

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES
RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN EN
PACIENTES MEXICANOS CON EPILEPSIA**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental**

P R E S E N T A

Yair Emiliano Delgado Namorado

Comité de tutores:

Codirectoras

Dra. Victoria Campos Peña

Dra. Beatriz Gómez González

Asesora

M. en C. Elizabeth Ruiz Sánchez

Fecha: 29 de agosto de 2019

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 616026

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Evaluación de polimorfismos en genes relacionados con la inflamación en pacientes mexicanos con epilepsia", que presentó

Yair Emiliano Delgado Namorado

El día 29 de agosto del año 2019

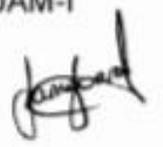
Sinodales:

Presidenta: Dra. María de los Ángeles Aguilar Santamaría 

Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, UAM-I

Secretario: Dr. Héctor Fernando Serrano 

Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, UAM-I

Vocal 1: Dra. Nancy Monroy Jaramillo 

Departamento de Neurogenética, INNNMVS

Vocal 2: Dr. Alberto Ortega Vázquez 

Departamento de Sistemas Biológicos, CBS, UAM-X

Vocal 3: M. en C. Elizabeth Ruiz Sánchez 

Departamento de Neurotoxicología, INNNMVS

COMITÉ TUTORAL

Co-directora de tesis: Dra. Victoria Campos Peña

Adscripción: Investigador en Ciencias Médicas “D”, Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Co-directora de tesis: Dra. Beatriz Gómez González

Adscripción: Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Asesora: M. en C. Elizabeth Ruiz Sánchez

Adscripción: Laboratorio de Neurotoxicología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Biología Experimental** y a la **UAM-I**, por todos estos años de formación académica que me brindaron, los cuales fueron la base para lograr concluir esta maestría.

Al **CONACYT**, por otorgarme el apoyo económico (No. de Beca: 616026) el cual fue fundamental para que pudiera dedicarme a tiempo completo en la realización de esta tesis.

A la **Dra. Victoria Campos Peña**, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por todo lo que me enseñó, no solo en el ámbito científico sino también en el humano, llevaré conmigo cada uno de los consejos que me brindó lo cuales me ayudarán a ser un mejor profesionista, gracias por todo el apoyo.

A la **Dra. Beatriz**, a la **M. en C. Elizabeth** y a **los miembros de mi jurado**, por todo el apoyo que recibí de su parte el cual ayudó a que este trabajo fuera mejorando cada día, sus consejos y sugerencias fueron muy valiosos.

A **Dani, Karla, Fer, Carol y Pavel**, su apoyo, consejos, amistad y todas las experiencias a su lado me ayudaron mucho para poder realizar este trabajo, mi estancia en el laboratorio se volvió muy agradable gracias a ustedes. Todos serán unos grandes profesionistas, fue un placer trabajar a su lado.

A mis **amigos y familia**, en especial a **Fernando**, mi mejor amigo, a **Brenda**, mi gran compañera, a **Roxana**, mi querida hermana, y a **los que ya no están**, pero en su momento me tendieron la mano, no saben cuántas veces ayudaron a levantarme en mi camino, son una bendición en mi vida, mil gracias, los quiero mucho.

Y a la persona más importante en mi vida, **Rosy, mi madre**, te lo he dicho antes y no me cansaré nunca de decirlo, sin ti yo no sería lo que soy ahora, todo lo que tengo es por ti, todos mis logros también son tuyos. No me alcanzará la vida para agradecer todo lo que me has dado. Eres un ejemplo de superación y perseverancia, la vida me ha quitado mucho, pero no pudo haberme regalado una mejor madre y para mí eres la mejor mamá de todas. Gracias por TODO, TE AMO MADRE.

RESUMEN

La epilepsia es la enfermedad neurológica más común y aproximadamente el 30% de los pacientes que la padecen no responden al tratamiento con fármacos, es decir, tienen epilepsia refractaria. La epilepsia de lóbulo temporal (ELT) es la forma más frecuente de epilepsia focal en adultos y la mayoría de los pacientes con ELT presentan esclerosis hipocampal (EH). Por otro lado, se estima que la incidencia de convulsiones en pacientes con tumores cerebrales (EPT) varía entre el 30% y el 100%. Varios estudios sugieren que existe un ciclo de retroalimentación positiva entre la epileptogénesis y la inflamación cerebral. Así mismo, se sabe que la inflamación puede ser modulada por la apolipoproteína E (ApoE). En México, son pocos los trabajos que estiman la influencia de factores genéticos y la neuroinflamación en el curso de la epilepsia, por tal motivo, en este estudio se analizaron algunas variantes presentes en los genes *PTGS2*, *CR1*, *CRP*, *TNF- α* , *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, y *ApoE*, en pacientes mexicanos que presentan epilepsia refractaria de lóbulo temporal, con o sin EH y EPT. Se identificaron las siguientes asociaciones: a) los genotipos G/G y G/G de las variantes rs1800795 (*IL6*) y rs20417 (*PTGS2*), respectivamente, con la EPT. b) El genotipo G/G de rs1799724 (*TNF- α*) con la EH. c) El genotipo C/G (rs1800947) y G/G (rs20417) localizados en *CRP* y *PTGS2*, respectivamente, con ELT. Por último, se observó que la combinación del alelo ϵ 4 de *ApoE* con el genotipo G/G (rs1800795) de *IL-6* y G/G (rs20417) de *PTGS2* se encuentra asociada con ELT. Estos resultados presentan posibles marcadores genéticos asociados a la inflamación para la ELT, EH y EPT.

ABSTRACT

Epilepsy is the most common neurological disease and approximately 30% of patients who suffer from it do not respond to drug treatment, that is, they present drug-resistant epilepsy. Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most frequent form of focal epilepsy in adults and the majority of patients with TLE hippocampal sclerosis (HS) is also present. On the other hand, it is estimated that the incidence of seizures in patients with brain tumors (EPT) varies between 30% and 100%. Several studies suggest that there is a positive feedback loop between epileptogenesis and brain inflammation. Similarly, it is known that inflammation can be modulated by apolipoprotein E (ApoE). In Mexico, there are few articles estimating the influence of genetic factors and neuroinflammation in the course of epilepsy. For this reason, in this study, some variants present in *PTGS2*, *CR1*, *CRP*, *TNF- α* , *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, and *ApoE* genes were evaluated in Mexican patients with refractory TLE with and without HS, and EPT. The following associations were identified: a) G/G and G/G genotypes of the variants rs1800795 (*IL6*) and rs20417 (*PTGS2*), respectively, with EPT. b) The G/G genotype of rs1799724 (*TNF- α*) with HS. c) The genotype C/G (rs1800947) and G/G (rs20417) located in *CRP* and *PTGS2*, respectively, with TLE. Finally, it was observed that the combination of the $\epsilon 4$ *ApoE* allele with the G/G genotype (rs1800795) of *IL-6* and G/G (rs20417) of *PTGS2* is associated with TLE. These results present possible genetic markers associated with inflammation for TLE, HS and EPT.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Definición de epilepsia | 1 |
| 1.2. Prevalencia | 2 |
| 1.3. Etiología | 2 |
| 1.4. Clasificación | 3 |
| 1.5. Epilepsia farmacorresistente | 7 |
| 1.6. Epilepsia del lóbulo temporal | 11 |
| 1.7. Esclerosis hipocampal | 13 |
| 1.8. Epilepsia asociada a tumor | 17 |
| 1.9. Fisiopatología de la epilepsia | 19 |
| 1.10. Inflamación y epilepsia | 27 |
| 1.10.1. Citocinas | 29 |
| 1.10.2. Interleucina-1 β | 32 |
| 1.10.3. Interleucina-6 | 33 |
| 1.10.4. Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) | 34 |
| 1.10.5. Ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) | 34 |
| 1.10.6. Receptor del complemento 1 (CR1) | 36 |

| | |
|---|----|
| 1.10.7. Proteína C reactiva (CRP) | 38 |
| 1.11. ApoE y epilepsia | 39 |
| 2. ANTECEDENTES | 41 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 44 |
| 4. HIPÓTESIS | 47 |
| 5. OBJETIVO GENERAL..... | 47 |
| 6. OBJETIVOS PARTICULARES..... | 48 |
| 7. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 49 |
| 7.1. Definición de la muestra de estudio | 49 |
| 7.2. Criterios de inclusión para los grupos de estudio..... | 50 |
| 7.3. Criterios de exclusión para los grupos de estudio..... | 50 |
| 7.4. Grupo control | 50 |
| 7.5. Análisis de variantes de un solo nucleótido (SNV) mediante PCR en Tiempo Real..... | 51 |
| 7.5.1. Polimorfismos propuestos..... | 54 |
| 7.6. Análisis estadístico..... | 56 |
| 8. RESULTADOS | 57 |
| 8.1. Base de datos | 57 |
| 8.1.1. Grupos de estudio..... | 57 |

| | |
|---|-----|
| 8.1.2. Edad del grupo de pacientes | 57 |
| 8.1.3. Género del grupo de pacientes..... | 57 |
| 8.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg | 58 |
| 8.3. Frecuencias alélicas..... | 60 |
| 8.4. Frecuencias genotípicas | 60 |
| 8.5. Desequilibrio de ligamiento. | 64 |
| 8.6. Haplotipos y combinaciones multi/ <i>oci</i> | 66 |
| 8.7. Distribución de genotipos de ApoE | 69 |
| 9. DISCUSIÓN | 73 |
| 9.1. Género | 75 |
| 9.2. Frecuencias alélicas y genotípicas..... | 75 |
| 9.3. Desequilibrio de ligamiento y haplotipos | 78 |
| 9.4. ApoE | 79 |
| 10. CONCLUSIÓN | 80 |
| 10.1. Perspectivas..... | 81 |
| 11. REFERENCIAS | 82 |
| ANEXO I..... | 110 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de epilepsia

Con más de 50 millones de personas afectadas en todo el mundo, la epilepsia es la enfermedad neurológica más común (Moshé *et al.*, 2015). Se define como una familia de padecimientos diversos, caracterizado por convulsiones recurrentes que resultan de la actividad anormal de las neuronas en el sistema nervioso central (SNC) (Fisher *et al.*, 2014). Una convulsión, o crisis epiléptica, es un evento en el que hay una excitación anormal de una población neuronal, donde los grupos de neuronas se vuelven hiperexcitables (Scharfman, 2007).

En 2005, la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE; por sus siglas en inglés *International League Against Epilepsy*), utilizó como criterio práctico para definir esta enfermedad: “la ocurrencia de dos o más crisis epilépticas no provocadas con más de 24 horas de diferencia”. Posteriormente, en el 2014, la ILAE amplió este criterio a “la aparición de convulsiones recurrentes hasta en un periodo de 10 años y el diagnóstico de síndrome epiléptico” (Cruz-Cruz *et al.*, 2017). La ILAE aceptó las recomendaciones de un grupo de trabajo que altera la definición práctica para circunstancias especiales que no cumplen con los dos criterios de ataques no provocados. Propuso que la epilepsia se considere definida por cualquiera de las siguientes condiciones: (1) Al menos dos crisis epilépticas no provocadas (o reflejas) que ocurren con una separación mayor a 24 horas; (2) una crisis no provocada (o refleja) y una probabilidad de ataques adicionales similares al riesgo general de recurrencia (al menos del 60%)

después de dos ataques no provocados, que ocurran en los próximos 10 años; (3) diagnóstico de un síndrome de epilepsia (Fisher *et al.*, 2014).

1.2. Prevalencia

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existen alrededor de 50 millones de personas con epilepsia en el mundo (World Health Organization, 2019). Se estima que la prevalencia es más baja en países desarrollados (Estados Unidos y Europa) en comparación con países en desarrollo (América Latina y África).

La prevalencia de la enfermedad es de 3.3 a 6.8 casos por cada 1000 habitantes en Europa y América del Norte; de 2.4 a 10.7 casos por cada 1000 habitantes en Asia; de 5.1 a 57 casos por cada 1000 habitantes en América Latina y de 4.3 a 74.4 casos por cada 1000 habitantes en África (Nwani *et al.*, 2015). En México, la prevalencia estimada es muy alta, ya que oscila entre 11.4 a 20.3 por cada 1000 habitantes (Programa Prioritario de Epilepsia, 2018).

1.3. Etiología

La epilepsia es, en la mayoría de los casos, de tipo multifactorial, es decir, es el resultado de la interacción de factores tanto genéticos como ambientales y también puede ser influenciada por variables como fiebre, ciclo menstrual, uso de drogas, etc. Sin embargo, en la mayoría de los casos, hay una causa predominante a la que se asigna su origen, por ejemplo, si la epilepsia ocurre como un evento subyacente a la presencia de un tumor, se le asignara el nombre de epilepsia secundaria a tumor. En

la práctica clínica, existen muchas razones obvias por las cuales dicha asignación de causa predominante es necesaria y valiosa (Shorvon, 2011).

De acuerdo con la ILAE, las causas de la epilepsia pueden ser:

1) De origen genético, donde la epilepsia es, como se entiende, el resultado directo de un defecto genético conocido o presunto en el que las convulsiones son el síntoma central del trastorno.

2) De origen estructural/metabólico, donde conceptualmente existe una condición o enfermedad estructural o metabólica (por ejemplo, trauma, apoplejía, tumor, infección, etc.), que se ha demostrado que está asociada con el riesgo de desarrollar epilepsia.

3) De causa desconocida, para designar que la naturaleza de la causa subyacente es aún desconocida; puede tener un defecto genético o puede ser la consecuencia de un trastorno separado aún no identificado (Berg *et al.*, 2010).

1.4. Clasificación

La clasificación de las epilepsias y las convulsiones ha evolucionado dramáticamente desde su inicio en 1960. Los cambios en esta clasificación reflejan los avances en la comprensión de los patrones fenotípicos y los mecanismos subyacentes, basados en las contribuciones aportadas por la investigación clínica y básica de todo el mundo (Scheffer *et al.*, 2017).

La ILAE clasifica principalmente a las epilepsias de acuerdo con su etiología. Sin embargo, cada epilepsia y cada paciente pueden clasificarse con base a otro tipo de características específicas. Estas incluyen la edad de inicio, los antecedentes cognitivos y de desarrollo, los exámenes motores y sensoriales, las características observadas en el electroencefalograma (EEG), factores secundarios como presencia de fiebre, ciclo menstrual, drogas, estrés, trastornos del sueño, etc. Comúnmente, las epilepsias suelen clasificarse de acuerdo con la edad de inicio (por ejemplo, la epilepsia neonatal “benigna” y la epilepsia juvenil con ausencias); también dependiendo de la región del cerebro dónde se localiza la zona epileptogénica (por ejemplo, la epilepsia del lóbulo temporal y la epilepsia de lóbulo parietal) (Berg *et al.*, 2010).

Así mismo, la ILAE recomienda que las convulsiones sean descritas según sus manifestaciones motoras, cognitivas, y sensoriales (Berg & Millichap *et al.*, 2013). El objetivo principal de clasificar a las convulsiones es proporcionar un marco de comunicación para el uso clínico, es decir, que esta clasificación se convierta en una forma abreviada de comunicación en todo el mundo entre los médicos que atienden a personas con dicho padecimiento. Además, algunas agencias reguladoras aprueban medicamentos o dispositivos indicados para tipos de convulsiones determinadas. Por último, la clasificación de las convulsiones podría proporcionar un enlace útil a síndromes o etiologías específicas.

Dependiendo del tipo de crisis, la ILAE clasifica a la epilepsia en cuatro categorías:

1) Origen focal: "Cuando se originan dentro de redes neuronales limitadas a un hemisferio". Pueden estar discretamente localizadas o distribuidas más ampliamente y pueden originarse en estructuras subcorticales.

2) Origen generalizado: "Aquellas originadas en algún punto en redes neuronales distribuidas rápida y bilateralmente". La clasificación de una crisis con inicio aparentemente generalizado no descarta un inicio focal no detectado debido a las limitaciones de los métodos clínicos actuales, pero esto es más un problema de diagnóstico correcto que de clasificación.

3) Origen desconocido: Los médicos suelen observar convulsiones sin inicio o incluso en ausencia de conocimiento sobre su origen, por lo que se decidió clasificar provisionalmente estas crisis. La ILAE ha proporcionado una descripción más detallada de estas crisis de inicio desconocido cuando se observan características clave, como lo es la actividad tónico-clónica o la pérdida del conocimiento durante el curso de la convulsión.

4) Convulsión no clasificada: Por último, puede ser imposible clasificar una convulsión, ya sea porque se tiene información incompleta o debido a su naturaleza inusual, en cuyo caso se denomina una convulsión no clasificada. Esta categoría debe usarse sólo cuando el médico confía en que el evento es una crisis, pero no puede clasificarlo más allá del evento.

La ILAE re-clasificó las convulsiones recientemente como se muestra en la Figura 1 (Fisher *et al.*, 2017; Brodie *et al.*, 2018).

Clasificación de los Tipos de Convulsiones de la ILAE 2017

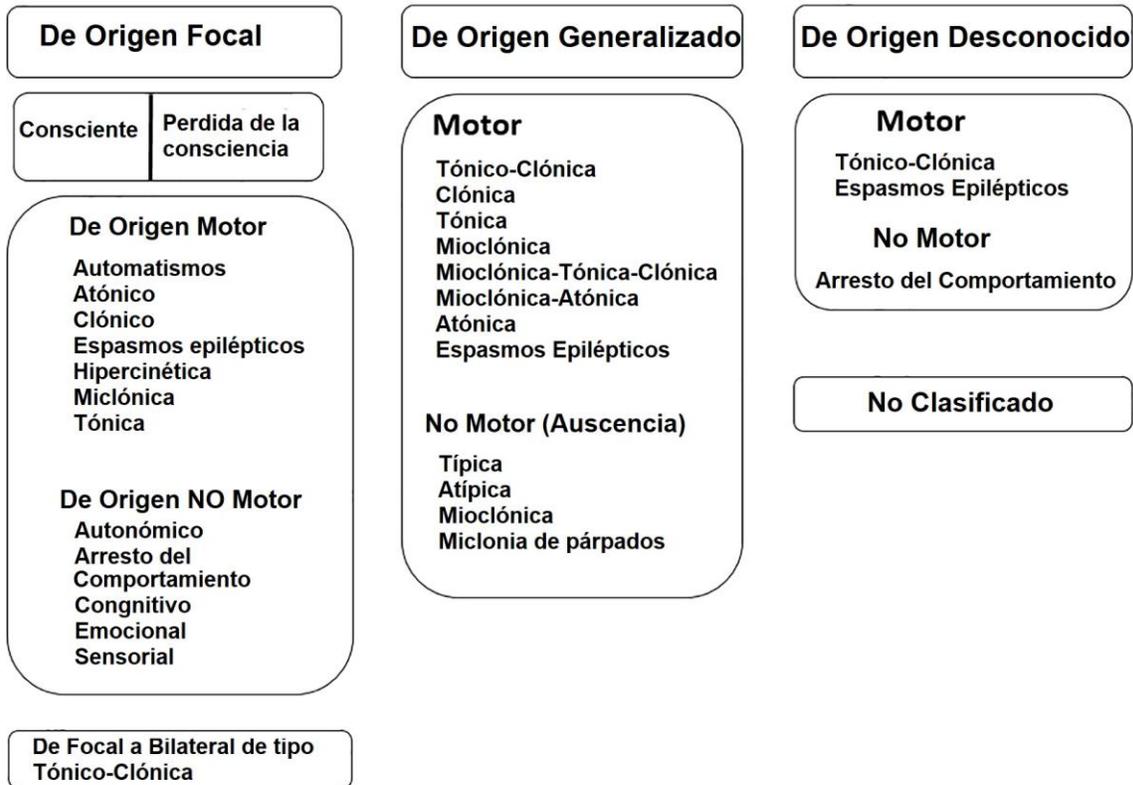


Figura 1. Clasificación de la epilepsia. Las convulsiones se pueden clasificar en cuatro grupos: de origen focal, de origen generalizado, de origen desconocido y no clasificado. Las de origen Focal se pueden subdividir en aquellas crisis donde se pierde la consciencia y en aquellas donde no, aunque al igual que con las de origen generalizado y de origen desconocido, también se pueden subdividir en de origen motor y no motor. En el caso de las de Origen Generalizado las crisis de origen no Motor también se les llama crisis de ausencia. Por otra parte, una convulsión puede pasar de un origen Focal a uno Bilateral (Generalizado) antes llamadas “crisis parciales secundariamente generalizadas”. Imagen modificada de: Fisher *et al.*, 2017.

1.5. Epilepsia farmacorresistente

Actualmente existen más de 25 fármacos antiepilépticos (FAE) que tienen el objetivo de suprimir o disminuir el número de crisis convulsivas. Estos actúan sobre diversos mecanismos y dianas moleculares implicadas en la regulación de la excitabilidad

neuronal (Perucca & Mula, 2013). Sin embargo, aproximadamente el 30% de las personas con epilepsia no responden a los FAE, lo que se conoce como farmacorresistencia. En México, un estudio (Martínez-Juárez *et al.*, 2012) encontró que el 56% de los pacientes con epilepsia que ingresan en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", presentan resistencia a los medicamentos. Esto no es sorprendente dado que todos los fármacos actuales, simplemente reducen la incidencia de las convulsiones ("antiictogénico") y no interfieren con la historia natural de la epilepsia. Por lo tanto, no son antiepilépticos *per se* ya que no son capaces de prevenir la epilepsia, interferir con el proceso de epileptogénesis, ni curar la patología (Pohlmann-Eden & Weaver, 2013).

La ILAE definió recientemente la farmacorresistencia en la epilepsia como *"el fracaso de un ensayo adecuado de dos programas de FAE tolerados, elegidos y utilizados adecuadamente (ya sea en monoterapia o en combinación) para lograr una libertad de crisis sostenida"* (Kwan *et al.*, 2010). Sin embargo, esta definición de farmacorresistencia no es absoluta, los pacientes que no alcanzan la libertad de crisis a menudo experimentan una reducción en la frecuencia o gravedad de las convulsiones cuando se les trata con los FAE. Por lo tanto, los pacientes con epilepsia farmacorresistente experimentan una respuesta -aunque la respuesta sea inadecuada- a los medicamentos. La farmacorresistencia, por tanto, puede ser un "fenómeno relativo". Varios estudios han tratado de determinar las características del paciente que están asociadas con la farmacorresistencia a los FAE (Oskoui *et al.*,

2005; Spooner *et al.*, 2006; Hitiris *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 2008; Berg, 2009; Sillanpää & Schmidt, 2009). El factor más consistente entre una amplia gama de estudios es una alta frecuencia de convulsiones antes del tratamiento, ya que el uso de los FAE no garantiza la libertad total de las crisis, los antecedentes familiares de epilepsia son también un factor que se ha encontrado asociado a la farmacorresistencia. Otros elementos que se han relacionado con la epilepsia refractaria son las convulsiones ocasionadas por una lesión cerebral traumática (epilepsia postraumática), deficiencia cognitiva, espasmos infantiles y antecedentes de convulsiones febriles neonatales. De igual forma, se ha propuesto que las epilepsias asociadas con lesiones estructurales, identificadas por neuroimagen, como lo son las displasias, son más propensas a ser intratables (Rogawski, 2013).

Se han propuesto dos hipótesis para explicar la farmacorresistencia: la del transportador y la del objetivo. La hipótesis del transportador se relaciona con los aspectos farmacocinéticos. En general, los transportadores de eflujo pueden contribuir significativamente a la función de la barrera hematoencefálica (BHE). Estas moléculas median un transporte activo desde el parénquima cerebral en dirección a la luz capilar, lo que limita la penetración de sustratos, como los FAE, al cerebro. Varios estudios han observado una sobreexpresión del transportador de eflujo glicoproteína-P (P-gp) en el tejido cerebral de pacientes con epilepsia farmacorresistente (van Vliet *et al.*, 2004; Volk *et al.*, 2004; Seegers *et al.*, 2002). Además, estudios en roedores

demonstraron que cuando se les induce la sobreexpresión de la glicoproteína-P se limita la penetración al cerebro y la eficacia de los fármacos antiepilépticos (Potschka, 2010).

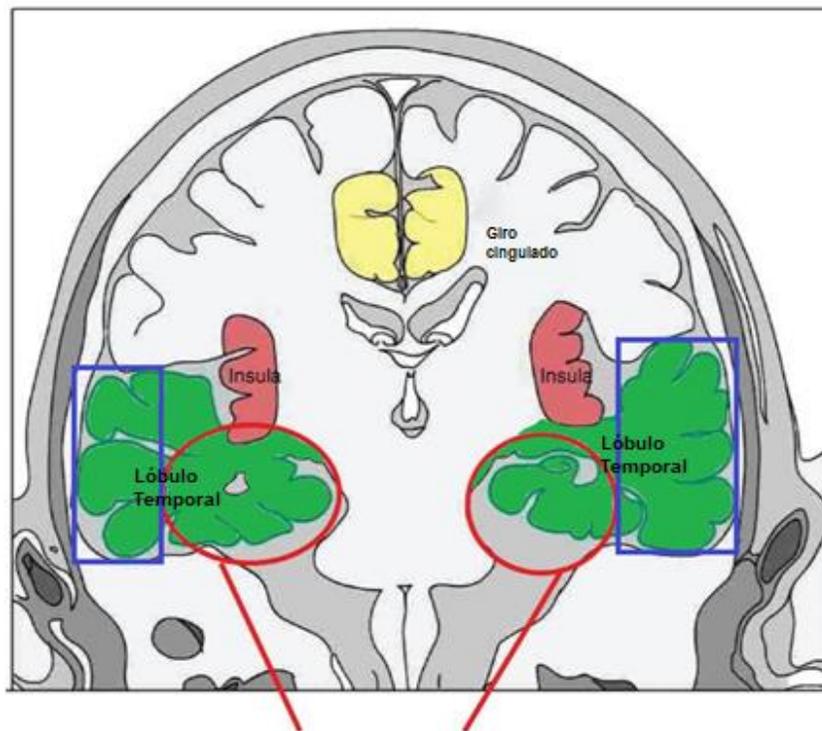
La hipótesis del objetivo postula que las alteraciones en las propiedades de los objetivos de los FAE producen una disminución de la sensibilidad al fármaco y, por lo tanto, conducen a la refractariedad (Tang *et al.*, 2017). Para mostrar actividad antiepiléptica, un medicamento debe actuar sobre una o más moléculas diana en el cerebro. Estos objetivos incluyen canales iónicos, receptores de neurotransmisores y transportadores o enzimas metabólicas involucradas en la liberación, captación y metabolismo de los neurotransmisores. Esta hipótesis plantea que alteraciones en las propiedades de estos objetivos impiden una interacción adecuada con los FAE lo que termina impidiendo que estos ejerzan su efecto de manera adecuada. Según los objetivos específicos involucrados en los mecanismos de los FAE, estos se pueden dividir en medicamentos que actúan mediante (a) la modulación de los canales iónicos dependientes de voltaje (incluidos los canales de sodio, calcio y potasio); (b) mejora de la inhibición sináptica (por ejemplo, potenciando la inhibición mediada por el ácido γ -aminobutírico [GABA]); (c) inhibición de la excitación sináptica (por ejemplo, mediante el bloqueo de los receptores de glutamato) (Schmidt & Löscher, 2005). Por ejemplo, se ha observado en pacientes con epilepsia que hay cambios en los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje, así como en la estructura de la subunidad del receptor GABA-A, lo que provoca una eficacia reducida de varios fármacos antiepilépticos (Remy & Beck, 2005). Estos cambios moleculares en los objetivos

farmacológicos pueden ser intrínsecos (polimorfismos) o adquiridos (por proceso de enfermedad, convulsiones, fármacos, etc.), y ambos pueden conducir a una sensibilidad reducida de los FAE (Sharma *et al.*, 2015).

Las hipótesis del objetivo y del transportador son las más citadas para explicar la epilepsia refractaria, pero ninguna, por sí sola, explica completamente las bases neurobiológicas de la farmacorresistencia (Tang & Bauer, 2017).

1.6. Epilepsia del lóbulo temporal

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es la forma más frecuente de epilepsia focal en adultos (Cendes *et al.*, 2014) y representa cerca del 40% de los casos totales de epilepsia (Mériaux *et al.*, 2014). Existen dos tipos de ELT, mesial y lateral, clasificadas de acuerdo con la localización de la zona epileptogénica. En la epilepsia del lóbulo temporal mesial la zona epileptogénica es el hipocampo, la amígdala y el subíctulum, y la zona epileptogénica de la epilepsia del lóbulo temporal lateral es la neocorteza (Figura 2).



Lóbulos temporales mediales

Figura 2. Zonas epileptogénicas en la ELT. Esquema coronal del cerebro, en verde se remarca el lóbulo temporal. Las zonas encerradas en círculos rojos definen el área de los lóbulos temporales mediales donde se encuentra la zona epileptogénica de la epilepsia de lóbulo temporal mesial. En los recuadros azules se encierra la neocorteza, donde se encuentra la zona epileptogénica de la epilepsia de lóbulo temporal lateral. Modificado de: http://thaiepilepsysociety.com/wp-content/uploads/2013/07/Seizure-semiology_EST_09092018_handout_Lunliya.pdf

Más del 80% de los pacientes con ELT tiene la forma mesial y a menudo presentan resistencia al tratamiento farmacológico (Quarato *et al.*, 2005). El síntoma típico de este tipo de epilepsia son las crisis parciales complejas, que se acompañan con una alta probabilidad de aura (sensación previa a la convulsión). Para un paciente, el aura puede presentarse como una molestia epigástrica, a veces descrita como náuseas o síntomas psiquiátricos, incluido el miedo o ansiedad (Kawamura *et al.*, 2016).

La ELT mesial se caracteriza por presentar neurodegeneración, conexiones aberrantes y astrogliosis en el hipocampo (Steinhäuser & Seifert, 2010). También se asocia con una neurogénesis aberrante, la cual se incrementa durante la fase temprana de la epilepsia y posteriormente disminuye durante la fase crónica de la enfermedad (Marta, 2011). El lóbulo temporal es la principal estructura involucrada en los procesos de aprendizaje, memoria y el comportamiento afectivo. El daño a esta estructura, generado como el resultado de la presencia de convulsiones espontáneas recurrentes, ocasiona deterioro de la memoria, ansiedad y depresión (Helmstaedter, 2002). Las complicaciones cognitivas de la epilepsia son diversas lo que disminuye en gran medida la calidad de vida de los individuos (Vrinda *et al.*, 2018).

1.7. Esclerosis hipocampal

La mayoría de los pacientes con ELT mesial, presentan esclerosis hipocampal (EH), también llamada esclerosis mesial temporal (Figura 3). Es una lesión del hipocampo que se caracteriza por presentar gliosis y pérdida de neuronas piramidales, aunque la neurodegeneración se puede extender hacia la amígdala y la corteza entorrinal (Kawamura *et al.*, 2016). La esclerosis es causada por la muerte neuronal, resultado del flujo sanguíneo deficiente y/o de las alteraciones metabólicas que se producen

durante las convulsiones, y es la causa más común de la resistencia a los fármacos en la epilepsia en adultos (Walker, 2015).

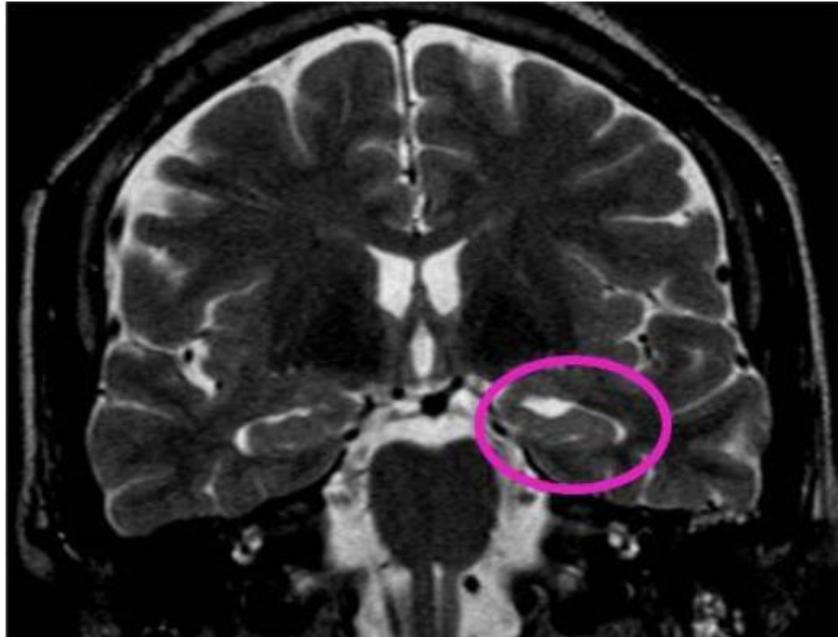


Figura 3. Resonancia magnética de un paciente con ELT con EH. El hipocampo izquierdo es atrófico, con pérdida de la arquitectura interna, y con una señal hiperintensa (encerrado en rosa). Tomado de Rodríguez, 2014.

La estructura básica del hipocampo incluye células granulares del giro dentado, neuronas piramidales CA1-4, e interneuronas circundantes. Las células granulares y las neuronas piramidales, forman un circuito excitador que está modulado por interneuronas inhibitoras. En particular, las neuronas piramidales de la región CA3, están conectadas entre sí por colaterales excitatorias recurrentes. Por lo tanto, el circuito del hipocampo está regulado por un equilibrio entre la excitación de las colaterales recurrentes y la inhibición de las interneuronas. Cuando el equilibrio

colapsa, el circuito del hipocampo se vuelve hiperexcitable y susceptible a las convulsiones (Kawamura *et al.*, 2016).

Basado en los patrones de pérdida neuronal observados en la esclerosis hipocampal, la ILAE proporciona una identificación patológica de tres subtipos distintos (Figura 4). La EH tipo 1 implica pérdida neuronal en la región CA1, CA3 y CA4, mientras que la EH tipo 2 implica solo pérdida neuronal en CA1. La EH tipo 3 describe pérdida neuronal restringida a CA4. Las muestras de hipocampo que muestran gliosis reactiva con poca/ninguna pérdida neuronal se clasifican como "No-EH" (Cendes *et al.*, 2014).

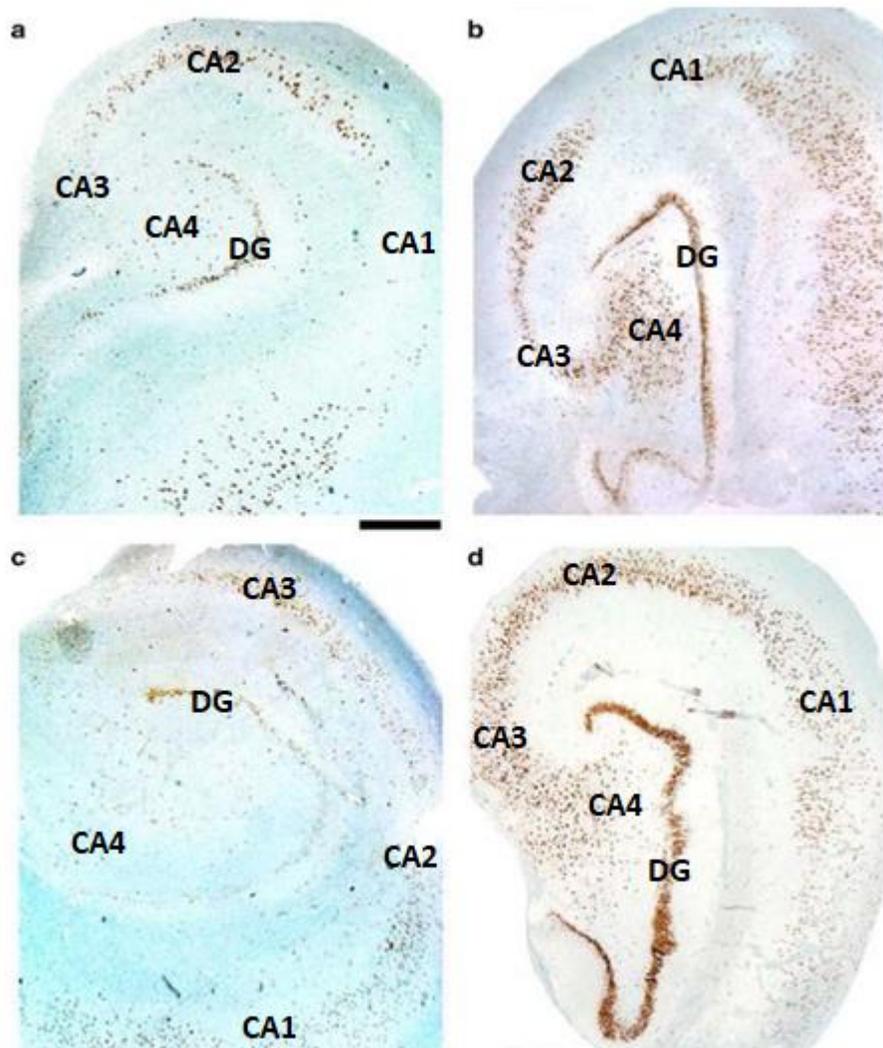


Figura 4. Subtipos histológicos de la EH en pacientes con ELT según la clasificación ILAE. Inmunohistoquímica NeuN, se observan de color café los núcleos de las neuronas: a) EH ILAE Tipo 1. b) EH ILAE Tipo 2. c) EH ILAE Tipo3. d) ELT sin EH “No-EH” (modificado de Cendes *et al.*, 2014). (CA: Cornu Ammonis; DG: Giro dentado; Barra de escala para todas: 1,0 mm).

Existe evidencia sustancial, particularmente de modelos experimentales, que esta pérdida neuronal en la EH está mediada por la excitotoxicidad, la activación de la vía

del objetivo de la rampamicina en mamíferos (mTOR), la reorganización de la vía de la fibra musgosa y las citocinas proinflamatorias (Tai *et al.*, 2018).

1.8. Epilepsia asociada a tumor

Los tumores cerebrales primarios, son las neoplasias más comunes y letales en todo el mundo. Las convulsiones epilépticas a menudo pueden ser causadas por la presencia de tumores cerebrales y se ha demostrado que el microambiente tumoral es un factor importante para el desarrollo de la epilepsia (Conti *et al.*, 2011). Se estima que la incidencia de convulsiones en pacientes con tumores cerebrales varía entre el 30% y el 100% dependiendo del tipo de tumor (Mao *et al.*, 2016). A menudo se manifiestan como convulsiones focales con generalización secundaria y son refractarias al tratamiento antiepiléptico (Danfors *et al.*, 2009).

Las convulsiones son más comunes en pacientes que presentan tumores de bajo grado como son los tumores neuroepiteliales, los gangliogliomas y los oligodendrogliomas (Figura 5). En el caso de tumores cerebrales de alto grado como el glioblastoma multiforme y los tumores metastásico, la incidencia de epilepsia es menor (Beaumont & Whittle, 2000). Los tumores de bajo grado consisten en células bien diferenciadas que pueden liberar neurotransmisores y otros moduladores que están implicados en la epileptogénesis. Por otro lado, el crecimiento altamente infiltrante de tumores cerebrales de alto grado puede dañar la red subcortical esencial para la transmisión eléctrica (Norden & Blumenfeld, 2002). Además, la gliosis y los

cambios inflamatorios crónicos en las regiones peri-tumorales pueden provocar crisis epilépticas (You *et al.*, 2012).

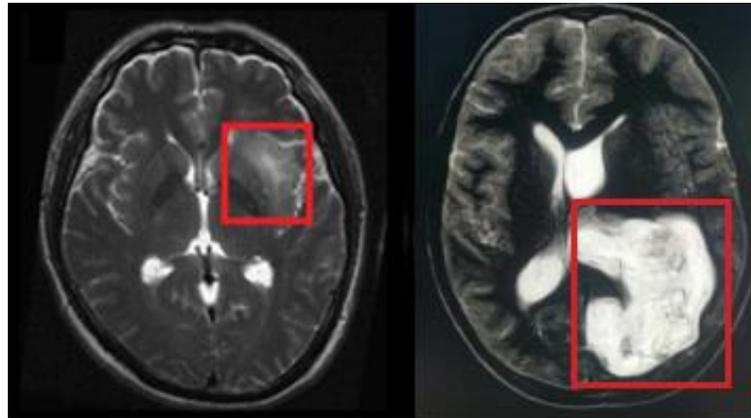


Figura 5. Resonancias magnéticas de 2 tumores, uno de bajo y otro de alto grado. Lado izquierdo: Resonancia magnética de un paciente con astrocitoma de bajo grado (Grado II de la OMS; señalado en el recuadro rojo) que presentó convulsiones secundarias generalizadas como síntoma inicial. Lado derecho: Resonancia magnética de paciente con endodimoma de alto grado (Grado IV de la OMS; señalado en recuadro rojo) (modificado de You; *et al.*, 2012).

La ubicación del tumor también es un factor importante para el desarrollo de epilepsia asociada a un tumor. El crecimiento tumoral en el área subcortical, en estructuras profundas de la línea media, tiene menos probabilidades de provocar convulsiones (Chang *et al.*, 2008). Se ha sugerido que la ubicación y la proximidad del tumor a la sustancia gris cortical, también es un factor importante en el desarrollo de la epilepsia en pacientes con glioma (Schaller & Rüegg, 2003). En general, los tumores localizados en lóbulos frontales y temporales, así como en el sistema límbico, son más propensos a causar convulsiones que aquellos localizados en otras regiones (Chang *et al.*, 2008). Es importante aclarar que no todos los pacientes que presentan algún tipo de tumor

localizado histopatológicamente en una misma región llegan a desarrollar convulsiones. Esto sugiere fuertemente que otros tipos de factores, como los genéticos, pueden desempeñar un papel muy importante en el desarrollo de la epilepsia asociada con la presencia de algún tumor (Rosati *et al.*, 2009).

En la actualidad existen dos teorías que tratan de explicar la patogénesis de la epilepsia relacionada con la presencia de algún tumor. Una de ellas considera su origen: el propio tumor puede liberar moléculas que podrían hacer que el tejido tumoral sea epileptogénico, o podría cambiar el microambiente peritumoral y convertirlo en una zona epileptogénica. La otra teoría es que el tumor, al comprimir mecánicamente el tejido normal circundante, lo convierte en epileptogénico después de sufrir isquemia e hipoxia. Ambos procesos podrían causar otro tipo de efectos secundarios, como son cambios en la disponibilidad de neurotransmisores y sus receptores, cambios metabólicos y favorecer la respuesta inflamatoria, lo que eventualmente, puede favorecer el desarrollo de crisis epilépticas (You *et al.*, 2012).

1.9. Fisiopatología de la epilepsia

La hiperexcitabilidad neuronal que ocurre durante las crisis epilépticas se debe a cambios en las propiedades de las membranas neuronales y en su actividad eléctrica, lo que se traduce en cambios del control homeostático en el espacio sináptico (D´Ambrosio, 2004). Una convulsión se puede conceptualizar que ocurre cuando hay una alteración del equilibrio normal entre la excitación (E) y la inhibición (I) en el

cerebro. Este desequilibrio E/I puede ser el resultado de variaciones en muchos niveles de la función cerebral, desde los genes y las cascadas de señalización intracelular, hasta los circuitos neuronales generalizados (Stafstrom & Carmant, 2015).

Normalmente existe una alta concentración de potasio dentro de una neurona y una alta concentración extracelular de sodio (Scharfman, 2007), así como también de cloro (Glykys *et al.*, 2017). Si el equilibrio está perturbado (por ejemplo, si el potasio está elevado en el espacio extracelular), esto puede conducir a la despolarización neuronal y por tanto a la liberación de neurotransmisores excitatorios (Somjen, 2002). Las bombas presentes en la membrana plasmática mantienen en equilibrio estos gradientes químicos y eléctricos, lo que plantea la posibilidad de que una anomalía en estas bombas pueda facilitar las convulsiones (Scharfman, 2007). Una de estas bombas es la ATPasa de sodio y potasio (NaKATPasa), y se ha demostrado en modelos experimentales que el bloqueo de esta bomba puede llevar a una actividad epiléptica, lo que sugiere que tiene un papel muy importante en el desarrollo de la epilepsia (Vaillend *et al.*, 2002). Además de las bombas NaKATPasa, la glía también proporciona controles importantes sobre la concentración de iones extracelulares, lo que ha llevado a suponer que las células gliales son tan importantes como las neuronas en la regulación de la actividad convulsiva (Fellin & Haydon, 2005). Es importante tener en cuenta que las convulsiones, por sí mismas, pueden conducir a los cambios en los gradientes transmembranales. Por ejemplo, las convulsiones son seguidas por un aumento en el potasio extracelular lo que puede a su vez, despolarizar

aún más las neuronas. Por lo tanto, el potencial transmembranal es un punto de control que, si se altera, podría provocar convulsiones y comenzar un ciclo "vicioso", presumiblemente controlado por muchos factores que mantienen la homeostasis, como la bomba NaKATPasa y la glía (Scharfman, 2007).

El glutamato y el ácido γ -aminobutírico (GABA) son los principales neurotransmisores excitador e inhibitor, respectivamente, del sistema nervioso central. El glutamato es un aminoácido no esencial y se produce principalmente por neuronas y células gliales a partir de precursores locales derivados de la glucosa y el α -cetoglutarato (Frisardi *et al.*, 2011). El glutamato participa junto con el GABA para modular la actividad de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas. La mayoría de las neuronas excitadoras en el SNC son glutamatérgicas; además, se estima que más de la mitad de las terminaciones nerviosas liberan glutamato (Walton & Dodd, 2007). La despolarización presináptica promueve que las vesículas sinápticas liberen su contenido de glutamato en la sinapsis a través de la exocitosis, donde el glutamato liberado se une a los receptores ionotrópicos y metabotrópicos postsinápticos, estimulando el influjo de cationes que despolariza a la célula postsináptica (Campos-Peña & Meraz-Ríos, 2014). Por su parte, el GABA al ser liberado por la neurona presináptica (Figura 6) activa a los receptores GABA-A postsinápticos y permite la entrada de aniones cloruro

(Cl⁻) a través de la membrana, lo que da como resultado la hiperpolarización de la neurona postsináptica (Glykys *et al.*, 2017).

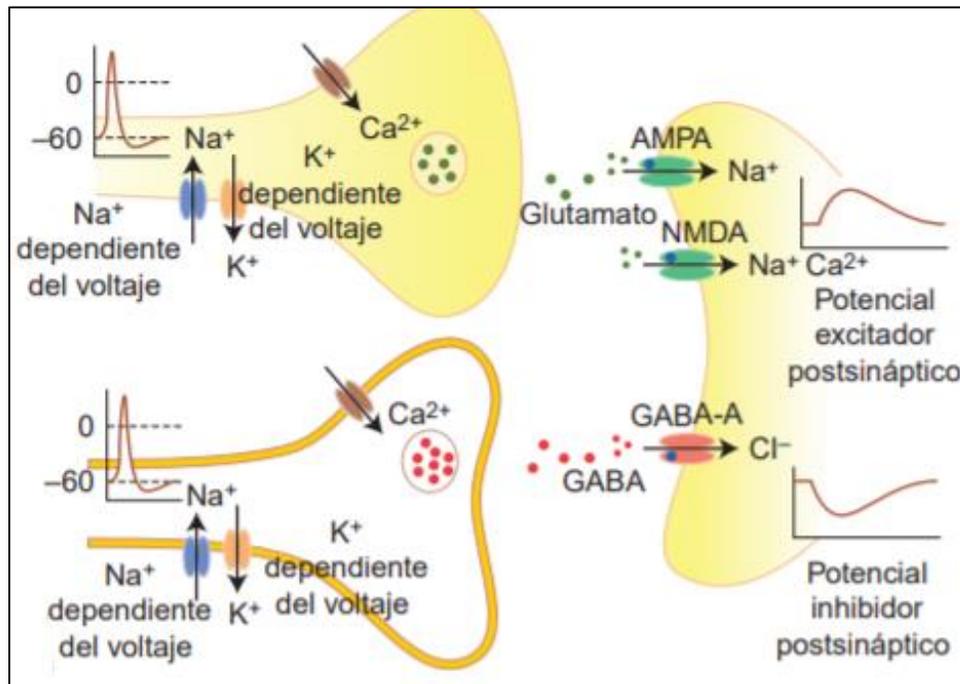


Figura 6. Transmisión sináptica. En esta imagen se observa el potencial de acción nervioso y la transmisión sináptica. Se genera por la apertura sucesiva de canales dependientes de voltaje (Na⁺ y K⁺). La transmisión sináptica se realiza mediante la liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica. Los neurotransmisores se unen al receptor de la neurona postsináptica. Según la naturaleza del neurotransmisor, la unión de este sobre el receptor produce una despolarización cuando se trata de un neurotransmisor de la vía excitadora o una hiperpolarización cuando se trata de un neurotransmisor de la vía inhibitoria. Cuando estas dos vías se encuentran en desequilibrio, por diversos mecanismos, se puede generar una descarga epileptiforme. Modificado de Auvin (2014).

Sin embargo, es importante señalar que tanto el glutamato como el GABA pueden no tener una relación simple y directa con la presencia de las convulsiones. Una razón es que los receptores de glutamato y GABA pueden presentar desensibilización y reducir sus efectos. Además, los axones de las neuronas glutamatérgicas inervan a otras

neuronas excitatorias y a las neuronas GABAérgicas en muchos sistemas neuronales. Es sorprendentemente difícil predecir cómo la modulación del glutamato o del GABA influyen en la generación de convulsiones *in vivo*, dadas estas características básicas de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica (Scharfman, 2007).

De los receptores de glutamato ionotrópicos postsinápticos, los de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) son críticos para la neurotransmisión excitadora rápida, mientras que los de N- metil-D- aspartato (NMDAR) median gran parte de los potenciales excitatorios postsinápticos lentos, esenciales para el procesamiento global de la información (Barker-Haliski & White, 2015). El glutamato también puede interactuar con un receptor ionotrópico adicional, el de kainato (KAR) (Lerma & Marques, 2013) y con otros metabotrópicos, pre y postsinápticos (mGluRs). El efecto del glutamato sobre estos subtipos de receptores estimula una serie de eventos pre y postsinápticos excitatorios, los cuales subyacen a la actividad neuronal normal y anormal. En condiciones normales, el glutamato sináptico está sujeto a recaptación tanto por los astrocitos como por las mismas neuronas a través de los transportadores de glutamato: el transportador de glutamato 1 (GLT-1) y el transportador de glutamato/l-aspartato (GLAST) (Barker-Haliski & White, 2015), también conocido como transportador de alta afinidad de aminoácido excitatorio (EAAT). El transporte de glutamato mediado por EAAT es dependiente de Na^+ ; en cada ciclo una molécula de glutamato se transporta junto con dos o tres iones Na^+ y un H^+ al espacio intracelular a cambio de un ion de K^+ que sale al espacio extracelular.

Éstos también interactúan con otras proteínas en la membrana plasmática y están regulados por proteínas cinasas, factores de crecimiento y segundos mensajeros (Robinson, 2002). Las alteraciones en este sistema regulador, así como las mutaciones genéticas en los transportadores y las enzimas involucradas en el metabolismo del glutamato, pueden provocar daños excitotóxicos debido a una liberación excesiva de glutamato, que a su vez puede causar la muerte neuronal (Campos-Peña & Meraz-Ríos, 2014).

En la epilepsia, la expresión de *GLT-1* y *GLAST* está regulada negativamente, un efecto que puede contribuir a un mayor daño excitotóxico en condiciones de liberación crónica de glutamato provocada por las convulsiones (Barker-Haliski & White, 2015).

Hay que destacar que la descarga excesiva de glutamato por sí misma no necesariamente causa una convulsión. La sincronización de una red de neuronas debe estar involucrada y existen diferentes formas en que las neuronas se pueden sincronizar. Las interconexiones glutamatérgicas son un ejemplo de un mecanismo que puede conducir a la sincronización. Se sabe que las células piramidales de la corteza están ricamente interconectadas entre sí por las sinapsis glutamatérgicas (Scharfman, 2007). Las uniones gap en las neuronas corticales son otro mecanismo para la sincronización pues permiten una vía de baja resistencia al flujo de corriente eléctrica de una célula a otra, de modo que las neuronas acopladas se sincronizan

rápida y efectivamente (Traub *et al.*, 2004). Otro mecanismo de sincronización implica, paradójicamente, inhibición; muchas neuronas GABAérgicas hacen numerosas conexiones a las células piramidales en un área local. Esto activa los canales iónicos dependientes de voltaje de las células piramidales. El resultado es una despolarización que es sincrónica en un grupo de células piramidales. Algunos de los cambios que se desarrollan dentro del cerebro de las personas con epilepsia también promueven la sincronización y pueden ser una de las razones por las cuales las convulsiones son recurrentes. Estos cambios incluyen el crecimiento de las colaterales axónicas de las neuronas excitatorias, por lo general las que usan glutamato como neurotransmisor, por ejemplo, la célula granular del giro dentado (Sloviter *et al.*, 2006). En modelos animales de epilepsia y en pacientes con epilepsia, los axones de las células granulares desarrollan nuevas colaterales que generan nuevos circuitos excitatorios sinápticos. La "reorganización sináptica" resultante puede contribuir a la sincronización, e ilustra cómo la plasticidad del sistema nervioso puede contribuir a la epileptogénesis (Scharfman, 2007).

Esta sincronización también es apoyada por células de la glía. La actividad neuronal induce la liberación de glutamato desde la terminal presináptica de la neurona. El exceso de glutamato liberado escapa de la hendidura sináptica y activa los mGluRs del grupo I (mGluR5 en particular) en los astrocitos, dando como resultado la activación de PLC β , aumento de Ca²⁺ intracelular y la liberación de glutamato de los astrocitos. El glutamato se difunde a las neuronas vecinas (Figura 7), donde activa receptores

NMDA extrasinápticos y receptores AMPA, lo que resulta en una potenciación sincronizada de múltiples células piramidales (McNamara *et al.*, 2006).

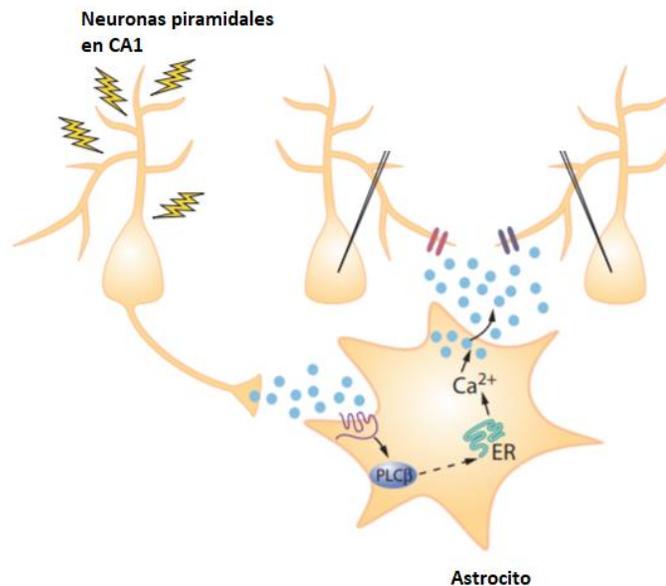


Figura 7. Glía y epilepsia. La glía puede contribuir a la sinapsis excitatoria glutamatérgica (modificado de McNamara *et al.*, 2006).

Por otro lado, se han considerado algunos mecanismos moleculares que podrían conducir a la epilepsia. Se han reportado varias mutaciones en la vía PI3K / IGF / mTOR junto con malformaciones cerebrales que están fuertemente asociadas con la epilepsia (Guerrini & Dobyns, 2014). La activación de esta vía puede ser un paso necesario en el crecimiento de los procesos neurales aferentes y eferentes, de modo que la sobreactivación de la vía mTOR puede conducir a una conectividad neuronal aberrante (Staley, 2015). Así mismo, la vía del factor de transcripción de silenciamiento

de RE1 (REST) -activada por el estado epiléptico- modula la expresión de diferentes genes como los que codifican las diferentes subunidades de los receptores de GABA (como *GABRB3* y *GABRD*), glutamato (como *GRIA2*) y canales de potasio (como *KCNC2/3*) (Goldberg & Coulter, 2013).

1.10. Inflamación y epilepsia

Se sabe que la inflamación en el sistema nervioso central (SNC) es una característica importante en muchas enfermedades neurodegenerativas (Webster *et al.*, 2017). Aunque el término “neuroinflamación” carece de una definición consensuada, en términos generales, podemos definirla como la biosíntesis y liberación de moléculas con propiedades pro-inflamatorias por células residentes del cerebro, incluidas la microglía y astrocitos, neuronas, células endoteliales de la BHE y macrófagos de sangre periférica (Varvel *et al.*, 2016).

La neuroinflamación no sólo se desencadena en respuesta a factores "clásicos", como son la presencia de infecciones, autoinmunidad o toxinas; sino también por factores que conducen a un aumento de la actividad neuronal, como pueden ser las crisis epilépticas (Yamanouchi *et al.*, 2017). La acumulación de evidencia preclínica y clínica sugiere que existe un ciclo de retroalimentación positiva entre la epileptogénesis y la inflamación cerebral. Las convulsiones epilépticas aumentan los mediadores

inflamatorios clave, éstos, causan un daño secundario al cerebro y aumentan la probabilidad de convulsiones recurrentes (Shimada *et al.*, 2014).

Los mediadores inflamatorios liberados por las células cerebrales (Figura 8) durante la actividad epiléptica (citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, factores del complemento, etc.), no sólo promueven una inflamación local, sino que también funcionan como neuromoduladores afectando directamente la función y excitabilidad neuronal (Ravizza & Vezzani, 2018). La epileptogénesis se asocia, junto con el daño neuronal y la gliosis, con un estado inflamatorio elevado y persistente en el microentorno del tejido neuronal (Alyu & Dikmen, 2017). Una amplia gama de investigaciones sobre la neuroinflamación y la epilepsia se han centrado en el hipocampo debido a la patología, fisiología y manifestaciones clínicas bien documentadas de la esclerosis hipocampal (Rana & Musto 2018). Sin embargo, la evidencia también ha asociado a la neuroinflamación con la muerte de células neuronales extrahipocampales y con la gliosis (Jung *et al.*, 2009). Por esto se cree que un estado agudo de neuroinflamación, como el que provoca las crisis epilépticas, contribuye y empeora un estado preexistente de inflamación crónica (Rana & Musto 2018).

En los últimos años, un conjunto complejo de moléculas inflamatorias, como IL-1 o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y sus receptores se han descrito en focos

epileptogénicos en diferentes formas de epilepsias farmacorresistentes (Vezzani *et al.*, 2011). Al activar las vías mediadas por estos receptores, tales como el receptor de IL-1 (IL1R1) o el receptor tipo Toll (TLR), estas moléculas tienen efectos neuromoduladores distintos a su función inmunológica canónica. Es importante destacar que las acciones neuromoduladoras de algunas moléculas inflamatorias contribuyen a la hiperexcitabilidad en las redes neuronales que subyacen a las convulsiones (Iori *et al.*, 2016).

1.10.1. Citocinas

Las citocinas son proteínas que modulan los procesos inflamatorios, en el SNC, producidas principalmente por las células gliales y neuronas durante la inflamación cerebral (Bartfai *et al.*, 2007). Las citocinas proinflamatorias, como la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-2 y la IL-6, concentradas en pequeñas cantidades dentro del cerebro, aumentan después de las convulsiones causando cambios sinápticos perjudiciales y una hiperexcitación neuronal. Las citocinas secretadas por la microglía y astrocitos incluyen a las IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Vezzani *et al.*, 2011).

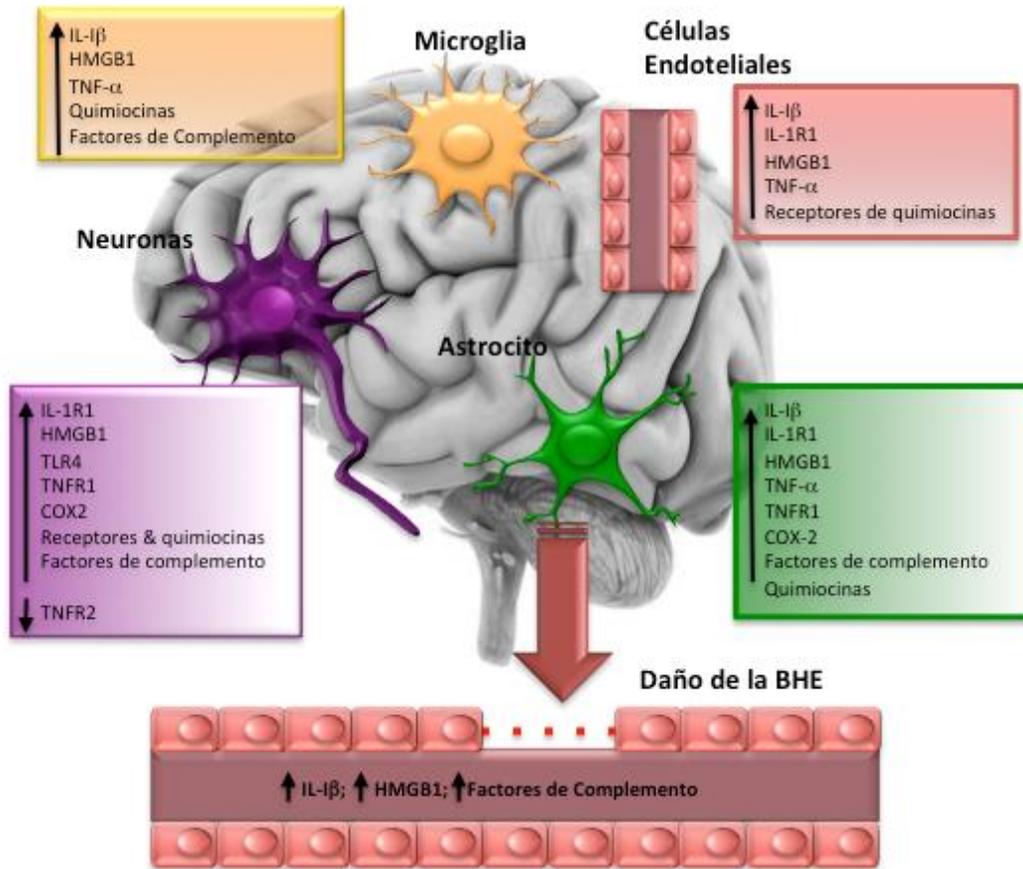


Figura 8. Mediadores inflamatorios liberados en el tejido cerebral epileptogénico. Cada uno de los mediadores inflamatorios (citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, factores del complemento), son liberados por las células residentes del cerebro durante las convulsiones o después de acontecimientos epileptogénicos. La barrera hematoencefálica (BHE), también pueden afectar directamente la excitabilidad neuronal por los cambios en los receptores y canales iónicos. Modificado de van Vliet *et al.* 2018. IL: Interleucina; TNF: Factor de necrosis tumoral; HMGB1: Proteína 1 del grupo de alta movilidad; TNFR1: Receptor 1 de TNF; COX2: Ciclooxygenasa 2; TLR4: Receptor tipo Toll 4; IL-1R1: Receptor1 de IL-1.

La secreción de este tipo de citocinas aumenta en los estados inflamatorios y regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune (Turner *et al.*,2014). La IL-1 (α y β)

induce la producción de IL-6 (Tsakiri *et al.*, 2008), aumenta la actividad de la acetilcolinesterasa neuronal (Li *et al.*, 2000), la activación microglial y la producción adicional de IL-1 (α y/o β) (Rothwell & Luheshi, 2000), con la consecuente activación y expresión de más citocinas pro-inflamatorias, estableciendo así un proceso de auto-propagación (Heneka *et al.*, 2010). Como se ilustra en la figura 9, estas citocinas son liberadas por células endoteliales, así como por la glía y neuronas en el SNC, lo que permite la comunicación entre las células efectoras y las células blanco durante el proceso inflamatorio (Vezzani *et al.*, 2011). Así mismo, se sabe que las citocinas pueden provocar un estado de hiperexcitación neuronal ya que al unirse a sus receptores activan vías de señalización que implican la liberación de calcio intracelular mediante Inositol trifosfato (IP3) y proteínas G, para activar a la proteína cinasa cinasa A (PKA) y a la proteína cinasa C (PKC), entre otras cinasas. Este aumento de calcio intracelular provoca la liberación de glutamato al espacio extracelular (Tzeng, 2007; Turner *et al.*, 2014; Chavan *et al.*, 2017).

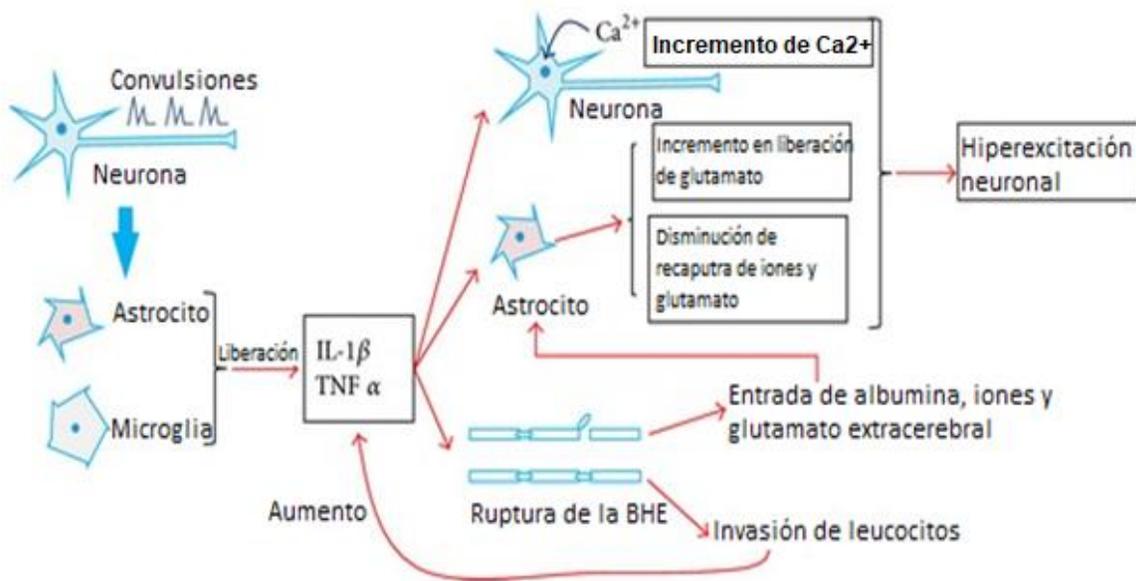


Figura 9. Mecanismos inflamatorios de las citocinas propuestos en la epileptogénesis. Las crisis epilépticas inducen la liberación de citocinas de las células gliales, lo que aumenta la afluencia de calcio neuronal así como la concentración de glutamato extraneuronal; disminuye la captación de K⁺ y glutamato por la glía y deteriora la BHE. La ruptura de la BHE conduce a la entrada de albúmina, iones y glutamato extracerebral y a la invasión de leucocitos en el cerebro, lo que resulta en una mayor liberación de citocinas inflamatorias. Tales respuestas inflamatorias provocan una inducción a la hiperexcitabilidad neuronal, recurrencia de convulsiones y, finalmente, al desarrollo de epilepsia refractaria (modificado de Shimada *et al.*, 2014).

1.10.2. Interleucina-1β

La citocina proinflamatoria IL-1β se expresa en los astrocitos y la microglía activa, incrementa la liberación de glutamato de los astrocitos y disminuye su recaptura, aumentando su disponibilidad en la sinapsis y promoviendo la hiper-excitabilidad neuronal (Alyu & Dikmen, 2016). Igualmente, se ha sugerido que la IL-1β induce crisis epilépticas a través de la sobre-regulación de los receptores NMDA en la célula postsináptica mediante la activación de la subunidad GluN2B del receptor NMDA

(Viviani, 2003). Las concentraciones fisiopatológicas de IL-1 β presentes en la epilepsia del lóbulo temporal (ELT), disminuyen la neurotransmisión mediada por GABA en hasta un 30% y conducen a la generación de convulsiones debido a la hiperexcitabilidad neuronal (Roseti, 2015).

1.10.3. Interleucina-6

La IL-6 es una citocina proinflamatoria que se expresa con niveles bajos en el SNC, pero la estimulación de astrocitos y microglía puede favorecer el incremento en su expresión (Jüttler *et al.*, 2002). Esta citocina puede también ser regulada por el incremento de otras citocinas, como TNF, IL-1 β , interferón gamma (IFN- γ) e IL-17 (Gruol, 2015). La sobre-regulación de *IL-6* disminuye la potenciación a largo plazo (LTP) y la neurogénesis en el hipocampo, al mismo tiempo que aumenta la gliosis, creando condiciones que pueden contribuir a la epileptogénesis (Erta *et al.*, 2012; Levin & Godukhin, 2017). Se ha propuesto que la exposición prenatal a IL-6, resulta en un incremento en el riesgo de neurodegeneración del hipocampo, generando cambios tanto en la morfología como en la estructura (Samuelsson *et al.*, 2006). Por otro lado, la participación de la IL-6 en la neuroinflamación que conduce al desarrollo de la epilepsia ha sido demostrada en diversos modelos (Samland *et al.*, 2003; Qiu & Gruol, 2003; Minami *et al.*, 1991). Por ejemplo, la administración intranasal de IL-6 en ratones provoca un estado pro-convulsivo (Erta *et al.*, 2012).

1.10.4. Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

El TNF- α es liberado por los astrocitos y microglía en estado activo (Pan *et al.*, 1997). Las células gliales tienen la capacidad de censar los niveles extracelulares de glutamato y, al detectar niveles bajos de esta molécula, liberan TNF- α para incrementar la actividad sináptica y mantener el nivel del impulso excitatorio neuronal (Stellwagen & Malenka, 2006). El TNF- α regula a la proteína N-cadherina, una molécula de adhesión involucrada en la formación y organización de las sinapsis excitadoras e inhibitorias (Kubota *et al.*, 2009). También, se ha observado que el TNF- α aumenta la liberación de glutamato microglial mediante la regulación positiva de la glutaminasa (Takeuchi *et al.*, 2006), regula el aumento de los receptores AMPA, lo que conduce a un incremento en la transmisión glutamatérgica (Beattie *et al.*, 2002). El aumento de receptores AMPA permite a su vez la entrada masiva de Ca^{++} , induciendo neurotoxicidad (Galic *et al.*, 2012). Otro aspecto importante es, que además de aumentar el número de receptores de glutamato, se induce la endocitosis de receptores GABA, reduciendo el impulso inhibitorio y causando cambios en la excitabilidad neuronal (Stellwagen *et al.*, 2005).

1.10.5. Ciclo-oxigenasa-2 (COX-2)

La ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) es una enzima codificada por el gen prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (*PTGS2*), localizado en el cromosoma 1 (Li *et al.*, 2018). Su expresión se encuentra regulada por varios factores, como son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), citocinas como IL-1 y TNF- α , glucocorticoides,

mineralocorticoides y endotoxinas bacterianas (Dey *et al.*, 2016). Dentro del SNC, *PTGS2* se expresa en neuronas neocorticales y del hipocampo, y en algunas condiciones patológicas puede ser inducida en microglía y astrocitos (Feng *et al.*, 1995; Krishnaswamy *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 1999). La COX-2 cataliza pasos clave de la síntesis de prostanoïdes en las células de mamífero. El prostanoïde más importante de la COX-2 parece ser la prostaglandina E2 (PGE2), un mediador celular en la respuesta inflamatoria, y así mismo la PGE2 es capaz de inducir la expresión de *PTGS2* en las células microgliales (Heneka *et al.*, 2010). La enzima COX-2 se induce rápidamente durante las convulsiones. El aumento del nivel de COX-2 en áreas específicas del cerebro epiléptico puede ayudar a identificar regiones de inflamación cerebral inducida por convulsiones (Rojas *et al.*, 2014). La PGE2 promueve la vasodilatación local, la infiltración de células inmunes y la regulación positiva de muchos mediadores proinflamatorios en regiones cerebrales inflamadas por lo que se ha sugerido (Dey *et al.*, 2016) que la COX-2 facilita las convulsiones a través de la PGE2 (Figura 10). En este sentido, se sabe que PGE2 estimula al receptor de prostaglandinas E3 (EP3) en los astrocitos, incrementando la liberación de glutamato astrocítico e induciendo la hiperexcitabilidad y muerte neuronal y, por otro lado, la inhibición de EP3 puede retrasar la inducción de la crisis (Shimada 2014).

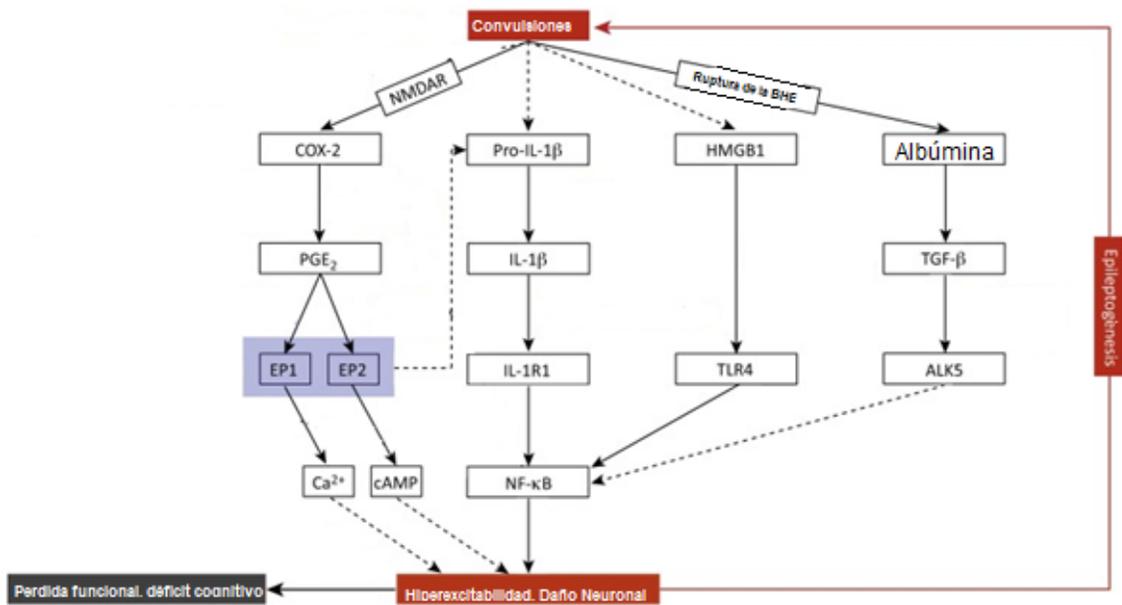


Figura 10. Señalización mediada por PGE2 y las convulsiones. PGE2 actúa sobre cuatro receptores acoplados a proteínas G (GPCR), concretamente EP1, EP2, EP3 y EP4. La activación del receptor EP1 juega un papel importante en la permeabilidad de la BHE después de accidentes cerebrovasculares isquémicos. Así mismo, hay una creciente evidencia que relaciona la activación del receptor EP2 con la PGE2 y la neurotoxicidad secundaria en modelos de inflamación crónica y neurodegeneración a través del aumento de los niveles de cAMP y Ca^{2+} intracelular. También, la activación de la COX-2 y la cascada de prostaglandinas induce citocinas proinflamatorias, incluidas IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que a su vez inducen la transcripción de COX-2 que compromete a la vía de NF- κ B y así perpetúan las reacciones inflamatorias en la periferia y el cerebro (modificado de Dey *et al.*, 2016). EP1: Receptor de prostaglandinas E1; EP2: Receptor de prostaglandinas E2; cAMP: Adenosín monofosfato cíclico; NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa B; ALK5: Cinasa 5 de tipo activina.

1.10.6. Receptor del complemento 1 (CR1)

Por su parte, CR1 es un activador de la respuesta inmune mediada por el sistema del complemento. La ruta del CR1 en éste activa la opsonización de patógenos para su absorción fagocítica y su posterior destrucción (Jacobson & Weis, 2008). Se ha demostrado que varias proteínas del sistema del complemento se expresan en exceso

en pacientes con epilepsia y en modelos experimentales (Whitney & McNamara, 2000; Xiong *et al.*, 2003). También, se ha encontrado una asociación genética del componente 3 del complemento (C3), la proteína más importante y abundante del sistema del mismo, con el desarrollo de epilepsia en pacientes con ELT y antecedentes de convulsiones febriles, lo que sugiere un papel muy importante del sistema del complemento en la ELT (Jamali *et al.*, 2006; van Vliet *et al.*, 2018). Estudios con ratones deficientes en el componente C3, desarrollaron significativamente menos convulsiones conductuales después de una infección con una tasa convulsiva comparable a la de los ratones control. Estos estudios indican que el complemento participa en la inducción de convulsiones agudas durante las infecciones (Libbey *et al.*, 2010). Se sabe que el sistema del complemento participa en los procesos de poda sináptica mediante la opsonización (Stevens *et al.*, 2007). En modelos de roedores, durante la fase de remodelación neural en la epilepsia, los componentes C1q, C3 y C4 se regulan al alza en las células microgliales del hipocampo. Esto sugiere que durante las convulsiones iniciales las células gliales median el proceso de poda como un mecanismo inflamatorio para compensar la hiperactividad inducida por el crecimiento de sinapsis aberrantes (Aronica *et al.*, 2007). Además, las convulsiones se asocian con la regulación al alza de la señalización a través de CX3CL1 y su receptor microglial CR1 (Figura 11), que tienen roles en la poda y la maduración sináptica (Xu *et al.*, 2012). El aumento de la señalización de CX3CL1 y de CR1 se vincula con la migración microglial al sitio de la inflamación (Ali *et al.*, 2015), con la muerte neuronal y con una reducción de la función GABAérgica (Roseti *et al.*, 2013), lo que agrava el desequilibrio excitatorio/inhibitorio en respuesta a convulsiones iniciales (Neniskyte & Gross, 2017).

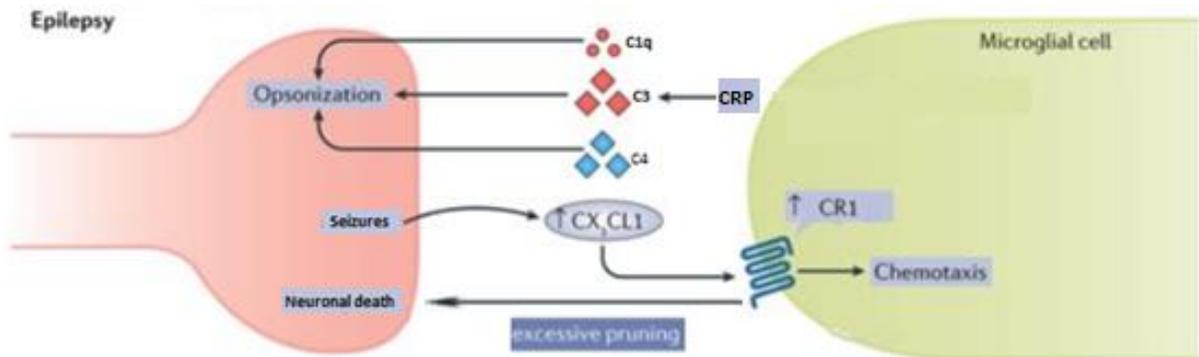


Figura 11. Componentes moleculares de la poda sináptica aberrante por la glía en la epilepsia.

Las opsoninas complementarias C1q, C3 y C4 están reguladas al alza en el cerebro de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (en microglía, astrocitos y neuronas), así como CX3CL1 y su receptor, CR1, lo cual se asocia con la migración microglial al sitio de la inflamación (quimiotaxis), con la muerte neuronal y con una reducción de la función GABAérgica (modificado de Neniskyte & Gross, 2017).

1.10.7. Proteína C reactiva (CRP)

La proteína C reactiva (CRP) fue la primera proteína de fase aguda descrita, se trata de un marcador sistémico de inflamación y daño tisular. Cuando la CRP humana es reconocida por el sistema del complemento activa la vía clásica del complemento, particularmente por la vía de la opsonina C3 (Wolbink *et al.*, 1996). CRP tiene similitud con algunas de las propiedades clave de los anticuerpos, lo que sugiere que, en diversas circunstancias, esta proteína puede contribuir a la defensa del huésped contra una infección y funcionar como un mediador proinflamatorio (Lloyd-Jones *et al.*, 2006). Se ha observado también que los niveles basales de la CRP son más altos en pacientes con epilepsia refractaria en comparación con controles sanos lo que sugiere que las convulsiones estimulan la producción de CRP (Alapirtti *et al.*, 2012).

1.11. ApoE y epilepsia

La apolipoproteína E (ApoE) es una glicoproteína que se expresa en varios tipos de células, pero en mayor medida en el hígado y en el SNC (Mahley, 1988). En el cerebro, la *APOE* se expresa predominantemente en astrocitos, pero también en la microglía y posterior a una lesión excitotóxica algunas neuronas son capaces de sintetizarla (Xu *et al.*, 2006). Es la lipoproteína más abundantemente producida en el SNC y es secretada por células gliales mediante partículas que tienen forma discoidal y contienen fosfolípidos y colesterol (DeMattos *et al.*, 2001). La ApoE funciona como un ligando en la endocitosis mediada por receptores de partículas de lipoproteínas en el SNC (Holtzman *et al.*, 2012). Los estudios *in vitro* han mostrado que el colesterol liberado de las partículas de lipoproteínas que contienen ApoE se usa para apoyar el mantenimiento de las conexiones sinápticas (Mauch *et al.*, 2001). La presencia de ciertas variantes alélicas del gen *APOE* se ha asociado con una variedad de fenotipos de enfermedades humanas, que incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (Liu *et al.*, 2013). Otro estudio ha señalado su estrecha relación en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente, sugiriendo que al igual que en la EA, la presencia del alelo *APOE* ϵ 4 se asocia con un inicio más temprano de la ELT y, por lo tanto, puede ser una variante genética patogénica (Briellmann *et al.*, 2000). Así mismo, se sabe que la inflamación puede ser modulada por la ApoE mediante la interacción con el receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) presente en la glía (Tai *et al.*, 2015). Los datos publicados apoyan que en la microglía el patrón: *APOE* ϵ 2 \geq *APOE* ϵ 3 \geq *APOE* ϵ 4 (indica que el efecto descrito a continuación se ha visto favorecido con el genotipo ϵ 2 en comparación con los genotipos ϵ 3 y ϵ 4)

puede activar de manera diferencial la vía de NF- κ B, a través de LRP1, modulando a la baja los niveles de diferentes mediadores inflamatorios (TNF α , NO, IL-1 β o IL-6), y, por el contrario, los niveles de estos mediadores son mayores con el patrón: *APOE* ϵ 4 \geq *APOE* ϵ 3 \geq *APOE* ϵ 2 (indica que este efecto se ha visto favorecido con el genotipo ϵ 4 en comparación con los genotipos ϵ 2 y ϵ 3) (Maezawa *et al.*, 2006). Por lo tanto, dependiendo de la variante de *APOE* se verá afectada la respuesta inflamatoria (Tai *et al.*, 2015).

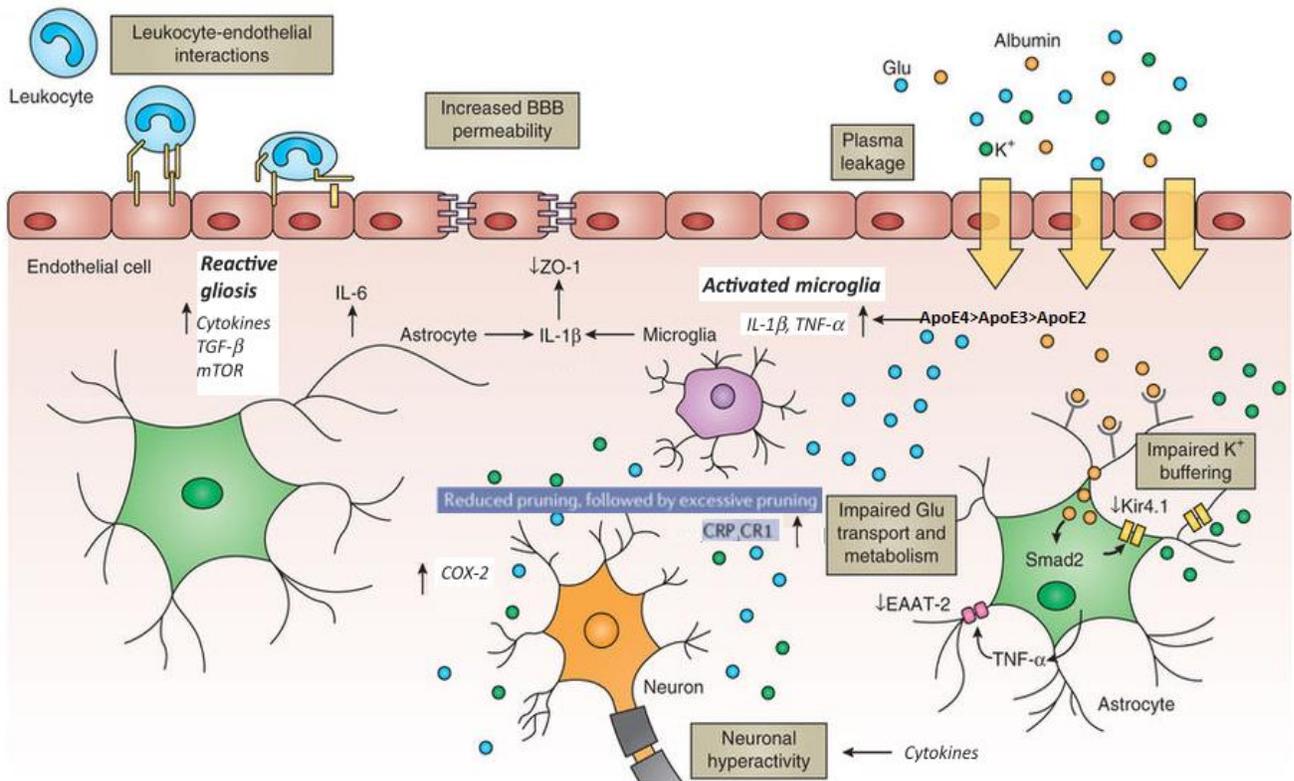


Figura 12. Inflamación y Epilepsia. En esta imagen se resume como la inflamación puede afectar el microambiente neuronal, así como activar diferentes vías de señalización que conllevan a un aumento en la actividad neuronal, en la epileptogénesis, la ruptura de la BHE y la excitotoxicidad (modificada de Obermeier *et al.*, 2013).

2. ANTECEDENTES

El estudio de la inflamación en el cerebro y su importancia en la neurodegeneración ha revelado que las citocinas y las prostaglandinas tienen un papel muy importante en el desarrollo de muchas enfermedades neurodegenerativas (Allan & Rothweel, 2001; Kempuraj *et al.*, 2016; Domingues *et al.*, 2017), incluyendo la epilepsia (Li *et al.*, 2011;

Devinsky *et al.*, 2013; Paudel *et al.*, 2018). Se ha descrito, a partir del análisis de tejido cerebral humano, cultivos celulares y estudios en animales transgénicos, que existe una asociación entre la neurodegeneración y los polimorfismos en genes pro-inflamatorios (Nicoll *et al.*, 2000).

La identificación de variantes genéticas (polimorfismos) en genes asociados a la inflamación ha tenido una gran relevancia en el estudio de los procesos neurodegenerativos tales como la epilepsia (Webster *et al.*, 2017). En un estudio realizado por Kariuki *et al.* (2013) se demostró que el genotipo recesivo G/G de la variante genética rs17047660 presente en el gen de *CR1* contribuye a desarrollar convulsiones febriles asociadas a la malaria en niños africanos (Kariuki *et al.* 2013). Así mismo, la variante genética rs6656401 de *CR1* se ha asociado con otras enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer (Lambert *et al.*, 2009) y la angiopatía amiloide cerebral (Biffi *et al.*, 2012). Esta variante genética también puede actuar en conjunto con la variante *APOE* ϵ 4 para contribuir con el deterioro cognitivo en la población caucásica estadounidense (Keenan *et al.*, 2012).

De igual forma, se encontró una relación entre el alelo A de la variante genética rs689466 en el gen de COX-2 y las convulsiones febriles en la población taiwanesa (Hung *et al.*, 2017). También se observó que el genotipo C/T de la variante genética

rs1143634 en el gen de IL-1 β se asoció con un mayor riesgo de desarrollar epilepsia post-traumática en una población caucásica (Diamond *et al.*, 2014).

Contrario a lo observado en los genes de COX y CR1, no se encontró relación entre el riesgo de desarrollar convulsiones febriles y la presencia de variantes genéticas en los genes de IL-1 α e IL-1 β en la población china (Yu *et al.*, 2018). Se ha observado que la presencia de los alelos C de los polimorfismos rs1800947 y rs1130864 del gen de CRP, incrementa el riesgo de que ocurra un accidente vascular isquémico (Kuhlenbaeumer *et al.*, 2010). Dado el papel que tiene la CRP en el desarrollo de la epilepsia es necesario investigar si variantes genéticas en el gen *CRP* pudieran representar un riesgo para desarrollo de dicha enfermedad. Las variantes genéticas que se evalúan en la presente investigación ya han sido estudiadas en otros estudios en diferentes enfermedades como la esclerosis múltiple en la población polaca (Mirowska-Guzel *et al.*, 2011) y la enfermedad de Alzheimer en la población mexicana (Toral-Rios *et al.*, 2015).

Antecedentes directos de nuestro laboratorio, sugieren que la presencia de variantes genéticas en los genes que codifican para CR1, TNF- α y COX-2 pudieran estar asociados con la presencia de esclerosis mesial temporal en pacientes mexicanos con epilepsia. El análisis de las frecuencias alélicas señala que el efecto de la presencia

del alelo G en la variante del gen *CR1* se encuentra fuertemente asociado con la ELT mesial ($p=0.007$).

3. JUSTIFICACIÓN

Las personas con epilepsia sufren de discriminación, incompreensión, estigma social, y el estrés de vivir con una enfermedad crónica e impredecible, que puede conducir a la pérdida de autonomía para las actividades de la vida diaria (Quintas *et al.*, 2012). Aunque la epilepsia puede tratarse con éxito en muchos casos, la brecha de tratamiento es enorme, especialmente en países de ingresos medios y bajos, debido a que los medicamentos antiepilépticos son inaccesibles, muchas veces debido a su alto costo. Además, no todos los pacientes responden a los tratamientos farmacológicos disponibles. Por otro lado, se ha demostrado que la cirugía y otros procedimientos como son la neuroestimulación y dieta hipocalórica pueden ser otras rutas terapéuticas que ayudan a mejorar la calidad de vida de los pacientes (Moshé *et al.*, 2015). En este contexto es importante seguir investigando acerca de los mecanismos patológicos relacionados con la epilepsia para poder ofrecer mejores tratamientos a los pacientes y, aunque los mecanismos patológicos en la epilepsia siguen siendo poco claros, evidencia creciente muestra que la expresión de genes relacionados con la inflamación contribuye a su etiopatogenia (Cui *et al.*, 2015).

En años recientes, ha habido una creciente aparición de información sobre las bases genéticas de los síndromes epilépticos. Las mutaciones presentes tanto en uno como en varios genes pueden conducir al desarrollo de la epilepsia y muchos de los síndromes epilépticos, tienen una base genética compleja, que contribuye a un estado de excitabilidad celular alterada, que subyace a la epilepsia (Stafstrom & Carmant, 2015). En este sentido, las variantes de un solo nucleótido (SNV), antes conocidos como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), son una de las herramientas más empleadas en los estudios de asociación genética (Iniesta *et al.*, 2005), por lo que resulta importante investigar si algunas variaciones pueden representar algún cambio en el riesgo para el desarrollo de la epilepsia. Cabe mencionar que diversas asociaciones genéticas recomiendan no usar el término polimorfismo, debido al significado impreciso que se le ha dado en el uso coloquial, y en su lugar optar por usar términos neutros como variante o cambio genético (den Dunnen *et al.*, 2016), sin embargo, en el presente trabajo también se utiliza el término polimorfismo debido al uso frecuente con el que aún se utiliza el término y así evitar alguna confusión con aquellos que no se encuentren familiarizados con la nomenclatura actual.

Las SNV son la forma más simple de variación del ADN entre los individuos y se presentan a lo largo del genoma a una frecuencia de aproximadamente uno en cada mil pares de bases. Pueden ser responsables de la diversidad entre los individuos, la evolución del genoma, los rasgos familiares más comunes, las diferencias en la respuesta a los fármacos en las enfermedades complejas y comunes como la diabetes,

la obesidad, la hipertensión y trastornos neurológicos como la epilepsia (Shastry, 2009).

Las variaciones genéticas juegan un papel importante en la etiología de los trastornos epilépticos (Myers & Mefford, 2015). La determinación de la patogenicidad en las variantes genéticas de pacientes con epilepsia es fundamental para asesorar a las familias sobre el riesgo recurrente. Más aún, en un futuro, podrían permitir el desarrollo de un tratamiento molecular específico (Lohmann & Klein, 2014).

En la última década, el número de genes implicados en la epilepsia ha crecido exponencialmente (Ran *et al.*, 2014). Estos descubrimientos genéticos han revolucionado la práctica clínica para evaluar las bases moleculares de la epilepsia y sentar las bases para el futuro desarrollo de la medicina en epilepsia. Sin embargo, a pesar de estos avances significativos, las etiologías moleculares para la mayoría de los pacientes con epilepsia siguen siendo confusas y la mayoría de los estudios en genética y genómica se han realizado en poblaciones caucásicas (Wang *et al.*, 2017). Como se ha mencionado en los antecedentes, muchos estudios (Biffi *et al.*, 2012; Kariuki *et al.* 2013; Diamond *et al.*, 2014; Toral-Rios *et al.*, 2015; Hung *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018) han encontrado una asociación entre algunas enfermedades, entre ellas la epilepsia, y las variantes genéticas relacionadas a la inflamación, lo que ha puesto en evidencia la importancia que tiene estudiarlas para poder detectar posibles

marcadores genéticos asociados a la inflamación en distintas patologías como la epilepsia. En México, son pocos los trabajos que estiman la influencia de factores genéticos y la neuroinflamación en el curso de la epilepsia (Cruz-Cruz *et al.*, 2017). Por lo que en esta investigación se estudiaron algunos polimorfismos presentes en los genes que codifican para COX-2, CR1, CRP, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en pacientes mexicanos con epilepsia del lóbulo temporal con y sin esclerosis hipocampal, y epilepsia secundaria a tumor, todas ellas con resistencia al tratamiento con fármacos.

4. HIPÓTESIS

La presencia de variantes genéticas presente en los genes que codifican para COX-2, CR1, CRP, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, podrían estar asociadas con la epilepsia en la población mexicana y estas asociaciones se presentarán de manera diferencial entre los distintos tipos de epilepsia.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar variantes genéticas de un solo nucleótido presentes en los genes que codifican para COX-2, CR1, CRP, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, así como el genotipo de *APOE*, y evaluar si están asociados con la epilepsia de lóbulo temporal con y sin esclerosis mesial y epilepsia asociada a tumor en pacientes mexicanos con resistencia a los fármacos.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una comparación entre la frecuencia alélica, genotípica y haplotípica de las diferentes variantes genéticas en los genes señalados en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal sin esclerosis, con esclerosis hipocampal, epilepsia asociada a tumor y un grupo control.
- Reconocer las variables genéticas que pudieran contribuir al desarrollo del fenotipo en los distintos tipos de epilepsia evaluados en los grupos de estudio.
- Analizar las frecuencias genotípicas en los grupos de estudio asociándolas a variables como edad y género para comprobar si existen diferencias significativas.
- Evaluar los patrones de ligamiento entre los loci para observar si hay un desequilibrio que pudiera estar asociado a la epilepsia.
- Determinar si hay haplotipos que puedan estar asociados a la epilepsia.
- Identificar si existe una relación entre el genotipo de *APOE* y los polimorfismos evaluados.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Definición de la muestra de estudio

Este trabajo fue realizado en 144 adultos mexicanos del Programa de Cirugía de Epilepsia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), que fueron clínicamente diagnosticados con epilepsia en el lóbulo temporal con esclerosis o sin esclerosis hipocampal, o bien con epilepsia secundaria a tumor, que todos hayan presentado farmacorresistencia y que no presenten otra enfermedad neurodegenerativa agregada. Los grupos de estudio fueron comparados con personas que no presentaban síntomas de epilepsia u otro tipo de enfermedad neurodegenerativa. Un comité de ética y un comité de investigación con revisión independiente responsable por la conducta ética y los principios científicos en el INNN han aprobado este estudio (Protocolo 127/15). Los grupos de estudio quedaron divididos de la siguiente manera:

- 37 pacientes con epilepsia farmacorresistente de lóbulo temporal sin esclerosis hipocampal.
- 76 pacientes con epilepsia farmacorresistente de lóbulo temporal con esclerosis hipocampal.
- 31 pacientes con epilepsia farmacorresistente asociada a tumor.

7.2. Criterios de inclusión para los grupos de estudio

- Mexicanos Femeninos y Masculinos entre 18 y 70 años.
- Clínicamente diagnosticado con ELT con o sin esclerosis hipocampal, o con epilepsia asociada a tumor y que presentara farmacoresistencia.
- Que acepten su participación mediante consentimiento informado (Anexo I).

7.3. Criterios de exclusión para los grupos de estudio

- Pacientes que presenten otro tipo de enfermedad neuro-degenerativa o neuro-infecciosa agregada.
- Que no acepten participar en el estudio.
- Extranjeros.

7.4. Grupo control

Se cuenta con un banco de ADN de sujetos sanos, mexicanos, que no presentan ningún tipo de enfermedad neurológica, sin antecedentes familiares de epilepsia, cuyo rango de edad va de los 18 a los 80 años, de este banco se tomaron las muestras para el grupo control el cual quedó compuesto por 100 sujetos.

Todos los datos de los pacientes y los controles, tales como sexo, edad, diagnóstico y nacionalidad, fueron obtenidos de los expedientes que se encuentran en la base de datos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, dichos expedientes fueron verificados y realizados por varios especialistas.

7.5. Análisis de variantes de un solo nucleótido (SNV) mediante PCR en Tiempo Real

El ADN genómico se extrajo a partir de la sangre periférica de los pacientes de los grupos de estudio y de las personas del grupo control. La purificación de ácidos nucleicos se realizó mediante el empleo del Kit QIAamp DNA BLOOD mini Kit y de acuerdo con el protocolo establecido por el proveedor (QIAGEN®, Venlo, Países Bajos). El ADN genómico se cuantificó y se almacenó en alícuotas de 10 ng/ μ L. Posteriormente, las alícuotas fueron empleadas para realizar los ensayos de PCR en Tiempo Real para identificar SNV, mediante la técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan (Figura 13).

COMPONENTES DE PCR EN TIEMPO REAL MEDIANTE TECNOLOGÍA DE SONDAS TAQMAN®

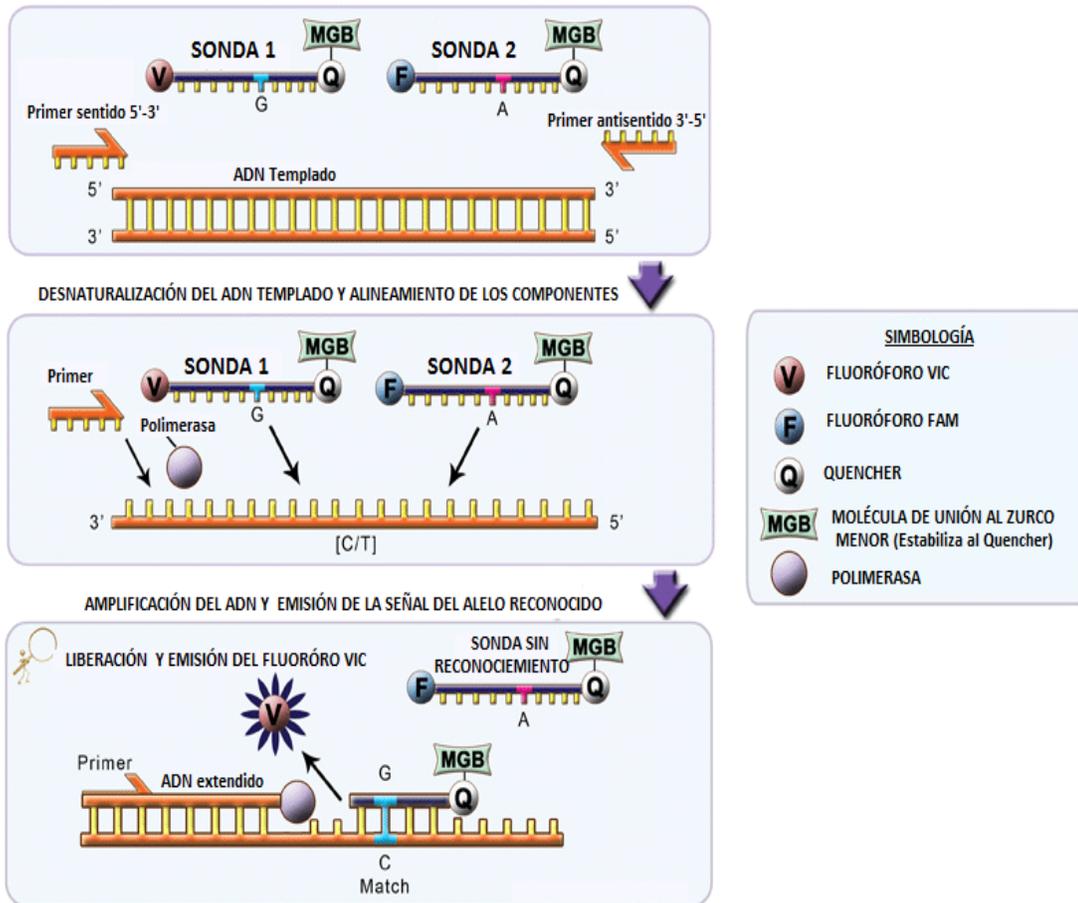


Figura 13. Fundamento de la Genotipificación por PCR en Tiempo Real mediante tecnología TaqMan®. Un SNV consta de dos alelos, un individuo puede tener una o dos copias de un alelo, por lo que esta técnica incluye el diseño de dos sondas marcadas con fluoróforos distintos (V o F) junto con un bloqueador de la señal o quencher (Q). Una sonda contiene en su secuencia al nucleótido complementario al del alelo ancestral y la otra al nucleótido complementario al alelo polimórfico. Los alelos presentados por el individuo dictarán la unión complementaria de las sondas al ADN molde. Al inicio de la PCR, la doble cadena se desnatura, se unen los respectivos cebadores y se alinean las sondas a su región complementaria. La polimerasa comienza a extender el ADN, a partir del lugar donde se localizan los cebadores. Al llegar al lugar de posicionamiento de la sonda, por su actividad de exonucleasa, libera al primer nucleótido de dicha sonda junto con el fluoróforo separándolo de su quencher y emitiendo la señal con la que se identificará un alelo (Modificado de <http://www.salimetrics.com/dna-analysis/snp-genotyping.php>).

El proceso de amplificación resulta en la detección de la señal de una o ambas sondas, dependiendo de los alelos de un SNV determinado en un individuo (Figura 14 a, b, c). La intensidad de la fluorescencia emitida en la curva de amplificación para cada alelo fue interpretada por el software del equipo en un diagrama de dispersión con el cual se pudo llevar a cabo la discriminación alélica y la identificación del genotipo correspondiente a cada uno de los individuos estudiados. Existen 3 genotipos posibles para cada polimorfismo: homocigoto para el alelo ancestral, heterocigoto y homocigoto para el alelo de menor frecuencia (Figura 18 d).

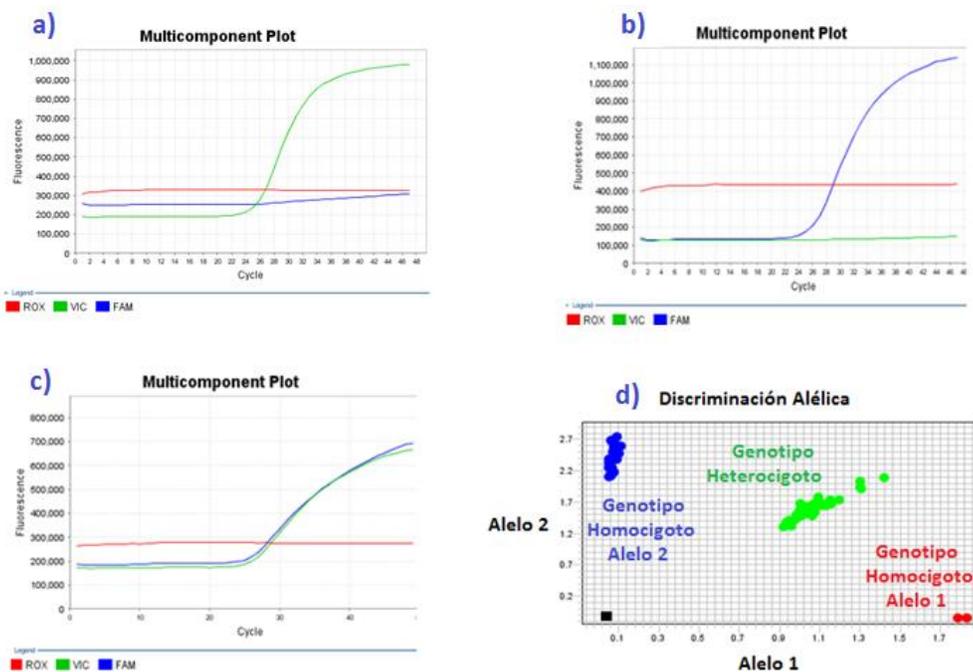


Figura 14. Detección de la señal de amplificación de los alelos y su discriminación. Se observan los tres posibles resultados de la señal de amplificación alélica: a) Amplificación del alelo marcado con 2'-loro-7'fenil-1,4-dicloro-6-carboxi-fluoresceína (VIC), por encima del fluoróforo basal 5-6-carboxi-X-rodamina (ROX), lo que significa que el genotipo del individuo es homocigoto para el alelo 1, en b) se observa que la amplificación del alelo marcado con 6-carboxifluoresceína (FAM) rebasa la fluorescencia basal, lo cual se interpreta como un genotipo homocigoto para el alelo 2, y en c) se puede observar una amplificación bialélica lo que se conoce como un genotipo heterocigoto. Las señales anteriores, son graficadas por el software del termociclador en un diagrama de dispersión, por medio del cual puede generar la discriminación de los genotipos de las muestras.

7.5.1. Polimorfismos propuestos

En este estudio se analizaron 14 variantes genéticas asociadas con la neuroinflamación en 8 genes distintos (Tabla 1), que fueron seleccionados con base en los hallazgos encontrados en el grupo de investigación, así como en lo reportado en la literatura mencionada en los antecedentes (Mirowska-Guzel *et al.*, 2011; Kuhlenbaeumer *et al.*, 2010; Toral-Rios *et al.*, 2015).

Tabla 1. Variantes genéticas evaluadas.

| GEN | VARIANTES | CROMOSOMA | LOCALIZACIÓN | ALELOS |
|--------------------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------|
| <i>IL-1α</i> | rs17561 | 2 | Exón | G/T |
| <i>IL-1β</i> | rs1143634 | 2 | Exón | C/T |
| <i>IL-6</i> | rs1800795 | 7 | -174 Promotor | C/G |
| | rs1800796 | | -572 Promotor | G/C |
| | rs1524107 | | Intrón | G/A |
| <i>IL-10</i> | rs1800871 | 1 | -819 Promotor | G/A |
| | rs1800896 | | -1082 Promotor | C/T |
| | rs1800872 | | -592 Promotor | C/A |
| <i>TNF-α</i> | rs1799724 | 6 | -850 Promotor | G/A |
| | rs1800629 | | -308 Promotro | T/C |
| <i>CRP</i> | rs1800947 | 1 | Exón | C/G |
| | rs1130864 | | 3' UTR | G/A |
| <i>PTGS2</i> | rs20417 | 1 | -765 Promotor | C/G |
| <i>CR1</i> | rs6656401 | 1 | Intrón | A/G |

Se utilizaron 2 sondas para asignar el genotipo de *APOE* (Tabla 2).

Tabla 2. Variantes alélicas para designar el genotipo de APOE.

| GEN | Variante | CROMOSOMA | LOCALIZACIÓN | ALELOS |
|-------------|-----------------|------------------|---------------------|---------------|
| APOE | rs429358 | 19 | Exón | T/C |
| APOE | rs7412 | 19 | Exón | C/T |

Con los datos obtenidos mediante la PCR en tiempo real, se asignó el genotipo de *APOE* a cada muestra cómo se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Asignación de genotipos de APOE

| Genotipo APOE | APOE rs429358 | | APOE rs7412 | |
|--------------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Genotipo | Aminoácido | Genotipo | Aminoácido |
| ε2/ ε2 | T/T | Cys/Cys | T/T | Cys/Cys |
| ε2/ ε3 | T/T | Cys/Cys | C/T | Cys/Arg |
| ε2/ ε4 | C/T | Cys/Arg | C/T | Cys/Arg |
| ε3/ ε3 | T/T | Cys/Cys | C/C | Arg/Arg |
| ε3/ ε4 | C/T | Cys/Arg | C/C | Arg/Arg |
| ε4/ ε4 | C/C | Arg/Arg | C/C | Arg/Arg |

7.6. Análisis estadístico

Con los datos aportados por el equipo se determinaron: las frecuencias alélicas y genotípicas con ayuda de los softwares estadísticos SNPStats y Epiinfo, así como las frecuencias haplotípicas y las combinaciones multi/*loci* utilizando el software Arlequin. Además, se realizó la prueba para el equilibrio de Hardy-Weinberg (EQHW) con el software GeneAEx, para determinar si las frecuencias genotípicas se encontraban en equilibrio; aquellos resultados que no cumplieron este criterio fueron excluidos del análisis. Las frecuencias genotípicas fueron analizadas bajo distintos modelos (codominante, dominante, recesivo) y se calculó la razón de momios (OR), la cual es la probabilidad de que una variante alélica, genotipo o genotipo multi/*loci* contribuyan o no la susceptibilidad de una enfermedad, para ello se toma en cuenta las frecuencias de dichas variantes en enfermos comparadas con sus frecuencias en los controles (Lewis, 2002). Para determinar si había diferencias significativas en las edades de nuestros grupos se llevó a cabo una prueba de ANOVA de una vía. También, para observar si existían diferencias en la distribución entre hombres y mujeres en nuestros grupos se realizó una prueba de X^2 . Posteriormente se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento mediante el programa *Haploview*. Finalmente, se analizaron las frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados y se observó si había una relación con el genotipo de *APOE* con la ayuda del programa *SNPStats*.

8. RESULTADOS

8.1. Base de datos

8.1.1. Grupos de estudio

Se obtuvieron 144 muestras de pacientes con epilepsia. De estos, 37 fueron pacientes con ELT sin esclerosis hipocampal (ELT sin EH), 76 de pacientes con ELT con esclerosis hipocampal (ELT con EH), 31 con epilepsia asociada a tumor (EPT).

8.1.2. Edad del grupo de pacientes

Los pacientes que se incluyeron en los diferentes grupos de estudio tenían una edad entre 18 y 70 años, con un promedio de 35 años. En el grupo de pacientes con ELT sin EH la edad promedio fue de 35.94 (± 1.68) años, en el grupo de ELT con EH de 37.14 (± 1.21) años y en el grupo de EPT fue de 36.97 (± 2.48) años, en el grupo control el promedio de edad fue de 37.71 (± 1.64) años, por lo tanto, no se observaron diferencias significativas ($p=0.9588$) en la edad entre nuestros grupos (ANOVA de una vía).

8.1.3. Género del grupo de pacientes

En la tabla 4 se muestra la cantidad de hombres y mujeres en cada grupo al comparar si existían diferencias en la distribución en el género de nuestros grupos se pudo observar que no había diferencias significativas entre ellos ($p=0.5550$).

Tabla 4. Género por grupos (Prueba de χ^2).

| Grupo de Estudio | Femenino | Masculino | p |
|------------------|----------|-----------|-------|
| Total | 119 | 125 | 0.555 |
| ELT | 17 | 20 | |
| ELT+EH | 33 | 43 | |
| EPT | 15 | 16 | |
| Control | 54 | 46 | |

8.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Este principio determina qué frecuencias genotípicas deberíamos observar al asumir que los alelos se transmiten de forma independiente entre generaciones. Si no hay diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas se dice que la población se encuentra en equilibrio. En los estudios de asociación genética entre casos y controles, el equilibrio Hardy-Wienberg debería cumplirse en nuestro grupo control. De manera contraria, si el equilibrio no se cumple en nuestros grupos de estudio podría permitir identificar aquellas variantes genéticas que pudiesen estar involucrados en el desarrollo y aparición de la enfermedad.

Al probar si las variantes genéticas estudiadas y su frecuencia genotípica cumplían con el EQHW se encontró que la variante rs1800896 de *IL-10* no lo hacía en el grupo control, por lo que se excluyó de los siguientes análisis (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg.

| Gen | Polimorfismo | ELT | ELT+EH | EPT | CONTROL |
|---------------------------------------|---------------------|------------|---------------|------------|-----------------|
| <i>IL-1α</i> | rs17561 | 0.514 | 0.870 | 0.304 | 0.805 |
| <i>IL-1β</i> | rs1143634 | 0.013 | 0.450 | 0.167 | 0.913 |
| <i>IL-6</i> | rs1800795 | 0.573 | 0.392 | 0.769 | 0.170 |
| | rs1800796 | 0.667 | 0.745 | 0.650 | 0.395 |
| | rs1524107 | 0.461 | 0.441 | 0.650 | 0.767 |
| <i>IL-10</i> | rs1800871 | 0.461 | 0.189 | 0.643 | 0.793 |
| | rs1800896 | 1.5E-06 | 7.07E-16 | 5.004E-07 | 7.99E-22 |
| | rs1800872 | 0.292 | 0.406 | 0.643 | 0.980 |
| <i>TNF</i> | rs1799724 | 0.382 | 0.904 | 0.349 | 0.242 |
| | rs1800629 | 0.788 | 0.569 | 0.847 | 0.256 |
| <i>CRP</i> | rs1800947 | 0.573 | 8.06E-13 | 0.769 | 0.757 |
| | rs1130864 | 0.330 | 0.341 | 0.573 | 0.300 |
| <i>CR1</i> | rs6656401 | 0.860 | 0.036 | 0.769 | 0.597 |
| <i>PTGS2</i> | rs20417 | 0.036 | 0.523 | 0.460 | 0.245 |

8.3. Frecuencias alélicas

Con respecto a las frecuencias alélicas, el alelo G de la variante rs1800795 de *IL-6* fue el único en mostrar diferencias significativas ($p=0.018$) entre el grupo de pacientes con EPT y el grupo control. Sin embargo, el valor de OR para la presencia del alelo G fue de 3.353 (1.169-9.615), como se observa en la tabla 6, lo que nos indica que, para este estudio, este alelo podría estar asociado con la epilepsia secundaria a tumor.

Tabla 6. Frecuencia alélica de la variante genética rs1800795 de IL-6 en pacientes con EPT vs. Controles

| ALELO | EPT | CONTROL | OR (95% CI) | p |
|----------|-------------|-------------|---------------------------|--------------|
| G | 0.95 | 0.85 | 3.353(1.169-9.615) | 0.018 |
| C | 0.05 | 0.15 | 0.2982 (0.104-0.8553) | |

8.4. Frecuencias genotípicas

El cálculo de las frecuencias genotípicas mostró diferencias significativas ($p<0.05$) entre los grupos de epilepsia *versus* el grupo control en cuatro variantes genéticas de distintos genes (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias genotípicas con diferencia significativa (*p<0.05) ELTvsControl, ELTEHvsControl y EPTvsControl.

| | POLIMORFISMO | GENOTIPO | ELT | ELT+EH | EPT | CONTROL |
|--------------|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|---------|
| IL-6 | rs1800795 | G/G | 0.82 | 0.81 | 0.90* | 0.74 |
| TNF-a | rs1799724 | G/G | 0.53 | 0.62* | 0.41 | 0.48 |
| CRP | rs1800947 | C/G | 0.18* | 0.04 | 0.10 | 0.06 |
| PTGS2 | rs20417 | G/G | 0.79* | 0.71 | 0.76* | 0.61 |

Al compararse las frecuencias genotípicas del grupo de pacientes con EPT *versus* el grupo control se observaron diferencias significativas ($p=0.003$) en el genotipo G/G en la variante rs1800795 de *IL-6* con un OR de 3.162 ($IC_{95}=1.433-6.978$); de igual forma se encontraron diferencias significativas ($p=0.022$) entre estos dos grupos en el genotipo G/G en la variante rs20417 del gen de COX-2 con un OR de 2.025 ($IC_{95}=1.1-3.726$). Estos genotipos al encontrarse con mayor frecuencia en el grupo de EPT en comparación con el grupo control se consideran como genotipos asociados a este tipo de epilepsia para este estudio (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias genotípicas EPT vs Controles de acuerdo con el modelo codominante. En rojo se muestra los genotipos de riesgo y en verde los genotipos de “protección”.

| Gen | Genotipo | EPT | CONTROL | OR (95% CI) | p |
|--------------------------------|----------|------|---------|------------------------|-------|
| <i>IL-6</i> (rs1800795) | G/G | 0.9 | 0.74 | 3.162 (1.433-6.978) | 0.003 |
| | C/G | 0.1 | 0.22 | 0.3939 (0.1758-0.8825) | 0.020 |
| | C/C | 0.00 | 0.04 | --- | 0.052 |
| <i>PTGS2</i> (rs20417) | G/G | 0.76 | 0.61 | 2.025 (1.1-3.726) | 0.022 |
| | C/G | 0.24 | 0.37 | 0.5377 (0.2914-0.9922) | 0.046 |
| | C/C | 0.00 | 0.02 | --- | 0.156 |

El genotipo C/G en la variante genética rs1800947 de *CRP* se encuentra con mayor frecuencia en el grupo de ELT *versus* el grupo control con una OR= 3.439 (IC₉₅=1.303-9.074), de igual forma, el genotipo G/G en la variante rs20417 del gen de COX-2 se encuentra con mayor frecuencia en el grupo ELT en comparación el grupo control con un OR= 2.405 (IC₉₅=1.285-4.502), por lo que ambos se podrían considerar como genotipos asociados con ELT para este estudio (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencias Genotípicas ELTvsControl de acuerdo con el modelo codominante. En rojo se muestran los genotipos de riesgo y en verde los genotipos de “protección”.

| Gen | Genotipo | ELT | CONTROL | OR (95% CI) | p |
|-----------------------------|----------|------|---------|-------------------------|--------|
| CRP (rs1800947) | C/G | 0.18 | 0.06 | 3.439 (1.303-9.074) | 0.009 |
| | G/G | 0.00 | 0.00 | --- | --- |
| | C/C | 0.82 | 0.94 | 0.2908 (0.1102-0.7672) | 0.009 |
| PTGS2 (rs20417) | G/G | 0.79 | 0.61 | 2.405 (1.285-4.502) | 0.005 |
| | C/G | 0.15 | 0.37 | 0.3005 (0.1518-0.5947) | 0.0004 |
| | C/C | 0.06 | 0.02 | --- | 0.150 |
| IL-10 (rs1800871) | G/G | 0.18 | 0.33 | 0.4457 (0.236-0.8612) | 0.015 |
| | G/A | 0.56 | 0.50 | --- | 0.396 |
| | A/A | 0.26 | 0.17 | --- | 0.122 |
| IL-10 (rs1800896) | C/T | 0.91 | 0.98 | 0.2063 (0.04343-0.9804) | 0.030 |
| | T/T | 0.06 | 0.02 | --- | 0.150 |
| | C/C | 0.03 | 0.00 | --- | 0.081 |
| IL-10 (rs1800872) | A/A | 0.18 | 0.35 | 0.4077 (0.2118-0.7848) | 0.006 |
| | C/A | 0.59 | 0.49 | --- | 0.157 |
| | C/C | 0.23 | 0.16 | --- | 0.213 |

Se observaron diferencias significativas ($p=0.04716$) en el genotipo G/G en la variante rs1799724 de *TNF- α* al comparar el grupo de ELT con EH con el grupo control con una OR= 1.768 (IC₉₅=1.0071-3.104), y al presentarse con mayor frecuencia en el grupo de pacientes se dice que este genotipo se encuentra asociado con la ELT con EH en este estudio (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencias Genotípicas ELTvsControl de acuerdo con el modelo codominante. En rojo se muestra el genotipo de riesgo y en verde el genotipo de “protección”.

| Gen | Genotipo | ELT+EH | CONTROL | OR (95% CI) | p |
|---|----------|--------|---------|----------------------------|-------|
| <i>TNF-α</i> (rs1799724) | G/G | 0.62 | 0.48 | 1.768 (1.007-3.104) | 0.047 |
| | G/A | 0.34 | 0.46 | --- | 0.084 |
| | A/A | 0.04 | 0.06 | --- | 0.517 |
| <i>IL-10</i> (rs1800871) | G/G | 0.2 | 0.33 | 0.5076 (0.2668- 0.9658) | 0.037 |
| | G/A | 0.58 | 0.50 | --- | 0.258 |
| | A/A | 0.22 | 0.17 | --- | 0.373 |

8.5. Desequilibrio de ligamiento.

Se considera que dos variantes genéticas se encuentran en desequilibrio de ligamiento cuando estas no segregan de manera independiente, es decir, que se heredan de manera conjunta con una frecuencia mayor de lo que se esperaría por mero azar. Para poder saber si las variantes genéticas estudiadas se encuentran en desequilibrio se toma en cuenta que el valor de D' debe ser igual o muy cercano a 1. Este análisis se realizó en primera instancia con los tres grupos de pacientes con epilepsia por separado y el grupo control. Sin embargo, al encontrar resultados similares en cada uno de los tres grupos con epilepsia, se decidió unirlos en uno sólo e incluirlo en un nuevo análisis junto al grupo control, los resultados que se muestran son de este último

estudio. En las Tablas 11 y 12 se observa que únicamente las variantes rs1800795 y rs1524107 de *IL-6* y las variantes rs1800871 y rs1800872 de *IL-10* se encuentran en desequilibrio de ligamiento en los 3 grupos de pacientes con epilepsia, estos resultados también se pueden observar en las Figuras 15 y 16. Si bien las otras variantes genéticas también tienen una D' cercana a 1, su valor de correlación (r^2) es muy bajo.

Tabla 11. Desequilibrio de ligamiento en el gen de *IL-6*.

| Gen | Locus 1 | Locus 2 | D' | r^2 |
|-------------|------------------|------------------|--------------|--------------|
| <i>IL-6</i> | rs1800795 | rs1800796 | 0.905 | 0.063 |
| | rs1800795 | rs1524107 | 0.962 | 0.885 |
| | rs1800796 | rs1524107 | 0.911 | 0.067 |

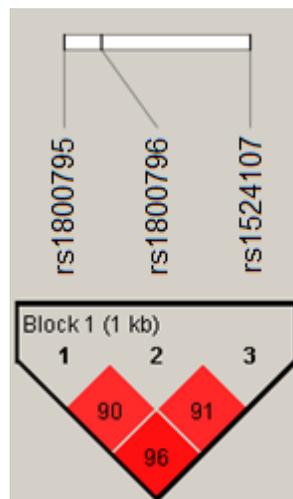


Figura 15. Esquema de desequilibrio de ligamiento para el gen *IL-6*. Los rombos rojos indican el valor de D' .

Tabla 12. Desequilibrio de ligamiento en el gen de IL-10.

| Gen | Locus 1 | Locus 2 | D' | r ² |
|--------------|-----------|-----------|-------|----------------|
| <i>IL-10</i> | rs1800871 | rs1800872 | 0.991 | 0.933 |

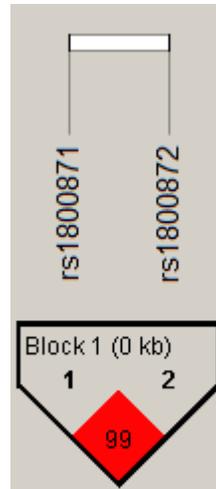


Figura 16. Esquema de desequilibrio de ligamiento para el gen *IL-10*. Los rombos rojos indican el valor de D'.

8.6. Haplotipos y combinaciones multi/*loci*

Con los datos obtenidos en el análisis del desequilibrio de ligamiento se procedió a calcular las frecuencias haplotípicas de las variantes genéticas que se encontraban en desequilibrio. En el caso de las variantes rs1800795 y 1524107 de *IL-6* únicamente se observaron diferencias significativas en el haplotipo CG en el grupo de EPT *versus* el grupo control, sugiriendo que el haplotipo CG podría ser un genotipo de protección al mostrar mayor frecuencia en el grupo control y presentar una OR de 0.3233 (0.0110-0.935) con una p=0.03039 (Tabla 13).

Tabla 13. Frecuencias haplotípicas de las variantes rs1800795 y rs524107 del gen de IL-6 en el grupo EPT comparadas con el grupo control. Frec.; frecuencia.

| Haplotipo | rs1800795 | rs1524107 | Frec. EPT (%) | Frec. Control (%) | p | OR (IC ₉₅) |
|-----------|-----------|-----------|------------------|----------------------|--------------|--|
| 1 | G | A | 34 | 36 | 0.764 | 0.9158 (0.512, 1.638) |
| 2 | G | G | 60 | 48 | 0.089 | 1.625 (0.927, 2.846) |
| 3 | C | G | 5 | 14 | 0.030 | 0.3233 (0.110, 0.935) |

En el caso de las variantes rs1800871 y rs1800872 de *IL-10* se observaron diferencias significativas en el haplotipo AC en el grupo de ELT sin EH en comparación con el grupo control, pero en este caso el haplotipo es de riesgo, ya que se encontró con mayor frecuencia en el grupo de ELT sin EH y mostró una OR de 1.845 (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencias haplotípicas de las variantes rs1800871 y rs1800872 del gen de IL-10 en el grupo ELT sin EH versus el grupo control.

| Haplotipo | rs1800871 | rs1800872 | Frec. | Frec. | p | OR |
|-----------|-----------|-----------|------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| | | | ELT (%) | Control (%) | | (IC ₉₅) |
| 1 | A | A | 1 | 4 | 0.1755 | 0.242 (0.026, 2.208) |
| 2 | A | C | 52 | 37 | 0.03326 | 1.845 (1.049, 3.244) |
| 3 | G | A | 45 | 53 | 0.2599 | 0.7256 (0.416,1.265) |

Se calcularon las combinaciones multi/*loci* encontrando únicamente diferencias significativas entre los pacientes con EPT *versus* el grupo control en tres combinaciones multi/*loci* que se muestran en la tabla 15; las tres combinaciones mostradas podrían ser de riesgo ya que se observan con mayor frecuencia en el grupo de EPT y presentan OR's mayores a 7 (con un CI de entre 0.8996 y 177.2). Sin embargo, en la combinación GGAGAGCCGG el CI del OR pasa por la unidad (0.8996-61.72), por lo que se debe tomar con medida el hecho de que esta combinación sea de riesgo para la EPT.

Tabla 15. Frecuencias de las combinaciones multi/loci de EPTvsControl.

| IL-6 | | | IL-10 | | | TNF-a | | CRP | | PTGS2 | Frec. EPT/Control | p | OR (IC ₉₅) |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|--------|----------------------|----------------------|------------------------|
| rs1800795 | rs1800796 | rs1524107 | rs1800871 | rs1800872 | rs1799724 | rs1800629 | rs1800947 | rs1130864 | rs20417 | | | | |
| G | C | G | A | C | G | C | C | A | G | 13%/1% | 0.0009 | 14.79 (1.897-115.4) | |
| G | G | A | G | A | G | C | C | G | G | 7%/1% | 0.0308 | 7.452 (0.8996-61.72) | |
| G | C | G | G | A | A | C | C | G | G | 19%/1% | 0.00002 | 23.22 (3.004-177.2) | |

8.7. Distribución de genotipos de ApoE

En la figura 17 se observa la distribución de los genotipos de *APOE* en el grupo control y en los 3 grupos de epilepsia reunidos en uno solo. En esta gráfica se observa que el alelo $\epsilon 4$ es más frecuente en controles que en los grupos de epilepsia, pero cuando se muestran por separado los grupos de epilepsia, como se ilustra en la figura 18, se puede observar que el grupo de ELT tiene un mayor porcentaje en cuanto a la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ (32.35%) que el grupo control (24.54%) específicamente con el genotipo $\epsilon 3/ \epsilon 4$.

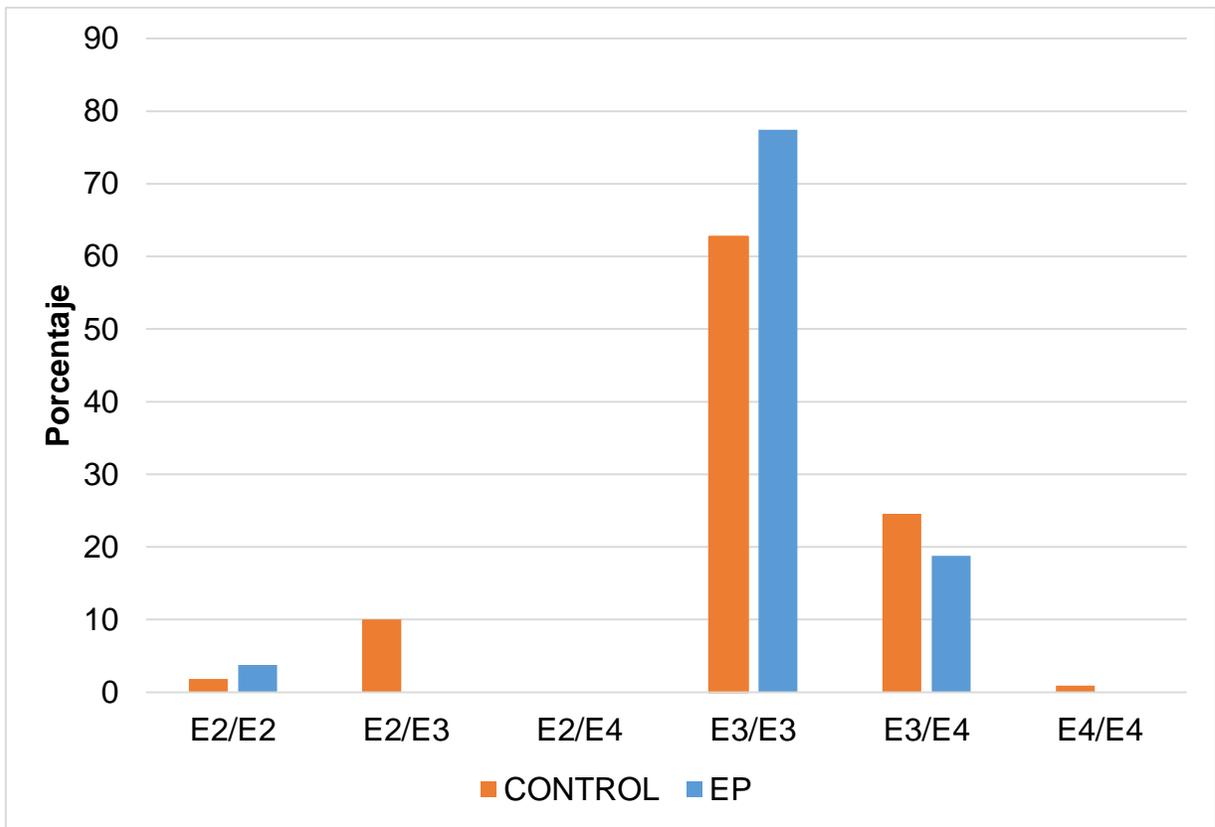


Figura 17. Distribución de los genotipos de *APOE*. Se muestran los datos del grupo control y los de los 3 grupos de epilepsia reunidos en uno solo (EP).

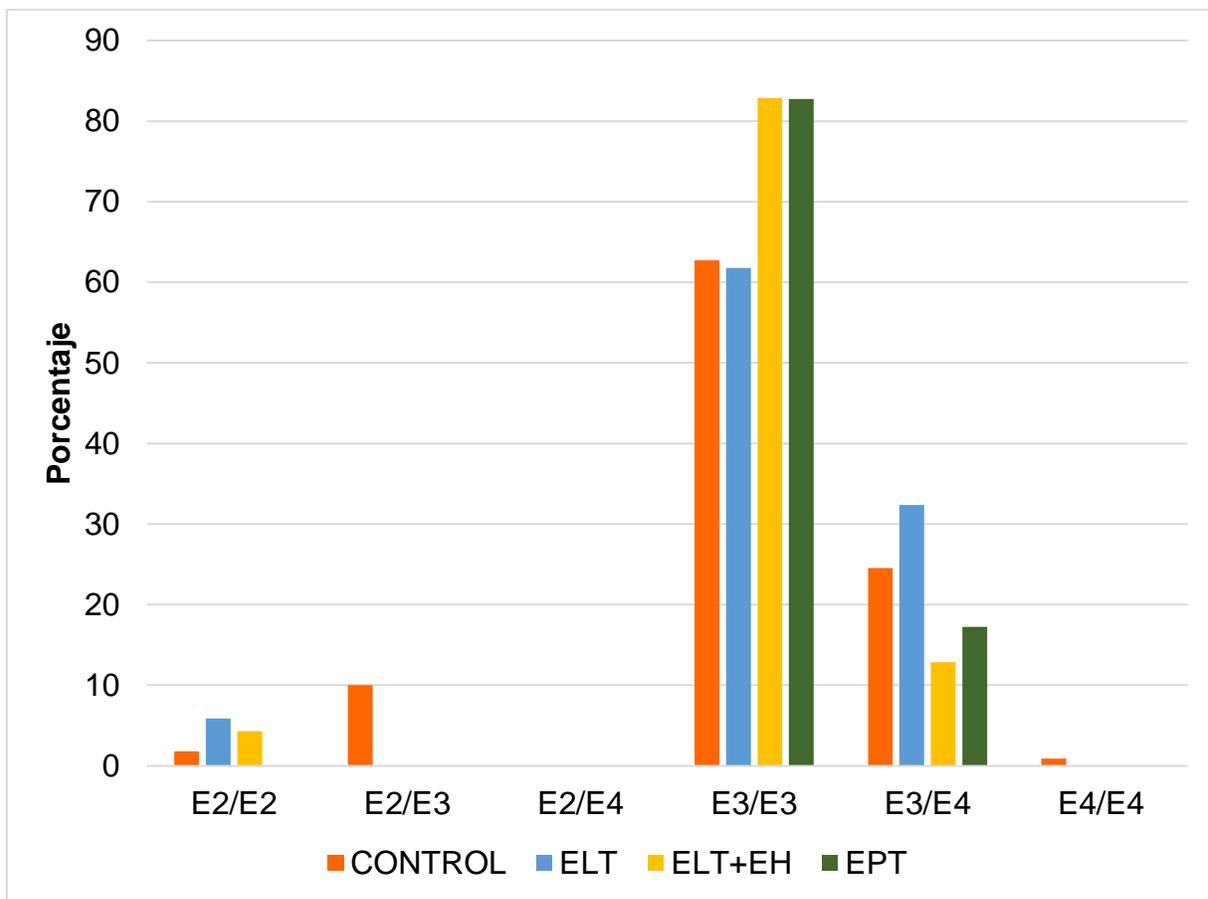


Figura 18. Distribución de los genotipos de *APOE*. Se muestran los datos del grupo control y de los 3 grupos de epilepsia por separado, ELT, ELT+EH y EPT.

Posteriormente se hizo un análisis en busca de una relación entre el genotipo de *APOE* y las variantes en los genes asociados con la inflamación ya mencionados. Únicamente se observó una relación con la presencia de alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y las variantes rs1800796 de *IL-6* y rs20417 del gen de COX-2 en el grupo de ELT en comparación con el grupo control. Para la variante rs1800796 de *IL-6* se observó que la presencia del alelo $\epsilon 4$ en combinación con el genotipo G/G se encuentra asociado con la ELT (OR=4.846; IC₉₅= 1.02-23.03) como se puede observar en la tabla 16.

Tabla 16. Análisis de la interacción entre la presencia del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y la variante rs1800796 de *IL-6*, controles versus ELT bajo el modelo codominante.

| <i>APOE</i> | Genotipo | ELT | Controles | p | OR (95% CI) |
|---|------------|-----------|-----------|----------------|----------------------------|
| Ausencia de alelo $\epsilon 4$ | C/C | 21% | 27% | 0.3217 | 0.718 (0.374,1.381) |
| | C/G | 38% | 37% | 0.8842 | 1.044 (0.588,1.85) |
| | G/G | 8% | 9% | 0.8003 | 0.879 (0.324,2.379) |
| Presencia de alelo $\epsilon 4$ | C/C | 9% | 12% | 0.4900 | 0.725 (0.291,1.806) |
| | C/G | 15% | 13% | 0.6843 | 1.181 (0.5304,2.63) |
| | G/G | 9% | 2% | 0.03034 | 4.846 (1.02, 23.03) |

Para la variante rs20417 del gen de COX-2 se observó que la presencia del alelo $\epsilon 4$ en combinación con el genotipo G/G se encuentra asociado con la ELT (OR=2.351; IC₉₅= 1.128-4.9) como se observa en la tabla 17.

Tabla 17. Análisis de la interacción entre la presencia del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y la variante rs20417 del gen de COX-2, controles *versus* ELT bajo el modelo codominante.

| <i>APOE</i> | Genotipo | ELT | Controles | p | OR (95% CI) |
|---|------------|------------|------------|-----------------|-----------------------------|
| Ausencia de alelo $\epsilon 4$ | G/G | 53% | 48% | 0.4806 | 1.222 (0.701,2.13) |
| | C/G | 9% | 24% | 0.004367 | 0.3132 (0.137, 0.71) |
| | C/C | 6% | 2% | 0.15 | 3.128 (0.61,15.88) |
| Presencia de alelo $\epsilon 4$ | G/G | 26% | 13% | 0.02065 | 2.351 (1.128, 4.9) |
| | C/G | 6% | 13% | 0.09223 | 0.4272 (0.15,1.17) |
| | C/C | 0% | 0% | --- | --- |

9. DISCUSIÓN

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico con una alta prevalencia. Aunque se dispone de tratamiento sintomático, 30% a 40% de los pacientes no responden a los medicamentos antiepilépticos (Pohlmann-Eden & Weaver, 2013). La identificación de los mecanismos patológicos subyacentes a la epilepsia facilitaría el desarrollo de nuevos tratamientos. Una gran cantidad de evidencia apunta hacia una participación de la inflamación del cerebro en la epileptogénesis (Vezzani, *et al.*, 2011; Shimada, *et al.*, 2014; Dey, *et al.*, 2016; Iori & Vezzani, 2016; Neniskyte & Gross, 2017; Rana &

Musto 2018). Sin embargo, el papel exacto de este proceso no está claro. Llegar a comprender esto puede llevar a perspectivas importantes con respecto al desarrollo y evaluación de tratamientos antiinflamatorios y las posibilidades de detección para pacientes en riesgo (Amhaoul *et al.*, 2014). La identificación de biomarcadores celulares y moleculares puede ser útil para comprender el ciclo dinámico epileptogénico en modelos experimentales y humanos (Ran *et al.*, 2014). Esto permitiría una estratificación más precisa en la epilepsia y tendría múltiples usos, incluida la predicción temprana de la enfermedad después de una lesión cerebral o una primera convulsión, la medición de la progresión y la estratificación de la resistencia al FAE en función de la capacidad de respuesta al fármaco. Además, podría llevar al desarrollo de mejores modelos animales para una detección más efectiva y rentable de los FAE y disminuir el costo de los ensayos clínicos a través de una mejor selección de pacientes (Walker, 2015).

Uno de los enfoques genómicos que se han hecho en la epilepsia es realizar estudios de asociación genética, diseñados para identificar variantes genéticas comunes que contribuyen al riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Lohmann & Klein, 2014; Poduri, 2015). La identificación de variantes en el gen de la subunidad alfa tipo I del canal de sodio dependiente de voltaje (SCN1A) como factores de riesgo genético para la epilepsia es, quizás, el más conocido (Myers & Mefford, 2015). Sin embargo, hay otros estudios que se han hecho en otros genes, tomando en cuenta aquellos que están asociados a la inflamación (Kariuki, *et al.* 2013; Diamond, *et al.*, 2014; Hung, *et*

al., 2017), como se ha informado en los antecedentes. El presente estudio se enfocó a la búsqueda de factores de riesgo genéticos asociados a la epilepsia de lóbulo temporal con y sin esclerosis hipocampal, y a la epilepsia asociada a tumor, con enfoque poligénico y centrado en la inflamación.

9.1. Género

Al igual que en reportes anteriores (McHugh & Delanty, 2008; Ortiz-Gonzalez *et al.*, 2013) en este estudio se observó que en todos nuestros grupos de epilepsia hay más hombres que mujeres, aunque sin ser significativas las diferencias. Esto se puede relacionar a que hay una mayor exposición por parte de los hombres a las causas de la epilepsia lesional (McHugh & Delanty, 2008).

9.2. Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias obtenidas fueron comparadas con los datos del proyecto 1000 genomas encontrando que los resultados de nuestros controles son similares a los publicados por éste (Grch37.ensembl.org, 2019). En el presente estudio se encontró que el alelo G y el genotipo G/G de la variante rs1800795 de *IL-6* se encuentran asociados con la EPT. Este es el primer estudio que reporta la asociación de esta variante genética con la EPT. Las razones por las que esta variante genética pudiera contribuir con la EPT aún no son claras, sin embargo, varios estudios (Terry *et al.*, 2000; Villuendas *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006) han reportado que el alelo G y el

genotipo G/G de esta variante genética están asociados con un incremento en los niveles de ARN mensajero y proteína de IL-6 en el tejido cerebral. Los resultados de este estudio también sugieren que el genotipo C/G de esta variante genética pudiera ser considerado como un genotipo de protección contra EPT. En el año 2003 un estudio (Miñambres *et al.*, 2003) encontró que el alelo C de esta variante genética está asociado con menores concentraciones de IL-6, lo que podría asociarse con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Si bien en el genotipo C/C no se vio esta protección hay que resaltar que este genotipo únicamente estuvo presente en el grupo control, lo que no descarta que el alelo C este asociado con menores concentraciones de IL-6. La sobreexpresión de *IL-6* disminuye la neurogénesis en el hipocampo y aumenta la gliosis, creando condiciones que pueden contribuir a la epileptogénesis (Erta, 2012; Levin, 2017), por lo que un aumento de los niveles de IL-6 causado por esta variante genética podría contribuir al estado epileptogénico en los pacientes con EPT.

De igual manera, los resultados muestran que el genotipo G/G de la variante genética rs20417 en el gen de COX-2, se encuentra asociado con EPT y con ELT. En ambos grupos se observó que el genotipo C/G de esta variante pudiese tener un efecto protector. En un estudio realizado por Papafili y colaboradores, en el 2002, se observó que aquellos portadores del alelo C de esta variante genética presentaban una disminución de alrededor del 28% en la expresión del gen de COX-2 en comparación con aquellos portadores del alelo G. En este sentido, el genotipo homocigoto G/G

podría contribuir a una mayor expresión del gen de COX-2 en comparación con el genotipo C/G, y esto podría a su vez favorecer a procesos epileptogénicos en los pacientes con EPT y ELT. Se ha observado que el genotipo G/G de esta variante genética se encuentra asociado con la enfermedad de Alzheimer en la población mexicana (Toral-Ríos *et al.*, 2015), lo que podría sugerir la presencia de vías en común en ambas patologías.

Se observó que el genotipo G/G de la variante genética rs1799724 en el gen de TNF- α se encuentra asociado con la ELT con EH. Al igual que con las dos anteriores variantes genéticas, éste también es el primer estudio que reporta una asociación entre esta variante genética y la epilepsia. Se ha observado que las variantes genéticas rs1799724, rs1800795 y rs20417 pueden afectar los niveles de expresión de TNF- α , dado que se encuentran en el área promotora del gen (Kimura *et al.*, 2016). También se ha observado que los niveles de TNF- α en el hipocampo están aumentados en la ELT con EH (Teocchi *et al.*, 2013); hay que recordar que esta citocina puede contribuir al desarrollo de la epilepsia (Stellwagen 2005; Kubota 2009; Galic 2012) lo que pudiera asociar a esta variante genética a la ELT con EH. Se ha observado que TNF- α se encuentra mayormente expresado en ELT con EH que en ELT sin EH (Aalbers *et al.*, 2014; Teocchi & D'Souza-Li, 2016), lo que explicaría por qué se observa este resultado únicamente en el grupo de ELT con EH.

9.3. Desequilibrio de ligamiento y haplotipos

En el presente estudio se observó que hay dos regiones con alto desequilibrio de ligamiento. La primera región se indentifico entre las variantes rs1800795 y rs1524107 de *IL-6*. Al calcular las frecuencias haplotípicas de estas dos variantes genéticas se encontró que el haplotipo CG se encuentra con mayor frecuencia en los controles *versus* el grupo EPT. Se observa que este haplotipo lo compone el alelo C de la variante genética rs1800795 que está asociado con una disminución en la expresión de *IL-6* (Miñambres *et al.*, 2003). Con respecto al alelo G de la variante genética rs1524107 se sabe que no afecta los niveles de IL-6 (Jiang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2016), lo que podría explicar por qué se encuentra presente en los otros haplotipos sin alguna diferencia significativa. Este es el primer reporte de una asociación de esta región con la epilepsia, por lo que se deben hacer más estudios de este tipo en más poblaciones para poder entender mejor su papel en la enfermedad.

La otra región que se observó con alto desequilibrio de ligamiento es la que está entre las variantes rs1800871 y rs1800872 de *IL-10*. El análisis de las frecuencias haplotípicas muestran que el haplotipo AC, formado por estas dos variantes, se encuentran con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con ELT, sugiriendo que esta combinación alélica pudiera estar asociada con este tipo de epilepsia. En los datos de las frecuencias alélicas y genotípicas no se registró ningún alelo o genotipo en estas variantes genéticas que pudiesen asociarse con el grupo de ELT, por lo que no se descarta que exista alguna otra en la región que comprenden estas dos variantes genéticas que pudiera estar asociada a ELT.

9.4. ApoE

La distribución de los genotipos de *APOE* mostró que $\epsilon 3/\epsilon 4$ se encuentra con mayor frecuencia en los pacientes con ELT. Esto concuerda con lo encontrado en otras investigaciones realizadas en poblaciones caucásicas y asiáticas (Gambardella *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016), y es la primera vez que se evalúa esta asociación entre el genotipo de *APOE* y la epilepsia en la población mexicana. Hay que mencionar que la distribución de genotipos de *APOE* en nuestra población control es similar a lo reportado por otros estudios (Suástegui-Román *et al.*, 2002; Aceves *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2013; Genis-Mendoza *et al.*, 2018) en la población mexicana.

También se analizó si existía una correlación entre la presencia de al menos una copia del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y los genotipos de cada una de las variantes en genes asociados con la inflamación. Se observó que el genotipo G/G de rs1800796 en *IL-6* y el genotipo G/G de la variante rs20417 en el gen de *COX-2*, en presencia de al menos un alelo $\epsilon 4$ de *APOE*, se asocian con mayor frecuencia a la ELT. Se ha sugerido que tanto la variante genética rs1800796 como el alelo $\epsilon 4$ de *APOE* podrían estar asociados con una respuesta inflamatoria alterada, sin embargo, el mecanismo aún no es claro (Wang & Jia, 2010). No se ha reportado alguna asociación entre la EPT y el alelo $\epsilon 4$ de *APOE*, a diferencia de lo registrado con ELT (Briellmann, 2000; Palop & Mucke, 2009), lo que podría explicar por qué no se encontró una asociación entre el alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y la variante genética rs1800796 en EPT.

Ningún otro estudio ha evaluado la asociación del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y estas dos variantes genéticas en pacientes con epilepsia. Sin embargo, varios autores (Finch & Morgan, 2007; Tsoi *et al.*, 2007; Vitek *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2017) han señalado que el alelo $\epsilon 4$ de *APOE* favorece la respuesta inflamatoria ya que se ha observado un aumento de la secreción de citocinas por parte de los macrófagos y la microglía en presencia de este alelo en epilepsia. La asociación del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y las respuestas inflamatorias se han hecho especialmente en relación con la enfermedad de Alzheimer (Palop & Mucke, 2009), por lo que es importante ampliar el conocimiento de los mecanismos de este alelo en otras patologías neuronales como es la epilepsia.

10. CONCLUSIÓN

Se encontró que el genotipo G/G de la variante rs1800795 de *IL-6* se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con EPT. Para la variante rs20417 del gen de COX-2 la frecuencia del genotipo G/G fue significativamente más frecuente en pacientes con EPT y ELT. Por su parte el genotipo C/G de la variante rs1800947 de *CRP*, así como el haplotipo AC, conformado por las variantes rs1800871 y rs1800872 de *IL-10*, se observaron con mayor frecuencia en pacientes con ELT. Lo mismo sucedió con el genotipo G/G de la variante rs1799724 de *TNF- α* , que fue más frecuente en pacientes que presentan ELT con EH. Así mismo, se observó que el genotipo G/G de la variante rs1800796 de *IL-6* y el genotipo G/G de la variante rs20417 del gen de COX-2, en presencia del alelo $\epsilon 4$ de *APOE*, se observaron con mayor frecuencia en pacientes con ELT.

En este estudio se identificaron alelos, genotipos, haplotipos y combinaciones multi/*loci* de SNV en genes relacionados con la inflamación, asociadas con los diferentes tipos de epilepsia evaluados. A su vez, estas asociaciones se presentaron de manera diferencial entre los distintos grupos de epilepsia; por lo que estos resultados presentan posibles marcadores genéticos asociados a la inflamación para la ELT, EH y EPT, sin embargo, hay que continuar investigando los efectos de estas variantes genéticas en otras poblaciones, además de describir los mecanismos que contribuyan a la patogenia de la epilepsia.

10.1. Perspectivas

Este estudio contribuye en la búsqueda de marcadores genéticos para la epilepsia en nuestra población. De igual forma, aporta conocimiento sobre la participación de la inflamación en la epilepsia. Este es el primer estudio que evalúa la asociación de variantes genéticas relacionadas con la inflamación en la población mexicana y los resultados son prometedores, por lo que se evaluarán los niveles de expresión del RNA mensajero y de las proteínas de los genes analizados en biopsias de tejido cerebral de pacientes con epilepsia. Así, este estudio tiene el potencial de seguir aportando más información en torno a esta enfermedad.

11. REFERENCIAS

- Aalbers, M. W., Rijkers, K., Majoie, H. J. M., Dings, J. T., Schijns, O. E. M. G., Schipper, S., & Hoogland, G. (2014). The influence of neuropathology on brain inflammation in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroimmunology*, 271(1-2): 36–42.
- Aceves, D., Ruiz, B., Nuno, P., Roman, S., Zepeda, E. & Panduro, A. (2006). Heterogeneity of Apolipoprotein E Polymorphism in Different Mexican Populations. *Biología Humana*, 78 (1): 65-75.
- Alapirtti, T., Waris, M., Fallah, M., Soilu-Hänninen, M., Mäkinen, R., Kharazmi, E. & Peltola J. (2012). C-reactive protein and seizures in focal epilepsy: A video-electroencephalographic study. *Epilepsia*. 53(5): 790-796.
- Ali, I., Chugh, D., & Ekdahl, C. T. (2015). Role of fractalkine–CX3CR1 pathway in seizure-induced microglial activation, neurodegeneration, and neuroblast production in the adult rat brain. *Neurobiology of Disease*, 74: 194-203.
- Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10): 734-744.
- Alyu, F., & Dikmen, M. (2017). Inflammatory aspects of epileptogenesis: contribution of molecular inflammatory mechanisms. *Acta Neuropsychiatrica*, 29(1): 1-16.
- Amhaoul, H., Staelens, S., & Dedeurwaerdere, S. (2014). Imaging brain inflammation in epilepsy. *Neuroscience*, 279: 238-252.

Aronica, E., Boer, K., Van Vliet, E. A., Redeker, S., Baayen, J. C., Spliet, W. G. M., & Gorter, J. A. (2007). Complement activation in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 26(3): 497-511.

Auvin, S. (2014). Antiepilépticos. *EMC-Pediatría*, 49(1): 1–12.

Barker-Haliski, M., & White, H. S. (2015). Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a022863.

Bartfai, T., Sanchez-Alavez, M., Andell-Jonsson, S., Schultzberg, M., Vezzani, A., Danielsson, E., & Conti, B. (2007). Interleukin-1 System in CNS Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113(1): 173-177.

Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., & Malenka, R. C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science*, 295(5563): 2282-2285.

Beaumont, A., & Whittle, I. R. (2000). The pathogenesis of tumour associated epilepsy. *Acta Neurochirurgica*, 142(1): 1-15.

Berg, A. T. (2009). Identification of pharmaco-resistant epilepsy. *Neurologic Clinics*, 27(4): 1003-1013.

Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., van Emde Berg, A. T., & Millichap, J. J. (2013). The 2010 revised classification of seizures and epilepsy. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 19(3): 571-597.

Biffi, A., Shulman, J. M., Jagiella, J. M., Cortellini, L., Ayres, A. M., Schwab, K., & Meschia, J. F. (2012). Genetic variation at CR1 increases risk of cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*, 78(5), 334-341.

Briellmann, R. S., Torn–Broers, Y., Busuttil, B. E., Major, B. J., Kalnins, R. M., Olsen, M., & Berkovic, S. F. (2000). APOE ϵ 4 genotype is associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 55(3): 435-437.

Brodie, M. J., Zuberi, S. M., Scheffer, I. E., & Fisher, R. S. (2018). The 2017 ILAE classification of seizure types and the epilepsies: what do people with epilepsy and their caregivers need to know?. *Epileptic Disorders*, 20(2): 77-87.

Campos, M., Edland, S. D., & Peavy, G. M. (2013). Exploratory study of apolipoprotein E ϵ 4 genotype and risk of Alzheimer's disease in Mexican Hispanics. *Journal of the American Geriatrics Society*, 61(6): 1038-1040.

Campos-Peña, V., & Meraz-Ríos, M. A. (2014). Alzheimer disease: the role of A β in the glutamatergic system. *Neurochemistry*, <https://doi.org/10.5772/57367>

Cendes F, Sakamoto A C, Spreafico R, Bingaman W, Becker A J. (2014). Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 128(1): 21-37.

Chang, E. F., Potts, M. B., Keles, G. E., Lamborn, K. R., Chang, S. M., Barbaro, N. M., & Berger, M. S. (2008). Seizure characteristics and control following resection in 332 patients with low-grade gliomas. *Journal of Neurosurgery*, 108(2): 227-235.

Chang, W.-T., Huang, M.-C., Chung, H.-F., Chiu, Y.-F., Chen, P.-S., Chen, F.-P., Hsu, C.-C. (2016). Interleukin-6 gene polymorphisms correlate with the progression of nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes: A prospective cohort study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 120:15–23. doi:10.1016/j.diabres.2016.07.013

Chavan, S. S., Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2017). Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. *Immunity*, 46(6): 927-942.

Chen, Y., Pawlikowska, L., Yao, J. S., Shen, F., Zhai, W., Achrol, A. S., & Young, W. L. (2006). Interleukin-6 involvement in brain arteriovenous malformations. *Annals of Neurology*, 59(1): 72-80.

Conti, L., Palma, E., Roseti, C., Lauro, C., Cipriani, R., De Groot, M. & Limatola, C. (2011). Anomalous levels of Cl⁻ transporters cause a decrease of GABAergic inhibition in human peritumoral epileptic cortex. *Epilepsia*, 52(9): 1635-1644.

Cruz-Cruz, M.R., Gallardo-Elías, J., Paredes-Solís, S., Legorreta-Soberanis, J., Flores-Moreno, M., & Andersson, N. (2017). Factores asociados a epilepsia en niños en México: un estudio caso-control. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 74(5): 334-340.

Cui, L., Tao, H., Wang, Y., Liu, Z., Xu, Z., Zhou, H., & Liu, Y. (2015). A functional polymorphism of the microRNA-146a gene is associated with susceptibility to drug-resistant epilepsy and seizures frequency. *Seizure*, 27, 60-65.

D'Ambrosio R. (2004). The role of glial membrane ion channels in seizures and epileptogenesis. *Pharmacol Ther*, 103:95-108.

Danfors, T., Ribom, D., Berntsson, S. G., & Smits, A. (2009). Epileptic seizures and survival in early disease of grade 2 gliomas. *European Journal of Neurology*, 16(7): 823-831.

DeMattos, R. B., Brendza, R. P., Heuser, J. E., Kierson, M., Cirrito, J. R., Fryer, J., & Holtzman, D. M. (2001). Purification and characterization of astrocyte-secreted

apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochemistry International*, 39(5-6): 415-425.

den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J. & Human Genome Variation Society (HGVS), the Human Variome Project (HVP), and the Human Genome Organization (HUGO). (2016). HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Human Mutation*, 37(6): 564-569.

Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N. C., & Rogawski, M. A. (2013). Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 36(3): 174–184. doi:10.1016/j.tins.2012.11.008

Dey, A., Kang, X., Qiu, J., Du, Y., & Jiang, J. (2016). Anti-inflammatory small molecules to treat seizures and epilepsy: from bench to bedside. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(6): 463-484.

Diamond, M. L., Ritter, A. C., Failla, M. D., Boles, J. A., Conley, Y. P., Kochanek, P. M., & Wagner, A. K. (2014). IL-1 β associations with posttraumatic epilepsy development: A genetics and biomarker cohort study. *Epilepsia*, 55(7): 1109-1119.

Domingues, C., AB da Cruz e Silva, O., & Henriques, A. (2017). Impact of cytokines and chemokines on Alzheimer's disease neuropathological hallmarks. *Current Alzheimer Research*, 14(8): 870-882.

Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9): 1254.

Fan, Y. Y., Cai, Q. L., Gao, Z. Y., Lin, X., Huang, Q., Tang, W., & Liu, J. H. (2017). APOE ϵ 4 allele elevates the expressions of inflammatory factors and promotes Alzheimer's disease progression: a comparative study based on Han and She populations in the Wenzhou area. *Brain Research Bulletin*, 132: 39-43.

Fellin, T., & Haydon, P. G. (2005). Do astrocytes contribute to excitation underlying seizures? *Trends in Molecular Medicine*, 11(12): 530-533.

Feng L, Xia Y, García GE, Hwang D, Wilson CB. 1995. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclo-oxygenase- 2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Investigation*, 95:1669-1675.

Finch, C., & Morgan, T. (2007). Systemic Inflammation, Infection, ApoE Alleles, and Alzheimer Disease: A Position Paper. *Current Alzheimer Research*, 4(2): 185–189. doi:10.2174/156720507780362254

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., & Hesdorffer, D. C. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsy*, 55(4): 475-482.

Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., & Scheffer, I. E. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4): 522-530.

Frisardi, V., Panza, F., & Farooqui, A. A. (2011). Late-life depression and Alzheimer's disease: the glutamatergic system inside of this mirror relationship. *Brain Research Reviews*, 67(1-2): 344-355.

Gambardella, A., Aguglia, U., Chifari, R., Labate, A., Manna, I., Serra, P., & Ventura, P. (2005). ApoE epsilon4 allele and disease duration affect verbal learning in mild temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 46(1): 110-117.

Genis-Mendoza, A., Martinez-Magana, J., Bojorquez, C., Tellez-Martinez, J., Jimenez-Genchi, J., Roche, A., & Zapata, L. (2018). Program for APOE-E4 allele detection in a Mexican population of older patients with cognitive impairment. *Gaceta Medica de Mexico*, 154(5): 555-560.

Glykys, J., Dzhala, V., Egawa, K., Kahle, K. T., Delpire, E., & Staley, K. (2017). Chloride dysregulation, seizures, and cerebral edema: a relationship with therapeutic potential. *Trends in Neurosciences*, 40(5): 276-294.

Goldberg, E. M., & Coulter, D. A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Review Neurosciences*, 14(5): 337.

Grch37.ensembl.org. (2019). Ensembl Genome Browser. Disponible en: <http://grch37.ensembl.org/index.html> [Accesado el 20 de Mar de 2019].

Gruol, D. L. (2015). IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology*, 96: 42-54.

Guerrini, R., & Dobyns, W. B. (2014). Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *The Lancet Neurology*, 13(7): 710-726.

Helmstaedter, C. (2002). Effects of chronic epilepsy on declarative memory systems. *Progress in Brain Research*, 135:439-453.

Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 117(8): 919-947.

Hitiris, N., Mohanraj, R., Norrie, J., Sills, G. J., & Brodie, M. J. (2007). Predictors of pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy Research*, 75(2-3): 192-196.

Holtzman, D. M., Herz, J., & Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(3): a006312.

Huang, C., Yan, B., Lei, D., Si, Y., Li, H., Chen, M. W., & Li, J. M. (2015). Apolipoprotein 4 may increase viral load and seizure frequency in mesial temporal lobe epilepsy patients with positive human herpes virus 6B. *Neuroscience Letters*, 593: 29-34.

Hung, K. L., Liang, J. S., Wang, J. S., Chen, H. J., Lin, L. J., & Lu, J. F. (2017). Association of a novel GABRG2 splicing variation and a PTGS2/COX-2 single nucleotide polymorphism with Taiwanese febrile seizures. *Epilepsy Research*, 129: 1-7.

Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4): 333-341.

Iori, V., Frigerio, F., & Vezzani, A. (2016). Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. *Current Opinion in Pharmacology*, 26: 118-123.

Jacobson AC & Weis JH. 2008. Comparative Functional Evolution of Human and Mouse CR1 and CR2. *J Immunol*,181(5):2953-2959.

Jamali, S., Bartolomei, F., Robaglia-Schlupp, A., Massacrier, A., Peragut, J. C., Régis, J., & Royer, B. (2006). Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain*, 129(3): 625-641.

Jiang, C. Q., Lam, T. H., Liu, B., Lin, J. M., Yue, X. J., Jin, Y. L., & Thomas, G. N. (2010). Interleukin-6 receptor gene polymorphism modulates interleukin-6 levels and the metabolic syndrome: GBCS-CVD. *Obesity*, 18(10): 1969-1974.

Jung, K. H., Chu, K., Lee, S. T., Kim, J. H., Kang, K. M., Song, E. C., & Roh, J. K. (2009). Region-specific plasticity in the epileptic rat brain: A hippocampal and extrahippocampal analysis. *Epilepsia*, 50(3): 537-549.

Jüttler, E., Tarabin, V., & Schwaninger, M. (2002). Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *The Neuroscientist*, 8(3): 268-275.

Kariuki, S. M., Rockett, K., Clark, T. G., Reyburn, H., Agbenyega, T., Taylor, T. E., & Newton, C. R. (2013). The genetic risk of acute seizures in African children with falciparum malaria. *Epilepsia*, 54(6): 990-1001.

Kawamura J M, Ruskin D N, Masino S A. (2016). Metabolic therapy for temporal lobe epilepsy in a dish: investigating mechanisms of ketogenic diet using electrophysiological recordings in hippocampal slices. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9: 112.

Keenan, B. T., Shulman, J. M., Chibnik, L. B., Raj, T., Tran, D., Sabuncu, M. R., & Huentelman, M. J. (2012). A coding variant in CR1 interacts with APOE- ϵ 4 to influence cognitive decline. *Human Molecular Genetics*, 21(10): 2377-2388.

Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P. A., Selvakumar, G. P., Saeed, D., Zahoor, H., & Zaheer, A. (2016). Neuroinflammation induces neurodegeneration. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Spine*, 1(1): 1-15

Kimura, K., Takayanagi, R., Yokoyama, H., & Yamada, Y. (2016). Effects of tumor necrosis factor α -857C/T polymorphism on the expression of tumor necrosis factor α . *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 124(8): 669-674.

Krishnaswamy N, Lacroix-Pepin N, Chapdelaine PH, Taniguchi H, Kauffenstein G, Chakravarti A, Danyod G, Fortier MA. 2010. Epidermal Growth Factor Receptor Is an Obligatory Intermediate for Oxytocin-Induced Cyclooxygenase 2 Expression and Prostaglandin F2 Production in Bovine Endometrial Epithelial Cells. *Endocrinology*, 151:1367-1374.

Kubota, K., Inoue, K., Hashimoto, R., Kumamoto, N., Kosuga, A., Tatsumi, M., & Takeda, M. (2009). Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 regulates cell adhesion and synaptic morphology via modulation of N-cadherin expression. *Journal of Neurochemistry*, 110(2): 496-508.

Kuhlenbaeumer, G., Hüge, A., Berger, K., Kessler, C., Voelzke, H., Funke, H., & Ringelstein, E. B. (2010). Genetic variants in the C-reactive protein gene are associated with microangiopathic ischemic stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 30(5): 476-482.

Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6): 1069-1077.

Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., & Letenneur, L. (2009). European Alzheimer's Disease Initiative Investigators. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 41(10): 1094-1099.

Lerma, J., & Marques, J. M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron*, 80(2), 292-311.

Levin, S. G., & Godukhin, O. V. (2017). Modulating effect of cytokines on mechanisms of synaptic plasticity in the brain. *Biochemistry (Moscow)*, 82(3): 264-274.

Lewis, C. M. (2002). Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Briefings in Bioinformatics*, 3(2): 146-153.

Li, G., Bauer, S., Nowak, M., Norwood, B., Tackenberg, B., Rosenow, F., & Hamer, H. M. (2011). Cytokines and epilepsy. *Seizure*, 20(3): 249-256.

Li, Q., Ma, C., Zhang, Z., Chen, S., Zhi, W., Zhang, L., & Ma, T. (2018). Association between cyclooxygenase-2 (COX-2) 8473 T> C polymorphism and cancer risk: a meta-analysis and trial sequential analysis. *BMC Cancer*, 18(1): 847.

Li, Y., Liu, L., Kang, J., Sheng, J. G., Barger, S. W., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2000). Neuronal–glial interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *Journal of Neuroscience*, 20(1): 149-155.

Li, Z., Ding, C., Gong, X., Wang, X., & Cui, T. (2016). Apolipoprotein E ε4 Allele was Associated With Nonlesional Mesial Temporal Lobe Epilepsy in Han Chinese Population. *Medicine*, 95(9): e2894

Libbey J E, Kirkman N J, Wilcox K S, White H S, Fujinami R S. 2010. Role for complement in the development of seizures following acute viral infection. *Journal of Virology*. 84(13): 6452-6460.

Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 9(2): 106.

Lloyd-Jones D. M., Liu, K., Tian, L., & Greenland, P. (2006). Narrative review: assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Ann Intern Med*, 145(1): 35-42.

Lohmann, K., & Klein, C. (2014). Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics*, 11(4): 699-707.

Maezawa, I., Maeda, N., Montine, T. J., & Montine, K. S. (2006). Apolipoprotein E-specific innate immune response in astrocytes from targeted replacement mice. *Journal of Neuroinflammation*, 3(1): 10-15

Mahley R.W. (1988). Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622–630

Malik, M. A., Hamid, M. H., Ahmed, T. M., & Ali, Q. (2008). Predictors of intractable childhood epilepsy. *J Coll Physicians Surg Pak*, 18(3): 158-62.

Mao X Y, Tokay T, Zhou H H, & Jin W L (2016). Long-range and short-range tumor-stroma networks synergistically contribute to tumor-associated epilepsy. *Oncotarget*, 7(22): 33451-33460.

Marta, A. M. (2011). Neurogenesis in the epileptic brain: a brief overview from temporal lobe epilepsy. *Pharmacological Reports*, 63(6): 1316-1323.

Martínez-Juárez, I. E., López-Zapata, R., Gómez-Arias, B., Bravo-Armenta, E., Romero-Ocampo, L., Estévez-Cruz, Z., Morán-Molina, S. (2012). Epilepsia farmacorresistente: uso de la nueva definición y factores de riesgo relacionados.

Estudio en población mexicana de un centro de tercer nivel. *Rev Neurol*, 54: 159-66.

Mauch, D. H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E. C., Otto, A., & Pfrieger, F. W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, 294(5545):1354-1357.

McHugh, J. C., & Delanty, N. (2008). Epidemiology and classification of epilepsy: gender comparisons. *International Review of Neurobiology*, 83: 11-26.

McNamara, J. O., Huang, Y. Z., & Leonard, A. S. (2006). Molecular Signaling Mechanisms Underlying Epileptogenesis. *Science's STKE*, 2006(356): re12–re12. doi:10.1126/stke.3562006re12

Mériaux C., Franck J., Park D. B., Quanico J., Kim Y. H., Chung C. K., Fournier I. (2014). Human temporal lobe epilepsy analyses by tissue proteomics. *Hippocampus*, 24(6): 628-642.

Minami, M., Kuraishi, Y., & Satoh, M. (1991). Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 β , IL-6, TNF α and LIF in the rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176(2): 593-598.

Miñambres, E., Cemborain, A., Sánchez-Velasco, P., Gandarillas, M., Díaz-Regañón, G., Sánchez-González, U., & Leyva-Cobián, F. (2003). Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Critical Care Medicine*, 31(3): 933-938.

Mirowska-Guzel, D., Gromadzka, G., Mach, A., Czlonkowski, A., & Czlonkowska, A. (2011). Association of IL1A, IL1B, ILRN, IL6, IL10 and TNF- α polymorphisms with risk and clinical course of multiple sclerosis in a Polish population. *Journal of Neuroimmunology*, 236(1-2): 87-92.

Moshé, S. L., Perucca, E., Ryvlin, P., & Tomson, T. (2015). Epilepsy: new advances. *The Lancet*, 385(9971): 884-898.

Myers, C. T., & Mefford, H. C. (2015). Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Medicine*, 7(1): 91-101.

Neniskyte, U., & Gross, C. T. (2017). Errant gardeners: glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(11): 658-670.

Nicoll, J. A., Mrak, R. E., Graham, D. I., Stewart, J., Wilcock, G., MacGowan, S., & Moss, T. (2000). Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 47(3): 365-368.

Norden, A. D., & Blumenfeld, H. (2002). The role of subcortical structures in human epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 3(3): 219-231.

Nwani, P. O., Nwosu, M. C., Asomugha, L. A., Enwereji, K. O., Arinzechi, E. O., & Ogunniyi, A. O. (2015). Epidemiology of active epilepsy in a suburban community in Southeast Nigeria: A door-to-door survey. *Niger J Clin Pract*, 18: 527-33.

Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12): 1584-1596.

Ortiz-González, X. R., Poduri, A., Roberts, C. M., Sullivan, J. E., Marsh, E. D., & Porter, B. E. (2013). Focal cortical dysplasia is more common in boys than in girls. *Epilepsy & Behavior*, 27(1): 121-123.

Oskoui, M., Webster, R. I., Zhang, X., & Shevell, M. I. (2005). Factors predictive of outcome in childhood epilepsy. *Journal of Child Neurology*, 20(11): 898-904.

Palop, J. J., & Mucke, L. (2009). Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 66(4): 435-440.

Pan, W., Zadina, J. E., Harlan, R. E., T Weber, J. O. S. E. P. H., Banks, W. A., & Kastin, A. J. (1997). Tumor necrosis factor- α : a neuromodulator in the CNS. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(5): 603-613.

Papafili, A., Hill, M. R., Brull, D. J., McAnulty, R. J., Marshall, R. P., Humphries, S. E., & Laurent, G. J. (2002). Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(10): 1631-1636.

Paudel, Y. N., Shaikh, M. F., Shah, S., Kumari, Y., & Othman, I. (2018). Role of inflammation in epilepsy and neurobehavioral comorbidities: Implication for therapy. *European Journal of Pharmacology*, 837: 145-155

Perucca, P., & Mula, M. (2013). Antiepileptic drug effects on mood and behavior: molecular targets. *Epilepsy & Behavior*, 26(3): 440-449.

Poduri, A. (2015). Meta-Analysis Revives Genome-Wide Association Studies in Epilepsy: A New Look at GWAS in Common Epilepsies. *Epilepsy Currents*, 15(3): 122-123.

Pohlmann-Eden, B., & Weaver, D. F. (2013). The puzzle (s) of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia*, 54(s2): 1-4.

Potschka, H. (2010). *cc. Pharmacogenomics*, 11(10): 1427-1438.

Programa Prioritario de Epilepsia (PPE). (2018). Frecuencia en México. Disponible en: <http://www.epilepsiamexico.gob.mx/info-pacientes/frecuencia.htm> [Accesado el 21 de enero de 2018].

Qiu, Z., & Gruol, D. L. (2003). Interleukin-6, β -amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *Journal of Neuroimmunology*, 139(1-2): 51-57.

Quarato, P. P., Di Gennaro, G., Mascia, A., Grammaldo, L. G., Meldolesi, G. N., Picardi, A., & Manfredi, M. (2005). Temporal lobe epilepsy surgery: different surgical strategies after a non-invasive diagnostic protocol. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(6): 815-824.

Quintas, R., Raggi, A., Giovannetti, A. M., Pagani, M., Sabariego, C., Cieza, A., & Leonardi, M. (2012). Psychosocial difficulties in people with epilepsy: a systematic review of literature from 2005 until 2010. *Epilepsy & Behavior*, 25(1): 60-67.

Rana A., & Musto A. E. (2018). The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of neuroinflammation*, 15(1): 144-155.

Ran, X., Li, J., Shao, Q., Chen, H., Lin, Z., Sun, Z. S., & Wu, J. (2014). EpilepsyGene: a genetic resource for genes and mutations related to epilepsy. *Nucleic Acids Research*, 43(D1): D893-D899.

Ravizza, T., & Vezzani, A. (2018). Pharmacological targeting of brain inflammation in epilepsy: Therapeutic perspectives from experimental and clinical studies. *Epilepsia Open*, 3: 133-142.

Remy, S., & Beck, H. (2005). Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*, 129(1): 18-35.

Robinson, M. B. (2002). Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *Journal of Neurochemistry*, 80(1): 1-11.

Rodríguez, M. M. M. (2014). Epilepsia: Anatomía y patología del lóbulo temporal. EPOS™, the Electronic Presentation Online System
<http://dx.doi.org/10.1594/seram2014/S-0539>

Rogawski, M. A. (2013). The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 54(s2): 33-40.

Rojas A, Jiang J, Ganesh T, Yang M S, Lelutiu N, Gueorguieva P, Dingledine R. 2014. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*. 55(1): 17-25.

Rosati, A., Tomassini, A., Pollo, B., Ambrosi, C., Schwarz, A., Padovani, A., & Bonetti, B. (2009). Epilepsy in cerebral glioma: timing of appearance and histological correlations. *Journal of Neuro-Oncology*, 93(3): 395-400.

Roseti, C., Fucile, S., Lauro, C., Martinello, K., Bertollini, C., Esposito, V., & Palma, E. (2013). Fractalkine/CX 3 CL 1 modulates GABA A currents in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 54(10): 1834-1844.

Roseti, C., van Vliet, E. A., Cifelli, P., Ruffolo, G., Baayen, J. C., Di Castro, M. A., & Palma, E. (2015). GABA_A currents are decreased by IL-1 β in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. *Neurobiology of Disease*, 82: 311-320.

Rothwell, N. J., & Luheshi, G. N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in Neurosciences*, 23(12), 618-625.

Samland, H., Huitron-Resendiz, S., Masliah, E., Criado, J., Henriksen, S. J., & Campbell, I. L. (2003). Profound increase in sensitivity to glutamatergic-but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. *Journal of Neuroscience Research*, 73(2): 176-187.

Samuelsson, A. M., Jennische, E., Hansson, H. A., & Holmang, A. (2006). Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA_A dysregulation and impaired spatial learning. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290 (5): R1345-1356.

Schaller, B., & Rüegg, S. J. (2003). Brain tumor and seizures: pathophysiology and its implications for treatment revisited. *Epilepsia*, 44(9): 1223-1232.

Scharfman, H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 7(4): 348-354.

Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., & Nordli, D. R. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4): 512-521.

Schmidt, D., & Löscher, W. (2005). Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*, 46(6): 858-877.

Seegers, U., Potschka, H., & Löscher, W. (2002). Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, 51(3): 257-268.

Sharma, A. K., Rani, E., Waheed, A., & Rajput, S. K. (2015). Pharmacoresistant epilepsy: a current update on non-conventional pharmacological and non-pharmacological interventions. *Journal of Epilepsy Research*, 5(1): 1-8.

Shastry, B. S. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. In *Single Nucleotide Polymorphisms. Methods in Molecular Biology*, 578: 3-22.

Shimada, T., Takemiya, T., Sugiura, H., & Yamagata, K. (2014). Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators of Inflammation*, 2014: 901902

Shorvon, S. D. (2011). The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, 52(6): 1052-1057.

Sillanpää, M., & Schmidt, D. (2009). Early seizure frequency and aetiology predict long-term medical outcome in childhood-onset epilepsy. *Brain*, 132(4): 989-998.

Sloviter, R. S., Zappone, C. A., Harvey, B. D., & Frotscher, M. (2006). Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: possible anatomical substrate of granule cell hyperinhibition in chronically epileptic rats. *Journal of Comparative Neurology*, 494(6): 944-960.

Somjen, G. G. (2002). Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. *The Neuroscientist*, 8(3): 254-267.

Spooner, C. G., Berkovic, S. F., Mitchell, L. A., Wrennall, J. A., & Harvey, A. S. (2006). New-onset temporal lobe epilepsy in children Lesion on MRI predicts poor seizure outcome. *Neurology*, 67(12): 2147-2153.

Stafstrom, C. E., & Carmant, L. (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(6): a022426.

Staley, K. (2015). Molecular mechanisms of epilepsy. *Nature Neuroscience*, 18(3): 367.

Steinhäuser, C., & Seifert, G. (2010). Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 51: 54-54.

Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., & Malenka, R. C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *Journal of Neuroscience*, 25(12): 3219-3228.

Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, 440(7087): 1054–1059. doi:10.1038/nature04671

Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., & Sher, A. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131(6): 1164-1178.

Suástegui-Román, R. S., Gómez, P. Y., Camacho, J. O. M. G., Arriola, J. G., Prado, A. J., Caro, O. L., & Vilatela, M. A. (2002). Frecuencia de la apolipoproteína E en una población Nahua. *Revista de Investigación Clínica*, 54(5): 415-421.

Tai, L. M., Ghura, S., Koster, K. P., Liakaite, V., Maienschein-Cline, M., Kanabar, P., & Green, S. J. (2015). APOE-modulated A β -induced neuroinflammation in Alzheimer's disease: current landscape, novel data, and future perspective. *Journal of Neurochemistry*, 133(4): 465-488.

Tai X Y, Bernhardt B, Thom M, Thompson P, Baxendale S, Koepp M, Bernasconi N. (2018). Neurodegenerative processes in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: Clinical, pathological and neuroimaging evidence. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(1): 70-90.

Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., & Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from

hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30): 21362-21368.

Tang, F., Hartz, A., & Bauer, B. (2017). Drug-resistant epilepsy: multiple hypotheses, few answers. *Frontiers in Neurology*, 8: 301-319.

Teocchi, M. A., Ferreira, A. É. D., de Oliveira, E. P. D. L., Tedeschi, H., & D'Souza-Li, L. (2013). Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1): 53-59.

Teocchi, M. A., & D'Souza-Li, L. (2016). Apoptosis through death receptors in temporal lobe epilepsy-associated hippocampal sclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2016: 1-12.

Terry, C. F., Loukaci, V., & Green, F. R. (2000). Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24): 18138-18144.

Thampratankul Lunliya. (2019). Introduction to Seizure Semiology: Focal Epilepsy. Mahidol University. Disponible en: http://thaiepilepsysociety.com/wp-content/uploads/2013/07/Seizure-semiology_EST_09092018_handout_Lunliya.pdf [Accesado el 01 de marzo de 2019].

Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Rosas-Carrasco, O., Mena-Barranco, F., Carvajal-García, R., Meraz-Ríos, M. A., & Campos-Peña, V. (2015). Evaluation of

inflammation-related genes polymorphisms in Mexican with Alzheimer's disease: a pilot study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 148.

Traub, R. D., Michelson-Law, H., Bibbig, A. E., Buhl, E. H., & Whittington, M. A. (2004). Gap junctions, fast oscillations and the initiation of seizures. *Recent Advances in Epilepsy Research*, 548: 110-122

Tsakiri, N., Kimber, I., Rothwell, N. J., & Pinteaux, E. (2008). Interleukin-1-induced interleukin-6 synthesis is mediated by the neutral sphingomyelinase/Src kinase pathway in neurones. *British Journal of Pharmacology*, 153(4), 775-783.

Tsoi, L. M., Wong, K. Y., Liu, Y. M., & Ho, Y. Y. (2007). Apoprotein E isoform-dependent expression and secretion of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460(1): 33-40.

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(11): 2563-2582.

Tzeng, S. (2007). A Possible Therapeutic Strategy for CNS Repair: Reduction of iNOS Production in Activated Glia by Interference of PGE₂/EP₂ Action. *Glia*. Jan 15;55(2):214-223

Vaillend, C., Mason, S. E., Cuttle, M. F., & Alger, B. E. (2002). Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. *Journal of Neurophysiology*, 88(6): 2963-2978.

van Vliet, E., Aronica, E., Redeker, S., Marchi, N., Rizzi, M., Vezzani, A., & Gorter, J. (2004). Selective and persistent upregulation of mdr1b mRNA and P-glycoprotein in the parahippocampal cortex of chronic epileptic rats. *Epilepsy Research*, 60(2-3): 203-213.

van Vliet, E. A., Aronica, E., Vezzani, A., & Ravizza, T. (2018). Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. *Neuropathology and applied neurobiology*, 44(1): 91-111.

Varvel, N. H., Neher, J. J., Bosch, A., Wang, W., Ransohoff, R. M., Miller, R. J., & Dingledine, R. (2016). Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after status epilepticus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(38): E5665-E5674.

Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. 2011. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*, 7(1): 31-40.

Villuendas, G., San Millán, J. L., Sancho, J., & Escobar-Morreale, H. F. (2002). The-597 G→A and-174 G→C polymorphisms in the promoter of the IL-6 gene are associated with hyperandrogenism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3): 1134-1141.

Vitek, M. P., Brown, C. M., & Colton, C. A. (2009). APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiology of Aging*, 30(9): 1350-1360.

Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *Journal of Neuroscience*, 23(25): 8692-8700.

Volk, H. A., Potschka, H., & Löscher, W. (2004). Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy research*, 58(1): 67-79.

Vrinda M, Arun S, Srikumar B N, Kutty B M, Rao S. (2018). Temporal Lobe Epilepsy-induced Neurodegeneration and Cognitive Deficits: Implications for Aging. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. In press.

Walker, L. E., Mirza, N., Yip, V. L. M., Marson, A. G., & Pirmohamed, M. (2015). Personalized medicine approaches in epilepsy. *Journal of Internal Medicine*, 277(2): 218-234.

Walker M C. (2015). Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. *Semin Neurol* 35(03): 193-200.

Walton, H. S., & Dodd, P. R. (2007). Glutamate–glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 50(7-8): 1052-1066.

Wang, M., & Jia, J. (2010). The interleukin-6 gene –572C/G promoter polymorphism modifies Alzheimer's risk in APOE ϵ 4 carriers. *Neuroscience Letters*, 482(3): 260–263. doi:10.1016/j.neulet.2010.07.051

Wang, Y., Du, X., Bin, R., Yu, S., Xia, Z., Zheng, G., & Wang, Y. (2017). Genetic variants identified from epilepsy of unknown etiology in chinese children by targeted exome sequencing. *Scientific Reports*, 7: 40319-40328.

Webster, K. M., Sun, M., Crack, P., O'Brien, T. J., Shultz, S. R., & Semple, B. D. (2017). Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1): 10-27.

Whitney, K. D., & McNamara, J. O. (2000). GluR3 autoantibodies destroy neural cells in a complement-dependent manner modulated by complement regulatory proteins. *Journal of Neuroscience*, 20(19): 7307-7316.

Wolbink, G. J., Brouwer, M. C., Buysmann, S., Ten Berge, I. J., & Hack, C. E. (1996). CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. *The Journal of Immunology*, 157(1): 473-479.

World Health Organization. (2019). *Epilepsy: a public health imperative*. WHO. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Xiong, Z. Q., Qian, W., Suzuki, K., & McNamara, J. O. (2003). Formation of complement membrane attack complex in mammalian cerebral cortex evokes seizures and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 23(3): 955-960.

Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R. W., & Huang, Y. (2006). Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with

targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *Journal of Neuroscience*, 26(19): 4985-4994.

Xu, Y., Zeng, K., Han, Y., Wang, L., Chen, D., Xi, Z., & Chen, G. (2012). Altered expression of CX3CL1 in patients with epilepsy and in a rat model. *The American Journal of Pathology*, 180(5): 1950-1962.

Yamanouchi, H., Moshé, S. L., & Okumura, A. (2017). *Acute Encephalopathy and Encephalitis in Infancy and Its Related Disorders*. Elsevier Health Sciences.

You G, Sha Z, & Jiang T. (2012). The pathogenesis of tumor-related epilepsy and its implications for clinical treatment. *Seizure*, 21(3): 153-159.

Yu, X., Zhang, N., Liu, S., Xi, Z., & Zhang, Y. (2018). Polymorphisms in the interleukin-1 β (IL-1B) and interleukin-1 α (IL-1A) genes on risk of febrile seizures: a meta-analysis. *Neurological Sciences*, 39(9): 1-8.

Zhang M, Harris RC, Mckanna JA. 1999. Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rat renal cortex by adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids. *Proc Natl Acad Sci*, 96: 15280-15285x

ANEXO I



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Ciudad de México a ____ de _____ del ____

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO VÁLIDAMENTE INFORMADO

En caso de tratarse de un paciente que se encuentre en estado de incapacidad transitoria o permanente y que por consiguiente no pueda expedir el consentimiento libremente, la autorización será suscrita por el familiar más cercano en vínculo que le acompañe, o en su caso por tutor o representante legal.

I. DATOS GENERALES

NOMBRE: _____ EDAD: _____

SEXO: _____ FECHA DE NACIMIENTO: _____

TELEFONO: _____ VIVE CON: _____

DOMICILIO: _____

Nombre de la persona que recibió la información y otorga el consentimiento:

Paciente () Representante legal () Familiar () Parentesco _____

Médico Tratante: _____

DIAGNÓSTICO: Epilepsia

- A. **PLAN DE MANEJO:** Toma de muestra de sangre total y tejido obtenido a partir de la cirugía, para la determinación de marcadores moleculares relacionados con la epilepsia; con el fin de realizar investigación básica, que permita identificar posibles blancos terapéuticos
- B. **RESULTADOS ESPERADOS:** identificación de polimorfismos en los genes de proteínas que participan en la regulación de procesos inflamatorios y que puedan estar asociados con el desarrollo de la Epilepsia
- C. **RIESGOS Y COMPLICACIONES:** Este estudio no representa ningún riesgo para su salud, el riesgo es el inherente a la cirugía programada para el manejo del tratamiento.
- D. **ALTERNATIVAS DE MANEJO:** No tomar muestra, sin que esto repercuta en la calidad de atención que se le brinda.
- E. **ACEPTO EL PROCEDIMIENTO y ACEPTO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**
Si () No ()

1. El propósito del procedimiento es purificar los ácidos nucleicos, para la creación de un banco que permita realizar estudios de Biología Molecular y nos ayude a identificar el perfil genómico de la población. Estos estudios permitirán la identificación de blancos terapéuticos que ayuden al diagnóstico temprano de la epilepsia. El estudio se realizará en individuos clínicamente diagnosticados con epilepsia.

2. Se aclaró al paciente (y/o su familiar o representante legal) que los antecedentes clínico-patológicos referidos en la historia clínica, no pueden considerarse como causas naturales de complicaciones potenciales para el procedimiento actual.
3. Los beneficios derivados de este trabajo son el incrementar el conocimiento sobre el proceso clínico y patológico de las demencias y epilepsia, que abren la posibilidad de detección temprana, tratamientos más eficaces y mejor calidad en la atención médica de estos padecimientos propios y exclusivos del ser humano.

POR LO TANTO Y CON LA ANOTACIÓN VERBAL Y ESCRITA

1. Declaro en forma libre y voluntaria sin existir ninguna presión física o moral sobre mi persona, que he comprendido, por las explicaciones que se me han proporcionado el propósito y los riesgos del procedimiento, aclarando las dudas que he planteado. Así mismo declaro que he leído y comprendido totalmente el consentimiento y los espacios en blanco han sido llenados antes de firmar.
2. Estoy enterado que en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna, puedo revocar el consentimiento que otorgo.

AUTORIZO:

**MI PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN Y QUE SE ME (LE)
REALICEN LOS PROCEDIMIENTOS PLANEADOS**

Toma de muestra de sangre venosa para el estudio de polimorfismo relacionado con el desarrollo de la epilepsia.

Lugar y fecha _____ Hora. _____

Nombre y firma de la persona que dio el consentimiento

Nombre, firma del investigador principal

TESTIGOS

Nombre y firma

Nombre y firma

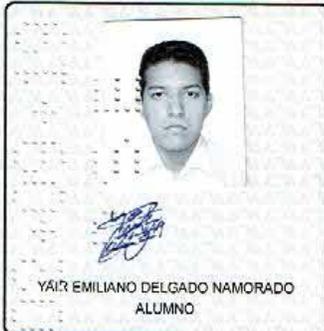
Los datos personales recabados serán protegidos e incorporados en el sistema de registro de datos de pacientes cuya finalidad se integra a un registro que proporcione la capacidad de definir con precisión y diligencia la situación clínica del paciente con la finalidad de dar seguimiento a la atención médica integral. Para cualquier duda comunicarse con la Dra. Victoria Campos Peña al 56063822 ext. 2010 o al 044-5554569605, email neurovcp@gmail.com. Comité de Bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (56063822 ext. 5027).



EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN EN PACIENTES MEXICANOS CON EPILEPSIA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:30 horas del día 29 del mes de agosto del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA
DR. ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ
DRA. NANCY MONROY JARAMILLO
MTRA. ELIZABETH RUIZ SANCHEZ
DR. HECTOR FERNANDO SERRANO



Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: YAIR EMILIANO DELGADO NAMORADO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS
DRA. SILVIA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA
DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA

VOCAL
DR. ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ

VOCAL
DRA. NANCY MONROY JARAMILLO

VOCAL
MTRA. ELIZABETH RUIZ SANCHEZ

SECRETARIO
DR. HECTOR FERNANDO SERRANO