

# Variantes genéticas de susceptibilidad en epilepsia genética generalizada en familias colombianas

## Susceptibility gene variants in genetic generalized epilepsy in Colombian families

Johanna Tejada Moreno (1), Jaime Carrizosa Moog (1,2), Christian Gomez Castillo (2), Carlos Medina Malo (3), Angelica Uscategui (3,4), Laura Guio (3), Dagoberto Cabrera Hemer (2), Winston Rojas (5), William Cornejo Ochoa (2), Nicolás Pineda Trujillo (1).

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** las epilepsias genéticas generalizadas (EGG) siguen patrones de herencia compleja. Este fenotipo es producto de la interacción de diferentes genes con factores ambientales. Los genes/loci más consistentemente asociados con este grupo de epilepsias son *ECA1*, *ECA2-GABRG2*, *ECA3-CLCN2* (también conocido como *JME6-CLCN2*), *JME1-EFHC1* y *JME5-GABRA1*. En Colombia poco se sabe sobre la contribución de las variantes genéticas en estos genes a la susceptibilidad para ser afectado por cualquiera de las formas de EGG. Nuestro propósito fue evaluar el papel de los cinco genes/loci más consistentemente asociados en otros estudios en un grupo de familias colombianas con EGG.

**MÉTODOS:** se evaluaron dos marcadores para cada locus/gen. Los genotipos se obtuvieron mediante las técnicas de PCR-RFLP y ARMS-Tetraprimer. Los análisis estadísticos incluyeron pruebas de asociación alélica y haplotípica, además de pruebas de interacción gen-gen.

**RESULTADOS:** se incluyeron 98 familias, de las cuales 51 fueron epilepsia de ausencias, mientras que 47 fueron epilepsia mioclónica juvenil. Se identificó una interacción significativa entre el alelo G del marcador rs4428455 (valor  $P = 0,0008$ ; gen *GABRA1*) y el alelo G de marcador rs719395 (valor  $P = 0,002$ ; gen *EFHC1*).

**CONCLUSIÓN:** estos dos marcadores parecen incrementar el riesgo de EGG en población colombiana. Otros genes no analizados aquí podrían estudiarse con una muestra de mayor tamaño.

**PALABRAS CLAVES:** epilepsia; epilepsia generalizada; estudios de asociación genética; genes (DeCS).

### SUMMARY

**INTRODUCTION:** Generalized genetic epilepsies (GGE) follow complex inheritance patterns. This phenotype is due to interaction of several genes with environmental factors. The genes/loci most consistently associated with this group of epilepsies are *ECA1*, *ECA2-GABRG2*, *ECA3-CLCN2* (also known as *JME6-CLCN2*), *JME1-EFHC1* and *JME5-GABRA1*. In Colombia, little is known about the contribution of gene variants to susceptibility to GGE forms. Our purpose was to evaluate the role of the five most consistently associated genes /loci in other studies, in Colombian families set with GGE.

**METHODS:** Genotypes were obtained by means of PCR-RFLP and ARMS-Tetraprimer. Statistical analyses included both allelic and haplotypic association tests, in addition to gene-gene interaction tests. Two genetic markers were tested for each gene/locus.

**RESULTS:** Ninety-eight families were included, from which 51 had absence epilepsy, and 47 had juvenile myoclonic epilepsy. A significant interaction was identified between allele G at marker rs4428455 ( $P$ -value = 0.0008; gene *GABRA1*) and allele G at marker rs719395 ( $P$ -value = 0.002; gene *EFHC1*).

**CONCLUSION:** Our results suggest that these two markers are associated with GGE in the Colombian population. Other genes not analyzed could be tested using a larger sample size.

**KEY WORDS:** epilepsy; epilepsy, generalized; genes; genetic association studies (MeSH).

1. Grupo Mapeo Genético, Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia.
2. Pediatrias, Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia.
3. Liga Central Contra la Epilepsia, LICCE. Bogotá-Colombia.
4. Departamento de Pediatría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá-Colombia.
5. Genética Molecular. Insitituto de Biología, Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia.

## INTRODUCCIÓN

Los aportes más representativos que se han realizado en el estudio de la genética en las epilepsias idiopáticas generalizadas, hoy denominadas epilepsias genéticas generalizadas (EGG) (1,2), provienen de estudios de agregación familiar y estudios con gemelos monocigóticos y dicigóticos —revisado en (3)—. Dichos estudios sugieren que las EGG presentan un componente hereditario fuerte y determinante (4). Entre los principales síndromes epilépticos de este grupo se encuentran las epilepsias de ausencias infantiles —*childhood absence epilepsy* (CAE)—, juveniles —*juvenile absence epilepsy* (JAE)— y la epilepsia mioclónica juvenil —*juvenile myoclonic epilepsy* (JME)—. Una pequeña proporción de estos síndromes puede corresponder a la categoría de monogénicos y seguir modos de herencia mendeliana simple (5). En estos, una sola mutación en un gen determinado es suficiente para causar el fenotipo —revisado en (6)—. La gran mayoría de estos síndromes obedece a un patrón poligénico y presenta herencia compleja, en la cual el fenotipo está determinado por una combinación de alelos de susceptibilidad distribuidos en uno o más genes y que interactúan con factores ambientales —revisado en (6)—.

El estudio de las EGG comunes (las de herencia compleja) se dificulta debido a que en estas familias no se observa una relación clara entre el defecto genético y el fenotipo. Adicionalmente, factores como la heterogeneidad genética, la penetrancia incompleta y la expresividad variable contribuyen a la complejidad de las EGG comunes y complican su estudio (7).

A pesar de los anteriores factores, se ha logrado identificar varios genes relacionados con formas particulares de epilepsia. Así, mediante análisis de ligamiento y estudios de asociación se han identificado seis *loci* (*ECA1-ECA6*) relacionados con CAE. El primer *locus* *ECA1* se superpone con el primer *locus* para IGE (*IGE1*) y ocupa el mismo lugar genético, 8q24. En esta región no se ha aislado aún el gen responsable de la variedad de fenotipos ligados a dicho *locus* (8,9). En el caso de *ECA2*, se estableció que el gen que codifica para la subunidad  $\gamma$ -2 del receptor GABA (*GABRG2*) presenta mutaciones asociadas con CAE (10,11). De igual forma, en el *locus* *ECA3* (3q23) que codifica para el canal de calcio Clc-2 se han identificado seis mutaciones asociadas con diferentes subtipos de EGG (12). Asimismo, los estudios funcionales de estas mutaciones han evidenciado una alteración en la cinética de dichos canales (13-15).

Aunque se ha hecho mucho progreso en la identificación de los genes relacionados con JME, solo en tres de ellos se han identificado variantes que segregan en familias con la enfermedad. Entre ellos se encuentran el gen *GABRA1*, que se localiza en la región cromosómica 5q34 (*JME5*) y codifica para la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor GABA (16);

el gen *CLCN2*, ubicado en la región 3q26 (*JME6/ECA3*), que codifica para el canal de calcio Clc-2, mencionado anteriormente (13); y el gen *EFHC1* en la región 6p12 (*JME1*), el cual codifica para una proteína denominada mioclonina que contiene un dominio de unión a calcio (17). Es de resaltar que las familias con frecuencia máxima de mutaciones en el gen *EFHC1* son de origen hispano (17,18). Los genes restantes presentan polimorfismos asociados con la susceptibilidad a JME (19,20). Adicionalmente, se han descrito al menos otros 10 *loci* asociados con el síndrome, en los cuales aún no se ha identificado un gen asociado con la enfermedad (3).

Ninguno de los estudios anteriores incluye familias colombianas con epilepsia de ausencias o epilepsia mioclónica juvenil en las formas comunes. No obstante, en el caso de la epilepsia generalizada con gran mal del despertar (EGMA) se ha reportado una extensa familia de origen antioqueño (21,22) con resultados negativos. Nuestro grupo ha publicado otros estudios genéticos que incluyen familias colombianas y síndromes de EGG (23,24). Nuestro propósito fue analizar los cinco genes/*loci* más frecuentemente asociados con CAE, JAE o JME en un grupo de familias con estos tres síndromes de presentación común.

## MÉTODOS

En este estudio participaron pacientes con diagnóstico de CAE, JAE o JME, provenientes del Programa de Epilepsia de la Universidad de Antioquia-Medellín, la Liga Central contra la Epilepsia (LICCE-Bogotá), o de la consulta privada de neurólogos coinvestigadores del proyecto. Todos los pacientes debían tener un exámen neurológico y desarrollo normal, así como disponibilidad de sus padres para participar en el estudio. Además, cada paciente debía contar con al menos seis de sus bisabuelos con ascendencia *paisa* (región antioqueña). La procedencia *paisa* se determinó con base en una encuesta de ancestralidad que tiene en cuenta la procedencia de los padres, abuelos y bisabuelos del paciente. En la misma encuesta también se preguntó por otros familiares con epilepsia. Dicha encuesta se aplicó en una visita domiciliar que pretendía extender la genealogía, así como indagar por otros afectados en la familia.

Se calculó el poder de la muestra usando el programa GPC (25). Este cálculo se basó en las características del síndrome y los marcadores evaluados en la bibliografía reportada.

Los marcadores polimórficos SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) se eligieron con base en los criterios de “*tagging* SNP” de la población *CEPH* derivada del norte y occidente de Europa y residente en el estado americano de Utah, disponible en el proyecto HapMap (26). La selección de los oligos o *primers* para la amplificación de los

marcadores genéticos, así como la selección de las enzimas para la genotipificación, se llevó a cabo mediante el uso de programas y herramientas bioinformáticas disponibles en la web, como Primer3 (27) o NEBcutter V 2.0 (28). Los marcadores seleccionados fueron los siguientes: *rs9820367* y *rs2228291* para el gen *CLCN2*; *rs6894357* y *rs4428455* para el gen *GABRA1*; *rs11135176* y *rs211037* para el gen *GABRG2*; *rs719395* y *rs614570* para el gen *EFHC1*; *rs35353620* y *rs35706211* para la región *ECA1*.

Durante la visita a las familias de origen antioqueño, se tomó una muestra de sangre periférica (10 ml) de los padres y del hijo afectado, previo consentimiento informado. Las muestras se conservaron con anticoagulante (EDTA) a -20° C hasta el momento de la extracción del ADN. Las muestras procedentes de Bogotá-LICCE se enviaron al laboratorio y fueron almacenadas en similares condiciones. La extracción del ADN se realizó mediante el método fenol-cloroformo.

Los marcadores genéticos tipo SNP se genotipificaron mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) acoplada a una reacción de digestión con enzima de restricción (PCR-RFLP). Para algunos SNP se usó la metodología Tetra-primer ARMS-PCR (sistema de amplificación refractario de mutaciones) o una PCR alelo específica. Las PCR se realizaron en un termociclador BioRad Dyad. Posteriormente, los productos de amplificación y digestión se visualizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, sometidos a una fuente de luz ultravioleta con ayuda de un transiluminador UVP.

Las inconsistencias mendelianas se evaluaron usando el programa Pedcheck v 1.1. Los SNP donde se encontraron las inconsistencias se genotipificaron nuevamente. Si después de la genotipificación las inconsistencias persistían, se eliminó el genotipo del padre que presentó la incompatibilidad con el hijo. En los casos en los cuales los dos padres presentaron incongruencias con su hijo, se eliminó el dato del trío completo para el marcador en particular. También se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas; además, se evaluó el supuesto de equilibrio Hardy-Weinberg para cada uno de los marcadores. Estos análisis se realizaron con la librería dgcGenetics, del paquete estadístico R (29). Las medidas de desequilibrio de ligamiento se graficaron con el programa Haploview v 4.2 (30). Todos los valores P se consideraron significativos si  $P \leq 0,005$  (0,05/10 marcadores analizados).

Para determinar si existían diferencias genéticas entre los dos grupos de familias con JME (provenientes de Antioquia y de Bogotá) se realizaron diferentes análisis de diferenciación poblacional, como pruebas de homogeneidad alélica y genotípica, e índices de fijación, tanto en los padres como en los hijos. Estos análisis se llevaron a cabo en los programas GENEPOP 4.0.10 (31) y Arlequin 3.5.1.2 (32).

Se realizó un análisis de asociación alélica no paramétrica, específicamente la prueba TDT (prueba de desequilibrio en la transmisión) usando el programa Unphased 3.1.4 (33). Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis estratificado que consistió en realizar la TDT subdividiendo la muestra de acuerdo con las características clínicas del grupo de pacientes (por ejemplo sexo, edad de inicio, frecuencia de las crisis), tanto para las familias con CAE/JAE como para aquellas con JME.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de interacción gen-gen entre los genes evaluados.

## RESULTADOS

La muestra estuvo conformada por 41 tríos familiares (caso índice y sus dos padres) y 10 dúos (caso índice y uno de sus padres) con CAE/JAE de origen antioqueño. En cuanto a JME, se incluyeron 26 tríos y 5 dúos familiares de origen antioqueño, más 16 tríos familiares procedentes de Bogotá (LICCE).

Los resultados los hemos dividido en tres secciones. Estas hacen referencia a los análisis para epilepsia de ausencias (CAE/JAE), epilepsia mioclónica juvenil (JME) y la combinación de estos tres síndromes, que en nuestro estudio integran EGG.

### Pacientes con epilepsia de ausencias (CAE/JAE)

En nuestro estudio se incluyeron 24 niños y 27 niñas (razón de 0,9 niños/niña) con epilepsia de ausencias (24 CAE, 6 JAE). Según las crisis, los pacientes picnolépticos (>10 crisis/día) fueron 29; los 17 restantes fueron no picnolépticos.

El porcentaje de genotipificación estuvo por encima de 90% en la muestra total, con un intervalo entre 91,5% y 94,1%. Nueve de los marcadores evaluados se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. El marcador *rs2228291* se desvió del equilibrio en la muestra conformada por los padres ( $P = 0,0003$ ). Este marcador no fue incluido en las posteriores pruebas de asociación.

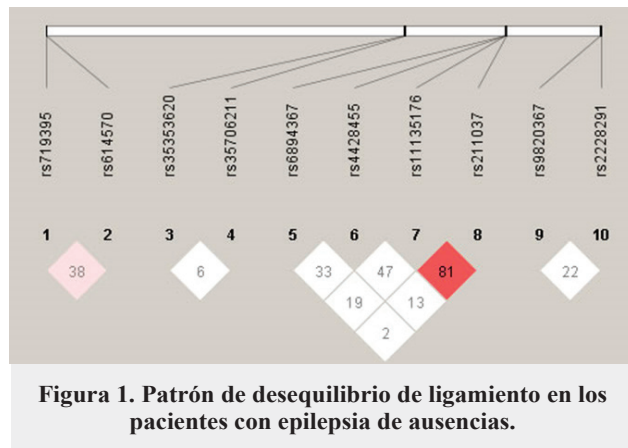
Los valores de LD (desequilibrio de ligamiento) solo fueron altos para los marcadores del *locus* ECA2, involucrando los SNP *rs11135176* y *rs211037* ( $D' = 0,816$ , figura 1).

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de desequilibrio en la transmisión (TDT), teniendo en cuenta las familias con epilepsia de ausencias, CAE/JAE. En este análisis se encontró una fuerte asociación del fenotipo (epilepsia de ausencias) con la variante *rs4428455* ( $P = 0,0008$ ). Se observa que el alelo G representa riesgo. OR = 7,5, IC95% (1,71-32,80).

**Tabla 1. Resultados positivos del análisis de asociación de epilepsia genética generalizada con marcadores en los genes GABRA1 y EFHC1.**

Tipo Epilepsia	Marcador	Alelo	Trans	No-trans	Chi <sup>2</sup>	Valor-p	Odds-R	IC 95% inf	IC 95% sup
CAJE/JAE	rs4428455	A	4 (0.0488)	17 (0.2073)	11,2518	0,0008	1	1	1
		G	78 (0.9512)	65 (0.7927)			7,5	1,715	32,8
JME	rs719395	A	64 (0.8000)	52 (0.6500)	4,6119	0,0318	1	1	1
		G	16 (0.2000)	28 (0.3500)			0,4545	0,2152	0,9599
GGE	rs4428455	A	14 (0.09091)	34 (0.2208)	11,0758	0,0008	1	1	1
		G	140 (0.9091)	12 (0.07792)			3,222	1,525	6,807
	rs719395	A	125 (0.8013)	101 (0.6474)	9,5375	0,002	1	1	1
		G	31 (0.1987)	55 (0.3526)			0,4419	0,2575	0,7582

Trans: Transmisiones; No-trans: No transmisiones; IC: intervalo de confianza; inf: inferior; sup: superior



**Figura 1. Patrón de disequilibrio de ligamiento en los pacientes con epilepsia de ausencias.**

Adicionalmente, se encontraron otros valores que sugieren asociación en los marcadores rs9820367 ( $P=0,03$ ) y rs719395 ( $P=0,03$ ) con valores de OR = 0,45, IC95% (0,22-0,96) y OR = 0,43, IC95% (0,20-0,94), respectivamente. En estos dos casos, el alelo G en ambos SNP actuaría como un alelo de protección.

En el análisis teniendo en cuenta las familias con epilepsia de ausencias, en las cuales el paciente es de sexo masculino, se encontró asociación con el alelo G del marcador rs719395, con un valor de  $P=0,005$  y un OR = 0,21, IC95% (0,06-0,75) (tabla 2). También se observó asociación con el SNP rs4428455 ( $P=0,00004$ ); sin embargo, el pequeño tamaño de la muestra y el bajo número de transmisiones del alelo A no permite el cálculo del valor de OR y la asociación a uno de los alelos de este *locus*.

Al analizar los datos según la edad de inicio se identificó asociación del fenotipo denominado CAE (inicio < 10 años) y el marcador rs4428455, con un valor de  $P=0,007$  y un OR = 9, IC95% (1,1-71) para el alelo G (tabla 2).

En los resultados del análisis de asociación en los pacientes denominados picnolépticos (pacientes con más de diez crisis por día) se encontró un valor de  $P$  significativo ( $P=0,0004$ ), que sugiere asociación al evaluar el SNP rs4428455, sin embargo, el pequeño tamaño de la muestra y el bajo número de transmisiones del alelo A impiden el cálculo del valor de OR y la asociación a uno de los alelos de este marcador (tabla 2).

### Pacientes con epilepsia mioclónica juvenil (JME)

La edad promedio de diagnóstico fue 13,8 años (desviación estándar = 5,0). Los hijos afectados tuvieron una proporción 1:1 hombre:mujer.

Se encontró equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los marcadores analizados, en ambos grupos de familias (tanto las que provienen de Antioquia como aquellas que provienen de Bogotá). El mayor LD se encontró en los SNP rs6894357 y rs4428455, con un valor de  $D'=0,621$  (datos no mostrados).

En la prueba de homogeneidad individual (por marcador), se observó que existen diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas en los padres ( $P=0,001$ ) y en los hijos ( $P=0,006$ ), y en las frecuencias genotípicas en los padres ( $P=0,0000$ ) y en los hijos ( $P=0,0007$ ) del marcador rs1135176 en las poblaciones evaluadas (Antioquia-Bogotá). No se observaron otras diferencias significativas (datos no mostrados).

En el análisis de homogeneidad global (teniendo en cuenta todos los marcadores) en los hijos no se observan diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas ( $P=0,2164$ ); tampoco en la distribución de las frecuencias genotípicas ( $P=0,1266$ ) entre las dos poblaciones evaluadas (datos no mostrados).

**Tabla 2. Resultados positivos del análisis de asociación estratificado de EGG con marcadores en los genes GABRA1 y EFHC1**

Tipo epilepsia	Criterio de estratificación	Marcador	Alelo	Trans	No-trans	Chi <sup>2</sup>	Valor-p	Odds-R	IC 95% inf	IC 95% sup
CAE/JAE	genero masculino	rs4428455	G	38	26	9	9.5x10 <sup>-4</sup>	1	1 1	
			A	2	14			0,14	0,08	0,65
	CAE (inicio <10)	rs4428455	A	3	11	7,361	0,0066	1	1 1	
			G	61	53			9	1,14	71,04
GGE	Picnolépticos	rs4428455	G	49	40	12,477	0,0004	1	1 1	
			A	1	10			0	0 0	
			genero masculino	rs4428455	A			6	20	10,8175
	G	54	40		5,667	1,661	19,34			
	rs719395	A	51		36	10,6311	0,0011	1	1 1	
		G	9	24	0,2105			0,07162	0,6188	

Trans: Transmisiones; No-trans: No transmisiones; IC: intervalo de confianza; inf: inferior; sup: superior

No se encontraron valores de P significativos al evaluar los índices de fijación FIS (subdivisión intrapoblacional) y FIT (endogamia total), en ninguno de los marcadores evaluados individualmente, considerando la muestra de los padres y de los hijos. Al evaluar el índice de fijación FST (subdivisión interpoblacional), se encontraron valores de P significativos en el SNP *rs111335176* en los padres ( $P=0,0000$ ) y en los hijos ( $P=0,001$ ). Esto indica que hay diferenciación entre las dos poblaciones evaluadas solo en este *locus*. En la prueba global de diferenciación poblacional en los padres se observó un valor de  $FST=0,0198$  en los padres y de  $FST=0,0205$  en los hijos. Según estos resultados, la diferenciación entre las dos poblaciones es apenas de 2% (34).

Con base en los resultados del análisis de diferenciación poblacional, se determinó que no existen diferencias entre las poblaciones evaluadas (Antioquia y Bogotá) en nueve de los marcadores analizados, por lo cual estas pueden considerarse como una sola población. Debido a las diferencias halladas entre las dos poblaciones en el *locus rs111335176*, este no se tuvo en cuenta en los posteriores análisis de asociación que consideraron el grupo de las familias de origen antioqueño y el bogotano como una sola población.

La tabla 1 muestra los resultados de los análisis de asociación en el conjunto de familias con JME. Se observó asociación del alelo G del SNP *rs719395* ( $OR=0,45$ ,  $IC95\% 0,22-0,96$ ,  $P=0,03$ ).

No se encontró asociación genética entre el sexo del individuo afectado con JME, ni considerando su edad de inicio, ni su frecuencia de las crisis.

### Pacientes con epilepsia genética generalizada (EGG = CAE/JAE + JME).

Esta muestra se encuentra conformada por el total de las familias evaluadas en la investigación. A este grupo se le denominó familias con EGG (epilepsia genética generalizada). Se trata de los 98 pacientes y sus familiares reunidos para el estudio, grupo cuyo número asciende a 294 individuos (entre afectados y otros familiares). Según los criterios asumidos para múltiples comparaciones, dos SNP no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Uno de estos fue el *rs2228291* y el segundo fue el *rs719395*. Este último se encontraba en desequilibrio solo en los casos.

El análisis de TDT en la muestra global mostró una fuerte asociación de EGG con los marcadores *rs4428455* ( $P=0,0008$ ) y *rs719395* ( $P=0,002$ , tabla 1). En ambos casos, G es el alelo asociado, con un  $OR=3,2$ ,  $IC95\% (1,5-6,8)$  y  $OR=0,44$ ,  $IC95\% (0,26-0,76)$ , respectivamente. En el primer caso, este alelo se comportaría como de riesgo, mientras que en el segundo caso actuaría como alelo de protección en el desarrollo del fenotipo EGG.

En el análisis de interacción se encontró que el marcador *rs4428455* interactúa con el *rs719395* ( $P=0,005$ ). Estos resultados sugieren que los individuos que portan el alelo A en *rs4428455*, y adicionalmente el alelo G en *rs719395*, presentan un riesgo superior para el desarrollo de EGG, con relación a aquellos individuos que no portan dichos alelos en estos marcadores,  $OR=2,95$ ,  $IC95\% (1,3-6,6)$  (datos no mostrados).

En el análisis de TDT estratificado teniendo en cuenta las familias en las cuales el paciente es de sexo masculino,

se encontró asociación para los marcadores *rs4428455* ( $P=0,001$ ,  $OR=5,7$ ,  $IC95\% 1,7-19,3$ ) y el marcador *rs719395* ( $P=0,001$ ,  $OR=0,2$ ,  $IC95\% 0,07-0,62$ ) (tabla 1).

En cuanto a la edad de inicio, no se encontró asociación para inicio temprano o tardío, considerando la muestra combinada para integrar EGG. Con respecto a la frecuencia de las crisis, este análisis no se realizó dado que la variable “número de crisis fue diferente en cada uno de los grupos y su medida no es equivalente.

## DISCUSIÓN

El objetivo inicial de la investigación fue analizar 100 tríos familiares con EGG, distribuidos en 50 tríos familiares con epilepsia de ausencias (CAE/JAE) y 50 tríos familiares con epilepsia mioclónica juvenil (JME), todos con origen *paisa*. Debido a los estrictos criterios de inclusión (diagnóstico apropiado de CAE/JAE, examen neurológico y desarrollo normal, disponibilidad de ambos padres del paciente y procedencia paisa), solo fue posible completar 41 tríos y 10 dúos para las epilepsias de ausencias. En cuanto a las muestras de las familias con JME, el objetivo también consistió en la colección de 50 tríos completos; sin embargo, por los motivos antes mencionados, relacionados con los criterios de inclusión, solo fue posible coleccionar una muestra de 42 tríos y 5 dúos (16 de estos proceden de Bogotá-LICCE). En estas familias se evaluaron 10 SNP, dos por gen/*locus* candidato.

### Familias con epilepsia de ausencias (CAE/JAE)

Según los análisis de calidad de los datos, solo hubo un marcador con dudosa calidad de sus genotipos. Este fue *rs2228291* y por esto no se reportan más análisis para este.

En el análisis de asociación alélica, teniendo en cuenta todas las familias con CAE/JAE, se encontró una fuerte asociación del fenotipo (epilepsia de ausencias) con el marcador *rs4428455* ( $P=0,0008$ ). El valor de  $OR=7,5$ ,  $IC95\% (1,7-32,8)$  indica que los individuos que portan el alelo G tienen 7,5 veces más riesgo de desarrollar CAE/JAE con respecto a los individuos que no portan este alelo.

Este marcador se encuentra ubicado en la región cromosómica 5q34, en un *locus* denominado *ECA4* o *JME5*, donde se localiza el gen *GABRA1*, el cual codifica para la subunidad  $\alpha 1$  del receptor GABAA. Este *locus* fue identificado mediante análisis de ligamiento en una familia canadiense con epilepsia mioclónica juvenil autosómica dominante (ADJME) (16), y también ha sido asociado con epilepsia de ausencias infantil (CAE) en casos esporádicos (35). Estudios funcionales indican que mutaciones en esta subunidad alteran la actividad del canal, por diversos mecanismos que van desde una disminución en la amplitud de la corriente

del receptor hasta la pérdida total de la función del canal (16,35). Estos mecanismos incluyen expresión disminuida en la superficie celular de los canales que involucran alguna subunidad mutada (36), lo que ha llevado a la noción de que algunas mutaciones en estas subunidades (del receptor GABAA) podrían causar los síntomas por medio de haploinsuficiencia o dominancia negativa —revisado en (37)—

Los intervalos de confianza son bastante amplios, lo cual puede deberse al pequeño tamaño de la muestra. Este comportamiento se observa también en los posteriores análisis de estratificación por sexo, edad de inicio y frecuencia de las crisis, siendo el número de individuos aún más reducido. Esto podría ajustarse aumentando el tamaño de la muestra. Para tal fin, podría incluirse pacientes de otras regiones del país, pues los criterios de inclusión agotaron los pacientes que podríamos tomar actualmente en Medellín.

Si se considera la estratificación por edad de inicio de las crisis, en los pacientes clasificados con CAE se mantuvo la asociación con el marcador *rs4428455*. Esto puede relacionarse quizás con un factor de severidad (edad de inicio más temprano) o con el sesgo referido a que la mayoría de la muestra CAE/JAE se compone principalmente de niños CAE.

### Familias con epilepsia mioclónica juvenil (JME)

Los resultados obtenidos a partir de la estimación de los índices de fijación indican que las diferencias a nivel interpoblacional se observan principalmente en el marcador *rs11135176*. La prueba global en la muestra total mostró un valor de  $FST=0,0261$ . Valores similares se encontraron al evaluar la muestra conformada por solo los padres ( $FST=0,0198$ ) y solo los hijos ( $FST=0,0205$ ). El índice de fijación Wright ( $FST$ ) cuantifica la disminución en la heterocigocidad que se manifiesta en una población subdividida. Este índice tiene un rango de 0 a 1, donde 0 indica ausencia de estructura y 1 sugiere un alto grado de diferenciación entre subgrupos. Valores entre 0 y 0,05 indican poca diferenciación (34,38). Según los resultados obtenidos, la diferenciación entre las dos poblaciones, de origen antioqueño y de origen bogotano, es pequeña (0-0,05), por lo cual pueden considerarse una sola población.

La estratificación poblacional y la mezcla pueden generar resultados espurios en estudios de asociación genética, específicamente en estudios de casos y controles, por lo cual es importante que este fenómeno sea controlado o corregido de alguna manera. Una aproximación aceptable de controlar la subdivisión poblacional y la mezcla es a través de un diseño apropiado basado en familias. La prueba TDT (test de desequilibrio en la transmisión) controla la estratificación, ya que evalúa simultáneamente ligamiento y asociación (39).

El análisis de TDT en la muestra conformada por todos

los pacientes con JME (Antioquia y Bogotá) encontró un valor P que sugiere asociación ( $P=0,03$ ) del fenotipo (epilepsia mioclónica juvenil) con el marcador *rs719395*. Sin embargo, en este caso el valor P no supera el umbral de la corrección por múltiples comparaciones ( $p < 0,005$ ). El valor de OR = 0,45, IC95% (0,22-0,96) indica que el alelo G otorgaría protección contra el desarrollo del fenotipo JME.

Diversas hipótesis se han planteado respecto al papel que desempeña este gen en la susceptibilidad para desarrollar epilepsia. Entre ellas, la más plausible podría ser aquella que involucra un efecto proapoptótico mediante la interacción con canales de calcio dependientes de voltaje. Diversos análisis funcionales plantean que las mutaciones identificadas en este gen podrían prevenir la eliminación de neuronas con una precaria homeostasis de calcio durante el desarrollo del sistema nervioso central, generando circuitos hiperexcitables susceptibles al desarrollo de crisis epilépticas (17).

Este gen es de gran importancia debido a que un número considerable de mutaciones que se han encontrado asociadas a JME fueron identificadas en familias de origen hispano (México, Honduras, Belice y Los Ángeles). En este gen se han identificado todo tipo de mutaciones en casi todos los exones que lo conforman, con respuestas funcionales altamente variables (17,18,40). Las mutaciones más frecuentes en la población hispana son F229L, D210N, D253Y, P77T y A221H.

Sin embargo, la búsqueda de variantes polimórficas implicadas en la susceptibilidad a JME en *EFHC1* no siempre ha sido exitosa. Recientemente, después de analizar una gran cohorte de familias de origen hispano en la que se hizo una búsqueda activa de variantes genéticas, este gen no resultó asociado (41). Similares resultados se encontraron al evaluar una cohorte de origen holandés (42). Se hace necesaria la búsqueda de nuevas mutaciones tanto en la región codificante del gen, así como en las regiones no codificantes, implicadas en el proceso de empalme de *EFHC1* (splicing).

Los marcadores *rs6894367* y *rs4428455* se encuentran localizados en el gen *GABRA1*, el cual ha sido implicado en la susceptibilidad para desarrollar JME y CAE (16,35). El marcador *rs6894357* se localiza a una distancia de 22 Kb de *rs2279020*, el cual ha sido asociado con resistencia a múltiples medicamentos antiepilépticos (43). Y *rs4428455* se ha relacionado con epilepsia de ausencias infantil en el presente trabajo.

El análisis estratificado se realizó teniendo en cuenta la muestra completa, conformada por las familias de origen antioqueño y las de origen bogotano. En estos análisis no se encontró la asociación previamente identificada en la muestra completa. Es posible que la estratificación en este grupo de familias no haya sido exitosa en la búsqueda de asociación debido al pequeño tamaño de la muestra, así

como se observó en el subgrupo de los pacientes con epilepsia de ausencias.

### Familias con epilepsia genética generalizada (EGG = CAE/JAE + JME)

Se unificó la muestra de las familias con EGG. Así, se analizó un total de 98 tríos conformados por 51 familias con CAE/JAE y 47 familias con JME.

Hubo dos excepciones al supuesto de equilibrio Hardy-Weinberg. La primera fue para el marcador *rs2228291* ( $P=0,004$ ) en los padres. Por esta razón, no pudo considerarse posteriormente este marcador para los análisis de asociación. La segunda excepción fue para el *locus* marcador *rs719395* ( $P=0,004$ ) en los niños afectados. Esta observación no invalida la posterior inclusión de este marcador en las pruebas de asociación, pues la desviación del EH-W en los casos puede ser un indicativo de la asociación misma. Además, este marcador sí estaba en equilibrio en los padres, quienes se asimilan a población general.

Los análisis de asociación mostraron una fuerte participación de los marcadores *rs4428455* [ $P=0,0008$ , OR = 3,2, IC95% (1,5-6,8)] y *rs719395* [ $P=0,002$ , OR = 0,44, IC95% (0,26-0,76)]. En ambos casos, el alelo G fue el asociado. En el primer caso este alelo se comportaría como de riesgo y en el segundo caso actuaría como alelo de protección en el desarrollo del fenotipo EGG.

El marcador *rs4428455* ya había sido identificado como asociado, en la muestra de los pacientes con CAE/JAE analizados en este estudio para el alelo G. Este marcador se localiza en el gen *GABRA1*, el cual ha sido asociado con epilepsia mioclónica juvenil autosómica dominante (ADJME) (16) y con epilepsia de ausencias infantil (CAE) en casos esporádicos (35). Estos dos reportes previos pueden sustentar nuestra observación consistente de la asociación de este SNP en *GABRA1*, pero a la vez respaldan la teoría del continuum o de la heterogeneidad clínica de una misma variante genética.

El otro marcador asociado en este estudio, *rs719395*, se encuentra ubicado en el gen *EFHC1*, el cual codifica la proteína "mioclonina". Variantes en este gen se han relacionado con epilepsia mioclónica juvenil en familias de origen caucásico e hispanas (17). Este marcador (alelo G) también resultó asociado en el presente estudio en las familias con solo epilepsia mioclónica juvenil [ $P=0,03$ , OR = 0,45, IC95% (0,22-0,96), datos no mostrados].

Debe aclararse que las variantes genéticas analizadas en este estudio corresponden a la categoría de polimorfismos y no a mutaciones. Sin embargo, estas variantes se localizan en genes previamente implicados con alguno de los síndromes de EGG. Su asociación estadística puede corresponder a

uno de dos fenómenos. El primero es que corresponda a la variante funcional misma en tal gen. El segundo fenómeno posible es que la variante estudiada se encuentre físicamente cercana a otra que responde por el papel funcional. Así, la asociación identificada se debe al desequilibrio de ligamiento (LD) entre estas dos posiciones en el mismo gen.

En el análisis estratificado teniendo en cuenta el sexo, se identificó un papel causal de los dos marcadores asociados en los análisis previos (rs4428455 y rs719395), en las familias con pacientes de sexo masculino. Esta observación es llamativa, pues la relación de casos según el sexo es bastante cercana al 1:1. Es decir, este resultado no es un reflejo del muestreo preferencial por casos de un sexo en particular.

Estos marcadores se encuentran ubicados en los loci *ECA4/JME5* y *JME1*, donde se localizan los genes *GABRA1* y *EFHC1*, respectivamente (16,44). En estos genes se ha reportado un gran número de mutaciones asociadas tanto a epilepsia de ausencias como a epilepsia mioclónica juvenil, principalmente en familias multigeneracionales (16-18,35,40,45,46). Sin embargo, la influencia de SNP funcionales en formas esporádicas de estos síndromes no ha sido claramente establecida (47-50).

En conclusión, nuestros hallazgos implican la participación de al menos dos de cinco genes/*loci* analizados. En la actualidad, estamos analizando con mayor detalle, en una muestra de familias extendidas, si las variantes analizadas acá responden directamente por el riesgo o si están en desequilibrio con otras que sí contribuyen al papel funcional para desarrollar EGG. Así, podremos determinar con mayor precisión las variantes que deberían evaluarse directamente con el propósito de establecer si el espectro clínico de las EGG realmente comparte alelos de susceptibilidad y en qué grado.

### Agradecimientos

Este trabajo recibió apoyo económico de la Fundación Banco de la República (proyecto 2435). También agradecemos a la Universidad de Antioquia por su respaldo económico.

### Conflictos de intereses

Los autores manifiestan no tener conflictos de intereses en este estudio.

## REFERENCIAS

1. Annegers JF, Rocca WA, Hauser WA. Causes of epilepsy: contributions of the Rochester epidemiology project. *Mayo Clin Proc*. 1996;71(6):570-5.
2. Hempelmann A, Taylor KP, Heils A, Lorenz S, Prud'homme JF, Nabbout R, et al. Exploration of the genetic architecture of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia*. 2006;47(10):1682-90.
3. Weber YG, Lerche H. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Dev Med Child Neurol*. 2008;50(9):648-54.
4. Hirose S, Okada M, Kaneko S, Mitsudome A. Are some idiopathic epilepsies disorders of ion channels? A working hypothesis. *Epilepsy Res*. 2000;41(3):191-204.
5. Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, et al. Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):859-65.
6. Winawer MR. Epilepsy genetics. *Neurologist*. 2002;8(3):133-51.
7. Fong GC, Shah PU, Gee MN, Serratosa JM, Castroviejo IP, Khan S, et al. Childhood absence epilepsy with tonic-clonic seizures and electroencephalogram 3-4-Hz spike and multi-spike-slow wave complexes: linkage to chromosome 8q24. *Am J Hum Genet*. 1998;63(4):1117-29.
8. Sugimoto Y, Morita R, Amano K, Fong CY, Shah PU, Castroviejo IP, et al. Childhood absence epilepsy in 8q24: refinement of candidate region and construction of physical map. *Genomics*. 2000;68(3):264-72.
9. Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, et al. Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet*. 2001;28(1):49-52.
10. Kananura C, Haug K, Sander T, Runge U, Gu W, Hallmann K, et al. A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch Neurol*. 2002;59(7):1137-41.
11. Sander T, Schulz H, Saar K, Gennaro E, Riggio MC, Bianchi A, et al. Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Genet*. 2000;9(10):1465-72.
12. Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramirez A, Poser B, et al. Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet*. 2003;33(4):527-32.
13. D'Agostino D, Bertelli M, Gallo S, Cecchin S, Albiero E, Garofalo PG, et al. Mutations and polymorphisms of the CLCN2 gene in idiopathic epilepsy. *Neurology*. 2004;63(8):1500-2.
14. Stogmann E, Lichtner P, Baumgartner C, Schmied M, Hotzy C, Asmus F, et al. Mutations in the CLCN2 gene are a rare cause of idiopathic generalized epilepsy syndromes. *Neurogenetics*. 2006;7(4):265-8.
15. Saint-Martin C, Gauvain G, Teodorescu G, Gourfinkel-An I, Fedirko E, Weber YG, et al. Two novel CLCN2 mutations accelerating chloride channel deactivation are associated with idiopathic generalized epilepsy. *Hum Mutat*. 2009;30(3):397-405.
16. Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, et al. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form



- of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2002;31(2):184-9.
17. Liu AW, Delgado-Escueta AV, Serratosa JM, Alonso ME, Medina MT, Gee MN, et al. Juvenile myoclonic epilepsy locus in chromosome 6p21.2-p11: linkage to convulsions and electroencephalography trait. *Am J Hum Genet.* 1995;57(2):368-81.
  18. Liu AW, Delgado-Escueta AV, Gee MN, Serratosa JM, Zhang QW, Alonso ME, et al. Juvenile myoclonic epilepsy in chromosome 6p12-p11: locus heterogeneity and recombinations. *Am J Med Genet.* 1996;63(3):438-46.
  19. Bai D, Alonso ME, Medina MT, Bailey JN, Morita R, Cordova S et al. Juvenile myoclonic epilepsy: linkage to chromosome 6p12 in Mexico families. *Am J Med Genet.* 2002;113(3):268-74.
  20. Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, Hara Y, et al. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2004;36(8):842-9.
  21. Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, et al. Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1329-34.
  22. Greenberg DA, Delgado-Escueta AV, Widelitz H, Sparkes RS, Treiman L, Maldonado HM, et al. Juvenile myoclonic epilepsy (JME) may be linked to the BF and HLA loci on human chromosome 6. *Am J Med Genet.* 1988;31(1):185-92.
  23. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics.* 2003;19(1):149-50.
  24. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426(6968):789-96.
  25. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.
  26. Collins A, Ke X. Primer1: Primer Design Web Service for Tetra-Primer ARMS-PCR. *Open Bioinform J.* 2012;6:55-8.
  27. Vincze T, Posfai J, Roberts J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3688-91.
  28. O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 1998;63(1):259-66.
  29. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):559-75.
  30. R Foundation for Statistical Computing. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.2.1. 2005, Viena, Austria.
  31. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21(2):263-5.
  32. Barrett JC. Haploview: Visualization and analysis of SNP genotype data. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009;2009(10):pdb ip71.
  33. Rousset F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 2008;8(1):103-6.
  34. Excoffier L, Lischer LE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10(3):564-7.
  35. Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol.* 2003;25(2):115-21.
  36. Dudbridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered.* 2008;66(2):87-98.
  37. Hart D. Principles of population genetics. Tercera edición. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 1997.
  38. Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS. Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus. *Am J Hum Genet.* 1998;63(5):1531-40.
  39. Wray NR, Visscher PM. Population genetics and its relevance to gene mapping. En: Neale BM, Ferreira MAR, Medland SE, Posthuma D, editores. *Statistical genetics: Gene mapping through linkage and association.* Abingdon, Reino Unido: Taylor and Francis; 2008.
  40. Rodríguez-Acevedo A, Morales O, Durango H, Pineda-Trujillo N. Análisis de isonimia en una muestra de padres de pacientes antioqueños con fibrosis quística. *Biomédica.* 2012;32(1).
  41. Bedoya G, García J, Montoya P, Rojas W, Amézquita ME, Soto I, et al. Análisis de isonimia entre poblaciones del noroeste de Colombia. *Biomédica.* 2006;26:538-45.
  42. Trikalinos TA, Salanti G, Khoury MJ, Ioannidis JP. Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am J Epidemiol.* 2006;163(4):300-9.
  43. Salanti G, Amountza G, Ntzani EE, Ioannidis JP. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(7):840-8.
  44. Maljevic S, Krampfl K, Cobilanschi J, Tilgen N, Beyer S, Weber YG, et al. A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann Neurol.* 2006;59(6):983-7.
  45. Evans DM. Factors affecting power and type one error in association. En: Neale BM, Ferreira MAR, Medland SE, Posthuma D, editores. *Statistical genetics: Gene mapping through linkage and association.* Abingdon, Reino Unido: Taylor and Francis; 2008.
  46. Stogmann E, Lichtner P, Baumgartner C, Bonelli S, Assem-Hilger E, Leutmezer F, et al. Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology.* 2006;67(11):2029-31.
  47. Bai D, Bailey JN, Durón RM, Alonso ME, Medina MT, Martínez-Juárez IE, et al. DNA variants in coding region of EFHC1: SNPs do not associate with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia.* 2009;50(5):1184-90.
  48. Medina MT, Suzuki T, Alonso ME, Durón RM, Martínez-Juárez IE, Bailey JN, et al. Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology.* 2008;27;70(22 Pt 2):2137-44.
  49. Hernandez CC, Klassen TL, Jackson LG, Gurba K, Hu N, Noebels JL, Macdonald RL. Deleterious Rare Variants Reveal Risk for Loss of GABAA Receptor Function in Patients with Genetic Epilepsy and in the General Population. *PLoS One.* 2016 Sep 13;11(9):e0162883. Erratum in: *PLoS One.* 2016 Nov 21;11(11):e0167264.
  50. Kodera H, Ohba C, Kato M, Maeda T, Araki K, Tajima D, et al. De novo GABRA1 mutations in Ohtahara and West syndromes. *Epilepsia.* 2016;57(4):566-73.