteamérica. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss236718848

^{ix} Este de Asia http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss243117442

^x 1000 Genomas http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=15:27018905-27019905;source=dbSNP;v=rs4363842;vdb=variation;vf=3318170

^{xi} En este estudio

^{xii} http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=15:27018341-27019341;v=rs25409;vdb=variation;vf=16802#373430_tablePanel