

ASOCIACIÓN ENTRE ALELOS TRANSCRIPCIONALMENTE DEFICIENTES DEL GEN DE LA PRODINORFINA Y EL DESARROLLO DE EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

MARCELO ANDRÉS KAUFFMAN¹, DAMIÁN CONSALVO², DOLORES GONZALEZ-MORON³, SILVIA KOCHEN²

Este trabajo ha sido galardonado con el premio "J. M. Ramos Mejía" otorgado en el XLIII Congreso Argentino de Neurología - Mar del Plata 2006.

¹Consultorio de Neurogenética. Centro de Epilepsia. División Neurología. Hospital Ramos Mejía. UBA. CONICET;

²Centro de Epilepsia. División Neurología. Hospital Ramos Mejía. UBA. CONICET; ³Residencia de Neurología. División Neurología. Hospital Ramos Mejía.

Resumen *Introducción:* Factores genéticos serían importantes en el desarrollo de la Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT). La Prodinorfina (PDYN) participaría en el hipocampo en mecanismos regulatorios de la sincronía neuronal. El promotor del gen PDYN exhibe un polimorfismo funcional de repetición, donde alelos con más repeticiones (H) presentan una mayor eficiencia transcripcional que los de menos repeticiones (L). Desarrollamos un estudio de asociación en una población de pacientes con ELT mesial con Esclerosis del Hipocampo (EMTEH) y una revisión sistemática de la literatura para investigar el rol de este polimorfismo en la patología. *Materiales y Métodos:* Se incluyeron 102 pacientes con EMTEH y 86 controles sanos no relacionados. Se investigó la presencia de historia familiar de eventos comiciales. Se genotipificó el polimorfismo en el promotor de PDYN mediante PCR. Se compararon frecuencias alélicas y genotípicas mediante prueba de chi cuadrado. Se estimó Odds Ratio (OR) mediante regresión logística. Para el meta-análisis, se identificaron estudios de asociación caso-control entre PDYN y ELT mediante búsqueda en PUBMED. Se extrajeron frecuencias alélicas y genotípicas. Se estimó OR global mediante modelo de efectos fijos bajo herencias dominante y co-dominante. *Resultados:* En nuestra población, la frecuencia genotípica y alélica no fue diferente entre casos y controles ($p=0,61$) ni lo fue en el análisis limitado a ELT con predisposición familiar ($p=0,71$). En el meta-análisis, analizamos 591 pacientes con ELT y 1117 controles sanos. Encontramos asociación del alelo L ($p=0,003$; OR=1,40; IC 95=1,12-1,74) con un riesgo modestamente aumentado a desarrollar ELT en el grupo de pacientes con predisposición familiar. *Conclusiones:* Variantes alélicas funcionales en el promotor de PDYN modificarían el riesgo a desarrollar ELT en sujetos familiarmente predisuestos.

Palabras Claves: Epilepsia, Esclerosis del Hipocampo, Genética, Polimorfismo, Prodinorfina, Meta-Análisis

Summary *Transcriptionally Deficient Prodynorphin Promoter Alleles are Associated with Temporal Lobe Epilepsy (TLE).* Prodynorphin (PDYN) could be involved in regulatory mechanism of neuronal synchrony in the hippocampus. The PDYN gene promoter exhibits a functional repetitive motive polymorphism. High repetition alleles (H) are transcriptionally more efficient than low repetition alleles (L). We performed an association study in a population of patients with Mesial TLE with Hippocampal Sclerosis (MTEHS) and a systematic review of the literature in order to investigate the role of this polymorphism in the disease. *Methods:* 102 MTEHS patients and 86 healthy controls were included. We investigated the antecedent of family history for epileptic events. The PDYN promoter polymorphism was genotyped by means of a PCR assay. We compared allelic and genotypic frequencies using chi square test. We estimated Odds Ratio (OR) by logistic regression. For meta-analysis, we identified case-control association studies between TLE and PDYN searching in PUBMED. We extracted allelic and genotypic frequencies. We estimated pooled OR using a fixed effects model under dominant and co-dominant heredity. *Results:* In our population the genotypic and allelic frequencies were not different between cases and controls ($p=0.61$) neither in the analysis limited to TLE with familial predisposition ($p=0.71$). The Meta-Analysis included 591 TLE patients and 1117 healthy controls. We found an association between L allele ($p=0,003$; OR=1,40; IC 95=1,12-1,74) with a modestly higher risk to develop TLE in the group of patients with familial predisposition. *Conclusions:* Functional allelic variants in the PDYN promoter could modify the risk to develop TLE in subjects familiarly predisposed.

Keywords: Epilepsy, Hippocampal Sclerosis, Genetics, Prodynorphin, Polymorphism, Meta-Analysis

Introducción

La etiología de la Epilepsia del Lóbulo Temporal ha sido ampliamente investigada¹. Si bien, tradicionalmente ha sido considerada un desorden adquirido^{2, 3}, por mucho tiempo se vislumbró la posibilidad que factores genéticos pudieran ser importantes en su génesis y desarrollo⁴. La observación de formas familiares con patrón de herencia monogénico⁵, de antecedentes familiares positivos para convulsiones febriles y/o epilepsia en hasta un 30% de los pacientes⁶ y la identificación de variantes alélicas en seis genes diferentes como factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad han contribuido a la identificación de estos factores⁷⁻¹².

La Prodinorfina (PDYN) pertenece a la familia de proteínas precursoras de péptidos opioides¹³. Alfa y Beta-neoendorfina y Dinorfinas A y B son formadas a partir del clivaje de esta proteína precursora¹⁴. Las dinorfinas son extensamente expresadas en el sistema nervioso central y en particular en el hipocampo¹⁵, como respuesta a descargas epilépticas focales, donde participarían en mecanismos regulatorios tendientes a finalizar la actividad comicial, prevenir la generalización secundaria y el desarrollo de estado de mal epiléptico^{16, 17}.

El promotor del gen de PDYN exhibe un polimorfismo consistente en la presencia de una a cuatro repeticiones de un motivo de 69 pares de bases por bloque repetitivo. En dicho motivo se localiza un sitio de unión para el factor de transcripción AP-1. Los alelos con 3 y 4 repeticiones (alelos H) presentan una mayor eficiencia transcripcional, es decir expresan mayor cantidad de PDYN, que los alelos con 1 y 2 repeticiones (alelos L)¹⁸. Este factor de transcripción sería de importancia en las cascadas genéticas que siguen a la epileptogénesis y a la plasticidad neuronal^{19, 20}. En ese sentido, en un estudio realizado en una población de sujetos con ELT y antecedentes familiares positivos para epilepsia o convulsiones febriles fue observada una asociación entre ser portador de alelos L y presentar un mayor riesgo para desarrollar ELT. La presencia del mencionado alelo también fue asociada con una mayor posibilidad de presentar convulsiones con generalización secundaria y estado de mal epiléptico⁹. Sin embargo, otros tres estudios fallaron en reproducir estos hallazgos²¹⁻²³.

Es un hecho habitual la observación de hallazgos aparentemente contradictorios en estudios de epidemiología genética²⁴. Entre las varias razones que se han esgrimido para explicar esta situación²⁵, se encuentra la frecuente insuficiente potencia estadística para detectar efectos, que habitualmente son de pequeña magnitud^{26, 27}, en el diseño de estos estudios. En consecuencia, el desarrollo de revisiones sistemáticas y la aplicación de un meta-análisis como herramienta de síntesis permite superar alguna de las dificultades inherentes a la investigación de factores genéticos en enfermedades de herencia compleja.

En el presente trabajo investigamos el rol del polimorfismo de repetición en el promotor de PDYN en la ELT mesial con Esclerosis del Hipocampo (EMTEH), como un factor de riesgo para su desarrollo y como un modificador de las características fenotípicas del síndrome. Por otra parte realizamos una revisión sistemática y un meta-análisis de la evidencia disponible sobre este factor genético en la ELT incorporando nuestros resultados al mismo.

Pacientes y Métodos

Sujetos Participantes

El presente estudio incluyó 102 pacientes con diagnóstico de EMTEH asistidos en forma consecutiva en el Centro de Derivación de Epilepsia del Hospital Ramos Mejía de Buenos Aires, Argentina y a 86 controles sanos no relacionados y sin antecedentes comiciales. Los sujetos que participaron como controles eran comparables a los pacientes en lo que respecta a edad, sexo, origen étnico y área de residencia. 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 EMTEH fue hecho en base al relato histórico del paciente y/o familiar de las características semiológicas de las crisis, en base a los hallazgos electrofisiológicos (EEG de superficie en todos y Video-EEG 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 EMTEH (clínica-EEG + IRM) fueron incluidos. Se registraron para el análisis las siguientes características: edad y sexo; tiempo de evolución de la epilepsia, historia familiar para epilepsia y/o convulsiones febriles, antecedentes de convulsiones febriles; características de síntomas iciales, frecuencia de las crisis, horario de presentación y respuesta al tratamiento farmacológico.

Análisis Genético. Genotipificación del Polimorfismo en el promotor de PDYN

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 Cl₂Mg, 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 µl. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento flanqueante al elemento repetitivo en el promotor de PDYN bajo las siguientes condiciones de amplificación: 30 s a 95 °C, 45 s a 57 °C y 45 s a 72 °C por 35 ciclos. Se utilizó el siguiente par de primers: 5-AGC AAT CAG AGG TTG AAG TTG GCA GC y 5-GCA CCA GGC GGT TAG GTA GAG TTG TC. El producto de la amplificación se resolvió mediante una corrida electroforética en Agarosa al 2% y visualización mediante tinción con Bromuro de Etidio bajo luz ultravioleta. De esta forma, fue posible separar los fragmentos correspondientes a los alelos con 1, 2, 3 y 4 repeticiones del bloque de 68 pares de bases polimórfico (ver figura 1). Para el análisis se consi-

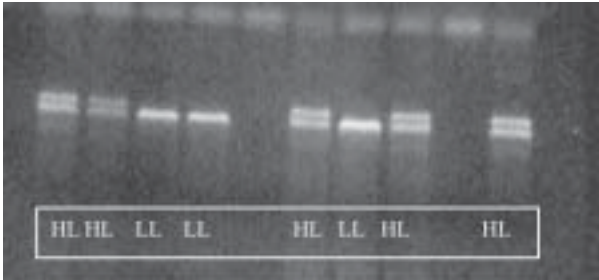


Fig. 1.- Corrida Electroforética en Agarosa al 2% donde se observan sujetos heterocigotas para el alelo L (HL) y homocigotas para L (LL).

deró a los alelos 1 y 2 como de baja actividad (L) y a los alelos 3 y 4 como de alta actividad (H).

Análisis Estadístico

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. El equilibrio de Hardy-Weinberg en controles fue probado con test exacto. Los diferentes factores de riesgo fueron analizados mediante regresión logística univariada (se obtuvieron OR con sus respectivos intervalos de confianza de un 95% de precisión). Todos los cálculos fueron realizados con STATA (StataCorp. 2005. *Stata Statistical Software: Release 9*. College Station, TX: StataCorp LP.) 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 de asociación caso-control entre el polimorfismo de repetición en el promotor de PDYN y la ELT mediante una búsqueda en la base de datos PUBMED y revisión individual de las referencias de los estudios incluidos. La estrategia de búsqueda utilizada fue "Temporal Lobe Epilepsy" OR "Seizure" AND "Prodynorphin" OR "PDYN" con fecha 1 de Agosto de 2006. Como criterio de inclusión se aceptó todo trabajo que reportara resultados sobre la asociación, sin importar el idioma de publicación, en una población de pacientes con ELT y tuviera el diseño de estudio caso-control. De los trabajos incluidos, se extrajo la siguiente información: Año de publicación, nacionalidad de los sujetos, número de casos y controles, frecuencias alélicas y genotípicas, número de pacientes con historia familiar positiva para epilepsia y/o convulsiones febriles, con generalización secundaria frecuente, con presentación de crisis parciales en *cluster*, con historia de estado de mal epiléptico, con antecedentes de convulsiones febriles en la infancia. Se examinó la calidad de los estudios incluidos mediante una escala modificada de Thakkinstian y col.²⁸ (ver anexo 1). Se construyeron tablas de 2x2 para cada estudio reportado y para el nuestro definiendo como exposición a los genotipos que incluían al alelo L y como no exposición a los sujetos homocigotas para el alelo H, con excepción de la comparación entre los homocigotas para L con los heterocigotas para H, en los que éste último genotipo constituía el grupo no expuesto. Las mencionadas tablas fueron importadas en el paquete estadístico STATA (StataCorp. 2005. *Stata Statistical Software: Release 9*. College Station, TX: StataCorp LP.) y utilizando el comando "metan a b c d"²⁹ se calcularon los Odds Ratio de cada estudio individual y el Odds Ratio global mediante

el método de la varianza inversa con efecto fijo y el estadístico de chi cuadrado. Entonces, se realizaron 3 comparaciones (LL vs HL; HL vs HH y LL vs HL) que utilizando la metodología descrita por Mineli y col.³⁰ permitió inferir el mejor modelo de herencia. Definidos los modelos dominante y co-dominantes ($\lambda=0,85$) como los que mejor ajustaban los datos reportados se realizó una nueva comparación entre los genotipos LL+HL vs HH (modelo dominante) y alelo L vs alelo H (modelo co-dominante). Siguiendo igual metodología se calculó también la asociación entre las características clínicas reportadas y el alelo L. Se investigó heterogeneidad entre los estudios mediante prueba de Cochran y sesgo de publicación mediante pruebas de Begg-Matzumdar y de Egger.

Resultados

Estudio de Asociación en Nuestra Población

La distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor del gen codificante de PDYN en pacientes y controles se resume en la Tabla 1. Los genotipos LL, HL y HH fueron encontrados en 9 (8,8%), 40 (39,2%) y 53 (52%) pacientes y en 8 (9,3%), 37 (43%) y 41 (47,7%) controles, respectivamente. En consecuencia, la frecuencia de los genotipos y alelos no fue diferente entre los casos y los controles ($p=0,61$). La distribución genotípica de los controles se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=1$).

El análisis limitado al grupo de pacientes familiarmente predispuestos, es decir aquellos que presentaban antecedentes familiares positivos para Epilepsia y/o convulsiones febriles, tampoco mostró una asociación significativa entre el polimorfismo investigado y el desarrollo de la patología. En efecto, la distribución genotípica consistió en sólo 1 sujeto homocigota para L (genotipo LL) y en 8 heterocigotas para L (genotipo HL) en este grupo de 18 pacientes con historia familiar positiva (Tabla 1).

Se observó una sobre-representación de sujetos con crisis comiciales nocturnas en el grupo de sujetos homocigotas para H. En el análisis de los restantes subgrupos de pacientes en función de sus características fenotípicas no observamos asociación entre ellas y el polimorfismo investigado (Tabla 2).

Meta-Análisis

La estrategia de búsqueda arrojó 33.486 artículos, de los cuales 19 respondían a la combinación de la patología con el gen investigado. Se incluyeron para el análisis 4 estudios que presentaban un diseño de caso-control. En estos estudios y en el nuestro se analizó la asociación entre el polimorfismo en el promotor de PDYN y el desarrollo de ELT en 591 pacientes con diagnóstico de ELT y en 1117 controles sanos. Los diferentes estudios fueron hechos en poblaciones provenientes de Austria, Italia, Estados Unidos y Gran Bretaña. Las características de los estudios incluidos, así como las frecuencias

TABLA 1.– Frecuencias Genotípicas en las poblaciones estudiadas

| Genotipos | EMTEH N=102 (%) | EMTEH HF N=18 (%) | Controles N=86 (%) |
|-------------|--------------------|----------------------|-----------------------|
| LL | 9 (8.8) | 1 (5.5) | 8 (9.3) |
| HL | 40 (39.2) | 8 (44.5) | 37 (43) |
| HH | 53 (52) | 9 (50) | 41 (47.7) |
| OR (95% IC) | 0,89 (0,57-0,38)* | 1,15 (0,52-2,53)* | |
| Valor P | 0,61** | 0,71** | |

EMTEH Epilepsia del Lóbulo Temporal con Esclerosis del Hipocampo

HF Historia Familiar positiva para eventos comiciales

*OR Odds Ratio Crudo

**Prueba de X²

TABLA 2.– Variables Analizadas en pacientes con EMTEH

| VARIABLES | LL+HL N=59 | HH N=52 | Valor de p |
|----------------------------------------------|---------------|------------|------------|
| Hombres, n (%) | 25 | 29 | NS |
| Mujeres n (%) | 24 | 24 | NS |
| Edad de inicio de Epilepsia media en años | 15,02 | 16,69 | NS |
| Historia de Convulsiones Febriles, n (%) | 13 (48,3) | 18 (34,6) | NS |
| Historia Familiar de CF/ Epilepsia, n (%) | 9 (15,2) | 9 (17,3) | NS |
| Estado de mal, n (%) | 8 (13,55) | 14 (26,9) | NS |
| Cluster, n (%) | 8 (13,55) | 9 (17,3) | NS |
| Nocturnas, n (%) | 16 (27,1) | 36 (69,23) | 0,0001* |
| Frec Mensualmediana | 1-2 | 3-4 | NS |
| Refractariedad, n (%) | 28 (47,4) | 28 (53,8) | NS |

*Prueba de X²

genotípicas de los pacientes analizados son resumidas en la Tabla 3.

No hubo heterogeneidad entre los estudios investigados (p=0,359 para ELT y p=0,221 para ELT con Historia Familiar positiva). No hubo evidencia de asociación entre la variante alélica en el promotor del gen codificante de PDYN y un riesgo aumentado a desarrollar Epilepsia del Lóbulo Temporal bajo un modelo de herencia dominante (p=0,69; OR=1,04; IC 95=0,84-1,29), ni bajo un modelo co-dominante (p=0,54; OR=1,05; IC 95=0,89-1,24) (Figura 2). No hubo evidencia de sesgo de publicación (prueba de Begg, p=0,80 y prueba de Egger, p=0,49). En cambio, sí encontramos asociación del alelo L, bajo un modelo dominante (p=0,01; OR=1,44; IC 95=1,06-1,95) y bajo un modelo co-dominante (p=0,003; OR=1,40; IC 95=1,12-1,74), con un riesgo modestamente aumentado a desarrollar ELT en el grupo de pacientes familiar-

mente predispuestos (Figura 3). Tampoco se evidenció sesgo de publicación en este caso (prueba de Begg, p=1 y prueba de Egger, p=0,82).

En el análisis de las diferentes características semiológicas, encontramos una asociación significativa entre el alelo L y la presencia de un antecedente positivo para estado de mal epiléptico en las diferentes poblaciones de pacientes con ELT investigadas (p=0,05; OR=1,51; IC 95=1,01-2,3) En cambio, no hubo evidencia de asociación en el resto de las variables clínicas investigadas sistemáticamente.

Discusión

La síntesis de la evidencia analizada permite demostrar una modesta asociación entre los alelos transcripcionalmente menos eficientes del gen codificante de la PDYN

TABLA 3.- Características de Estudios Incluidos en el Meta-Análisis

| Autor / País / Año | TLEHH | TLEHL | TLELL | Totcasos | TLEFHH | TLEFHL | TLEFLL | ContHH | ContHL | ContLL | TotCont | Calidad |
|---------------------------------|-------|-------|-------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| Stogmann / Austria / 2002 | 60 | 69 | 16 | 145 | 10 | 23 | 10 | 96 | 88 | 18 | 202 | 8 |
| Tilgen / EEUU / 2003 | 90 | 78 | 14 | 182 | 22 | 21 | 3 | 99 | 84 | 22 | 205 | 5 |
| Gambardella / Italia / 2003 | 66 | 40 | 9 | 115 | 28 | 25 | 7 | 138 | 105 | 16 | 259 | 8 |
| Cavalleri / Gran Bretaña / 2005 | 17 | 22 | 8 | 47 | 17 | 22 | 8 | 175 | 160 | 30 | 365 | 8 |
| Kauffman / Argentina / 2006 | 53 | 40 | 9 | 102 | 9 | 8 | 1 | 41 | 37 | 8 | 86 | 10 |

TLEHH: Epilepsia Lóbulo Temporal genotipo HH. TLEHL: Epilepsia Lóbulo Temporal genotipo HL. TLELL: Epilepsia Lóbulo Temporal genotipo LL. TLEFHH: Epilepsia Lóbulo Temporal con Historia Familiar + genotipo HH. TLEFHL: Epilepsia Lóbulo Temporal con Historia Familiar + genotipo HL. TLEFLL: Epilepsia Lóbulo Temporal con Historia Familiar + genotipo LL. ContHH Controles genotipo HH. ContHL: Controles genotipo HL. ContLL: Controles genotipo LL

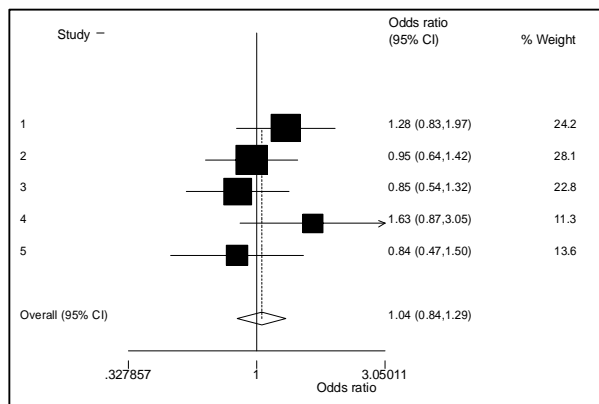


Fig. 2.- Forest Plot Meta-Análisis Epilepsia del Lóbulo Temporal bajo modelo Dominante. Estudios 1. Stögmann y col. 2. Tilgen y col. 3. Gambardella y col. 4. Cavalleri y col. 5. Kauffman y col.

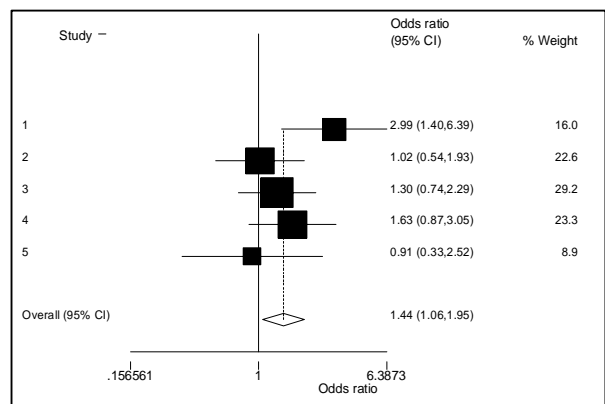


Fig. 3.- Forest Plot Meta-Análisis Epilepsia del Lóbulo Temporal con Historia Familiar Positiva bajo Modelo Dominante. Estudios 1. Stögmann y col. 2. Tilgen y col. 3. Gambardella y col. 4. Cavalleri y col. 5. Kauffman y col.

y el desarrollo de ELT en el subgrupo de pacientes con una predisposición familiar para el desarrollo de eventos comiciales. Sin embargo, cuando se consideran individualmente los resultados encontrados en nuestra población así como los reportados en las investigaciones realizadas en diferentes poblaciones por Tilgen²¹, Cavalleri²³ y Gambardella²² tal asociación no es evidenciada. En cambio, Stögmann y col.⁹ sí pudieron observar que los alelos con un menor número de repeticiones en el promotor de PDYN constituyen un marcador de riesgo para el desarrollo de ELT en pacientes con predisposición familiar.

Esta aparente contradicción es frecuentemente encontrada en la investigación de los factores genéticos implicados en el desarrollo de enfermedades con herencia compleja como la ELT²⁵. 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. Aunque los estudios de aso-

ciación caso-control constituyen una herramienta adecuada para la disección de los factores genéticos implicados en el desarrollo de las enfermedades con herencia compleja, es postulado que aquellas variantes genéticas con una prevalencia poblacional mayor al 10% sólo conferirían un riesgo de pequeña magnitud para el desarrollo de estas patologías relativamente frecuentes en la población³¹, requiriéndose en consecuencia investigar un gran número de sujetos para poder detectar esta contribución. Esta dificultad pudo resolverse, al menos parcialmente, con la realización de una revisión sistemática de la literatura y un meta-análisis³². Nuestros hallazgos, representando una síntesis del conocimiento acumulado, permiten poner de manifiesto el modesto efecto que esta variante alélica tiene en el desarrollo de la ELT.

Es considerado que un grupo de estudios incluido en un meta-análisis es heterogéneo cuando los hallazgos particulares de cada uno de ellos difiere más que lo que se esperaría sólo por la variabilidad del muestreo poblacional³³. Si bien no encontramos heterogeneidad

estadísticamente significativa en los estudios combinados, parecería haber dos clases de poblaciones analizadas en función de los resultados individuales reportados: unas con hallazgos positivos⁹ o con tendencia positiva²³ y otras con hallazgos negativos^{21, 22}. Los resultados obtenidos en nuestra población parecen ser más coincidentes con los de éste segundo grupo. Una explicación para estas diferencias podría estar dada en la posibilidad de una interacción epistática entre PDYN y otros factores genéticos o ambientales necesarios para la aparición de la patología con diferente representación en las poblaciones investigadas⁹.

A diferencia de otros polimorfismos en genes candidatos investigados en la ELT⁸, la variación genética analizada en el gen de PDYN ha demostrado tener una repercusión funcional y no ser un mero marcador genético¹⁸. Más aún, resulta interesante el rol que la PDYN y sus variantes alélicas podrían tener en la fisiopatología de la ELT. El polimorfismo en el promotor de PDYN, dependiendo del número de repeticiones presente, modifica la eficiencia transcripcional. La transcripción es regulada por la unión del complejo activador de la transcripción AP-1 que ha sido implicado en las cascadas transcripcionales que suceden a un evento convulsivo en diferentes modelos experimentales¹⁹. La Dinorfina, el producto del clivaje de PDYN, expresada en las células granulares del giro dentado, es el ligando endógeno del receptor de opiodes tipo κ ¹⁴, donde participa en varios mecanismos homeostáticos, regulando en particular la excitabilidad en el hipocampo mediante la apertura de canales de potasio que limitan la entrada de corrientes de calcio y la secreción de neurotransmisores excitatorios¹⁶. Ha sido implicada, en consecuencia, en los mecanismos que limitan la generalización de un foco ictal y la aparición del estado de mal epiléptico¹⁷. En consecuencia, resulta interesante la asociación observada entre los alelos L y un mayor riesgo a presentar estado de mal epiléptico en el curso de la patología. En cambio, la observación en nuestra población de una mayor frecuencia de crisis durante el sueño en el grupo de pacientes portadores del alelo H resulta más sorprendente si se tiene en cuenta que una mayor sincronía neuronal está presente en las fases de sueño lento³⁴ y éste alelo podría contribuir, mediante una mayor transcripción de PDYN, a compensar este proceso neurofisiológico.

En conclusión, a través del uso de metodología meta-analítica quedó en evidencia que variantes alélicas funcionales en el promotor del gen codificante de la Prodinorfina tendrían un rol en el riesgo genético para el desarrollo de ELT en sujetos familiarmente predispuestos para la aparición de eventos comiciales y modificarían las características fenotípicas de la patología, en particular la incidencia de estado de mal epiléptico y convulsiones durante el sueño.

Bibliografía

1. Berkovic SF, Jackson GD. The hippocampal sclerosis whodunit: enter the genes. *Ann Neurol* 2000; 47 (5): 557-8.
2. Meyer A, Falconer MA, Beck E. Pathological findings in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1954; 17 (4): 276-85.
3. Falconer MA, Meyer A, Hill D, Mitchell W, Pond DA. Treatment of temporal-lobe epilepsy by temporal lobectomy; a survey of findings and results. *Lancet* 1955; 268 (6869): 827-35.
4. Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JA. Etiology and Pathogenesis of Temporal Lobe Epilepsy. *Arch Neurol* 1964; 10: 233-48.
5. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, et al. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 2002; 30 (3): 335-41.
6. Briellmann RS, Torn-Broers Y, Jackson GD, Berkovic SF. Seizures in family members of patients with hippocampal sclerosis. *Neurology* 2001; 57 (10): 1800-4.
7. Kanemoto K, Kawasaki J, Yuasa S, 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): 796-9.
8. Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. *Neurology* 2003; 61 (9): 1204-10.
9. Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C, Aull-Watschinger S, Holtt V, Zimprich F. A functional polymorphism in the prodynorphin gene promoter is associated with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2002; 51 (2): 260-3.
10. Briellmann RS, Torn-Broers Y, Busuttill BE, et al. APOE epsilon4 genotype is associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2000; 55 (3): 435-7.
11. Buono RJ, Lohoff FW, Sander T, et al. Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 2004; 58 (2-3): 175-83.
12. Kauffman M, Consalvo D, Levy E, Mordoh J, Kochen S. El Polimorfismo G1465A Del Gen GABBR1 es un Marcador de Riesgo para el desarrollo de Epilepsia Mesial Temporal Con Esclerosis Del Hipocampo. *Rev Neurol Arg* 2006; 31 (1): 25-31.
13. Solbrig MV, Koob GF. Epilepsy, CNS viral injury and dynorphin. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25 (2): 98-104.
14. Merg F, Filliol D, Usynin I, et al. Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the kappa-opioid receptor. *J Neurochem* 2006; 97 (1): 292-301.
15. Kiraly KP, Riba P, D'Addario C, et al. Alterations in prodynorphin gene expression and dynorphin levels in different brain regions after chronic administration of 14-methoxymetopon and oxycodone-6-oxime. *Brain Res Bull* 2006; 70 (3): 233-9.
16. Solbrig MV, Adrian R, Chang DY, Perng GC. Viral risk factor for seizures: Pathobiology of dynorphin in herpes simplex viral (HSV-1) seizures in an animal model. *Neurobiol Dis* 2006.
17. Nadler JV. The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem Res* 2003; 28 (11): 1649-58.
18. Zimprich A, Kraus J, Woltje M, Mayer P, Rauch E, Holtt V. An allelic variation in the human prodynorphin gene promoter alters stimulus-induced expression. *J Neurochem* 2000; 74 (2): 472-7.
19. Ogita K, Kitayama T, Okuda H, Yoneda Y. Effects of glutathione depletion by 2-cylohexen-1-one on excitatory

amino acids-induced enhancement of activator protein-1 DNA binding in murine hippocampus. *J Neurochem* 2001; 76 (6): 1905-15.

20. Alakurtti K, Virtaneva K, Joensuu T, Palvimo JJ, Lehesjoki AE. Characterization of the cystatin B gene promoter harboring the dodecamer repeat expanded in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *Gene* 2000; 242 (1-2): 65-73.
21. Tilgen N, Rebstock J, Horvath S, Propping P, Elger CE, Heils A. Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2003; 53 (2): 280-1; author reply 1-2.
22. Gambardella A, Manna I, Labate A, et al. Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44 (9): 1255-6.
23. Cavalleri GL, Lynch JM, Depondt C, 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.
24. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003; 361(9360): 865-72.
25. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet* 2005; 366 (9493): 1315-23.
26. Tan NC, Mulley JC, Scheffer IE. Genetic dissection of the common epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2006; 19 (2): 157-63.
27. Munafo MR. Candidate gene studies in the 21st century: meta-analysis, mediation, moderation. *Genes Brain Behav* 2006; 5 Suppl 1: 3-8.
28. Thakkinstian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. 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.
29. Bradburn M. metan - an alternative meta-analysis command. *Stata Technical Bulletin* 1998; 44: 4-15.
30. Minelli C, Thompson JR, Abrams KR, Thakkinstian A, Attia J. The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. *Int J Epidemiol* 2005; 34 (6): 1319-28.
31. Zondervan KT, Cardon LR. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 2004; 5 (2): 89-100.
32. Lin BK, Clyne M, Walsh M, et al. Tracking the epidemiology of human genes in the literature: the HuGE Published Literature database. *Am J Epidemiol* 2006; 164 (1): 1-4.
33. Petitti DB. Approaches to heterogeneity in meta-analysis. *Stat Med* 2001; 20 (23): 3625-33.
34. Malow BA. Sleep and epilepsy. *Neurol Clin* 2005; 23 (4): 1127-47.

Anexo 1

Escala de Valoración de Calidad de Estudios Incluidos en el Meta-Análisis

1. *Representatividad de casos*
 - a. Casos seleccionados consecutivamente o randomizadamente de la población de una manera explícitamente especificada en el paper.
 - b. Casos seleccionados consecutivamente o randomizadamente de la población sin una manera explícitamente especificada en el paper o con criterios de inclusión y exclusión muy restrictivos.
 - c. No hay método de selección especificado.
 2. *Representatividad de controles*
 - a. Controles seleccionados consecutivamente o randomizadamente de la misma población que los casos (igual localización geográfica o lugar de atención).
 - b. Controles seleccionados consecutivamente o randomizadamente de una población diferente que los casos.
 - c. No hay método de selección especificado.
 3. *Diagnóstico de Convulsiones Febriles o de Epilepsia del Lóbulo Temporal*
 - a. Claramente especificados los criterios diagnósticos para definir una convulsión febril o epilepsia del lóbulo temporal.
 - b. No especificados
 4. *Definición de Control Sano*
 - a. Los controles fueron interrogados específicamente sobre la negatividad de antecedentes de convulsiones febriles o epilepsia
 - b. No especificado
 5. *Procedimiento de Genotipificación*
 - a. Se realizó "ciego" para datos clínicos
 - b. No ciego o no especificado
 6. *Equilibrio de Hardy Weimberg*
 - a. Controles en equilibrio de harrdy weimberg
 - b. Controles en desequilibrio de hardy weimberg
 - c. No se realizó la prueba
 7. *Tratamiento estadístico*
 - a. Se utilizó tratamiento estadístico adecuado (por ejemplo, se corrigió por comparaciones múltiples)
 - b. No se utilizó tratamiento estadístico adecuado
- Items 1-2-6*
a-2 puntos
b-1 punto
c-0 puntos
- Items 3-4-5-7*
a-1 punto
b-0 puntos