



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA
ESPECIALIDAD DE NEUROLOGIA PEDIATRICA
**Identificación de variantes en el número de copias mediante técnica de
hibridación genómica comparativa en una cohorte pediátrica con epilepsia
sindrómica, en el Hospital Ignacio Morones Prieto de San Luis Potosí**

DR. ANDRES ENRIQUE QUIÑONES NOVELO

DIRECTOR CLÍNICO
Dr. Antonio Bravo Oro
Sub especialista en Neurología pediátrica

DIRECTOR METODOLÓGICO
Dra. María del Carmen Esmer Sánchez
Dra. en Ciencias Médicas

© copyright

Febrero 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIDAD EN NEUROLOGIA PEDIATRICA

TÍTULO DE TESIS

Identificación de variantes en el número de copias mediante técnica de hibridación genómica comparativa en una cohorte pediátrica con epilepsia síndrómica, en el Hospital Ignacio Morones Prieto de San Luis Potosí

PRESENTA

DR. ANDRES ENRIQUE QUIÑONES NOVELO

Firmas

DIRECTOR DR ANTONIO BRAVO ORO ESPECIALISTA NEUROLOGIA PEDIATRICA	
CO – DIRECTOR DRA MARIA DEL CARMEN ESMER SANCHEZ DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS	

Sinodales	
Dr. Abel Salazar Martínez	
Dr. Rene Andrade García	
Dra. Cristina González Amaro	
M. en C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefe de Investigación y Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	Dr. Jorge Luis García Ramírez Coordinador de la Especialidad en Neurología Pediátrica.



RESUMEN

Objetivo principal: Evaluar el rendimiento diagnóstico del análisis de microarreglos en pacientes con epilepsia síndromica y proponer posibles nuevos genes candidatos de epilepsia

Sujetos y métodos: Estudio observacional, transversal, retrospectivo. De pacientes de la consulta externa de neurología pediátrica registrados en una base de datos de microarreglos. Se seleccionaron los pacientes que cumplían con los criterios básicos de epilepsia y dismorfias. Se revisó expedientes. Se reanalizaron las variaciones determinando la frecuencia de variaciones patógenas. Además, se detectó genes candidatos de epilepsia, en variaciones posiblemente patógenas con superposición genotípico del DECIPHER, esta información se procesó con análisis descriptivo.

Resultados: Se seleccionaron 30 pacientes de 87 casos que cumplieron los criterios básicos de epilepsia más alguna dismorfia. Se encontraron 24 variaciones en el número de copias, no benignas. Catorce identificadas como duplicación y diez deleciones. En ocho pacientes se observaron variaciones patógenas 26% (8/30). Se encontró superposición de genes involucrados en 4 pacientes considerando a los genes ATAD3, ARHGEF7 y MTNR1A como posibles genes candidatos de epilepsia.

Conclusiones: Los microarreglos permiten al neurólogo detectar un 26% de variaciones patógenas en el número de copias en epilépticos cuando se acompañan de dismorfias, permitiendo dirigir el tratamiento médico o asistencial y la derivación para el asesoramiento genético familiar, además este trabajo presenta genes candidatos a considerar en las bases moleculares de la epilepsia.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ANTECEDENTES.	1
JUSTIFICACIÓN.	8
HIPÓTESIS.	9
OBJETIVOS.	10
SUJETOS Y MÉTODOS.	11
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	12
ÉTICA.....	13
RESULTADOS.	14
DISCUSIÓN.	20
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.	23
CONCLUSIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA.	25
ANEXO 1 REGISTRO DE LA TESIS AL COMITE ...	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 2 CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACION	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1 Principales genes relacionado a epilepsia (34).....	7
Tabla 2 Datos demográficos de 30 pacientes con epilepsia y dismorfias.	16
Tabla 3 Características clínicas de los pacientes con epilepsia con una o más NVC patógena.....	18
Tabla 4 CNV probablemente patógenas e información de genes candidatos para la epilepsia.	19

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Ilustración 1 Diagrama de flujo del estudio.	15
Ilustración 2 Grafico circular de tamaños de VNC de nuestra cohorte.	17

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a-CGH:	Array de hibridación genómica comparada
ADN:	Acido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
ACMG	Colegio Americano De Genética Médica Y Genómica
CGH:	Hibridación Genómica comparada
Chr:	Cromosoma
CMA:	Microarreglos de cromosomas o cariotipo molecular
CNV:	Variación en número de copias (Copy Number Variation)
Del:	Delección
DGV:	Base de datos de variantes estructurales. (Data base of genomic variants)
DI	Discapacidad intelectual
Dup:	Duplicación
EEG:	Electroencefalograma
IDD	Discapacidad intelectual y del desarrollo
kB	kilobases
mB	megabases
SCA	Ataxia espinocerebelosa
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Polimorfismo de un nucleótido
spM:	Síndrome de Phelan-McDermid
SW:	Variante de un nucleótido
TEA:	Trastornos del espectro autista
TND:	Trastornos del Neurodesarrollo
VS	Variante estructural

LISTA DE DEFINICION

DECIPHER	Base de datos interactiva basada en la web que incorpora un conjunto de herramientas diseñadas para ayudar a la interpretación de variantes genómicas.
DELECIION	Mutación genética en la cual se pierde material genético, desde un solo par de nucleótidos de ADN hasta todo un fragmento de cromosomas.
DISCAPACIDAD INTELLECTUAL	Estado individual que se caracteriza por presentar limitaciones significativas en el funcionamiento intelectual y en la conducta adaptativa y presentarse antes de los 18 años.
DUPLICACION	Es un tipo de mutación que implica la producción de una o más copias de un gen o región de un cromosoma.
GEN	Es una unidad de información en un locus de ácido desoxirribonucleico que codifica un producto génico, ya sea proteínas o ARN.
HAPLOINSUFICIENCIA	Describe un modelo de acción genética dominante en un organismo diploide, en el que una sola copia del alelo estándar en un locus en combinación heterocigótica con un alelo variante es insuficiente para producir el fenotipo estándar.
HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA	Es un método de citogenética molecular para analizar las variaciones en el número de copias (VNC) en relación con el nivel de ploidia del ADN de una muestra en comparación con una muestra de referencia.
KILOBASES	Son 1000 pares de bases de ADN o de ARN.
MEGABASES	Unidad de longitud de fragmentos de ADN que es igual a un millón de bases.
VNC INCIERTA	No hay evidencia suficiente disponible para la determinación inequívoca de importancia clínica.
VNC PATOGENICA	Clínicamente significativa en múltiples publicaciones revisadas por pares (>3-5Mb). En ausencia de loci sindrómicos claramente definidos dentro del intervalo.
TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA	Deficiencias persistentes en la comunicación e interacción social en diversos contextos, unidas a patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades.

**VARIACION EN EL
NUMERO DE COPIAS**

Se define como el segmento de ADN igual o mayor de 1 Kb cuyo número de copias es variable comparándolo con un genoma de referencia.



ANTECEDENTES.

DEFINICION

Una convulsión se define como la expresión clínica de descargas anormales, excesivas y sincrónicas de neuronas que residen principalmente en la corteza cerebral. Esta actividad paroxística anormal es intermitente y generalmente autolimitada, y dura de unos segundos a unos pocos minutos. (1,2)

La epilepsia se considera una enfermedad asociada a un trastorno duradero de la función cerebral normal. Se requiere al menos de dos ataques no provocados que ocurren con más de 24 horas de diferencia, o una convulsión no provocada y una condición asociada con probabilidad de presentar nuevas convulsiones en los próximos 10 años, como lesiones estructurales por eventos cerebrovasculares, infección del sistema nervioso central o ciertos tipos de lesión cerebral traumática. Este criterio fue agregado por el grupo de trabajo de la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) en 2014 y enfatiza la importancia de la neuroimagen y la electroencefalografía (EEG) en la evaluación de pacientes con una primera convulsión. La epilepsia puede surgir de una gran variedad de causas como las genéticas, estructurales, metabólicas, inmunes, infecciosas o desconocidas (3,4)

EPIDEMIOLOGIA

La incidencia de epilepsia en la infancia varía de aproximadamente 0.5 a 8 por 1,000 años-persona. Se estima que el 0.5 al 1% de los niños y adolescentes experimentarán al menos una convulsión afebril en la adolescencia. De todos los niños, del 3 al 5% tendrá una sola convulsión febril en los primeros cinco años de vida; del 3 al 6% de las personas con convulsiones febriles desarrollará convulsiones afebriles o epilepsia. Existe un riesgo de 3.6% de experimentar al menos una convulsión en una vida útil de 80 años(4–9)

En los países en vías de desarrollo el perfil de incidencia se eleva entre los adultos jóvenes. En la mayoría de los estudios, las tasas de incidencia son ligeramente más altas en hombres que en mujeres, pero no existen diferencias raciales significativas.



Se ha observado una incidencia mayor en los grupos socioeconómicos más bajos (7,10,11)

FISIOPATOLOGIA

El cerebro inmaduro, particularmente en el recién nacido y el lactante, difiere del cerebro adulto en los mecanismos básicos de epileptogénesis y propagación de convulsiones. Los niños mayores de seis años tienden a tener convulsiones que son bastante similares a las de los adultos, mientras que los niños más pequeños y los bebés tienen comportamientos menos complejos, particularmente con convulsiones focales con deterioro de la conciencia. (1,2)

La epilepsia de origen genético inicia, en su mayoría, en la infancia. Incluyen los síndromes epilépticos bien caracterizados como por ejemplo la epilepsia de ausencia infantil, la epilepsia de ausencia juvenil o la epilepsia mioclónica juvenil, así como síndromes más graves a menudo asociados con discapacidad del desarrollo neurológico y convulsiones refractarias, como el síndrome de Dravet. El análisis funcional ha demostrado que las variantes patogénicas en genes específicos conducen a una disfunción proteica que provoca hiperexcitabilidad y sincronización patológica de las redes neuronales que conducen a convulsiones epilépticas. (12,13)

Se ha observado etiología genética hasta en un 30 % de las epilepsias; denominándoles epilepsias genéticas y pueden dividirse en: epilepsia genética focal, generalizada y encefalopatías (12,14)

COMPONENTE GENETICO DE LA EPILEPSIA

La aplicación de la biología molecular a la epileptología ha permitido reforzar nuestro conocimiento de las bases genéticas de algunas epilepsias y ya es determinante para establecer una taxonomía de las enfermedades y síndromes epilépticos. El carácter familia de varios tipos de epilepsia se conocen desde la antigüedad, así

como el carácter hereditario de algunas entidades nosológicas que dan lugar a crisis epilépticas. (1,12)

Desde la identificación del primer gen causante de epilepsia en 1995, se han detectado más de 500 genes asociados a la epilepsia. Sin embargo, la importancia de muchos genes y sus variantes aún no está clara (tabla 1). Por ejemplo, muchas epilepsias son causadas por mutaciones en genes de canales iónicos (SCN1A, KCNQ2), implicados en la función de la vesícula sináptica (STXBP1, STX1B, PRRT2), con función en vías metabólicas (SLC2A1), en el metabolismo de la vitamina B6, receptores de neurotransmisores como el receptor GABAA (GABARG2) o subunidades de receptores NMDA (GRIN2A), así como defectos asociados al metabolismo del ARN/ADN (CDKL5, CHD2). (12)

Se pueden distinguir tres categorías generales de pruebas genéticas: 1) Paneles de análisis multigenico, destinados a la detección de mutaciones en genes conocidos seleccionados de antemano. Enfocados en identificar cambios de secuencia incluyendo mutaciones puntuales, deleciones o duplicaciones pequeñas. 2) El estudio citogenético para identificar variantes estructurales como deleciones o duplicaciones preferido en casos con manifestaciones múltiples incluyendo dismorfias y malformaciones anatómicas asociadas con la epilepsia. 3) Métodos de análisis de todo el genoma los que se pueden aplicar para identificar mutaciones en nuevos genes de predisposición. (12)

Entre los métodos de análisis cromosómico se encuentra el cariotipo cuya resolución es relativamente baja y solo detecta la aneuploidía de cromosomas completos o pérdidas o ganancias de 200 a 500 mil pares de bases o 0.2Mb, la hibridación fluorescente in situ (FISH) utilizando sondas de ADN específicas en cromosomas metafásicos es útil en casos muy particulares con la sospecha específica de un síndrome de microdeleción conocido. Ambas técnicas tienen una utilidad muy limitada en pacientes con epilepsia. (13,15)

La variación genética estructural se refiere a una clase de alteraciones de secuencia que abarcan típicamente más de 1000 pares de bases (una kilobase de ADN o kb) (14). Los estudios han indicado que estas variaciones genéticas pueden ser pequeñas (por ejemplo, en el rango de 450 pares de bases y superiores) y que la mayoría de los individuos tienen al menos 1,000 de tales variaciones.(16,17) Incluyen variantes en el número de copias (VNC), reordenamientos de secuencia y otras. Estas diferencias genómicas submicroscópicas en el número de copias de una o más secciones de ADN son el resultado de ganancias o pérdidas de ADN. Las ganancias de números de copias pueden resultar en duplicaciones, triplicaciones o incluso ganancias de números de copias múltiples. La mayoría de las eliminaciones son el resultado de la pérdida del número de copias en un locus (deleciones heterocigóticas), pero en algunos casos la pérdida puede afectar las copias en ambos loci (deleciones homocigóticas). (18,19)

Las VNC con mayor frecuencia son heredadas, pero pueden ocurrir de Novo. Inicialmente, se pensó que eran eventos raros esporádicos y correlacionaban con enfermedades mendelianas específicas. Esta percepción errónea acerca de su rareza y pobre vinculación absoluta con la enfermedad, se debieron principalmente a limitaciones técnicas. Los avances tecnológicos han demostrado que estas VNC son frecuentes y contribuye sustancialmente a la diversidad genética. Algunos estudios han sugerido que las diferencias de VNC en el genoma humano son tan extensas como 20%, aunque puede ser una sobreestimación y probablemente sea más cercano al 5%. Se estima conservadoramente que la mayoría de las personas portan un promedio de tres VNC a gran escala. El número de VNC conocidos que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad continúa aumentando. (18–21)

Los microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) también llamado microarreglos cromosómicos (CMA) que es una técnica de citogenética molecular particularmente útil por su capacidad para detectar las CNV asociadas con ganancias o pérdidas submicroscópicas en cada cromosoma. (13,15)

Esta técnica funciona comparando el contenido genómico (o ADN) de un paciente con un ADN control normal, puede analizar múltiples muestras, lo que provee de un menor trabajo práctico por muestra, y la interpretación de datos puede ser altamente automatizada. Dentro de las desventajas está el costo y las dificultades inherentes a la interpretación. (15)

Hay al menos dos tipos diferentes de arreglos, los específicos "dirigidos" y arreglos genómicos completos. Los arreglos dirigidos, diseñados para detectar a los síndromes de microdelección/micro duplicación conocidos. Las matrices genómicas completas cubren todo el genoma a diferentes niveles de resolución. (13,15)

La interpretación de los resultados de los CMA puede complicarse por la presencia de variantes de número de copias (VNC) que pueden ser benignas, patógenas o de significado incierto. Las VNC son patógenas cuando involucran un gen o genes sensibles o elementos reguladores. Algunas VNC patógenas causan trastornos sindromáticos con características fenotípicas consistentes, mientras que otras están asociadas con la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad.(22,23)

La distribución física de las VNC parece no ser aleatoria en todo el genoma. La frecuencia de la VNC es mayor en las regiones de duplicación segmentaria, lo que concuerda con la teoría de la recombinación homóloga no alélica como mecanismo primario para la causa de las VNC. Las VNC se observan más comúnmente en regiones ricas en genes. Las VNC parecen agruparse en familias de genes específicos, incluidos los genes de respuesta inmunitaria e inflamatoria, la señalización celular y las moléculas de adhesión celular, proteínas estructurales y receptores olfativos. La mayoría representan VNC benignos que reflejan la variación normal sin ninguna consecuencia clínica aparente (16–21,24–26)

La interpretación de VNC ha mejorado constantemente debido al uso de grandes bases de datos que permiten una comparación directa con controles aparentemente normales. Los ejemplos de estas bases de datos incluyen la base de datos de

variantes genómicas (DGV), el Proyecto 1000 Genomas o ClinVar. Otras bases de datos que incluyen información fenotípica, tales como DECIPHER se están convirtiendo en recursos valiosos para los hallazgos detectados por la hibridación genómica comparativa. (27–30)

Interpretar la patogenicidad de las VNC puede ser bastante difícil en presencia de múltiples VNC en un individuo. (30-31). También es importante destacar la presencia de VNC comunes en la población general. No está claro si muchos de estos polimorfismos comunes pueden desempeñar un papel en los trastornos comunes (14,31)

El interés por el estudio de las bases genéticas de la epilepsia ha aumentado considerablemente en los últimos años, estos estudios hacen énfasis en reconocer nuevos VNC, así como la utilidad del estudio con microarreglos en pacientes con epilepsia, habitualmente solicitamos a pacientes con algún patrón sindrómico, sin embargo, aún falta realizar estudios en cohortes de pacientes con epilepsia no sindrómica. Las VNC pueden contribuir a la epilepsia de dos maneras, cuando son variantes causales que pueden mostrar una transmisión dominante o cuando las VNC son variantes de predisposición a epilepsia y cuando es posible demostrar estadísticamente una mayor frecuencia en pacientes en comparación con los controles sanos. (12)

En un estudio realizado en el 2017 donde se evaluó mediante microarreglos una cohorte de niños en el que se observó una frecuencia de 11% del número de copias clínicamente relevantes, en general se espera que cuando se sospecha epilepsia sindrómica se encuentre un 10-15% de variantes patogénicas. En este estudio también se identificaron nuevas variaciones en el número de copias logrando proponer 4 genes nuevos genes candidatos para epilepsia. (32)

Otro estudio evaluó una cohorte de 49 sujetos con diagnóstico de epilepsia fármaco resistente encontrándose un rendimiento de la prueba del 14% para el diagnóstico genético de epilepsia, es decir se hallaron anomalías clínicamente significativas en 7 pacientes. (33)

Tabla 1 Principales genes relacionado a epilepsia (34)

EPILEPSIAS CON INICIO EN EL PRIMER AÑO DE VIDA	OMIM*	GEN	PROTEÍNA
Epilepsia neonatal familiar benigna	121200	<i>KCNQ2</i>	Canal de potasio
	121201	<i>KCNQ3</i>	Canal de potasio
Epilepsia neonatal-infantil familiar benigna	607745	<i>SCN2A</i>	Canal de sodio
Epilepsia infantil familiar benigna	605751	<i>PRRT2</i>	Proteína trans-membrana rica en prolina
Síndrome de Ohtahara	612164	<i>STXBP1</i>	Proteína ligante de sintaxina 1
	308350	<i>ARX</i>	Proteína relacionada al homeobox <i>Aristaless</i>
Encefalopatía epiléptica infantil precoz	613477	<i>SPTAN161</i>	Espectrina alfa no eritrocítica 1
	613720	<i>KCNQ2</i>	Canal de potasio
	613721	<i>SCN2A</i>	Canal de sodio
	613722	<i>PLCB1</i>	Fosfolipasa
	614959	<i>KCNT1</i>	Canal de potasio activado por calcio
Encefalopatía mioclónica precoz	609304	<i>SLC25A22</i>	Transportador mitocondrial de glutamato
Espasmos de inicio precoz	300672	<i>STK9/CDKL5</i>	Quinasa dependiente de ciclina
EPILEPSIAS CON CRISIS FEBRILES PREDOMINANTES			
Síndrome de Dravet	607208	<i>SCN1A</i>	Canal de sodio
Epilepsia generalizada con crisis febril plus	604403	<i>SCN1A</i>	Canal de sodio
	604233	<i>SCN1B</i>	Canal de sodio
	611277	<i>GABRG2</i>	Receptor GABA _A
	613060	<i>GABRD**</i>	Receptor GABA _A
Epilepsia ausencia infantil con crisis febril	607681	<i>GABRG2</i>	Receptor GABA _A
Epilepsia y retardo mental restringido al sexo femenino	300088	<i>PCDH19</i>	Protocaderina
EPILEPSIAS GENERALIZADAS IDIOPÁTICAS			
Epilepsia ausencias de inicio precoz	614847	<i>SLC2A1</i>	GLUT1 (Transportador de glucosa tipo 1)
Epilepsia ausencia infantil	612269	<i>GABRB3**</i>	Receptor GABA _A
	611942	<i>CACNA1H**</i>	Canal de calcio voltaje dependiente
Epilepsia mioclónica juvenil	611136	<i>GABRA1</i>	Receptor GABA _A
	254770	<i>EFHC1</i>	Proteína con dominio EF-hand
	607682	<i>CACNB4**</i>	Canal de calcio voltaje dependiente
	613060	<i>GABRD**</i>	Receptor GABA _A
EPILEPSIAS FOCALES			
Epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante	610353	<i>CHRNA2</i>	Receptor nicotínico
Epilepsia autosómica dominante con síntomas auditivos	600513	<i>CHRNA4</i>	Receptor nicotínico
	600513	<i>CHRN2</i>	Receptor nicotínico
	600512	<i>LGI1</i>	Proteína rica en leucina
EPILEPSIAS ASOCIADAS A OTROS ALTERACIONES PAROXÍSTICAS			
Epilepsia generalizada con disquinesia paroxística	609446	<i>KCNMA1</i>	Canal de potasio
Epilepsia con disquinesia paroxística inducida por ejercicios	138140	<i>SLC2A1</i>	GLUT1 (Transportador de glucosa tipo 1)
Epilepsia ausencia y ataxia episódica	108500	<i>CACNA1A</i>	Canal de cloro
Epilepsia focal y ataxia episódica	160120	<i>KCNA1</i>	Canal de potasio
Migraña hemipléjica familiar e epilepsia	602481	<i>ATP1A2</i>	Sodio-potasio ATPasa

*OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man®): <http://omim.org/>

** Candidatos a las variantes de estos genes fueron identificados en familias pequeñas con herencia compleja; sin embargo, los efectos de estas variantes en el riesgo de tener la enfermedad aun deben ser confirmados.



JUSTIFICACIÓN.

En el Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, se atienden al año aproximadamente 550 pacientes con epilepsia, en el periodo de enero 2013 a junio 2020 fue posible realizar CMA a una cantidad limitada de pacientes.

La aplicación de la metodología de microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) ha revelado muchos nuevos síndromes de microdelección / duplicación, hasta ahora indetectables por las técnicas citogenéticas convencionales.

Los estudios que utilizan análisis de microarreglos se han realizado en cohortes de niños con diagnóstico de epilepsia con posible etiología genética. Pocos estudios han abordado el rendimiento del análisis de microarreglos en cohortes con niños con epilepsia y dismorfias.

Aún son limitados los análisis que describen la utilidad de estas técnicas en una población con epilepsia sindrómica.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Neurología Pediátrica.

HIPÓTESIS.

La frecuencia de variaciones patógenas es de 15% en una población pediátrica con epilepsia sindrómica en el Hospital Central Ignacio Morones Prieto.

OBJETIVOS.

Objetivo general

Evaluar el rendimiento diagnóstico del análisis de microarreglos en pacientes con epilepsia síndrómica y proponer posibles nuevos genes candidatos de epilepsia.

Objetivos específicos

- Identificar las CNV patógenas conocidas que se relacionan con epilepsia
- Identificar las CNV de resultado incierto en genes con posible implicación epiléptica.

Objetivos secundarios

- Describir las características demográficas de la cohorte
- Reanalizar los resultados de las variaciones en términos de patógenos, posible patógenos e incierto.
- Describir el tipo de crisis epiléptica y el tipo de CNV asociada a cada crisis.
- Identificar la distribución de CNV en pacientes con epilepsia síndrómica.

SUJETOS Y MÉTODOS.

Se obtuvo la información para la cohorte, de la base de datos de 296 pacientes con estudio genético (CMA) del servicio de neurología pediátrica del Hospital Ignacio Morones Prieto. Estos estudios genéticos fueron realizados a pacientes en el periodo del 2013 a junio del 2020, en quienes se sospechó desbalance cromosómico y contaban recursos propios o eran menores de 5 años cubiertos por el seguro popular. Se revisaron los expedientes de los pacientes seleccionados, cruzando la información con la base de datos donde se extrajeron de aquellos pacientes con epilepsia (ILAE 2017), información como tipo de convulsiones, dismorfias, y características clínicas.

Esta base de datos cuenta con estudios genéticos de microarreglos que se obtuvieron a partir de 500 nanogramos de DNA genómico del paciente, marcado con fluorescencia y se compararon con respecto a un DNA control. Los DNAs se hibridaron con un microarreglo genómico humano de 60.000 sondas de alta resolución (Agilent, 60K) mediante hibridación genómica comparativa (aCGH).

La variación en número de copias se consideró potencialmente relevantes clínicamente si se superponían con regiones genéticas asociadas a epilepsia. Estas regiones se identificarán realizando búsquedas en la literatura utilizando Genbrowser, Clin Var y Decipher. En estas bases se detectaron genes cuya función y expresión en el SNC se podían ver implicados como posibles candidatos en epilepsia y que se encontraban en las variaciones de pacientes que se superponían con las registradas en el Decipher de pacientes con epilepsia.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizaron medidas de tendencia central y proporciones simples en la descripción de las características de los participantes. Se utilizó SPSS Statistics Version 22.0 (IBM Corporación, NY, EE. UU.) para realizar análisis descriptivos y comparativos. Se informó el rendimiento en base a la proporción de pacientes con VNC clasificada como patógenas (criterios de ACMG) sobre el total de pruebas realizadas.

ÉTICA.

- El presente trabajo se considera una investigación sin riesgo pues sólo se evaluaron expedientes clínicos.
- Se sometió al comité de ética e investigación del Hospital central “Dr. Ignacio Morones Prieto” para su evaluación y se autorizó con **el número de registro 12-21.**
- Registro en COFEPRIS 17CI 24028093, registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427.
- Se protegerán los datos personales obtenidos de los expedientes clínicos, firmándose una carta de confidencialidad comprometiéndonos al adecuado uso de los datos recolectados, además a cada paciente se le ha solicitado su consentimiento para ser incluido sus resultados genéticos al registro de nuestro departamento. **ANEXO 1, 2.**

RESULTADOS.

De los 290 pacientes pediátricos incluidos en la relación de pacientes con microarreglos, se seleccionó un subconjunto de 87 pacientes que cumplieron los criterios básicos de epilepsia más alguna dismorfia menor o mayor **Ilustración 1**. De estos se eliminaron por expediente incompleto o depurado 57 pacientes. De los restantes 16 son hombre y 14 mujeres. La edad media 9 años [DE:3.5]; rango 1 a 17 años. La mayoría de los pacientes presentaron dismorfias menores en 15 pacientes (50%), dismorfias mayores en 6 (20%), macrocefalia 4 (13%), microcefalia 11 (55%), discapacidad intelectual y/o retraso psicomotor 28 (92%), anomalías estructurales cerebrales 8 (26%). El tipo de convulsión prevalente entre la cohorte seleccionada son las focales (66%), seguido de bilaterales (20%) y focal a bilateral (13%) **Tabla 2**. Hubo ocho pacientes sin alteraciones en su estudio por microarreglo. Dos pacientes se clasificaron como VNCs benignos. Se detectaron VNC no clasificadas como benignas en 20 de 30 pacientes (66%). De estos, 5 pacientes fueron clasificados como probablemente benignas, 3 pacientes como probablemente patogénicas, 7 pacientes como patogénicas, 1 paciente tuvo dos VNCs: una benigna y otra patogénica, 2 pacientes tuvieron cada una dos VNCs clasificadas como probablemente patogénicas, en 1 paciente se encontró tres VNCs siendo estas clasificadas como Benigna, probablemente benigna y probablemente patogénica y en 1 paciente más también se encontró tres VNCs que se clasificaron como benigna y dos VNCs como probablemente patogénicas. En total se encontraron entre todos los pacientes 24 VNCs no benignas. Catorce identificadas como duplicación y diez deleciones. Estas VNC variaron de tamaño genómico en un rango que va de 0,025Mb a 50.3 Mb (mediana, 2.3 Mb) **Ilustración 2**. El número de reordenamientos patógenos encontrados fue 8 VNC en el mismo número de pacientes, siendo un 26% el rendimiento diagnóstico de la prueba en el total de la muestra (n=30). Estos asociados a síndromes genéticos conocidos como: síndrome de deleción 1p36, síndrome de duplicación NF-1, síndrome Guilles de la Tourette, síndrome micro duplicación 16p11.2, síndrome Phelan Mcdermid, Síndrome de deficiencia de sulfatasa de esteroide, síndrome de microdeleción Xp22 y síndrome de Rett. **Tabla 3** Se consideró a 10 VNC como posiblemente patogénicas de acuerdo con las pautas del American College of Medical Genetics, no asociado a síndromes genéticos conocidos. En la búsqueda realizada en la base de pacientes del DECIPHER, se encontró que 5 entre ellas las duplicaciones 1p36.3, 13q31, 11q23, 2p12 y la deleción 4q35.1 mostraban solapamiento

considerando localización, tamaño y fenotipo epiléptico con otras variantes patogénicas de esta base de datos.

De estas 5 VNC superpuestas con fenotipos de epilepsia se identificaron genes compartidos, que se expresan y tienen función en el SNC **Tabla 4**. Destacando genes que codifican proteínas de adhesión, comunicación entre neuronas como la FAT1, THY1, KIRREL3; desarrollo neuroblástico DVL1; genes relacionados con apoptosis como el gen ATAD3, además genes que participan en la regulación de neurotransmisores y hormonas como los genes MTNR1A, MCF2L y HSPA8.

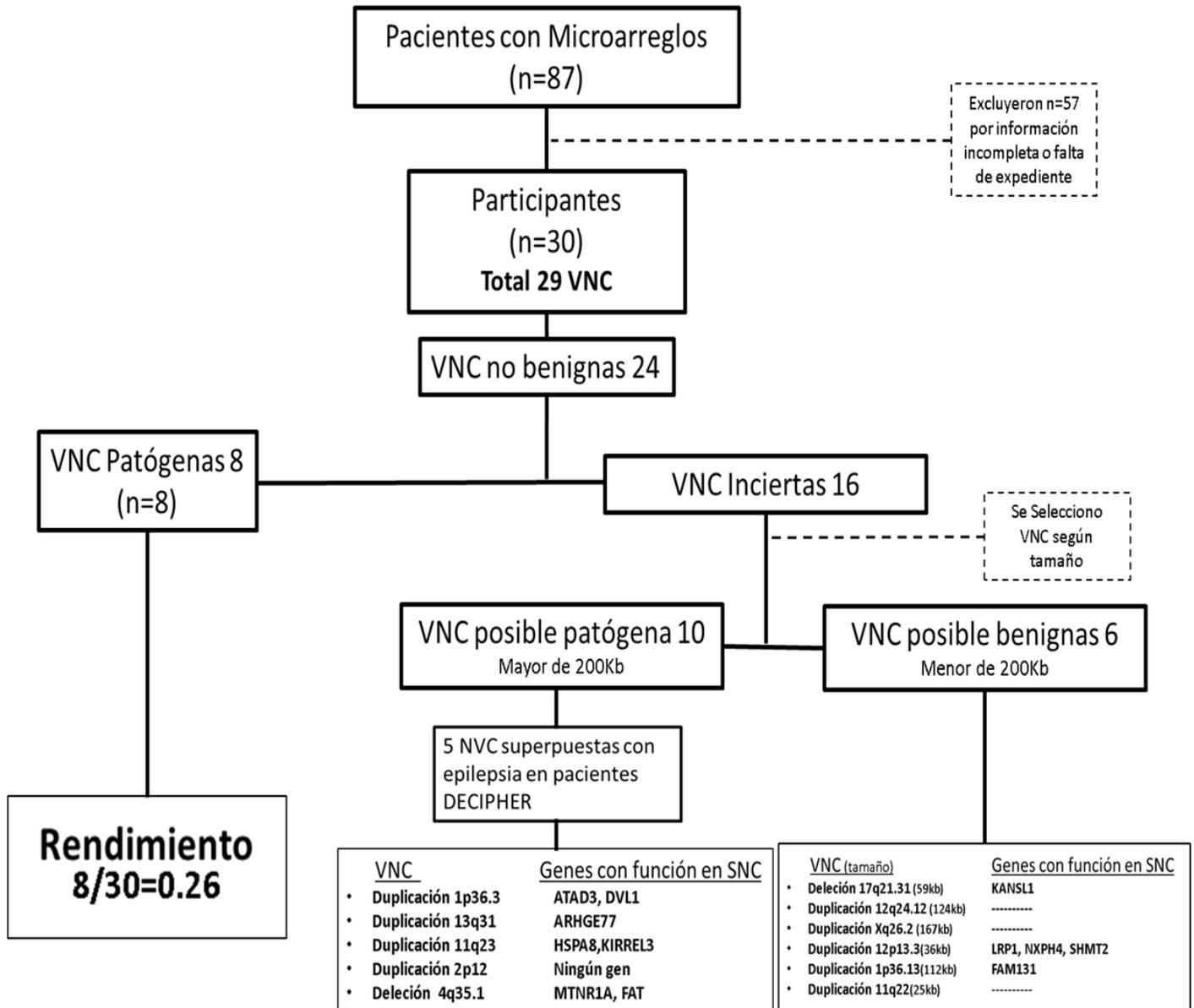


Ilustración 1 Diagrama de flujo del estudio.

Tabla 2 Datos demográficos de 30 pacientes con epilepsia y dismorfias.

Característica	Valor	
Sexo, No		
Masculino	16	
Femenino	14	
Edad años, media, (rango)		
Actual	9	(1-17)
Inicio de epilepsia	1.3	(1mes-7años)
Tipo de epilepsia, No.		
Focal	20	(66%)
Generalizada	6	(22%)
Focal a bilateral	4	(11%)
Discapacidad intelectual o retraso desarrollo, No. (%)		
Ausente	2	(8%)
Presente	28	(92%)
Microcefalia No. (%)	16	(59%)
Macrocefalia No. (%)	4	(11%)
Dismorfias No. (%)		
Menor	14	(47%)
Mayor	7	(23%)
Ambas	9	(30%)

Tamaño de VNCs en la cohorte Proporción total de VNC por rangos de tamaño.

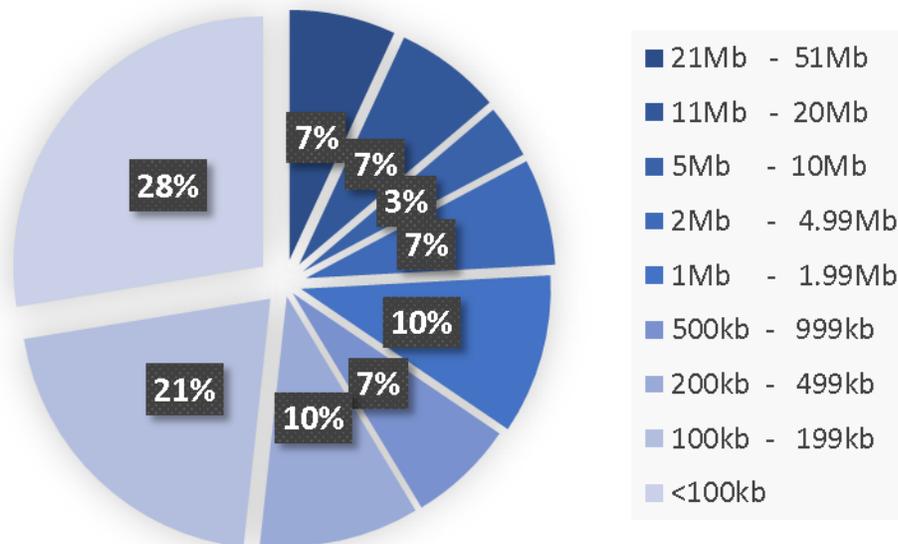


Ilustración 2 Grafico circular de tamaños de VNC de nuestra cohorte.

Tabla 3 Características clínicas de los pacientes con epilepsia y VNC patógenas

Sexo/ edad	Tipo de convulsión	Edad de inicio de convulsiones	Características dismórficas	CNV	Coordenadas genómicas (construcción del genoma)	Síndrome genético asociado	Interpretación
M / 9 años	Focal	3 años	Oreja prominentes Hipertelorismo Hipotonía central Dientes hipoplásicos Retrognatia y escoliosis	Micro duplicación 17q11.2 (1.2Mb)	17: 29,124,299-30,326,958 (NCBI 37 / hg 19)	Síndrome Duplicación Nf-1	PATOGENO
M / 10 años	Focal	7 meses	Asimetría craneal Epicanto inverso Puente nasal plano Pliegues palmares aberrantes Retrognatia Cataratas	Micro duplicación 16p11.2 (31Kb)	16: 31,196,169-31,227,836 (NCBI 37 / hg 19)	Síndrome Micro duplicación 16p11.2	PATOGENO
F / 7 años	Focal	1mes	Alteración de vía visual Hipotelorismo Pliegues palmares aberrantes Nistagmo	Microdelección 7q31.1 (105Kb)	7: 111,044,035-111,149,166 (NCBI 37 / hg 19)	Síndrome Guilles Tourette	PATOGENO
F / 10 años	Focal	2 años	Lisencefalia Macroftalmia Implantación baja de pabellón Asimetría facial Puente nasal plano	Delección 1p36.32-p36.22 (7.8Mb)	1: 2,879,904-10,715,397 (NCBI 37 / hg 19)	Síndrome Delección 1p36	PATOGENO
M / 6 años	Focal	2 años	Labio paladar hendido Macroftalmia	Delección terminal 22q13.31-q13.33 (18.1Mb)	22: 48,232,338-51,178,264 (NCBI 37 / hg 19)	Síndrome Phelan-Mcdermid	PATOGENO
F / 12 años	Focal Bilateral	1 año	Microcefalia	Delección Xp22.33-p11.22 (50.3Mb)	X: 2,709,027-53,088,016 (NCBI 37 / hg 19)	Síndrome Def. Sulfatasa de Esteroides	PATOGENO
F / 4 años	Bilateral	2 meses	Microcefalia	Microdelección Xp22.13 (111Kb)	X: 18,525,214-18,637,171 (NCBI 37 / hg 19)	Síndrome Microdelección Xp22	PATOGENO
M / 9 años	Focal	10 meses	Diastema dental Hipotonía central Implantación baja de pabellón	Microdelección Xq28 (228Kb)	X:153,277,239-153,505,538 (NCBI 37 / hg 19)	Síndrome De Rett	PATOGENO

Tabla 4 VNC probablemente patógenas e información de genes candidatos para la epilepsia.

CNV	Desbalances similares ya descritas y características clínicas asociadas (Decipher)	Genes en la región	Gen (s) de epilepsia conocidos o candidato (OMIM)	HI %	Enfermedad asociada	Estudios de función genética
Duplicación 1p36.33 (257Kb)	Delección (414364, 295212); Genitales hipoplásicos, RCTU, anomalía axonal, Hipoplasia cerebeloso Duplicación (270940); Cardiomegalia, hipospadias, hipertonia, escoliosis, clinodactilia	17 genes: UBE2J2, SCNN1D, ACAP3, PUSL1, CYP4V2, GLTPD1, TAS1R3, DVL1, MXRA8, AURKAIP1, CENL2, MRPL20, ANKRD65, TMEM88B, VWA1	ATAD3C ATAD3B DVL1 (601365)	83% 84.2% 15.7%	H. Ponto cerebelosa S. de Robinow	ATAD3: involucrada en la apoptosis. DVL1: desarrollo neuroblástico.
Delección 4q35.1-q35.2 (4.1Mb)	Duplicación (290382); Hiposmiarritmia Discapacidad intelectual	14 genes: SORBS2, U4, TLK3, FAM149A, FLJ38576, CYP4V2, KLBK1, F11, MTNRL1A, FAT1, ZFP42, TRIML2, FRG1	MTNRL1A (600665) FAT1 (600976)	72.5% 60.1%	TMPE SCA	MTNRL1A: Regula melatonina FAT1: Cadherina 1 adhesión, desarrollo y comunicación celular.
Duplicación 13q31.1-q34 (35.9Mb)	Delección (289887, 287910, 357788): convulsiones, DI. Duplicación (294105): Microcefalia, retraso psimotor, convulsiones.	83 genes: 7SK hasta ZIC2	HS6ST3 ARHGEF7 (605477) MCF2L	4.2% 25.19% 68.8%	Fibroadenoma mama DI Hipoparatiroidismo	HS6ST3: Enzima de sulfato heparan ARHGEF7: migración celular MCF2L: proteína señalización
Duplicación 11q23.3-q25 (18Mb)	Duplicación (409682, 387214): retraso crecimiento, convulsiones, microcefalia. Delección (284233): DI	123 genes: SIK3 hasta ZNF202	MFRP (606227) THY1 BSX CRTAM HSPA8 KIRREL3	61.7% 35.9% 26.4% 80.9% 7.2% 5.18%	Macroftalmia GPMS Síndrome de Jacobsen Trastorno del sueño DI	MFRP: proteína señalización. THY1: Adhesión y comunicación celular BSX: factor de transcripción CRTAM: molecular célula T citotóxica HSPA8: el ciclo de liberación de neurotransmisores KIRREL3: molécula adhesión
Duplicación 2p12 (931Kb)	Duplicación (268255): EEG anormal, DI	5 genes: REG3G, REG1B, REG1A, D56495, REG1P	REG1A REG1B REG3G REG1P	92% 90% 94% 90%	pancreatitis	REG: Unión a carbohidratos

Decipher: Número de registro en la plataforma Decipher y que se superpone a las VNCs de nuestra cohorte.

HI: haploinsuficiencia; **DI:** discapacidad intelectual; **H:** hipoplasia; **TMPE:** Trastorno de movimientos periódicos de las extremidades; **GPMS:** Glomerulopatía Mesangial

DISCUSIÓN.

Este estudio es la primera evaluación con CMA de una cohorte de pacientes pediátricos con epilepsia y dismorfias en nuestra unidad médica. El análisis reveló que una alta proporción de los pacientes presentaba VNC clínicamente relevantes. Este trabajo muestra que los pacientes con epilepsia, dismorfias y/o DI también tienen rendimientos altos en la detección de VNC patógenas. El 26% (n=8) de los pacientes de este estudio tenía VNC patógenas relacionada con algún síndrome genético conocido, y el 34%, presentaba características de probablemente patógena. Un estudio realizado en 805 pacientes pediátricos con epilepsia informó una frecuencia de 5% de VNC patógenas como explicación del fenotipo en su cohorte (34), además en un estudio con 143 pacientes con inicio de epilepsia en edad pediátrica y adultos, reportaron un 16.1% de VNC patógenos teniendo como criterios de inclusión a pacientes con discapacidad intelectual y trastornos convulsivos farmacorresistentes(35). En otro estudio que incluyeron 92 pacientes entre 1 a 22 años con epilepsia generalizada, discapacidad intelectual, signos autistas y anomalías congénitas observaron un rendimiento de 15.2%(36). Nuestros resultados reflejan mayor rendimiento; esto se pueden explicar al incluir pacientes con trastornos del neurodesarrollo además del criterio de epilepsia y dismorfias. Los pacientes con algún tipo de trastornos del desarrollo represento el 92%.

En general existen diferencias entre los rendimientos informados en los diferentes estudios, posiblemente debido a los criterios de selección, clasificación de las VNC, a la exclusión preliminar de resultados por mutaciones puntuales o grandes desequilibrios, nuestro trabajo, aunque intento eliminar estos sesgos no está exenta sobre todo debido al número reducido de participantes, pudiendo mejorar la precisión con una cohorte mayor.

Informamos en este trabajo solo variantes patógenas y posiblemente patógenas de acuerdo a las recomendaciones para la clasificación de VNC propuestas por ACMG(37). Se reconocieron VCN claramente patógenas (8/29 VNC) asociadas a síndromes genéticos reconocidas clásicamente en la literatura médica.

Para el análisis de posibles genes candidatos de epilepsia, se excluyeron VNCs patógenas ya reconocidas asociadas con fenotipo epiléptico; se incluyeron las VNC

mayores de 200kb, y cuyos genes tenían expresión y función en el sistema nervioso central, se revisó estos genes en descripciones de OMIM y Genoma Browser, se registró el porcentaje de haploinsuficiencia de cada gen de interés. Estas variaciones se contrastaron en el DECIPHER en busca VNCs superpuestas en pacientes epilépticos y se revisaron los genes con funcionalidad en el sistema nervioso que ambos compartían en la superposición. En un paciente con duplicación en 1p36.3, se identificó el gen **ATAD3** que forma un clúster ATAD3C, ATAD3B y ATAD3A y previamente se ha observado en pacientes con hipoplasia pontocerebelosa y en pacientes con encefalopatía de inicio tardío y atrofia cerebelosa atáxica y distónica. Los fibroblastos de los individuos afectados presentan anomalías en el ADN mitocondrial y alteración en el metabolismo de colesterol. (38) estas anomalías se han descrito en deleciones, pero no se conocen las consecuencias de la duplicación en este gen. La deleción 4q35.1 involucra el gen **MTNR1A** (OMIM 600665) que codifica el receptor de melatonina acoplado a proteína G e interviene en funciones neuro hormonales del ritmo circadiano. No está establecido mecanismos que lo relacionen con epilepsia, pero si se ha detallado la amplia expresión en el núcleo supraquiasmático, la corteza, el hipocampo, el núcleo del rafe dorsal y el hipotálamo lateral, también se ha descrito como regulador en el estado de ánimo, dolor y el sueño (39), se ha observado relación con disfunción conductual por su asociación con vías serotoninérgicas y noradrenérgicas relacionándolo con déficit de atención e hiperactividad y trastorno del espectro autista. (40) Esta misma deleción 4q35.1 involucra el gen FAT1, que codifica una molécula de adhesión, proteína relacionada con el desarrollo neuronal que incluyen la interconexión glial, la migración celular y el mantenimiento de la polaridad apical-basal, asociado con el fenotipo de distrofia facio escapulohumeral, trastorno afectivo bipolar, macroftalmia, nefropatía y sindactilia, nuestro paciente presentaba polidactilia y microftalmia(41) también se ha relacionado con ataxia espinocerebelosa autosómica dominante (42), no se reconoce en la literatura fenotipo epileptico en la mutación de este gen, sin embargo se debe considera su potencial relación, puesto que se ha descrito su amplia expresión en el sistema nervioso central y se ha implicado en la diferenciación neuronal (43) es además

necesario para una neurogénesis eficiente actuando como regulador de la formación de neuritas durante las primeras etapas de la diferenciación neuronal. En la duplicación 13q31 del mismo paciente, se consideró al gen **ARHGEF7** que codifica la proteína la β PIX que interviene en la estabilización eficaz de la transmisión sináptica en los receptores GABA, permitiendo el equilibrio excitador – inhibitor, mediante una vía conocida como GIT1 / β PIX / Rac1 / PAK que modula la actina F y es importante para mantener los niveles de receptor GABA de superficie y la integridad de la sinapsis inhibitora (44) también regula la espinosa génesis dendrítica (45) hasta el momento se ha relacionado con discapacidad intelectual, pero no con epilepsia, aunque no es difícil considerarlo como un importante candidato para fenotipos epilépticos. Observamos en un paciente la duplicación 11q23, cuyo fenotipo se caracterizaba por hipotonía central, implantación baja de pabellón auricular, nariz ancha, hipoacusia, atresia anal, escoliosis y paladar hendido. Se ha informado la delección en esta región que se relaciona con el síndrome de Jacobse, un trastorno raro caracterizado por dimorfismo craneofacial, cardiopatía congénita, discapacidad intelectual, crisis convulsivas, trastorno hemorrágico, defecto estructural renal e inmunodeficiencia. A esta VNC pertenece el gen BSX que regula la función del neuropéptido neuronal Y y a la proteína de choque térmico 70 del gen HSP70 que tiene su principal rol en la lesión cerebral, sobre expresándose durante las crisis epilépticas, es considerada una proteína neuroprotectora del tejido nervioso lesionado, como ha evidenciado modelos animales en neuronas piramidales del hipocampo inducidas a convulsiones. A pesar de esto aun es controvertido su papel definitivo como neuro protector. (46) El gen KIRREL3 en esta misma variación, traduce moléculas sinápticas de la superfamilia de las inmunoglobulinas juegan un papel crítico en el desarrollo del cerebro, así como en el mantenimiento de la plasticidad sináptica, cuya disfunción causa deterioro cognitivo, hasta el momento este gen no se ha relacionado con fenotipos epilépticos, pero si se considera como gen candidato para discapacidad intelectual y trastornos del espectro autista.

LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.

El rendimiento de los microarreglos en la cohorte aquí presentada puede estar sobrestimado, en función de ser un estudio trasversal con un número de participantes reducido.

Otra limitante es la falta de estudios a los padres dado que un criterio relevante para determinar patogenicidad es si la VNC fue heredada o de novo, lo anterior debido al costo que representa para los familiares realizar estudios a otros miembros de la familia.

También hay que considerar que la descripción individual de las características clínicas en la literatura y en las bases de datos de grandes poblaciones no son detalladas y esto limita la evaluación de algunas VNC s.

Aunque se intentó buscar genes candidatos de epilepsia considerando su expresión y función en el SNC de pacientes epilépticos con reordenamientos aberrantes contrastadas en bases de datos de variaciones estructurales, estos resultados se deben tomar con reserva. Establecer una función patogénica de un gen basándose únicamente en la función predicha, se debe considerar como una inferencia especulativa hasta mejor caracterización de los genes en la población humana.

Por último, este trabajo pretende resaltar la importancia del estudio genético en pacientes con epilepsia en los que sospeche desbalance genético, en base a la presencia de dismorfias menores o mayores, esto ayudara al clínico en neurología a dirigir el tratamiento tanto medico como asistencial. También provee información al neurólogo y a la paciente de complicaciones futuras en el paciente y al ser un conocimiento en vertiginosa evolución pueda en un futuro mejorar el arsenal terapéutico dirigido a función en genes específicos. Este trabajo sienta bases en nuestro medio hospitalario para nuevas investigaciones en relación con asociaciones específicas de dismorfias y presencia de desbalances.

CONCLUSIONES.

- La frecuencia de CNV patógenas (rendimiento) es de 26% en una población pediátrica con epilepsia síndrómica en el Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.
- Se proponen los genes ATAD3, ARHGEF7 y MTNR1A como posibles nuevos candidatos de epilepsia.
- Las variaciones con posible implicación epiléptica son: duplicación 1p36, deleción 4q35.1, duplicación 13q31, duplicación 11q23.
- El tipo de epilepsia más frecuente fue focal en un 66%.
- Los datos son limitados para considerar como VNC patógenas a las variantes relacionadas con los genes candidatos aquí propuestos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. abril de 2010;51(4):676-85.
2. Korff C, Nordli DR. Do generalized tonic-clonic seizures in infancy exist? *Neurology*. 13 de diciembre de 2005;65(11):1750-3.
3. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. abril de 2014;55(4):475-82.
4. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. abril de 2017;58(4):522-30.
5. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia*. agosto de 1991;32(4):429-45.
6. Oka E, Ohtsuka Y, Yoshinaga H, Murakami N, Kobayashi K, Ogino T. Prevalence of childhood epilepsy and distribution of epileptic syndromes: a population-based survey in Okayama, Japan. *Epilepsia*. marzo de 2006;47(3):626-30.
7. Russ SA, Larson K, Halfon N. A national profile of childhood epilepsy and seizure disorder. *Pediatrics*. febrero de 2012;129(2):256-64.
8. Aaberg KM, Gunnes N, Bakken IJ, Lund Søråas C, Berntsen A, Magnus P, et al. Incidence and Prevalence of Childhood Epilepsy: A Nationwide Cohort Study. *Pediatrics*. mayo de 2017;139(5).
9. Murphy CC, Trevathan E, Yeargin-Allsopp M. Prevalence of Epilepsy and Epileptic Seizures in 10-Year-Old Children: Results from the Metropolitan Atlanta Developmental Disabilities Study. *Epilepsia*. 1995;36(9):866-72.
10. Rwiza HT, Kilonzo GP, Haule J, Matuja WB, Mteza I, Mbena P, et al. Prevalence and incidence of epilepsy in Ulanga, a rural Tanzanian district: a community-based study. *Epilepsia*. diciembre de 1992;33(6):1051-6.
11. Cui W, Kobau R, Zack MM, Helmers S, Yeargin-Allsopp M. Seizures in Children and Adolescents Aged 6-17 Years - United States, 2010-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 6 de noviembre de 2015;64(43):1209-14.



12. Weber YG, Biskup S, Helbig KL, Von Spiczak S, Lerche H. The role of genetic testing in epilepsy diagnosis and management. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(8):739-50.
13. Wou K, Levy B, Wapner RJ. Chromosomal Microarrays for the Prenatal Detection of Microdeletions and Microduplications. *Clin Lab Med.* junio de 2016;36(2):261-76.
14. Butler KM, da Silva C, Alexander JJ, Hegde M, Escayg A. Diagnostic yield from 339 epilepsy patients screened on a clinical gene panel. *Pediatr Neurol.* diciembre de 2017;77:61-6.
15. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 30 de octubre de 1992;258(5083):818-21.
16. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* febrero de 2006;7(2):85-97.
17. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 1 de abril de 2010;464(7289):704-12.
18. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 23 de noviembre de 2006;444(7118):444-54.
19. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, et al. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet.* julio de 2005;37(7):727-32.
20. Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet.* julio de 2007;39(7 Suppl):S22-29.
21. Sharp AJ. Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. *Human Mutation.* 2009;30(2):135-44.
22. Girirajan S, Eichler EE. Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. *Hum Mol Genet.* 15 de octubre de 2010;19(R2):R176-187.
23. Fanciulli M, Petretto E, Aitman TJ. Gene copy number variation and common human disease. *Clin Genet.* marzo de 2010;77(3):201-13.
24. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet.* julio de 2005;77(1):78-88.

25. Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, et al. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet.* enero de 2007;80(1):91-104.
26. Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S, et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* abril de 2010;464(7289):713-20.
27. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 28 de octubre de 2010;467(7319):1061-73.
28. Zhang J, Feuk L, Duggan GE, Khaja R, Scherer SW. Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):205-14.
29. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* enero de 2014;42(Database issue):D980-985.
30. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 10 de abril de 2009;84(4):524-33.
31. Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L, Vu TH, et al. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS Genet.* noviembre de 2011;7(11):e1002334.
32. Vlaskamp DRM, Callenbach PMC, Rump P, Giannini LAA, Dijkhuizen T, Brouwer OF, et al. Copy number variation in a hospital-based cohort of children with epilepsy. *Epilepsia Open.* 2017;2(2):244-54.
33. Segal E, Pedro H, Valdez-Gonzalez K, Parisotto S, Gliksman F, Thompson S, et al. Diagnostic Yield of Epilepsy Panels in Children With Medication-Refractory Epilepsy. *Pediatric Neurology.* 1 de noviembre de 2016;64:66-71.
34. Olson H, Shen Y, Avallone J, Sheidley BR, Pinsky R, Bergin AM, et al. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Ann Neurol.* junio de 2014;75(6):943-58.
35. Borlot F, Regan BM, Bassett AS, Stavropoulos DJ, Andrade DM. Prevalence of Pathogenic Copy Number Variation in Adults With Pediatric-Onset Epilepsy and Intellectual Disability. *JAMA Neurol.* noviembre de 2017;74(11):1301-11.

36. Peycheva V, Kamenarova K, Ivanova N, Stamatov D, Avdjieva-Tzavella D, Alexandrova I, et al. Chromosomal microarray analysis of Bulgarian patients with epilepsy and intellectual disability. *Gene*. 15 de agosto de 2018;667:45-55.
37. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genetics in Medicine*. julio de 2011;13(7):680-5.
38. Malty RH, Aoki H, Kumar A, Phanse S, Amin S, Zhang Q, et al. A Map of Human Mitochondrial Protein Interactions Linked to Neurodegeneration Reveals New Mechanisms of Redox Homeostasis and NF- κ B Signaling. *Cell Syst*. 27 de diciembre de 2017;5(6):564-577.e12.
39. Comai S, Lopez-Canul M, De Gregorio D, Posner A, Ettaoussi M, Guarnieri FC, et al. Melatonin MT1 receptor as a novel target in neuropsychopharmacology: MT1 ligands, pathophysiological and therapeutic implications, and perspectives. *Pharmacol Res*. junio de 2019;144:343-56.
40. Jonsson L, Ljunggren E, Bremer A, Pedersen C, Landén M, Thuresson K, et al. Mutation screening of melatonin-related genes in patients with autism spectrum disorders. *BMC Med Genomics*. 8 de abril de 2010;3:10.
41. Lahrouchi N, George A, Ratbi I, Schneider R, Elalaoui SC, Moosa S, et al. Homozygous frameshift mutations in FAT1 cause a syndrome characterized by colobomatous-microphthalmia, ptosis, nephropathy and syndactyly. *Nat Commun*. 12 de marzo de 2019;10(1):1180.
42. Nibbeling EAR, Duarri A, Verschuuren-Bemelmans CC, Fokkens MR, Karjalainen JM, Smeets CJLM, et al. Exome sequencing and network analysis identifies shared mechanisms underlying spinocerebellar ataxia. *Brain*. 1 de noviembre de 2017;140(11):2860-78.
43. Ahmed AF, de Bock CE, Sontag E, Hondermarck H, Lincz LF, Thorne RF. FAT1 cadherin controls neuritogenesis during Ntera2 cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 de junio de 2019;514(3):625-31.
44. Smith KR, Davenport EC, Wei J, Li X, Pathania M, Vaccaro V, et al. GIT1 and β PIX are essential for GABA(A) receptor synaptic stability and inhibitory neurotransmission. *Cell Rep*. 9 de octubre de 2014;9(1):298-310.
45. Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, et al. Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/ β PIX signaling complex. *Neuron*. 10 de enero de 2008;57(1):94-107.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Neurología Pediátrica.

46. Yang T, Hsu C, Liao W, Chuang JS. Heat shock protein 70 expression in epilepsy suggests stress rather than protection. *Acta Neuropathol.* febrero de 2008;115(2):219-30.