

## Tesis de Maestría

# Investigación de la Asociación entre el polimorfismo G1465A del gen del receptor para GABA B y el desarrollo de esclerosis del hipocampo

Kauffman, Marcelo Andrés

2006

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Kauffman, Marcelo Andrés. (2006). Investigación de la Asociación entre el polimorfismo G1465A del gen del receptor para GABA B y el desarrollo de esclerosis del hipocampo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4528\\_Kauffman](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4528_Kauffman)

**Cita tipo Chicago:**

Kauffman, Marcelo Andrés. "Investigación de la Asociación entre el polimorfismo G1465A del gen del receptor para GABA B y el desarrollo de esclerosis del hipocampo". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4528\\_Kauffman](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4528_Kauffman)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

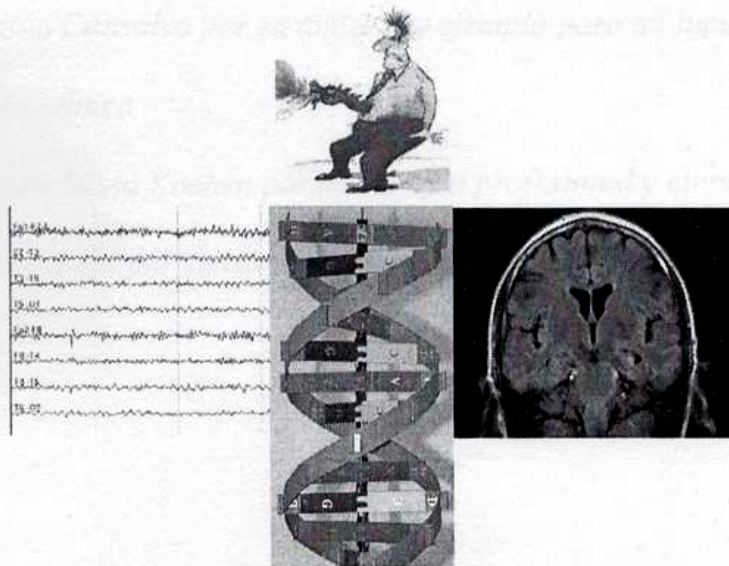
Universidad de Buenos Aires

BIBLIOTECA CENTRAL  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
Y NATURALES / UBA

**Universidad de Buenos Aires**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Maestría en Biología Molecular Médica**  
**Tesina de Maestría**

*“Investigación de la Asociación entre el Polimorfismo  
G1465A del gen del Receptor para GABA B y el  
desarrollo de Esclerosis del Hipocampo”*



**Maestrando: Médico Marcelo Andrés Kauffman**  
**Directora de Tesina: Prof. Dra. Silvia Kochen**

79227

*Al Profesor José Mordoh por haber permitido, generosamente, la realización del trabajo experimental en las instalaciones del Centro de Investigaciones Oncológicas*

*A la Lic. Estrella Levy por su paciencia y experiencia, invaluable e indispensables para que este trabajo pudiera llevarse a cabo*

*Al Dr. Damián Consalvo por su amistad y ejemplo para mi incursión en la investigación clínica*

*A la Profesora Silvia Kochen por su ejemplo profesional y científico*

*A Florencia y Sofía por su amor y comprensión*

*Buenos Aires, Noviembre del 2006*

# Índice

<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>Pacientes y Métodos</b>	<b>19</b>
<b>Resultados</b>	<b>28</b>
<b>Discusión</b>	<b>36</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>44</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>46</b>

# Introducción

La *Epilepsia* es una enfermedad del cerebro caracterizada por una predisposición crónica para la generación de crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales que le subyacen. Su definición requiere la ocurrencia de al menos una crisis epiléptica. Una crisis epiléptica se define como todo evento clínico transitorio que refleja la presencia de descargas hipersincrónicas de neuronas ubicadas en la corteza cerebral.[1] La Organización mundial de la salud (OMS) clasifica a la epilepsia dentro de las enfermedades mentales y la define como: “*una enfermedad crónica producida por diferentes etiologías y caracterizada por ataques recidivantes.*”[2] De esta definición se desprende que la Epilepsia no es una entidad única, sino que, numerosas etiologías y factores pueden estar involucrados en su causa y desarrollo.

Las epilepsias se conocen desde épocas remotas. La historia de la epilepsia refleja en gran medida la evolución de la medicina y la noción que los pueblos tenían acerca de la “enfermedad”. Las epilepsias, además, no han estado ajenas a concepciones políticas y filosóficas de cada época. Las primeras visiones atribuían el origen de la enfermedad a los demonios así como al castigo divino. Las grandes civilizaciones antiguas, intentaron dar una explicación científica a este padecimiento, conocimiento que se perdió durante el período de oscurantismo en la Edad Media; con el conocimiento de la anatomía y la fisiología en épocas más recientes, la epilepsia alcanzó un verdadero carácter científico consolidado con la aparición de la biología molecular.[3]

Aproximadamente unos 3000 años atrás, en la Mesopotamia, actualmente Irán, fue descrita una crisis epiléptica con generalización secundaria en Akkadiano, el más viejo lenguaje escrito. La causa de la crisis fue atribuida al Dios de la Luna. Otros casos de Epilepsia fueron descritos en Egipto, China, India y Babilonia, siempre haciendo referencia a causantes sobrenaturales de la enfermedad, situación mágica que perdura en cierta manera hasta nuestros días. Heródoto, quien es considerado el padre de la historia, hizo referencias en uno de sus escritos a que los actos de locura o conductas erráticas de Cambyses II, rey de Persia, se debían a una enfermedad de tipo somática. Dado que en realidad nunca pudo demostrarse que Cambyses tuviera epilepsia, los escritos de Heródoto fueron tomados como transicionales entre el pensamiento mágico y el somático. Unos años más tarde, en el año 400 antes de Cristo, Hipócrates escribió su famoso libro *“La enfermedad sagrada - On the Sacred Disease”* que podría considerarse como el primer tratado sobre la epilepsia. En él, Hipócrates descreía que la enfermedad fuera causada por los dioses. En cambio, postuló que las crisis se debían a la *“superficialidad de la flema que provocaba una anormal consistencia del cerebro”*, proponiendo dieta y drogas para su tratamiento. *“Le traité de l’ epilepsia”* de Tissot (1770), se constituyó en la primera aproximación moderna a la enfermedad. Allí se especificaba que para producir las crisis son necesarias dos situaciones: la primera, una disposición del cerebro a entrar en “contracción” más fácilmente que cuando está sano y la segunda un factor “irritante” que ponga en evidencia esta disposición. Esquirol en 1815 describió dos tipos de ataques, los severos y los ligeros. Estos fueron los primeros

conceptos para definir lo que más tarde serían el *Grand Mal* y el *Petit Mal*, respectivamente.[4-7]

Richard Catón fue el primero en demostrar que la estimulación cerebral de una rana provocaba una respuesta motora, y que la situación inversa también era posible. Además, fue el primero en observar una actividad eléctrica continua proveniente del cerebro.[8] La mayor parte de la investigación científica en Epilepsia en el período comprendido entre 1850 y 1900 fue realizada por los neurólogos Jackson y Gowers. John Hughling Jackson en 1861, fue el primero en correlacionar una localización cerebral con una determinada respuesta motora, sentando de esta manera las bases de la cirugía en la epilepsia. Él dio una explicación neurofisiológica a las descargas epilépticas, describiéndolas como “*descargas repentinas, temporarias y excesivas de células inestables de una parte de la sustancia gris del cerebro*”. Sus trabajos permitieron separar a la epilepsia de la psiquiatría y que pasara a ser considerada dentro de la neurología.[9] Macewen en 1875, localizó y resecó un meningioma frontal basándose solamente en la manifestación clínica de una crisis motora. Cerrando esta etapa, Víctor Horsley reportó el éxito de la cirugía cerebral en 3 pacientes de Jackson.[10]

El neuropsiquiatra y patólogo Wilhelm Sommer describió por primera vez lesiones en el asta de Amón como sustrato patológico de la epilepsia de 36 pacientes intervenidos quirúrgicamente. Sus hallazgos anticiparon en más de 100 años al actual diagnóstico por imágenes por resonancia magnética (IRM) de la Epilepsia del Lóbulo Temporal con



Esclerosis del Hipocampo.[11] Debe mencionarse que en 1825, Bouchet y Cazavielh también habían realizado una aproximación a la descripción de esta entidad.[12]

En 1929 Hans Berger, un profesor de psiquiatría de la alemana Universidad de Jena, publicó su trabajo acerca de la detección de la actividad eléctrica cerebral a través de un registro electroencefalográfico de superficie en humanos. En 1931 reportó que las alteraciones en el trazado eran más comunes en pacientes con epilepsia, obteniendo años más tarde el primer registro de una punta onda.[13] Posteriormente el grupo de trabajo de William Lennox demostró la presencia de actividad interictal e ictal durante una crisis de ausencia típica.[14] Años más tarde aparecieron las descripciones de Jasper sobre la presencia de las ondas agudas en la epilepsia focal. Wilder Penfield y Herbert Jasper en el Instituto Neurológico de Montreal durante los años 50 dieron el impulso definitivo al tratamiento quirúrgico de la epilepsia definiendo el llamado “foco epileptógeno” o zona de inicio de las crisis, basándose en la electrofisiología. Esta obra fue continuada en Francia por Bancaud y Talairach quienes, a través del uso de electrodos intracerebrales de profundidad, realizaron el mapeo de la propagación de las crisis de epilepsia en el cerebro humano.[15]

La liga internacional contra la epilepsia (ILAE) en las dos últimas décadas ha realizado importantes contribuciones para lograr establecer clasificaciones de las crisis epilépticas y los síndromes epilépticos.[16, 17] Esto, nos ha permitido la utilización de un lenguaje universal que ha facilitado la comunicación entre los clínicos y la posibilidad de realizar estudios de investigación clínica y básica en poblaciones más o menos comparables de

pacientes. Debe destacarse que a pesar de estos avances, las clasificaciones vigentes distan de ser perfectas y se encuentran en permanente revisión. Los avances en la biología molecular y la genética son un importante motor para la revisión y el reconocimiento de nuevos síndromes. Por ejemplo, en la actualización del 2001 son descritos los síndromes de epilepsias familiares que incluyen a la epilepsia del lóbulo temporal familiar.[18]

Desde las descripciones de Bouchet, Cazavielh y sobre todo de Sommers mucho es lo que se ha investigado y estudiado sobre el hipocampo y su relación con la forma de epilepsia más prevalente en la población adulta, la epilepsia del lóbulo temporal. Indefiniciones, enigmas y variadas especulaciones han rodeado a esta pequeña estructura de la región medial del lóbulo temporal. La organización bidimensional, relativamente simple, del hipocampo ha permitido que se desarrollaran detallados estudios anatomoclínicos, inmunohistoquímicos, microfisiológicos y de neuroimágenes alcanzándose un nivel de comprensión inédito en otras estructuras cerebrales. A pesar de esta fascinante lucha por el conocimiento de más de un siglo de duración, la principal pregunta acerca de la etiología de este síndrome sigue sin poder responderse. Varios han sido implicados como *culpables*: el *sospechoso* número uno es el antecedente de convulsiones febriles en la infancia. Se ha especulado que la presencia de convulsiones febriles prolongadas en una etapa del desarrollo cerebral postnatal determinada puede dañar al hipocampo y producir epilepsia varios años después. Estudios retrospectivos apoyan esta hipótesis con hallazgos contrapuestos en los diseños prospectivos. El *sospechoso* número dos es la presencia de una malformación del desarrollo subyacente

como causa de la alteración del hipocampo y el desarrollo de la epilepsia. Cambios displásicos sutiles, no totalmente específicos, en la anatomía patológica de hipocampos resecados en el tratamiento quirúrgico de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal refractaria al tratamiento médico han sido observados apoyando esta hipótesis. En cambio, la demostración por parte de algunos autores que la atrofia del hipocampo puede ser progresiva se opone a ésta hipótesis etiológica. El *sospechoso* número tres es el factor genético, sobre el que me voy a extender más adelante en la introducción y en el resto de esta tesina. [19]

Recién en Junio del 2004 es publicado un consenso de expertos que por primera vez le da entidad sindromática al conjunto de características clínicas, electrofisiológicas, anatomopatológicas e imagenológicas que definen a la Epilepsia del Lóbulo Temporal Mesial con Esclerosis del Hipocampo (ETMEH) [20]. Siendo típica la presencia de un aura característico (malestar epigástrico ascendente, miedo, sensación cefálica, experienciales y neurovegetativos) seguido por un arresto del comportamiento que es continuado por la aparición de automatismos motores simples.[21] Estos fenómenos consisten en conductas motoras involuntarias coordinadas y adaptadas que ocurren durante una crisis y se acompañan de una desestructuración de la conciencia. A esta constelación clínica la acompañan hallazgos frecuentes en el EEG (enlentecimiento temporal, espigas localizadas sobre los electrodos frontotemporales y esfenoideas) [22] y específicamente la presencia de atrofia del hipocampo uni o bilateral como hallazgo en las IRM. [23] El diagnóstico de atrofia del hipocampo o esclerosis del hipocampo,

mediante IRM, se hace en base a la presencia de cambios en la señal, disminución de tamaño y desorganización interna estructural de esta estructura temporal mesial. [24]

Desde los comienzos se pensó que podían estar involucrados factores genéticos en la Epilepsia. Por ejemplo, en el 400 AC Hipócrates sospechaba que las epilepsias podían ser heredadas y Tissot en el 1700 consideraba que factores genéticos podían brindar susceptibilidad para el desarrollo de crisis epilépticas.[25] Éste conocimiento inicial fue tomado por varias sociedades para estigmatizar a los pacientes epilépticos, prohibiéndoles en algunos casos el matrimonio para evitar su descendencia. En los años 50 y 60 del siglo pasado varios estudios epidemiológicos mostraron las primeras evidencias científicas de una predisposición genética en varias formas de epilepsia. En estos trabajos se observó que el riesgo de desarrollar epilepsia era de 1,5 a 5 veces mayor en individuos con un antecedente familiar del trastorno que en la población general. Se observó también, que el riesgo para familiares de pacientes con epilepsia generalizada idiopática era aproximadamente dos veces mayor que el riesgo para individuos con historia de epilepsia parcial. Estudiando más de cerca el tipo de factor genético implicado en la susceptibilidad para la epilepsia, Lennox en 1951 e Inouye en 1960 compararon la concordancia clínica entre gemelos monocigóticos y dicigóticos sugiriendo que existía un factor genético importante. [26-28] Además, demostraron que el modelo de herencia no es monogénico. En este sentido, Andermann propuso el modelo multifactorial para las epilepsias, en el cual factores genéticos y ambientales interactúan para determinar los riesgos de recurrencia familiar, en los años 70. [29] Las enfermedades complejas o multifactoriales son definidas como condiciones en las

cuales la correspondencia entre el genotipo y el fenotipo no es completa. Varios factores son responsables de la “complejidad”, entre ellas la penetrancia incompleta, la presencia de fenocopias, la heterogeneidad genética, la herencia poligénica o multifactorial y la alta prevalencia en la población general.[30]

El estudio de la genética en la epilepsia durante gran parte de los años 90 del siglo XX y comienzos del siglo XXI estuvo dominado por la investigación y reconocimiento de formas familiares poco frecuentes. Estos síndromes particulares presentan agregación familiar con un patrón de herencia monogénico. Utilizando estrategias clásicas de análisis de ligamiento y clonado posicional fue posible identificar los defectos genéticos responsables de estas formas familiares de epilepsia. Es así como se reconocen los síndromes monogénicos de la epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante, [31-33] la epilepsia parcial con focos variables [34, 35], las convulsiones familiares benignas neonatales [36-39], la epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus [40-42] y la epilepsia del lóbulo temporal familiar con síntomas auditivos [43, 44]. Se han encontrado como defectos moleculares responsables de estas formas a mutaciones en el receptor nicotínico neuronal para acetilcolina, en canales de potasio, en canales de sodio, en el receptor para GABA tipo A y en LGI 1 o epitempina.

La investigación de las formas familiares de la epilepsia del lóbulo temporal comienza en 1994 con la descripción realizada por Berkovic [45]. Caracteriza una forma de epilepsia del lóbulo temporal con comienzo en la adolescencia o adultez temprana, con un pronóstico benigno, con crisis que frecuentemente presentan *deja-vu* como aura y

con neuroimágenes normales. Al año siguiente Ottman y colaboradores describen un extenso pedigré afectado de la peculiar forma de epilepsia del lóbulo temporal familiar que tiene crisis con origen en la corteza lateral y síntomas auditivos al inicio de las mismas. [46] Como ya fue mencionado, el defecto genético en LGI 1 es identificado [44] en el año 2002. En 1998, Cendes y colaboradores plantearon que el síndrome de la epilepsia del lóbulo temporal familiar es heterogéneo [47]. Once familias con 36 individuos afectados con crisis del lóbulo temporal con semiología compatible con inicio en la región mesial fueron descritas. El pronóstico en estos pacientes era variable: fueron observadas desde formas benignas con buen control con el tratamiento farmacológico hasta formas refractarias que requerían tratamiento quirúrgico. Las IRM mostraron hallazgos compatibles con Esclerosis del Hipocampo en 61% de los casos. Kobayashi continuó la línea iniciada por Cendes, ampliando el número de familias afectadas por el denominado síndrome de la Epilepsia del Lóbulo Temporal Mesial Familiar y observando que las alteraciones observadas en el Hipocampo por las IRM podían ser encontradas en familiares no afectados. [48]

La búsqueda de factores genéticos en las formas comunes de las epilepsias no ha sido tan exitosa como la emprendida para la identificación de las alteraciones genéticas causantes de las raras formas de epilepsias familiares monogénicas. Esto podría deberse a que existen diferencias evolutivas entre las mutaciones patogénicas, en el gran efecto causal de las alteraciones responsables de las formas monogénicas y la consiguiente fuerte correlación entre genotipo y fenotipo resultante. [49, 50] Existe evidencia que apoya la denominada hipótesis de la “*enfermedad común-variante común*” que postula

que el “factor genético” actuante en las enfermedades poligénicas está mediado por variantes alélicas presentes en más del 1% de la población denominadas polimorfismos.

[51] Cuando estos polimorfismos implican la sustitución de un solo nucleótido se los denomina *Polimorfismos de Nucleótido Único* o SNPs por sus siglas en inglés.

El desarrollo de estudios de asociación resulta ser una herramienta válida para la disección de los factores genéticos involucrados en las enfermedades con herencia compleja [52]. Los estudios de asociación comparan la frecuencia de alelos específicos en un grupo de sujetos afectados con la enfermedad de interés con la de un grupo control no afectado. Un alelo es considerado asociado a una enfermedad cuando su frecuencia entre los casos y controles difiere más de lo esperado por efecto del azar, siempre y cuando los controles difieran de los casos sólo por la ausencia de enfermedad. Sin embargo, los estudios de asociación no están exentos de sesgos y limitaciones. Una asociación puede ser encontrada por azar o podría estar sesgada por fallas en el diseño. Es importante, entonces, conducirlos adecuada y cuidadosamente y más aún la prueba de asociación aumenta con la replicación de hallazgos iniciales positivos en poblaciones independientes y cuando la variante alélica investigada tiene consistente plausibilidad biológica [53].

La epilepsia del lóbulo temporal es una enfermedad con herencia compleja en la que los factores genéticos serían importantes en su génesis. Además de haber sido descritas raras formas familiares con patrón de herencia monogénico [54], hasta un 58% de los pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal Mesial con Esclerosis del Hipocampo refieren la presencia de antecedentes familiares positivos para convulsiones febriles y/o

epilepsia [55] y polimorfismos en seis genes diferentes han sido implicados como factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad [56-61]. Sin embargo, no es infrecuente que genes inicialmente identificados como asociados al desarrollo de una enfermedad no lo sean luego en nuevos reportes [62]. En una población de pacientes italianos fue identificada la asociación entre un polimorfismo (G1465A) en el gen que codifica para GABBR1 con un riesgo aumentado a padecer Epilepsia del Lóbulo Temporal [56]. En cambio, seis reportes subsiguientes han fallado en replicar los hallazgos de la primera investigación [62-67]. Como la Epilepsia del Lóbulo Temporal es un síndrome de características heterogéneas [68] es importante desarrollar la pesquisa de los factores genéticos en grupos homogéneos clínicamente para controlar factores que pudieran afectar la reproducibilidad de los hallazgos iniciales.

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es el principal aminoácido inhibitorio del sistema nervioso central, su acción es mediada a través de receptores ionotrópicos (tipos A y C) que producen corrientes inhibitorias sinápticas rápidas y receptores metabotrópicos (tipo B) que producen una corriente inhibitoria lenta y sostenida [69]. El receptor para GABA tipo B (GABBR) es un heterodímero de 2 subunidades transmembrana relacionadas (tipos 1 y 2). Cambios en las corrientes inhibitorias gabaérgicas mediadas a través de GABBR1 tienen un rol en la fisiopatología de la Epilepsia del Lóbulo Temporal. Ratones que carecen del gen para GABBR1 desarrollan un fenotipo similar a la ELT humana caracterizado por convulsiones, actividad epileptiforme en el EEG y trastornos de memoria [70, 71]. Cambios en la expresión de GABBR1 fueron encontrados en hipocampos de pacientes sometidos a lobectomías



temporales como tratamiento de su EMTEH [72]. Teniendo en cuenta que la presencia de una malformación del desarrollo cortical asociada es una de las hipótesis postulada en la etiología de la Esclerosis del Hipocampo [73], resulta destacable el hecho que GABBR1 sería importante en la maduración y organización de la corteza cerebral a través de la regulación de procesos migratorios durante la corticogénesis y la modulación de la transmisión sináptica [74-76]. En efecto, el bloqueo de GABBR1 impide la migración tangencial interneuronal durante el desarrollo, indicando por tanto el importante rol modulador de esta subunidad en este mecanismo de migración neuronal [76]. Por lo tanto es válido afirmar que variantes alélicas del gen GABBR1 podrían ser un marcador de riesgo biológicamente plausible para el desarrollo de EMTEH.

# Hipótesis y Objetivos

El objetivo de este primer trabajo es el de analizar el estado actual de los conocimientos sobre el uso de la tecnología en el aula.

La investigación se centra en el análisis de los factores que influyen en la adopción de la tecnología en el aula y en el desarrollo de estrategias de intervención que permitan mejorar el uso de la tecnología en el aula.

## Objetivo Principal

Analizar el uso de la tecnología en el aula y el desarrollo de estrategias de intervención que permitan mejorar el uso de la tecnología en el aula.

## Objetivos Secundarios

Analizar el uso de la tecnología en el aula y el desarrollo de estrategias de intervención que permitan mejorar el uso de la tecnología en el aula.

Analizar el uso de la tecnología en el aula y el desarrollo de estrategias de intervención que permitan mejorar el uso de la tecnología en el aula.

## **Hipótesis y Objetivos**

### **Hipótesis**

*La presencia del polimorfismo G1465A en el exón 7 de la subunidad R1 del receptor para GABA B está asociada a:*

- *Un riesgo aumentado para desarrollar EH en los pacientes con ELT.*
- *Una forma particular de presentación clínica y de respuesta al tratamiento en pacientes epilépticos con EH.*

### **Objetivo Primario**

- *Evaluar la contribución del receptor humano clonado para GABA tipo B en la patogénesis de la EH.*

### **Objetivos Secundarios**

- *Investigar la asociación entre el polimorfismo G1465A en el exón 7 del gen codificante de la subunidad R1 del Receptor para GABA tipo B y el desarrollo de EH en pacientes portadores de ELT.*
- *Investigar la asociación entre el polimorfismo G1465A y las formas de presentación clínica de los pacientes con EH*

# **Pacientes y Métodos**

## **Pacientes**

De la Base de Datos del Centro de Epilepsia de la División Neurología del Hospital General de Agudos Dr. JM Ramos Mejía se seleccionaron 102 pacientes que presentaron diagnóstico de Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo en las Imágenes por Resonancia Magnética. Dichos pacientes fueron contactados telefónicamente por mí e invitados a participar en el presente estudio de investigación. A todos les fueron explicadas las características del estudio, la metodología y procedimientos a realizar y los eventuales alcances de los resultados que pudieran obtenerse. Luego de esta explicación, les fue solicitado su consentimiento explícito para la participación mediante la firma de un formulario de consentimiento informado que previamente había sido aprobado por el Comité de Docencia y la Comisión de Bioética del mencionado centro hospitalario.

El diagnóstico de Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo se basó en la presencia de hallazgos característicos clínicos, electrofisiológicos y de Imágenes por Resonancia Magnética. Por lo tanto, a todos los pacientes les fue efectuado un exhaustivo interrogatorio acerca de la semiología ictal, un electroencefalograma digital de 16 canales y un estudio de Resonancia Magnética con un protocolo de adquisición de imágenes optimizado para la visualización de las estructuras temporales mesiales.

Debido a que ningún hallazgo es lo suficientemente específico para el diagnóstico, éste se basó en la suma de hallazgos distintivos.

En forma característica, en términos clínicos, un paciente con EMTEH se presentó con la secuencia temporal de un aura típico (malestar epigástrico, sensación extraña, miedo,

deja vu o jamais vu) seguido por arresto del comportamiento, ruptura de contacto y automatismos orales y manuales. En términos electrofisiológicos, presentó enlentecimiento en las regiones temporales y ondas agudas fronto-temporales. En las IRM, el diagnóstico de Esclerosis del Hipocampo se hizo en base a la presencia de disminución de tamaño, alteración en la estructura interna y cambios de señal de esta estructura anatómica temporal mesial.

Además fue incluido un grupo de 71 sujetos voluntarios sanos que no presentaban antecedentes ni padecimiento actual de cualquier desorden neurológico o comicial. Estos sujetos eran no relacionados con los pacientes ingresados y provenientes del mismo grupo poblacional que recibe atención en el centro hospitalario, ya que fueron seleccionados de una población que acudía a realizarse estudios bioquímicos. Ellos también prestaron su consentimiento expreso utilizando el formulario mencionado más arriba.

A todos los sujetos participantes se les extrajo 5 ml. de sangre mediante venopuntura, la muestra sanguínea fue anticoagulada con EDTA y almacenó anónimamente a -40 C hasta su posterior procesamiento.

### **Extracción y Purificación de ADN genómico**

Se purificó ADN genómico total mediante la técnica de Bromuro de Cetil Trimetilamonio (CTAB). Dicho protocolo de extracción consistió en la realización de los siguientes pasos:

1. *Se descongelaron las muestras almacenadas en baño a 37 °C.*
2. *800 µl de sangre entera fueron homogenizados con 0,5 ml de solución de TE10 (Tris-CLH 10mM ph=7,5, EDTA 10mM ph=8,0).*
3. *Se centrifugó la solución durante 3 minutos a 10000 rpm.*
4. *Se descartó el sobrenadante, dejando aproximadamente 0,5 ml.*
5. *Se lavó el pellet 3-4 veces con TE10 repitiendo la centrifugación hasta que éste quedara claro.*
6. *Se resuspendió el pellet, mediante agitación y vortex, en 600 µl de una solución de lisis (2% p/v CTAB, 1,4M ClNa, 0,2% p/v de 2-Mercapto etanol, 20mM EDTA, 10mM tris-ClH ph=7,5).*
7. *Se incubó a 37 °C durante toda la noche.*
8. *Se extrajo con un volumen de Cloroformo-Isoamílico (24:1).*
9. *Se agitó y centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos.*
10. *Se precipitó la fase acuosa, extraída en otro tubo, con 2/3 volumen de isopropanol frío.*
11. *Se dejó precipitar 1 hora a 4 °C.*
12. *Se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm y descartó el sobrenadante con cuidado.*
13. *Se lavó el pellet con Etanol al 70% y volvió centrifugar durante 3 minutos a 14000 rpm.*
14. *Se descartó el sobrenadante con cuidado y dejó secar el pellet.*
15. *Se resuspendió el pellet en 50 µl de agua bidestilada esteril llevandola a baño a 37 °C.*

## Genotipificación

### PCR

Un fragmento de 441 pares de bases, flanqueante al exón 7, del gen codificante de la subunidad I del receptor tipo B para GABA fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el siguiente par de primers:

*5'-AACAGTAACACAAACCCATCC-3' (forward)*

*5'-GCATGTTTGTAGAAGGTGCC-3' (reverse)*

Para ello, se utilizó el siguiente protocolo de amplificación:

*En un volumen final de 50µl se homogeneizó la siguiente solución,*

- *Buffer compuesto por Tris-ClH 20mM y ClK 50mM*
- *ClMg<sup>++</sup> 1,5 mM*
- *dNTPS 0,2 mM de cada uno*
- *primers 50 pM de cada uno*
- *ADN genómico 3 µl (aprox. 4,5 ng.)*
- *H2O para completar volumen.*

*Se programó un ciclado en un termociclador BioRad con las siguientes características,*

- *1 paso a 95°C durante 5 minutos*
- *Agregado de 1U de Taq Polimerasa por muestra (Hot Start PCR)*
- *35 ciclos consistentes en los siguientes 3 pasos,*
  - *1 paso a 95°C durante 1 minuto*



- *1 paso a 55°C durante 1 minuto*
- *1 paso a 72°C durante 1 minuto*
- *1 paso final de extensión a 72°C durante 5 minutos*

### **Digestión Enzimática**

Para la identificación de las variantes alélicas se realizó una digestión enzimática con la enzima Eag I (*New England Biolab*) durante 3 hs. y una posterior corrida electroforética en un gel de agarosa al 2%.

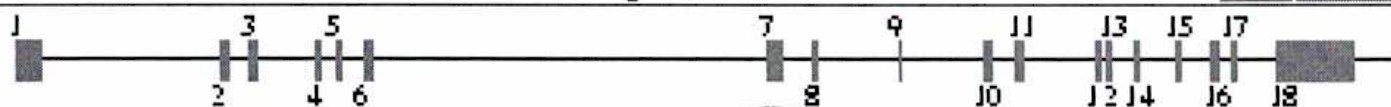
Para la digestión se preparó una solución en un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía,

- *Buffer del fabricante de la enzima 2  $\mu$ l*
- *Enzima 3 U*
- *Producto amplificado 7,5  $\mu$ l*
- *H<sub>2</sub>O para completar volumen*

La corrida electroforética se realizó durante 40 minutos.

El patrón de bandas observadas permitía identificar los 3 genotipos posibles, ya que el polimorfismo G1465A elimina el sitio de restricción.

Figura 1. A) Secuencia flanqueante nucleotídica y aminoácida del polimorfismo G1465A. Sitio polimórfico indicado en azul. B) Sitios de Restricción de EagI, donde puede observarse que el cambio de G por A resulta en la pérdida del sitio de reconocimiento (a la derecha) y la falta de corte por parte de la enzima. C) Gel de Agarosa al 2% de producto de amplificación digerido, donde se observan 2 bandas (a la izquierda) y 3 bandas (a la derecha) indicativas de los genotipos G/G y G/A, respectivamente.



1393 CAG GAG GCA CCG CTG GCC TAT GAT GCC ATC TGG GCC TTG GCA CTG GCC  
 465 Gln Glu Ala Pro Leu Ala Tyr Asp Ala Ile Trp Ala Leu Ala Leu Ala

1441 CTG AAC AAG ACA TCT GGA GGA GGC G/AGC CGT TCT GGT GTG CGC CTG GAG  
 481 Leu Asn Lys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Arg Ser Gly Val Arg Leu Glu  
Ser

1489 GAC TTC AAC TAC AAC AAC CAG ACC ATT ACC GAC CAA ATC TAC CGG GCA  
 497 Asp Phe Asn Tyr Asn Asn Gln Thr Ile Thr Asp Gln Ile Tyr Arg Ala

1537 ATG AAC TCT TCG TCC TTT GAG GGT GTC TCT GGC CAT GTG GTG TTT GAT  
 513 Met Asn Ser Ser Ser Phe Glu Gly Val Ser Gly His Val Val Phe Asp

A

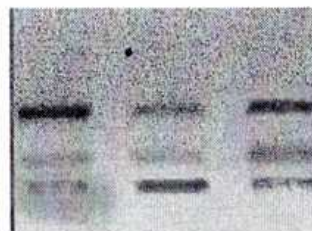
G GCGGC CGT TCT

G GCAGC CGT TCT

B



C



## **Estadística**

Las frecuencias de los alelos y genotipos entre pacientes y controles, así como entre los diferentes subgrupos de pacientes, fueron comparadas utilizando la prueba de chi cuadrado o el test exacto de Fisher según correspondiese por las frecuencias esperadas. Las variables continuas fueron comparadas con test t o de Mann-Whitney según correspondiera a la distribución de las variables. Se estableció un nivel de significancia bilateral en 0,01.

El equilibrio de Hardy-Weinberg en controles fue probado con test exacto. Este principio asume que, bajo ciertas condiciones, luego de una generación de entrecruzamiento al azar, las frecuencias genotípicas de un solo locus genético quedarán fijas en un particular valor de equilibrio. También especifica que las frecuencias en equilibrio pueden ser representadas como el producto de la función que relaciona las frecuencias alélicas, para nuestro caso de un solo locus bialélico la función de equilibrio está dada por:  $p^2+2pq+q^2=1$ , donde  $p$  representa al alelo dominante (G) y  $q$  al alelo recesivo (g). Es decir, que mediante el test exacto contrastamos la hipótesis nula de equilibrio.

Como estimación del efecto conferido por la variante alélica polimórfica utilizamos la medida de riesgo Odds Ratio. Éste junto a sus intervalos de confianza fue estimado a partir de las respectivas tablas de contingencia. En consecuencia obtuvimos una medida de riesgo univariada no ajustada aplicando la fórmula:  $OR=ad/bc$ ; donde  $a$  representa a los sujetos enfermos con el genotipo AG,  $d$  a los sujetos sanos con el genotipo GG,  $b$  a los sujetos sanos con el genotipo AG y  $c$  a los sujetos enfermos con el genotipo GG. Se utilizó como herramienta informática el paquete SPSS versión 11.5

# Resultados

### Sujetos Analizados

Se incluyeron 102 pacientes y 71 controles sanos no relacionados sin antecedentes comiciales o de enfermedad neurológica.

Las características clínicas de los sujetos incluidos, así como las presentadas por sujetos evaluados en otros estudios que han investigado esta variación genética, se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1. Características clínicas de sujetos con EMTEH de este estudio y de los reportados en la literatura**

Estudio	n	Hombres, n (%)	EH, n (%)	Edad de Inicio, años, media (DE)	HF, n (%)	CF, n (%)	Refractarios, n (%)
<i>Stogmann et al.</i> <sup>67</sup>	188	78 (41.5)	112 (59.6)	15,1 (13.5)	48 (25.5) <sup>a</sup>	42 (22.3) <sup>b</sup>	175 (93.1)
<i>Jin et al.</i> <sup>66</sup>	112	64 (57.1)	67 (59.8)	16,46 (8.99)	NR	28 (25)	NR
<i>Salzmann et al.</i> <sup>65</sup>	110	47 (42.7)	108 (98.2)	15,05 (5.23)	22 (20)	60 (54.5)	110 (100)
<i>Cavallieri et al.</i> <sup>62</sup>	245	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Tan et al.</i> <sup>64</sup>	234	96 (41)	140 (59.8)	15 (13.5)	NR	82 (35)	159 (68)
<i>Ma et al.</i> <sup>63</sup>	120	49 (40.8)	NR	22,8 (10.08)	66 (55)	120 (100)	23 (19.2)
<i>Gambarella et al.</i> <sup>36</sup>	141	63 (44.7)	31 (22)	30,9 (21.9)	51 (36.2)	21 (14.9)	14 (9.9)
<i>Kauffman et al.</i>	102	51 (50)	102 (100)	16,4 (13.37)	18 (17.6)	20 (19.6)	60 (58.8)

<sup>a</sup> 176 pacientes investigados, en 12 pacientes la historia familiar no pudo ser investigada correctamente.

<sup>b</sup> 184 pacientes investigados, en 4 pacientes no se pudo obtener información confiable.

NR, no reportado

HF, Historia Familiar positiva para Epilepsia o convulsiones febriles.

CF, Antecedente de Convulsiones Febriles.

### PCR

Se realizó optimización de la reacción en cadena de la polimerasa mediante determinación empírica de las mejores condiciones de ciclado. Este procedimiento, luego de varios ensayos, resultó en las condiciones descritas en la sección de metodología desarrollada.

### RFLP

Se realizó optimización de la reacción de digestión enzimática mediante determinación empírica de las mejores condiciones físico-químicas, en particular tiempo de digestión y concentración enzimática. Se hicieron ensayos por duplicado en las diferentes condiciones y aquella que mostró 100% de reproducibilidad fue la que resultó en las condiciones descritas en la sección de metodología desarrollada.

### Análisis de la Distribución de Frecuencias Genotípicas

La distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas del polimorfismo G1465A del gen codificante de GABBR1 en pacientes y controles se resume en la tabla 2. La distribución genotípica de los controles se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=1$ ), mientras que no ocurre lo propio con la distribución de los casos ( $p=0,00069$ ). La frecuencia de los genotipos fue diferente entre los casos y los controles ( $p=3,788e-08$ ), no habiendo diferencias en el resto de las variables demográficas analizadas entre estos 2 grupos de sujetos. El genotipo A/G fue encontrado en 49 pacientes (48%) y en 6 controles (8,5%). La portación del genotipo A/G confiere entonces, un riesgo 10 veces



mayor para el desarrollo de EMTEH que la portación del genotipo G/G. (OR10,016; IC 95% 3,98-25,18)

**Tabla 2. Distribución de Genotipos del Polimorfismo G1465A del gen GABBR1 en pacientes con EMTEH y Controles**

Polimorfismo	Casos	Controles	ODDS RATIO	Valor de <i>p</i>
G1465A	N=102	N=71		
A/A	0	0	N/A	$p=3,788e-08^*$
A/G	49 (48)	6 (8,5)	10,016 (3.98-25.18)**	
G/G	53 (52)	65 (91,5)	1 (grupo de referencia)	

<sup>†</sup> Los valores expresados como n (%)

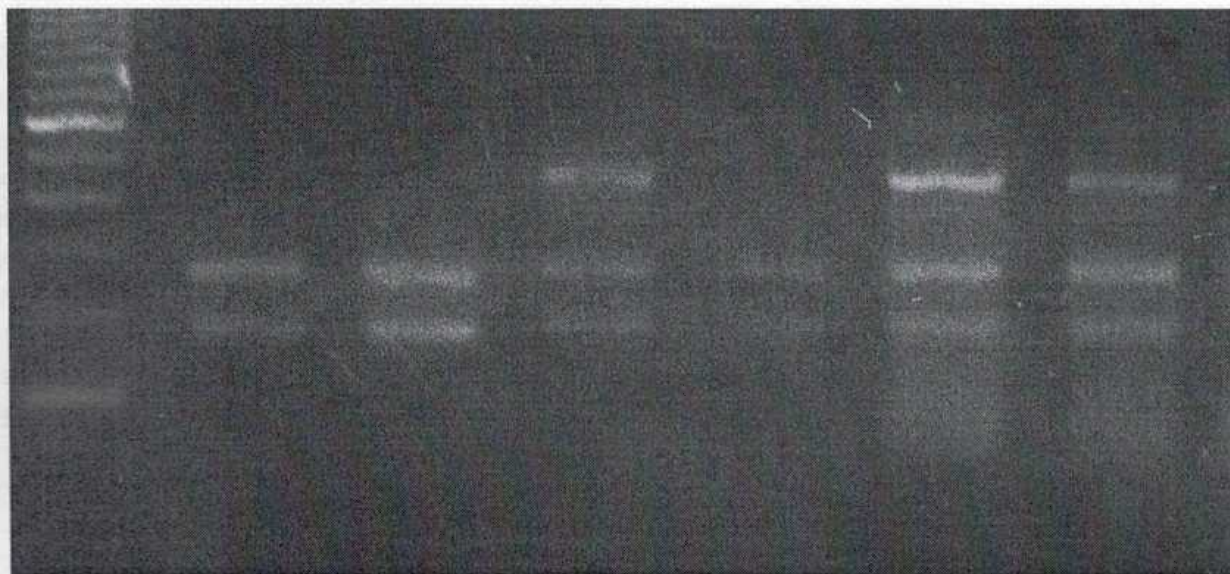
\*Valor de *p* estimado a partir de  $X^2$  de Pearson con corrección de Yates

\*\*OR no ajustado

Figura 2. Corrida Electroforética en Agarosa con Tinción con Bromuro de Etidio, donde puede observarse el producto de la digestión enzimática. Panel A. calle 1: marcador de peso molecular. Calles 2-3: G/G. calle 4: G/A. calle 5: G/G. calle 6-7: G/A. Panel B. calle 1: marcador de peso molecular. calles 2 no aplica. calle 3: G/A. calles 4-5: G/G. calle 6: G/A. calle 7: G/G. calle 8: G/A

**Panel A**

Caso 3    Caso 67    Caso 45    Control 2    Control 34    Caso 66



G/G

G/G

G/A

G/G

G/A

G/A

**Panel B**

Caso 28    Caso 29    Control 15    Caso 7    Caso 11    Caso 12



G/A

G/G

G/G

G/A

G/G

G/A

### Análisis de la Asociación entre la Variante Alélica y las características clínicas de los

#### pacientes

No encontramos asociación entre características clínicas particulares de los pacientes analizados y la presencia de la variante genética investigada. En efecto no hubo diferencias en la frecuencia de antecedentes familiares positivos para eventos comiciales, convulsiones febriles en la infancia o eventos traumáticos entre los 2 grupos de pacientes (G/G vs. G/A). Tampoco la hubo con la frecuencia mensual de crisis presentada por los enfermos o con el grado de respuesta al tratamiento. Aunque la frecuencia de crisis comiciales durante el sueño y de cluster de crisis parciales resultó mayor en el grupo de sujetos portador del genotipo G/G, esta diferencia no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, nuestro estudio no contaba con la potencia estadística suficiente para demostrar este objetivo secundario. (ver tabla 3)

**Tabla 3. Variables Analizadas en pacientes con EMTEH**

Variables	G/A N=49	G/G N=53	Valor de <i>p</i>
<b>Hombres</b> , n (%)	23	29	NS
<b>Mujeres</b> n (%)	27	23	NS
<b>Edad de inicio de Epilepsia</b> media en años	17,36	15,68	NS
<b>Historia de Convulsiones Febriles</b> , n (%)	13 (26,5)	17 (32,1)	NS
<b>Historia Familiar de CF/Epilepsia</b> , n (%)	9 (18,4)	10 (18,8)	NS
<b>Estado de mal</b> , n (%)	10 (20,4)	10 (18,8)	NS
<b>Cluster</b> , n (%)	10 (20,4)	6 (11,3)	NS
<b>Nocturnas</b> , n (%)	27 (55,1)	23 (43,4)	NS
<b>Frec Mensual</b> mediana	1-2	3-4	NS
<b>Refractariedad</b> , n (%)	26 (53,1)	34 (64,15)	NS

# Discusión

En el presente estudio hemos observado que el polimorfismo G1465A del gen codificante de GABBR1 es un marcador de riesgo para el desarrollo de EMTEH en la población investigada.

Esta asociación fue originalmente reportada por Gambardella y col. en una población de pacientes italianos con diagnóstico de Epilepsia del Lóbulo Temporal [56]. Nuestros resultados, obtenidos en una población independiente, confirman los hallazgos originales. El primer grupo de pacientes incluyó un número pequeño de sujetos con Esclerosis del Hipocampo. Por el contrario, nuestro grupo de pacientes está formado exclusivamente por sujetos con Epilepsia del Lóbulo Temporal con Esclerosis del Hipocampo. Aunque, nuestra estimación del efecto conferido por el polimorfismo es de menor magnitud que la observada por Gambardella, sí lo es la prevalencia del polimorfismo, sugiriendo esto que nos encontramos ante un grupo de pacientes más homogéneo y reforzando la asociación observada.

En cambio, seis recientes reportes fallaron en encontrar esta asociación estudiando pacientes provenientes de diferentes grupos étnicos. El polimorfismo G1465A no fue asociado con un riesgo a padecer Epilepsia del Lóbulo Temporal en investigaciones desarrolladas en los Estados Unidos [63], Francia [77], Gran Bretaña [78], Australia [64], China [66] y Austria [67]. Diferencias étnicas parecerían jugar un rol en la obtención de resultados conflictivos en estudios de asociación genética. Estas diferencias podrían aparecer porque el grado de desequilibrio de ligamiento entre el alelo causante de la enfermedad y los posibles alelos marcadores difiere según la

población investigada está, porque existe heterogeneidad alélica entre diferentes grupos étnicos o porque la asociación está modificada por otros factores genéticos o ambientales que varían entre los grupos estudiados [53]. Ya que nuestro grupo de pacientes es comparable en cuanto a las variables clínicas con las diferentes poblaciones estudiadas, creemos que las diferencias observadas entre nuestros resultados y los arriba referidos dependen de factores étnicos. Durante los pasados siglos XIX y XX, Argentina tuvo una muy importante inmigración que modeló su composición étnica. Entre 1857 y 1958 las principales corrientes inmigratorias provinieron de Italia y España dando cuenta de un 46 y 33% [79], respectivamente del total. El resto de la inmigración provino de diferentes nacionalidades, incluyendo a Francia, Alemania, Gran Bretaña e Irlanda. En el mismo sentido, un estudio de genética poblacional efectuado en Buenos Aires mostró que la contribución europea al pool genético de la población estudiada podía ser estimado en un 67,55% [80]. En consecuencia, creemos que nuestro hallazgo positivo obedece a la posible similitud étnica con la población investigada en el reporte original como resultado de nuestra particular historia inmigratoria.

Otra explicación podría ser que los resultados de Gambardella y los nuestros fueran falsamente positivos. Muchos autores se han expresado sobre las posibles causas de la frecuente falta de replicación de estudios inicialmente positivos en epidemiología genética [53, 81]. Una de las más frecuentemente indicadas como responsable de este fenómeno ha sido la no manifiesta presencia de estratificación poblacional [82, 83]. Éste concepto indica que la asociación es espúrea, a diferencia de los argumentos *población-*

*específico* postulados en el párrafo anterior, como consecuencia de una inadvertida composición de la población estudiada en la que no hay completa coincidencia étnica entre el grupo de sujetos enfermos y los controles sanos observándose en consecuencia una asociación dependiente de esta composición y no necesariamente de la presencia o ausencia de enfermedad. Sin embargo, se ha postulado que sólo ante situaciones extremas, como la presencia de unos pocos grupos étnicos y grandes diferencias entre estos grupos en las frecuencias genotípicas y en la tasa de enfermedad, ésta situación podría provocar un sesgo importante [84]. Más aún, estudios de simulación desarrollados en población con alto entrecruzamiento genético en su historia, como podría ser la nuestra, también concluyen que un sesgo importante sólo podría observarse en escenarios muy poco realistas como ser, la presencia de sólo dos grupos étnicos estructurados y con amplias diferencias en las tasas de prevalencia de enfermedad entre ellos [85]. Tomando en cuenta que nuestra población muy probablemente incluye mucho más que dos grupos étnicos y que no hay reportadas importantes diferencias en la prevalencia de Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo en las diferentes etnias, consideramos que la estratificación poblacional no es un sesgo importante en nuestros resultados.

Otra explicación para los resultados falsos positivos es la presencia del azar [53]. Para controlar esta situación, algunos investigadores han sugerido que sólo se acepten como evidencia de rechazo de la hipótesis nula de no asociación a valores de  $p$  altamente conservadores, como ser en el orden de  $1 \times 10^{-8}$  [81]. Esto se basa en la hipótesis que postula que todos los estudios posibles de epidemiología genética a ser efectuados



deberían considerarse como una de múltiples comparaciones efectuadas para probar la hipótesis de “*variante común-enfermedad común*” y en consecuencia correcciones al valor de significancia deberían realizarse. De todos modos, el nivel de significancia observado en nuestro estudio hace altamente improbable que el azar sea la causa de nuestros hallazgos.

Un análisis detallado de los pacientes italianos del reporte inicial muestra que esta asociación es más fuerte en aquellos pacientes con formas de epilepsias más severa y de comienzo más temprano.[56] Aunque los pacientes con EMTEH tienen más posibilidades de padecer epilepsia refractaria al tratamiento farmacológico [68], nuestros resultados no apoyan la existencia de asociación entre el polimorfismo investigado y este subtipo de pacientes.

La caracterización molecular del gen GABBR1 ha revelado la existencia de 5 polimorfismos que resultan en cambios de la secuencia aminoácidica [86]. Aquel que cambia una glicina por una serina en la posición 489, dentro de la porción N-terminal del receptor GABA B es el que ha sido investigado por nosotros. Es posible que esta mutación, que afecta la porción extracelular, altere sitios de unión a ligando que resulten en un funcionamiento ineficiente del receptor contribuyendo al mecanismo epileptogénico. Una de las formas de analizar el efecto de una mutación puntual en la función proteica, es mediante el análisis del grado de conservación entre especies de la posición aminoácidica polimórfica que permite predecir el efecto causal de la mutación puntual [87]. En este sentido, la posición 489 resulta altamente conservada, ya que un

análisis de homología entre 18 especies la mostró conservada en 14 de ellas. (ver figura 2) Esto apoya la posibilidad que el polimorfismo G1465A sea funcional. Más aún, la sustitución de una glicina por una serina disminuye la probabilidad de ajuste al modelo de dominio funcional de *receptor ANF* utilizando el programa HMMER2 [88] sobre la base de datos PFAM [89].

Variantes alélicas del gen GABBR1 resultan ser un marcador de riesgo biológicamente plausible para el desarrollo de EMTEH. Estudios en humanos y en modelos animales han mostrado el rol de la transmisión gabaérgica, a través del receptor tipo B, en la epileptogénesis de la Epilepsia del Lóbulo Temporal. Ratones que carecían del gen para GABBR1 desarrollaban un fenotipo similar a la ELT humana caracterizado por convulsiones, actividad epileptiforme en el EEG y trastornos de memoria [70]. Además, la región CA3 del hipocampo de estos ratones resultó más excitable que la de aquellos que expresaron GABBR1; esta situación parece estar mediada por receptores glutamatérgicos tipo NMDA que provocan cambios crónicos plásticos en redes neuronales del hipocampo [71]. En el mismo sentido, un aumento de un 172% de la expresión de GABBR1 fue encontrada en hipocampos de pacientes con EMTEH en comparación con la de hipocampos no epilépticos [90]. Princivalle y col, también encontraron un aumento en los niveles de ARNm de GABBR1 y GABBR2 en distintas regiones de tejido hipocampal proveniente de pacientes con EMTEH [72]. Estos cambios podrían reflejar la activación de mecanismos tendientes a contrarrestar la hiperexcitabilidad neuronal mediante una inhibición glutamatérgica presináptica. [72] Ha sido planteado que la Esclerosis del Hipocampo pueda ser consecuencia de una

malformación del desarrollo cortical [73], resulta interesante entonces, que GABBR1 podría ser importante en la maduración y organización de la corteza cerebral a través de la regulación de procesos migratorios durante la corticogénesis y la modulación de la transmisión sináptica [91, 92]. En este sentido, Lopez Bendo demostró que el bloqueo de GABBR1 impide la migración tangencial interneuronal durante el desarrollo [76].

Las hipótesis sobre cual o cuales son las causas de la EMTEH siguen siendo muchas [64]. Tradicionalmente, la EMTEH no ha sido considerada un trastorno genético. El síndrome de EMTEH rara vez es observado en más de un miembro en una familia, aunque sí fue observada una alta frecuencia de convulsiones febriles en otros miembros de la misma [55]. No hay una alta concordancia entre gemelos, aunque sí hay reportes de agregación familiar de características estructurales del hipocampo [93]. Variantes alélicas en los genes codificantes de Interleukina 1 $\beta$ [94], APOE[95], Proteína Priónica[60], prodinorfina[67] y KCNJ10[96] han sido identificadas como marcadores de un riesgo aumentado para el desarrollo de ELT. Los resultados de nuestro trabajo, apoyan la importancia de los factores genéticos en el desarrollo de EMTEH, considerándola una enfermedad multifactorial con herencia compleja.

Nuestra observación de una mayor frecuencia de crisis comiciales durante el sueño en los enfermos portadores del genotipo A/G resulta interesante a la luz del rol que el receptor para GABAB tiene en modular el sueño REM [97]. Teniendo en cuenta la más amplia epileptogenicidad postulada como consecuencia de una hipofunción de GABBR1[70], también resulta remarcable la tendencia observada hacia una asociación

entre la variante alélica investigada y una mayor posibilidad de presentar crisis parciales en cluster.

# Conclusiones

Nuestros resultados indican que el polimorfismo G1465A del gen que codifica para la subunidad 1 del receptor para GABA tipo B podría ser un marcador de riesgo para el desarrollo del síndrome de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo en determinados grupos poblacionales.

# Bibliografía

1. B. A. ... *Journal of ...* 1955, ...
2. ... *Journal of ...* 1956, ...
3. ... *Journal of ...* 1957, ...
4. ... *Journal of ...* 1958, ...
5. ... *Journal of ...* 1959, ...
6. ... *Journal of ...* 1960, ...
7. ... *Journal of ...* 1961, ...
8. ... *Journal of ...* 1962, ...
9. ... *Journal of ...* 1963, ...
10. ... *Journal of ...* 1964, ...
11. ... *Journal of ...* 1965, ...
12. ... *Journal of ...* 1966, ...
13. ... *Journal of ...* 1967, ...
14. ... *Journal of ...* 1968, ...
15. ... *Journal of ...* 1969, ...
16. ... *Journal of ...* 1970, ...
17. ... *Journal of ...* 1971, ...
18. ... *Journal of ...* 1972, ...
19. ... *Journal of ...* 1973, ...
20. ... *Journal of ...* 1974, ...

1. Fisher, R.S., et al., *Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. *Epilepsia*, 2005. **46**(4): p. 470-2.
2. WHO, *Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis*. Fact Sheet, 2001. **165**
3. Medina-Malo, C., *Historia de las epilepsias*, in *Epilepsias: diagnóstico y tratamiento*, M. Campos and A. Kanner, Editors. 2004, Editorial Mediterranea: Santiago. p. 37-48.
4. Temkin, O., *The falling sickness: a history of epilepsy from the Greek to the beginnings of modern neurology*. 2 ed. 1971: The John Hopkins University Press.
5. Gorji, A. and M. Khaleghi Ghadiri, *History of epilepsy in Medieval Iranian medicine*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001. **25**(5): p. 455-61.
6. Jankovic, S.M., et al., [*Epilepsy, eponyms and patron saints (history of Western civilization)*]. *Srp Arh Celok Lek*, 1996. **124**(5-6): p. 162-5.
7. Jankovic, S.M., et al., [*Eponyms and epilepsy (history of Eastern civilizations)*]. *Srp Arh Celok Lek*, 1996. **124**(7-8): p. 217-21.
8. Ormerod, W., *Richard Caton (1842-1926): pioneer electrophysiologist and cardiologist*. *J Med Biogr*, 2006. **14**(1): p. 30-5.
9. Sengoku, A., *The contribution of J. H. Jackson to present-day epileptology*. *Epilepsia*, 2002. **43 Suppl 9**: p. 6-8.
10. Feindel, W., *Osler and the "medico-chirurgical neurologists": Horsley, Cushing, and Penfield*. *J Neurosurg*, 2003. **99**(1): p. 188-99.
11. Sommer, W., *Erkrankung des ammonshorn als aetiologisches moment der epilepsie*. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1880. **10**: p. 631-675.
12. Dupont, S., [*MRI exploration of partial epilepsy*]. *Rev Neurol (Paris)*, 2002. **158**(5 Pt 2): p. 4S19-26.
13. Haas, L.F., *Hans Berger (1873-1941), Richard Caton (1842-1926), and electroencephalography*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003. **74**(1): p. 9.
14. Lennox, W.G. and J.P. Davis, *Clinical correlates of the fast and the slow spike-wave electroencephalogram*. *Pediatrics*, 1950. **5**(4): p. 626-44.
15. Bidzinski, J., *History of the surgical treatment of epilepsy*. *Neurol Neurochir Pol*, 1998. **32 Suppl 2**: p. 13-23.
16. ILAE, *Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy*. *Epilepsia*, 1989. **30**(4): p. 389-99.
17. ILAE, *Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy*. *Epilepsia*, 1981. **22**(4): p. 489-501.
18. Engel, J., Jr., *A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology*. *Epilepsia*, 2001. **42**(6): p. 796-803.



19. Berkovic, S.F. and G.D. Jackson, *The hippocampal sclerosis whodunit: enter the genes*. Ann Neurol, 2000. **47**(5): p. 557-8.
20. Wieser, H.G., *ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis*. Epilepsia, 2004. **45**(6): p. 695-714.
21. French, J.A., et al., *Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination*. Ann Neurol, 1993. **34**(6): p. 774-80.
22. Williamson, P.D., et al., *Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology*. Ann Neurol, 1993. **34**(6): p. 781-7.
23. Cendes, F., et al., *Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures?* Ann Neurol, 1993. **34**(6): p. 795-801.
24. Urbach, H., *Imaging of the epilepsies*. Eur Radiol, 2005. **15**(3): p. 494-500.
25. Andermann, E., *Genetic aspects of the epilepsies*, in *Genetic Aspects of Human Behaviour*, T. Sakai and T. Tsuboi, Editors. 1985, Igaku-shoin: Tokyo.
26. Lennox, W.G., [*Heredity of epilepsy, studies in families of patients and in twins*]. Pediatr Am, 1953. **10**(6): p. 251-2.
27. Metrakos, K. and J.D. Metrakos, *Genetics of convulsive disorders. II. Genetic and electroencephalographic studies in centrencephalic epilepsy*. Neurology, 1961. **11**: p. 474-83.
28. Inouye, E., *Observations on forty twin index cases with chronic epilepsy and their co-twins*. J Nerv Ment Dis, 1960. **130**: p. 401-16.
29. Andermann, E. and J.D. Metrakos, *Proceedings: A multifactorial analysis of focal and generalized cortico-reticular (centrencephalic) epilepsy*. Epilepsia, 1972. **13**(2): p. 348-9.
30. Ottman, R., *Analysis of genetically complex epilepsies*. Epilepsia, 2005. **46 Suppl 10**: p. 7-14.
31. Steinlein, O.K., et al., *A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 201-3.
32. Phillips, H.A., et al., *Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2*. Nat Genet, 1995. **10**(1): p. 117-8.
33. Lopes-Cendes, I., et al., *Genetic linkage studies in familial frontal epilepsy: exclusion of the human chromosome regions homologous to the El-1 mouse locus*. Epilepsy Res, 1995. **22**(3): p. 227-33.
34. Xiong, L., et al., *Mapping of a gene determining familial partial epilepsy with variable foci to chromosome 22q11-q12*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(6): p. 1698-710.
35. Scheffer, I.E., et al., *Familial partial epilepsy with variable foci: a new partial epilepsy syndrome with suggestion of linkage to chromosome 2*. Ann Neurol, 1998. **44**(6): p. 890-9.
36. de Haan, G.J., et al., *A Novel Splicing Mutation in KCNQ2 in a Multigenerational Family with BFNC Followed for 25 Years*. Epilepsia, 2006. **47**(5): p. 851-9.

37. Beck, C., et al., *A nonsense mutation in the alpha4 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor (CHRNA4) cosegregates with 20q-linked benign neonatal familial convulsions (EBNI)*. Neurobiol Dis, 1994. **1**(1-2): p. 95-9.
38. Lewis, T.B., et al., *Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q*. Am J Hum Genet, 1993. **53**(3): p. 670-5.
39. Malafosse, A., et al., *Confirmation of linkage of benign familial neonatal convulsions to D20S19 and D20S20*. Hum Genet, 1992. **89**(1): p. 54-8.
40. Kearney, J.A., et al., *Recurrent de novo mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy of infancy*. Pediatr Neurol, 2006. **34**(2): p. 116-20.
41. Moulard, B., et al., *Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) on chromosome 2q24-q33*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(5): p. 1396-400.
42. Scheffer, I.E. and S.F. Berkovic, *Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes*. Brain, 1997. **120** ( Pt 3): p. 479-90.
43. Ayerdi-Izquierdo, A., et al., *Genetic analysis of the LGI/Epitempin gene family in sporadic and familial lateral temporal lobe epilepsy*. Epilepsy Res, 2006.
44. Gu, W., E. Brodtkorb, and O.K. Steinlein, *LGII is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures*. Ann Neurol, 2002. **52**(3): p. 364-7.
45. Berkovic, S., A. Howell, and J. Hopper, *Familial temporal lobe epilepsy: a new syndrome with adolescent/adult onset and a benign course*, in *Epileptic seizures and syndromes*, P. Wolf, Editor. 1994, John Libbey & Company Ltd: London. p. 257-63.
46. Ottman, R., et al., *Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q*. Nat Genet, 1995. **10**(1): p. 56-60.
47. Cendes, F., et al., *Familial temporal lobe epilepsy: a clinically heterogeneous syndrome*. Neurology, 1998. **50**(2): p. 554-7.
48. Kobayashi, E., et al., *Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic, first-degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy*. Arch Neurol, 2002. **59**(12): p. 1891-4.
49. Thomas, P.D. and A. Kejariwal, *Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(43): p. 15398-403.
50. Tan, N.C., J.C. Mulley, and S.F. Berkovic, *Genetic association studies in epilepsy: "the truth is out there"*. Epilepsia, 2004. **45**(11): p. 1429-42.
51. Lohmueller, K.E., et al., *Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease*. Nat Genet, 2003. **33**(2): p. 177-82.
52. de Bakker, P.I., et al., *Efficiency and power in genetic association studies*. Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1217-23.
53. Colhoun, H.M., P.M. McKeigue, and G. Davey Smith, *Problems of reporting genetic associations with complex outcomes*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 865-72.

54. Kobayashi, E., et al., *Outcome of surgical treatment in familial mesial temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia*, 2003. **44**(8): p. 1080-4.
55. Briellmann, R.S., et al., *Seizures in family members of patients with hippocampal sclerosis*. *Neurology*, 2001. **57**(10): p. 1800-4.
56. Gambardella, A., et al., *GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy*. *Neurology*, 2003. **60**(4): p. 560-3.
57. Stogmann, E., et al., *A functional polymorphism in the prodynorphin gene promotor is associated with temporal lobe epilepsy*. *Ann Neurol*, 2002. **51**(2): p. 260-3.
58. Briellmann, R.S., et al., *APOE epsilon4 genotype is associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy*. *Neurology*, 2000. **55**(3): p. 435-7.
59. Kanemoto, K., et al., *Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy*. *Ann Neurol*, 2000. **47**(5): p. 571-4.
60. Walz, R., et al., *Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant*. *Neurology*, 2003. **61**(9): p. 1204-10.
61. Bueno, R.J., et al., *Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility*. *Epilepsy Res*, 2004. **58**(2-3): p. 175-83.
62. Cavalleri, G.L., et al., *Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here?* *Brain*, 2005. **128**(Pt 8): p. 1832-40.
63. Ma, S., et al., *The GABBR1 locus and the G1465A variant is not associated with temporal lobe epilepsy preceded by febrile seizures*. *BMC Med Genet*, 2005. **6**(1): p. 13.
64. Tan, N.C., et al., *Is variation in the GABA(B) receptor 1 gene associated with temporal lobe epilepsy?* *Epilepsia*, 2005. **46**(5): p. 778-80.
65. Salzmann, A., et al., *GABA receptor 1 polymorphism (G1465A) and temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia*, 2005. **46**(6): p. 931-3.
66. Ren, L., et al., *Lack of GABABR1 gene variation (G1465A) in a Chinese population with temporal lobe epilepsy*. *Seizure*, 2005. **14**(8): p. 611-3.
67. Stogmann, E., et al., *Lack of association between a GABA receptor 1 gene polymorphism and temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia*, 2006. **47**(2): p. 437-9.
68. Consalvo, D., et al., *[Mesial temporal sclerosis syndrome in adult patients]*. *Medicina (B Aires)*, 2000. **60**(2): p. 165-9.
69. Ong, J. and D.I. Kerr, *Clinical potential of GABAB receptor modulators*. *CNS Drug Rev*, 2005. **11**(3): p. 317-34.
70. Schuler, V., et al., *Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1)*. *Neuron*, 2001. **31**(1): p. 47-58.
71. Brown, J.T., et al., *Mechanisms contributing to the exacerbated epileptiform activity in hippocampal slices of GABAB1 receptor subunit knockout mice*. *Epilepsy Res*, 2003. **57**(2-3): p. 121-36.
72. Princivalle, A.P., et al., *GABA(B1a), GABA(B1b) AND GABA(B2) mRNA variants expression in hippocampus resected from patients with temporal lobe epilepsy*. *Neuroscience*, 2003. **122**(4): p. 975-84.

73. Fernandez, G., et al., *Hippocampal malformation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis*. Neurology, 1998. **50**(4): p. 909-17.
74. Lopez-Bendito, G., et al., *Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation*. Cell, 2006. **125**(1): p. 127-42.
75. Lujan, R., R. Shigemoto, and G. Lopez-Bendito, *Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain*. Neuroscience, 2005. **130**(3): p. 567-80.
76. Lopez-Bendito, G., et al., *Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons*. Cereb Cortex, 2003. **13**(9): p. 932-42.
77. Salzmann, A., et al., *GABAB Receptor 1 Polymorphism (G1465A) and Temporal Lobe Epilepsy*. Epilepsia, 2005. **46**(6): p. 931-933.
78. Cavalleri, G.L., et al., *Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here?* Brain, 2005.
79. Quijada, M., C. Bernard, and A. Schneider, *Homogeneidad y Nación. Con un estudio de un caso: Argentina, siglos XIX y XX*. 2000, Madrid: Consejo superior de Investigaciones Científicas, Centro de Humanidades. 245.
80. Martinez Marignac, V.L., et al., *Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers*. Hum Biol, 2004. **76**(4): p. 543-57.
81. Cordell, H.J. and D.G. Clayton, *Genetic association studies*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1121-31.
82. Wang, Y., R. Localio, and T.R. Rebbeck, *Evaluating bias due to population stratification in epidemiologic studies of gene-gene or gene-environment interactions*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(1): p. 124-32.
83. Choudhry, S., et al., *Population stratification confounds genetic association studies among Latinos*. Hum Genet, 2006. **118**(5): p. 652-64.
84. Khlrat, M., et al., *Robustness of case-control studies of genetic factors to population stratification: magnitude of bias and type I error*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(10): p. 1660-4.
85. Wang, Y., R. Localio, and T.R. Rebbeck, *Evaluating bias due to population stratification in case-control association studies of admixed populations*. Genet Epidemiol, 2004. **27**(1): p. 14-20.
86. Peters, H.C., et al., *Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy*. Neurogenetics, 1998. **2**(1): p. 47-54.
87. Johnson, M.M., J. Houck, and C. Chen, *Screening for deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in genes involved in steroid hormone metabolism and response*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(5): p. 1326-9.
88. Chukkapalli, G., C. Guda, and S. Subramaniam, *SledgeHMMER: a web server for batch searching the Pfam database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W542-4.
89. Bateman, A., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D138-41.

90. Furtinger, S., et al., *Increased expression of gamma-aminobutyric acid type B receptors in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy*. *Neurosci Lett*, 2003. **352**(2): p. 141-5.
91. Martin, S.C., et al., *Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons*. *J Comp Neurol*, 2004. **473**(1): p. 16-29.
92. Lopez-Bendito, G., et al., *Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development*. *Eur J Neurosci*, 2002. **15**(11): p. 1766-78.
93. Andermann, F., E. Kobayashi, and E. Andermann, *Genetic focal epilepsies: state of the art and paths to the future*. *Epilepsia*, 2005. **46 Suppl 10**: p. 61-7.
94. Kanemoto, K., et al., *Increased frequency of interleukin-1beta-511T allele in patients with temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, and prolonged febrile convulsion*. *Epilepsia*, 2003. **44**(6): p. 796-9.
95. Mitchell, L.A., et al., *Cognitive consequences of coexisting temporal lobe developmental malformations and hippocampal sclerosis*. *Neurology*, 2000. **54**(12): p. 2356.
96. Buono, R.J., et al., *Lack of association between an interleukin 1 beta (IL-1beta) gene variation and refractory temporal lobe epilepsy*. *Epilepsia*, 2001. **42**(6): p. 782-4.
97. Ulloor, J., et al., *Spontaneous REM Sleep Is Modulated By the Activation of the Pedunculopontine Tegmental GABAB Receptors in the Freely Moving Rat*. *J Neurophysiol*, 2004. **91**(4): p. 1822-1831.