

EL ALELO $\epsilon 4$ DE LA APOLIPOPROTEÍNA E MODIFICARÍA EL "PERÍODO SILENTE"
DEL DESARROLLO DE LA EPILEPSIA MESIAL TEMPORAL
CON ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO

MARCELO ANDRÉS KAUFFMAN¹, DAMIÁN CONSALVO², DOLORES GONZALEZ-MORON³, VIRGINIA PUJOL³,
PATRICIASOLÍS², SILVIA ODDO², CAROLINA LOMLOMDJIAN², SILVIA KOCHEN²

¹Consultorio de Neurogenética. Centro de Epilepsia. División Neurología. Hospital Ramos Mejía. UBA. CONICET. Laboratorio de Neurogenética. Servicio de Neurología. Sanatorio V. Franchín; ²Centro de Epilepsia. División Neurología. Hospital Ramos Mejía. UBA. CONICET. ³Residencia de Neurología. División Neurología. Hospital Ramos Mejía.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

El estudio fue financiado con Becas de Postgrado Conicet y UBA, subsidio UBACYT.

Resumen *Introducción:* El gen de la apolipoproteína E (ApoE) presenta polimorfismos en su secuencia codificante que modulan distintos mecanismos de regeneración neuronal. La epilepsia mesial temporal con esclerosis del hipocampo (EMT-EH) frecuentemente se desarrolla años después de una injuria cerebral, habiéndose sucedido fenómenos plásticos neuro-regenerativos potencialmente epileptogénicos durante este intervalo denominado «período silente». Estudios previos han sido controversiales en cuanto al rol de esta variante genética en la EMT-EH. En particular, podría modificar la edad de comienzo de la patología. *Objetivos:* Nuestro objetivo fue explorar en mayor profundidad el rol de la variación genética de ApoE en el intervalo silente de la epileptogénesis de la EMT-EH. *Pacientes y Métodos:* Se realizó un estudio de epidemiología molecular que incluyó 78 pacientes con EMT-EH, investigando el efecto del polimorfismo sobre la edad de comienzo de la patología. La genotipificación fue hecha mediante PCR-RFLP. Se realizó un análisis limitado a nuestra población y un meta-análisis de la evidencia acumulada incluyendo nuestros datos (574 pacientes en total). *Resultados:* En nuestra población, los sujetos portadores de la variante ApoE E4 evidenciaron una tendencia a comenzar sus crisis a más temprana edad. En el meta-análisis se confirmó esta tendencia, aquellos sujetos portadores de la variante ApoE $\epsilon 4$ comienzan sus crisis casi 4 años antes que los sujetos portadores de las isoformas 2 y 3 de ApoE ($p=0,005$). *Conclusión:* ApoE $\epsilon 4$ es un factor genético que modifica la edad de comienzo de la EMT-EH, pudiendo estar implicado en los procesos epileptogénicos que se suceden en el período silente del desarrollo de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo.

Palabras clave: Epilepsia del Lóbulo Temporal, Esclerosis del Hipocampo, ApoE $\epsilon 4$, Genética.

Abstract *ApoE $\epsilon 4$ might modify the silent interval of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.* *Background:* ApoE has a role in the maintenance and repair of neurons, but its three isoforms have different efficiency for these tasks. MTE-HS typically begins many years after an early cerebral insult. During this so called "silent interval" different epileptogenic processes occur that might involve the damage and repairing of neurons. Previous studies have evaluated the role of ApoE variants as modifiers of the clinical features of MTE-HS, but the results obtained have been controversial so far. Specifically, ApoE $\epsilon 4$ isoform might modulate the epileptic syndrome age of onset, suggesting a shorter "silent interval". *Aims:* Our aim was to explore the role of Apolipoprotein E (ApoE) $\epsilon 4$ isoform as a modifier of the "silent interval" of Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (MTE-HS) development. *Patients and Methods:* We included a population of 78 MTE-HS patients in a molecular epidemiology study that investigated the effect of ApoE $\epsilon 4$ in the syndrome age of onset. Genotyping was done by a PCR-RFLP assay. In order to better estimate the role of this variant as a modifier of this clinical feature, we performed a systematic review of the literature, incorporating into a meta-analysis our results along data available (6 studies; 574 patients) in published studies that have investigated the role of ApoE $\epsilon 4$ in Temporal lobe epilepsy (TLE). *Results:* In our population, ApoE $\epsilon 4$ carriers showed a trend to begin their epilepsy at a shorter age than non-carriers. The meta-analysis confirmed this trend, where ApoE $\epsilon 4$ carriers had an onset of habitual seizures almost 4 years earlier than non-carriers (mean difference 3.7 years; CI 95% 1.66-5.74; $p=0.0001$). *Conclusions:* ApoE $\epsilon 4$ is a genetic modifier of the age of onset of MTE-HS syndrome, that might have a role in the epileptogenic processes that occur during the «silent interval» of this pathology development.

Key words: Temporal Lobe Epilepsy, Hippocampal Sclerosis, ApoE, Genetics.

Introducción

Hace 127 años, Gowers reconoció por primera vez la existencia de un intervalo libre o silente entre la ocurrencia de una injuria cerebral y el comienzo posterior de una epilepsia sintomática¹. Durante este período suceden cambios estructurales y funcionales dinámicos que progresivamente resultan en la aparición clínica de la epilepsia^{2, 3}. El síndrome de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo (EMT-EH) resulta paradigmático de estos procesos, donde al frecuente antecedente de una injuria cerebral temprana, convulsión febril más frecuentemente, le sucede años después la aparición de las crisis comiciales espontáneas⁴. La variación existente en la edad de comienzo de la epilepsia, en este síndrome, puede estar influida por distintos factores genéticos⁵.

La apolipoproteína E (ApoE) es una proteína transportadora de lípidos que actúa como ligando del receptor para lipoproteínas de baja densidad. Además, juega un rol en los mecanismos de reparación y mantenimiento de las membranas celulares del sistema nervioso central y periférico⁶. El gen codificante de ApoE es polimórfico. Dos polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus iniciales en inglés), resultando en respectivos cambios de aminoácidos en las posiciones 112 y 158, dan lugar a tres variantes de la proteína: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ ⁷. El alelo $\epsilon 4$ provoca cambios estructurales en la conformación proteica que se traducen en la facilitación de distintos procesos involucrados en fenómenos neurodegenerativos⁸. Además de ser un factor de susceptibilidad reconocido para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer⁹ y otros procesos patológicos del sistema nervioso central¹⁰, podría tener un rol modificador de las características clínicas de la EMT-EH¹¹. Distintos grupos investigaron el impacto de este alelo en la edad de comienzo de la epilepsia del lóbulo temporal arribando a resultados opuestos¹². En consecuencia, aún resulta controversial su rol al respecto.

Es un hecho habitual la observación de hallazgos aparentemente contradictorios en estudios de epidemiología genética¹³. Varias son las razones que se han esgrimido para explicar esta situación¹⁴. El desarrollo de estudios de meta-análisis permite superar alguna de las dificultades inherentes a la investigación de factores genéticos en enfermedades de herencia compleja, como ser la falta de potencia estadística suficiente para detectar efectos que muy frecuentemente son de pequeña magnitud^{15, 16}.

Con el objetivo de explorar en mayor profundidad el rol de la variación genética de ApoE en el intervalo silente de la epileptogenesis de la EMT-EH, desarrollamos un estudio de epidemiología molecular, junto a una revisión sistemática y un meta-análisis de los otros estudios que han investigado sobre este tópico.

Pacientes y Métodos

Sujetos Participantes

El presente estudio incluyó 78 pacientes con diagnóstico de ETM-EH consecutivamente atendidos en el Centro de Referencia en Epilepsia del Hospital Ramos Mejía de Buenos Aires, Argentina. La población analizada forma parte de un grupo de 130 pacientes con diagnóstico de EMT-EH incluido en un estudio de investigación de los factores genéticos en la epilepsia entre Agosto del 2003 y Julio del 2005. Un consentimiento informado, aprobado previamente por la Comisión de bioética del Hospital Ramos Mejía, fue tomado a cada uno de ellos antes de su inclusión. El diagnóstico de EMT-EH fue hecho en base a las características semiológicas clínicas de las crisis según lo relatado por el paciente o testigos, en base a los hallazgos electrofisiológicos (EEG de superficie en todos y VideoEEG en alguno de ellos) y en base a los hallazgos de las Imágenes por Resonancia Magnética (IRM). Las IRM fueron realizadas de acuerdo a un protocolo de optimización para la detección de Esclerosis del Hipocampo (EH) que incluyó adquisición volumétrica, T2, FLAIR e IR coronales y axiales, paralelos y perpendiculares al eje mayor del hipocampo. Sólo aquellos pacientes que cumplían completamente el diagnóstico de EMT-EH (clínica-EEG + IRM) fueron incluidos. Se recabaron las siguientes características: edad y sexo; edad de inicio de la epilepsia, historia familiar para epilepsia y/o convulsiones febriles, antecedentes de convulsiones febriles.

Análisis Genético. Genotipificación de las isoformas de ApoE

A todos los sujetos participantes se les extrajo 10 ml. de sangre venosa mediante venopuntura. Se purificó ADN genómico total mediante la utilización del kit *FLEXIGENE*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Germany).

Este ADN se diluyó en una solución compuesta por 20 mM Tris-HCL (pH 8,8), 50 mM KCL, 1,5 mM Cl_2Mg , dNTPs a 0,2 mM cada uno, 50 pM de cada primer y 1,2 U de Taq polimerasa en un volumen final de 40 μ l. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento de 227 pares de bases flanqueante de los dos polimorfismos de nucleótido único de ApoE que determinan las 3 isoformas de la proteína (ApoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 30 s a 95 °C, 45 s a 65 °C y 45 s a 72 °C por 35 ciclos. Se utilizó el siguiente par de primers: 5-TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CCA y 5-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A.

Posteriormente, el producto de la amplificación fue sometido a dos reacciones de restricción separadas utilizando a las enzimas Afl III y a Hae II (New England Biolabs). Afl III digiere los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ en fragmentos de 177 y 50 pares de bases sin hidrolizar $\epsilon 4$, mientras que Hae II digiere los alelos $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ en fragmentos de 195 y 32 pares de bases, sin hidrolizar a $\epsilon 2$. Los productos de las digestiones se resolvieron mediante una corrida electroforética en Agarosa al 2,5% y visualización mediante tinción con Bromuro de Etidio bajo luz ultravioleta. De esta forma, fue posible identificar las 3 isoformas polimórficas del gen correspondientes a los 6 genotipos posibles. Para el análisis se dicotomizó la variable genotipo entre aquellos que incluyen la variante $\epsilon 4$ ($\epsilon 2\epsilon 4$; $\epsilon 3\epsilon 4$ y $\epsilon 4\epsilon 4$) y los que no la incluyen ($\epsilon 2\epsilon 2$; $\epsilon 3\epsilon 3$ y $\epsilon 2\epsilon 3$).

Análisis Estadístico

La presencia de la isoforma $\epsilon 4$ permitió dividir la muestra de pacientes en dos grupos, es decir portadores o no de esta isoforma. Para comparar las medianas de las edades de comienzo entre ambos grupos de pacientes se realizó una prueba de Mann Whitney, mientras que para comparar las variables categóricas se realizó prueba de X^2 . Se estableció un nivel de significancia bilateral en 0,05. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue probado con test exacto. Se utilizó como herramienta informática el paquete STATA versión 9. El Análisis Estadístico empleado en el meta-análisis es descrito en el apartado específico a ésta técnica que se detalla abajo.

Meta-Análisis

Se identificaron estudios que hayan investigado el rol de la variación genética de ApoE en la epilepsia del lóbulo temporal mediante una búsqueda en las bases de datos PUBMED y EpiGad junto a la revisión individual de las referencias de los estudios incluidos. La estrategia de búsqueda utilizada fue («Temporal Lobe Epilepsy» OR «Seizure») AND («Apolipoprotein E» OR «ApoE») con fecha 25 de Julio de 2008. Como criterio de inclusión se aceptó a todo trabajo que reportara resultados sobre la influencia de las variantes genéticas $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ de ApoE, sin importar el idioma de publicación, en la edad de comienzo de la epilepsia de una población de pacientes con ELT. De los trabajos incluidos, se extrajo la siguiente información: Año de publicación, nacionalidad de los sujetos, número de pacientes, frecuencias genotípicas, media de la edad de comienzo de la epilepsia en grupos de pacientes definidos según la presencia del alelo $\epsilon 4$ y sus medidas de dispersión. Se examinó la calidad de los estudios incluidos mediante una escala modificada de Thakkinian y col.¹⁷ (ver Anexo 1). Las mencionadas tablas fueron importadas en el paquete estadístico STATA 9 y utilizando el comando «*metan*»¹⁸ se calculó el efecto del genotipo sobre la edad de comienzo de la epilepsia determinando la diferencia estandarizada de las medias y las diferencias absolutas mediante el método de la varianza inversa con efecto fijo y el estadístico de Cohen. Se investigó heterogeneidad entre los estudios mediante prueba de Cochran y sesgo de publicación mediante pruebas de Begg-Matzumdar y de Egger.

Resultados

Influencia de ApoE $\epsilon 4$ sobre la edad de comienzo de la epilepsia en Nuestra Población

La distribución de los genotipos fue consistente con lo típicamente esperado en la población general, ajustándose al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,14$).

La distribución de los genotipos de las variantes polimórficas del gen codificante de ApoE se resume en la tabla 1. En consecuencia, 23 pacientes son portadores de al menos una copia del alelo $\epsilon 4$.

Aunque sin ser significativa la diferencia, los pacientes con el alelo $\epsilon 4$ tuvieron, en promedio, una edad de comienzo de su epilepsia menor que la de los sujetos no portadores (portadores del alelo $\epsilon 4$, edad media de comienzo: 14,3 años \pm 12,13 y no portadores, edad media de comienzo: 16,5 años \pm 12,54; $p=0,48$). Ver Tabla 2.

Tabla 1.– Distribución genotípica en nuestra población de pacientes con EMT-EH

Genotipos ApoE	Pacientes EMT-EH, n(%)
$\epsilon 2\epsilon 2$	0 (0)
$\epsilon 2\epsilon 3$	4 (5,1)
$\epsilon 2\epsilon 4$	4 (5,1)
$\epsilon 3\epsilon 3$	51 (65,4)
$\epsilon 3\epsilon 4$	17 (21,8)
$\epsilon 4\epsilon 4$	2 (2,6)

No hubo diferencias estadísticamente significativas en las restantes variables analizadas. Es decir, el antecedente de convulsiones febriles en la infancia o de historia familiar positiva para epilepsia fue similar para ambos grupos de pacientes. Ver Tabla 2.

Meta-Análisis

La estrategia de búsqueda arrojó 48.863 artículos, de los cuales 11 respondían a la combinación de la patología con el gen investigado. Tres reportes fueron excluidos porque no investigaron el impacto de la variación en ApoE sobre la presentación clínica de la epilepsia del lóbulo temporal¹⁹⁻²¹. Otros dos trabajos no fueron incluidos porque presentaban incompleta la información concerniente a la edad de comienzo de la epilepsia. En uno de ellos²², no era presentada la medida de dispersión y en el otro se mencionaba que las diferencias en las edades de comienzo no fueron significativas sin mostrarse las figuras respectivas para cada grupo de pacientes²³. Otro estudio comprendía a la misma población que un reporte más reciente del mismo autor²⁴. Finalmente se tomaron para el análisis cinco estudios^{11, 12, 25-27} que cumplían con los criterios establecidos arriba que, junto a los resultados obtenidos en nuestra población, incluyó datos provenientes de 574 pacientes. Los diferentes estudios fueron hechos en poblaciones provenientes de Turquía, Estados Unidos, Italia, Australia y Gran Bretaña. Las características de los estudios incluidos, así como las frecuencias genotípicas y las edades medias de comienzo de la epilepsia de los pacientes analizados son resumidas en la Tabla 3.

No hubo heterogeneidad entre los estudios investigados ($p=0,32$). La calidad de los trabajos analizados fue heterogénea (3-7). El análisis de los distintos trabajos incluidos muestra que aquellos sujetos que son portadores de al menos una copia del alelo $\epsilon 4$ tienen, en prome-

Tabla 2.- Variables analizadas en nuestra población de pacientes.

	ApoE4 (n=23)	no ApoE4 (n=55)	p
Edad, media \pm DS	38,5 \pm 9,9	38,7 \pm 11,1	
mediana, (1 y 3 cuartil)	37 (32-47)	37,5 (32-47,25)	0,79*
Sexo, F n (%)	14 (60,8)	28 (50,9)	0,42**
Edad Inicio Epi, media \pm DS	14,3 \pm 12,13	16,5 \pm 12,5	
mediana, (1 y 3 cuartil)	9 (4-20)	15 (6-26)	0,48*
Historia Familiar Positiva, n (%)	2 (8,7)	4 (7,3)	0,83**
Conv Febriles, n (%)	5 (21,7)	19 (34,5)	0,26**

n: Número de Pacientes, DS: Desvío Standard F Femenino, * Prueba de Mann Whitney, ** Prueba de X²

Tabla 3.- Características de los estudios incluidos en el meta-análisis.

Autor	País	Año	ApoE4 n	apo4 EMIE A (DS)	no ApoE4 n	no ApoE4 EMIE A (DS)	Calidad
Briellmann ¹¹	Australia	2000	10	5 (5)	33	14.9 (10)	4
Yeni ²⁶	Turquia	2004	8	7.44 (6,13)	39	8.75 (7,61)	3
Gambardella ²⁷	Italia	2005	24	26.2 (20,1)	114	33.9 (20,7)	6
Cavalleri ¹²	Inglaterra	2005	30	13.7 (10)	151	16.7 (11)	6
Busch ²⁵	EEUU	2007	22	13.82 (9,29)	65	14.26 (10,13)	5
Kauffman	Argentina	2008	23	14.3 (12,13)	55	16.5 (12,54)	7

n: Número de Pacientes portadores de ApoE4 o Número de Pacientes portadores de los alelos E2y E3, DS: Desvío Standard, EMIE: Edad Media de Inicio de la Epilepsia, A: Años.

dio, una edad de comienzo de su epilepsia casi 4 años menor que aquellos que no portan este alelo (diferencia de medias 3,7 años; IC 95% 1,66-5,74; p=0,0001; diferencia estandarizada de medias -0,29; IC 95% -0,08 ~ -0,49; p=0,005) (ver Figura 1). Para evaluar la robustez de este hallazgo se realizaron dos análisis de sensibilidad. La exclusión del estudio más influyente y con mayor diferencia en las edades medias de comienzo entre grupos no modificó el impacto de la variante genética sobre la edad de inicio del trastorno, aunque disminuyó en más de un año el estimado de la diferencia (diferencia de medias 2,2 años, p=0,03). Por otro lado, la inclusión de los dos trabajos excluidos por datos insuficientes, asumiendo en un caso una dispersión igual a la media de las dispersiones reportadas en los otros trabajos y en el otro, iguales edades medias para ambos grupos de pacientes, tampoco modificó el impacto de la variante genética (p=0,018).

No se evidenció sesgo de publicación. (Prueba de Begg, p=0,7 y prueba de Egger, p=0,69)

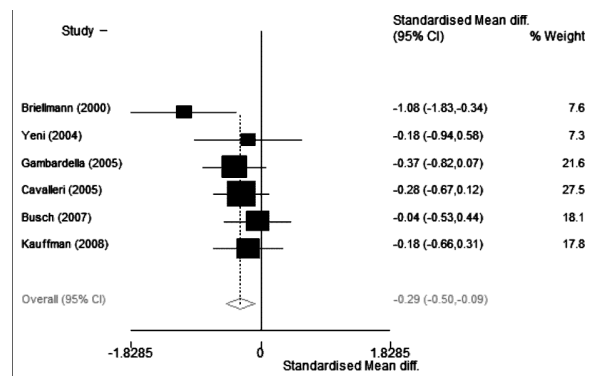


Fig. 1.- Forest Plot de los trabajos incluidos en el Meta-Análisis

Discusión

El presente estudio permitió demostrar que, en promedio, los pacientes portadores de al menos una copia del alelo ϵ 4 del gen ApoE tienen un comienzo de su epilepsia

sia cuatro años más temprano que los pacientes portadores de las otras dos variantes alélicas. Este hallazgo coincide con lo originalmente reportado por Briellmann y colaboradores¹¹. En cambio, los resultados obtenidos por diferentes investigadores, así como el análisis de las observaciones efectuadas en nuestra población parecen ser opuestos a lo originalmente reportado. Esta aparente contradicción es muy frecuentemente encontrada en la investigación de los factores genéticos implicados en el desarrollo de enfermedades con herencia compleja como podría ser la epilepsia del lóbulo temporal¹⁴. Estas discrepancias podrían obedecer a diferencias en las poblaciones estudiadas, dificultades en la definición del fenotipo investigado, o a falta de potencia estadística suficiente para detectar efectos de pequeña magnitud. Es postulado que aquellas variantes genéticas con una prevalencia poblacional mayor al 10% sólo conferirían un riesgo de pequeña magnitud para el desarrollo de patologías relativamente frecuentes en la población²⁸, requiriéndose en consecuencia investigar un gran número de sujetos para poder detectar esta contribución. En efecto, la evidencia acumulada en este tópico particular durante los últimos años es coincidente, en el sentido que, en todas las poblaciones investigadas, la edad media de comienzo de la epilepsia es menor en aquellos sujetos portadores del alelo $\epsilon 4$ que en los portadores de las otras dos variantes alélicas. De este modo, la combinación de los estudios en un meta-análisis, tal como actualmente es recomendado²⁹, bien pudo demostrar el efecto modulador de la variación genética de ApoE sobre la edad de comienzo de la patología.

Aún no es claro si la esclerosis del hipocampo es causa o consecuencia de las crisis del lóbulo temporal experimentadas por los pacientes afectados con este síndrome⁴. Una de las hipótesis investigadas postula que convulsiones febriles en la infancia provocan un daño progresivo en el hipocampo que resulta años después en la aparición clínica de la epilepsia^{30, 31}. Durante este período «silente» se sucedería una reorganización sináptica del hipocampo que terminaría en la generación de redes neuronales epileptogénicas³². Ha sido observado que este período silente es variable en los diferentes pacientes con EMT-EH, pudiendo asociarse esta variabilidad con la presencia de antecedentes familiares para desórdenes convulsivos⁵. En consecuencia factores genéticos podrían modificar los fenómenos de plasticidad neuronal involucrados en la epileptogénesis de este trastorno. En este sentido, ApoE influiría los mecanismos de respuesta astrogliar que suceden al daño neuronal resultando el déficit de función de esta proteína en procesos re-inervatorios anómalos³³.

La ApoE resulta ser un candidato biológicamente plausible a estar implicado también en la modulación de los fenómenos de regeneración neuronal involucrados en la fisiopatología del síndrome en estudio. Las tres isoformas

de ApoE dependen del cambio de tan sólo dos aminoácidos en las posiciones 112 y 158. La presencia de arginina en la posición 112 define a la isoforma ApoE $\epsilon 4$ ⁷. Este residuo es crítico tanto, para las interacciones de dominio de la proteína como para su estabilidad conformacional⁶. Estos cambios disfuncionales tornan a esta isoforma facilitadora de procesos neurodegenerativos como ser, la disrupción del citoesqueleto neuronal³⁴, el aumento en los depósitos de proteína β amiloide³⁵ y la potenciación de la apoptosis³⁶. Estos tres procesos fueron implicados en la EMT-EH. Un 55% de los hipocampos de pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico de su epilepsia mostró anomalías en el citoesqueleto de las células hiliares³⁷. Un aumento en el depósito de amiloide fue observado en piezas quirúrgicas de pacientes con EMT-EH portadores del alelo $\epsilon 4$ de ApoE²⁰. Una expresión incrementada de los marcadores de la apoptosis p-53, caspasa-3 y FAS fue encontrado en los hipocampos de pacientes con EMT-EH³⁸. Finalmente, distintas moléculas³⁹ están siendo evaluadas como tratamiento de los efectos perniciosos de la portación del alelo $\epsilon 4$ por lo que esta proteína podría resultar un blanco terapéutico interesante a ser explorado como una alternativa neuroprotectora o preventiva del desarrollo de la epilepsia del lóbulo temporal.

Entre las limitaciones del trabajo debe mencionarse que la muestra analizada es relativamente pequeña, que la calidad de los trabajos es heterogénea con fallas en un apropiado reporte de las características de los pacientes incluidos en alguno de ellos. Además, dado que variables como edad, género y etnicidad que podrían actuar como confundidores en el análisis no fueron completamente analizadas por los diferentes autores, estudios futuros con un mejor diseño son necesarios para confirmar estos hallazgos en poblaciones más seleccionadas. Sin embargo, las consistencias observadas del efecto de la variación genética en ApoE sobre la edad de comienzo de la epilepsia en los distintos análisis de sensibilidad efectuados y la plausibilidad biológica del polimorfismo investigado son una prueba de robustez de nuestros resultados.

En conclusión, la isoforma ApoE $\epsilon 4$ es un factor genético que podría estar implicado en los procesos epileptogénicos que se suceden en el período silente del desarrollo de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo.

Bibliografía

1. Gowers, W., *Epilepsy and Other Convulsive Diseases*. . 1881, London: J. & A. Churchill, New Burlington Street. 350.
2. Tani, H., A.E. Bandrowski, I. Parada, M. Wynn, J.R. Huguenard, D.A. Prince, et al., Modulation of epileptiform activity by glutamine and system A transport in a model of post-traumatic epilepsy. *Neurobiol Dis*, 2007. 25(2): 230-8.

3. Statler, K.D., Pediatric posttraumatic seizures: epidemiology, putative mechanisms of epileptogenesis and promising investigational progress. *Dev Neurosci*, 2006. 28 (4-5): 354-63.
4. Berg, A.T., The natural history of mesial temporal lobe epilepsy. *Curr Opin Neurol*, 2008. 21(2): 173-8.
5. Janszky, J., I. Janszky, and A. Ebner, Age at onset in mesial temporal lobe epilepsy with a history of febrile seizures. *Neurology*, 2004. 63(7): 1296-8.
6. Mahley, R.W., K.H. Weisgraber, and Y. Huang, Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103 (15): 5644-51.
7. Mahley, R.W., Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988. 240 (4852): 622-30.
8. Morrow, J.A., M.L. Segall, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, M. Knapp, B. Rupp, et al., Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain. *Biochemistry*, 2000. 39 (38): 11657-66.
9. Strittmatter, W.J., A.M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G.S. Salvesen, et al., Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90 (5): 1977-81.
10. Moulard, B., A. Sefiani, A. Laamri, A. Malafosse, and W. Camu, Apolipoprotein E genotyping in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: evidence for a major influence on the clinical presentation and prognosis. *J Neurol Sci*, 1996. 139 Suppl: 34-7.
11. Briellmann, R.S., Y. Torn-Broers, B.E. Busuttill, B.J. Major, R.M. Kalnins, M. Olsen, et al., APOE epsilon4 genotype is associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 2000. 55(3): 435-7.
12. Cavalleri, G.L., J.M. Lynch, C. Depondt, M.W. Burley, N.W. Wood, S.M. Sisodiya, et al., Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here? *Brain*, 2005. 128 (Pt 8): 1832-40.
13. Colhoun, H.M., P.M. McKeigue, and G. Davey Smith, Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*, 2003. 361(9360): 865-72.
14. Hattersley, A.T. and M.I. McCarthy, What makes a good genetic association study? *Lancet*, 2005. 366 (9493): 1315-23.
15. Tan, N.C., J.C. Mulley, and I.E. Scheffer, Genetic dissection of the common epilepsies. *Curr Opin Neurol*, 2006. 19 (2): 157-63.
16. Munafò, M.R., Candidate gene studies in the 21st century: meta-analysis, mediation, moderation. *Genes Brain Behav*, 2006. 5 Suppl 1: 3-8.
17. Thakkinstian, A., C. D'Este, J. Eisman, T. Nguyen, and J. Attia, Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res*, 2004. 19 (3): 419-28.
18. Bradburn, M., Deeks, and Altman, metan - an alternative meta-analysis command. *Stata Technical Bulletin*, 1998. 8: 86-100.
19. Schiefermeier, M., H. Kollegger, C. Madl, C. Polli, W. Oder, H. Kuhn, et al., The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease. *Brain*, 2000. 123 Pt 3: 585-90.
20. Gouras, G.K., N.R. Relkin, D. Sweeney, D.G. Munoz, I.R. Mackenzie, and S. Gandy, Increased apolipoprotein E epsilon 4 in epilepsy with senile plaques. *Ann Neurol*, 1997. 41(3): 402-4.
21. Correa, D.D., L.M. DeAngelis, W. Shi, H.T. Thaler, M. Lin, and L.E. Abrey, Cognitive functions in low-grade gliomas: disease and treatment effects. *J Neurooncol*, 2007. 81(2): 175-84.
22. Blumcke, I., A. Brockhaus, C. Scheiwe, B. Rollbrocker, H.K. Wolf, C.E. Elger, et al., The apolipoprotein E epsilon 4 allele is not associated with early onset temporal lobe epilepsy. *Neuroreport*, 1997. 8 (5): 1235-7.
23. Kumar, A., M. Tripathi, R.M. Pandey, L. Ramakrishnan, M. Srinivas, and K. Luthra, Apolipoprotein E in temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Dis Markers*, 2006. 22 (5-6): 335-42.
24. Gambardella, A., U. Aguglia, R. Cittadella, N. Romeo, G. Sibilia, E. LePiane, et al., Apolipoprotein E polymorphisms and the risk of nonlesional temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 1999. 40 (12): 1804-7.
25. Busch, R.M., T.T. Lineweaver, R.I. Naugle, K.H. Kim, Y. Gong, C.Q. Tilelli, et al., ApoE-epsilon4 is associated with reduced memory in long-standing intractable temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 2007. 68 (6): 409-14.
26. Yeni, S.N., C. Ozkara, N. Buyru, O. Baykara, L. Hanoglu, N. Karaagac, et al., Association between APOE polymorphisms and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Eur J Neurol*, 2005. 12(2): 103-7.
27. Gambardella, A., U. Aguglia, R. Chifari, A. Labate, I. Manna, P. Serra, et al., ApoE epsilon4 allele and disease duration affect verbal learning in mild temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2005; 46 (1): 110-7.
28. Zondervan, K.T. and L.R. Cardon, The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet*, 2004; 5 (2): 89-100.
29. Lin, B.K., M. Clyne, M. Walsh, O. Gomez, W. Yu, M. Gwinn, et al., Tracking the epidemiology of human genes in the literature: the HuGE Published Literature database. *Am J Epidemiol*, 2006; 164 (1): 1-4.
30. Cendes, F., F. Andermann, F. Dubeau, P. Gloor, A. Evans, M. Jones-Gotman, et al., Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology*, 1993; 43 (6): 1083-7.
31. Shinnar, S., D.C. Hesdorffer, D.R. Nordli, Jr., J.M. Pellock, C. O'Dell, D.V. Lewis, et al., Phenomenology of prolonged febrile seizures: results of the FEBSTAT study. *Neurology*, 2008; 71 (3): 170-6.
32. D'Alessio, L., J.J. Lopez-Costa, H. Konopka, D. Consalvo, E. Seoane, M.E. Lopez, et al., NADPH diaphorase reactive neurons in temporal lobe cortex of patients with intractable epilepsy and hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res*, 2007; 74 (2-3): 228-31.
33. Champagne, D., J. Rochford, and J. Poirier, Effect of apolipoprotein E deficiency on reactive sprouting in the dentate gyrus of the hippocampus following entorhinal cortex lesion: role of the astroglial response. *Exp Neurol*, 2005; 194 (1): 31-42.
34. Nathan, B.P., S. Bellosta, D.A. Sanan, K.H. Weisgraber, R.W. Mahley, and R.E. Pitas, Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, 1994; 264 (5160): 850-2.
35. Holtzman, D.M., K.R. Bales, T. Tenkova, A.M. Fagan, M. Parsadanian, L.J. Sartorius, et al., Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97 (6): 2892-7.
36. Ji, Z.S., R.D. Miranda, Y.M. Newhouse, K.H. Weisgraber, Y. Huang, and R.W. Mahley, Apolipoprotein E4 poten-

- tiates amyloid beta peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells. *J Biol Chem*, 2002; 277 (24): 21821-8.
37. Thom, M., S.M. Sisodiya, A. Beckett, L. Martinian, W.R. Lin, W. Harkness, et al., Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002; 61 (6): 510-9.
38. Xu, S., Q. Pang, Y. Liu, W. Shang, G. Zhai, and M. Ge, Neuronal apoptosis in the resected sclerotic hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurosci*, 2007; 14 (9): 835-40.
39. Ye, S., Y. Huang, K. Mullendorff, L. Dong, G. Giedt, E.C. Meng, et al., Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102 (51): 18700-5.

Anexo 1. Escala de Valoración de Calidad de Estudios Incluidos en el Meta-Análisis

1. Representatividad de casos

- Casos seleccionados consecutivamente o aleatoria-mente de la población de una manera explícitamente especificada en el artículo.
- Casos seleccionados consecutivamente o aleatoria-mente de la población sin una manera explícitamente especificada en el artículo o con criterios de inclusión y exclusión muy restrictivos.
- No hay método de selección especificado.

2. Diagnóstico de Convulsiones Febriles o de Epilepsia del Lóbulo Temporal

- Claramente especificados los criterios diagnósticos para definir una convulsión febril o epilepsia del lóbulo temporal.
- No especificados

3. Procedimiento de Genotipificación

- Se realizó «ciego» para datos clínicos
- No ciego o no especificado

4. Equilibrio de Hardy Weimberg

- Casos en equilibrio de Hardy Weimberg
- Casos en desequilibrio de Hardy Weimberg
- No se realizó la prueba

5. Tratamiento estadístico

- Se utilizó tratamiento estadístico adecuado (por ejemplo, se corrigió por comparaciones múltiples)
- No se utilizó tratamiento estadístico adecuado

Items 1-4

- a-2 puntos
- b-1 punto
- c-0 puntos

Items 2-3-5

- a-1 punto
- b-0 puntos