



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
COMITÉ DE TITULACIÓN



COORD. BIOL. 019/2012

C. EDUARDO IGNACIO DÍAZ BARBA
P R E S E N T E

Manifiestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de Tesis e Informes opción Tesis, con el título "Genotipificación de HLA-DRB1* en pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente y población general del Occidente de México", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo al Dr. Genaro Gabriel Ortiz y como asesor a la Dra. Mónica Elisa Ureña Guerrero

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, 02 de febrero de 2012.



DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M. C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Guadalajara, Jalisco. 08 de Noviembre del 2012

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis con el título: "GENOTIPIFICACIÓN DE *HLA-DRB1** EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE Y POBLACIÓN GENERAL DEL OCCIDENTE DE MÉXICO" que realizó el pasante Eduardo Ignacio Díaz Barba con número de código 399351551 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente



Dr. Genaro Gabriel Ortiz
Director



Dra. Mónica Ureña Guerrero
Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Anne Marguerite Helène Santerre		05/12/12
Dra Patricia Castro Felix		05/12/12
Galina Petrovna Zaitsev		05/12/12
Mónica Elisa Ureña Guerrero		08/11/12

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**



GENOTIPIFICACIÓN DE *HLA-DRB1 EN PACIENTES CON
ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE Y
POBLACIÓN GENERAL DEL OCCIDENTE DE MÉXICO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

EDUARDO IGNACIO DÍAZ BARBA

DIRECTOR

DR. GENARO GABRIEL ORTIZ

ASESORA INTERNA:

DRA. MÓNICA ELISA UREÑA GUERRERO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Enero del 2013

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Desarrollo del Envejecimiento y Enfermedades Neurodegenerativas. División de Neurociencias. Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS. Bajo la dirección del Dr. en C. Genaro Gabriel; con Co dirección del M. en C. José Alfonso Cruz Ramos y la Dra. en C. Gracia Viviana García Enríquez; y asesoría de la Dra. en C. Mónica Ureña Guerrero.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia

Por su apoyo durante el curso de mi carrera y mi proceso de titulación.

A los pacientes con esclerosis múltiple y donadores de órganos, por permitir obtener muestras de su sangre para obtener el DNA, necesario para realizar este estudio.

Al Dr. en C. Genaro Gabriel.

Por la confianza que puso en mí para realizar este trabajo, por proporcionar todo lo necesario para la elaboración del estudio y su disponibilidad en los trámites académicos.

Al M. en C. José Alfonso Cruz Ramos.

Por su apoyo y dirección, en los aspectos de genética formal.

A la Dra. en C. Gracia Viviana González Enríquez.

Por su dirección y enseñanza, en la parte experimental del trabajo.

A la Dra. en C. Mónica Ureña Guerrero.

Por su asesoría durante el registro y elaboración del manuscrito de mi tesis.

A las Dras. en Ciencias; Dra. Anne Marguerite Hélène Santerre, Dra. Luz Patricia Castro Feliz, Dra. Galina Petrovna Zaitseva.

Por sus comentarios que permitieron redondear la calidad del trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

aAc	Auto anticuerpo
APC	Célula presentadora de antígeno
BHE	Barrera hematocefálica
CD40L	CD40 ligando
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAE	Encéfalo mielitis experimental
EBV	Virus Epstein-Barr
EDSS	Escala ampliada del estado de discapacidad
EM	Esclerosis múltiple
EMB	Esclerosis múltiple benigna
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMPR	Esclerosis múltiple progresiva recurrente
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
EV	Endotelio vascular
GM-CSF	Factor estimulador de crecimiento colonial de granulocitos
HHV-6	Herpes-virus 6 humano
HLA	Antígeno leucocitario humano
HSV-1	Herpes-virus simple
H-W	Hardy-Weinberg
IA	Influencia ambiental
IC	Intervalo de confianza
IL	Interleuquina
INF- γ	Interferón gamma
IRM	Imágenes de resonancia magnética
LB	Linfocito B
LCR	Líquido cefalorraquídea
LT	Linfocito T

MBP	Proteína básica de mielina
MHC	Complejo Mayor de histocompatibilidad
MOG	Glucoproteína mieloide de oligodendrocitos
NO	Oxido nítrico
OM	Occidente de México
OR	<i>Odds ration</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLP	Proteína de proteolípido
PS	Población sana
RC	Región codificante
RNC	Región no codificante
SNC	Sistema nervioso central
SPP1	Fosforoproteína secretada 1
SSO	Oligonucleótido de secuencia específica
TCR	Receptor de linfocito T
TGF- β 1	Factor transformador del crecimiento β 1
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular-A

RESUMEN

La esclerosis múltiple es una enfermedad neurológica que presenta una etapa inflamatoria y otra degenerativa de origen multifactorial. Que produce desmielinización y daño neuronal mediado por los elementos celulares y séricos del sistema inmune (linfocitos, macrófagos, autoanticuerpos y complemento). A nivel mundial la esclerosis múltiple es la primera causa de discapacidad neurológica no traumática, en adultos jóvenes y afecta a las mujeres en una proporción 2:1 con respecto a los varones. En México la prevalencia de la esclerosis múltiple es baja (9 en 100,000 habitantes) en comparación con poblaciones de origen caucásico (100 en 100,000 habitantes). Sin embargo, desde finales del siglo pasado la esclerosis múltiple se ha vuelto una de las causas más frecuentes de consulta neurológica en nuestro país. Entre los factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad, la predisposición genética que se asocia con los genes del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, en particular el *HLA-DRB1**, destaca sobre los demás regiones génicas asociadas con la enfermedad.

En este estudio se determinó la distribución de las frecuencias de las familias alélicas (alelotipo) y genotipos (ambos alelotipos) del *HLA-DRB1** en 59 pacientes con esclerosis múltiple y en 189 personas sanas con orígenes en el Occidente de México. Se encontró una asociación de los alelotipos *HLA-DRB1*15* ($P = 0.04$; OR de 2.15; IC de 1.03-4.45) y *HLA-DRB1*09* ($P = 0.03$; $OR = 6.6$; $IC = 1.03-52.51$) con el riesgo a padecer la esclerosis múltiple. Además, en el análisis de genotipos se encontró asociación de los diplotipos *HLA-DRB1*15/*04* ($P = 0.0046$; $OR = 6.23$; $IC = 1.56-26.49$) y *HLA-DRB1*04/*14* ($P = 0.02$; $OR = 5.74$; $IC = 1.15-31.47$) con el riesgo a padecer dicha enfermedad. Los resultados confirman la asociación de *HLA-DRB1*15* con el riesgo a padecer la esclerosis múltiple en nuestra población, tal y como se ha reportado en otras poblaciones del mundo. Sin embargo, en nuestra población se encontró además, que el *HLA-DRB1*09* también confiere riesgo a padecer esclerosis múltiple; y que el *HLA-DRB1*04* en conjunto con *HLA-DRB1*15* o *HLA-DRB1*14* tienen un efecto sinérgico que aumenta el riesgo a padecer esclerosis múltiple.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Tipos de EM	2
2.2 Diagnóstico de la EM	3
2.3 Patogénesis de la EM	4
2.4 El proceso autoinmune en la EM	5
2.4.1 El inicio de la inflamación en la EM	6
2.4.2 Proceso crónico inflamatorio y daño neuronal	8
2.4.3 La respuesta adaptativa en la EM	12
2.5 Ambiente, genes y EM	13
2.6 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad	14
2.7 El gen <i>HLA-DRB1</i> * y su nomenclatura	16
2.8 La EM y alelos <i>HLA-DRB1</i> *	18
2.9 Epistasis en EM	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general	24
6.2 Objetivos particulares	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1 Tipo de estudio	25
7.2 Universo de estudio	25
7.3 Tamaño de muestra	26

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. <i>Mapa de Prevalencia de EM.</i>	2
Cuadro 1. <i>Tipos de EM y sus características.</i>	3
Cuadro 2. <i>Esquema de los diferentes estadios, valores y características valoradas en la Escala Amplia del Estado de Discapacidad (EDSS).</i>	4
Figura 2. <i>Esquema del establecimiento del proceso inflamatorio en el SNC que se asocia a la EM.</i>	7
Figura 3. <i>Interacción molecular entre el LT y la microglía activada durante la presentación del antígeno(s) procesado(s).</i>	8
Figura 4. <i>El EV en un medio inflamatorio produce SPP1.</i>	8
Figura 5. <i>La partición sinérgica de distintos linajes celulares durante el proceso crónico-inflamatorio de la EM.</i>	10
Cuadro 3. <i>Moléculas secretadas durante el proceso crónico-inflamatorio de la EM.</i>	11
Figura 6. <i>Esquema del locus 6p21.3 y las glucoproteínas codificadas por el MHC clase I y clase.</i>	15
Figura 7. <i>Esquema del HLA clase II.</i>	15
Figura 8. <i>Ejemplo del sistema de nomenclatura de los alelos del HLA.</i>	16
Cuadro 4. <i>Alelos HLA-DRB1* y alotipos (DR) correspondientes.</i>	17
Cuadro 5. <i>Alelos HLA-DRB1* y su relación con la enfermedad.</i>	19
Cuadro 6. <i>Epistasis entre los alotipos HLA-DRB1* y EM.</i>	20
Figura 9. <i>Imagen de dos soportes con SSO después de pasar por el proceso de hibridación.</i>	28
Figura 10. <i>Frecuencia de los alotipos HLA-DRB1* en pacientes y población sana.</i>	29
Cuadro 7. <i>Tipificación del HLA-DRB1* en pacientes y población sana.</i>	30
Cuadro 8. <i>Genotipos del HLA-DRB1* en pacientes y población sana.</i>	31
Cuadro 9. <i>Equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus HLA-DRB1*.</i>	33
Cuadro 10. <i>Análisis por subgrupos de los genotipos HLA-DRB1*.</i>	34

1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es definida como una enfermedad autoinmune crónico-inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), que se presenta en adultos jóvenes, genéticamente susceptibles y en la mayoría de los casos, causa discapacidad neurológica. Esta enfermedad es bifásica con una etapa inflamatoria y otra degenerativa, que puede presentarse en ausencia de un periodo de remisión u otro proceso inflamatorio (Ludwin, 2006; Porras-Betancourt *et al.*, 2007). En la mayoría de los casos esta enfermedad se manifiesta alrededor de la segunda o tercera década de la vida; afecta a la mujer en una relación de 2:1 con respecto al hombre independientemente de su incidencia en la población, la cual aumenta en poblaciones más cercanas a los polos geográficos (Noteworthy *et al.*, 2000; Fugger *et al.*, 2009). Los primeros reportes sobre los daños ocasionados al SNC, síntomas y características de la EM fueron realizados a finales del siglo XIX (Porras-Betancourt *et al.*, 2007).

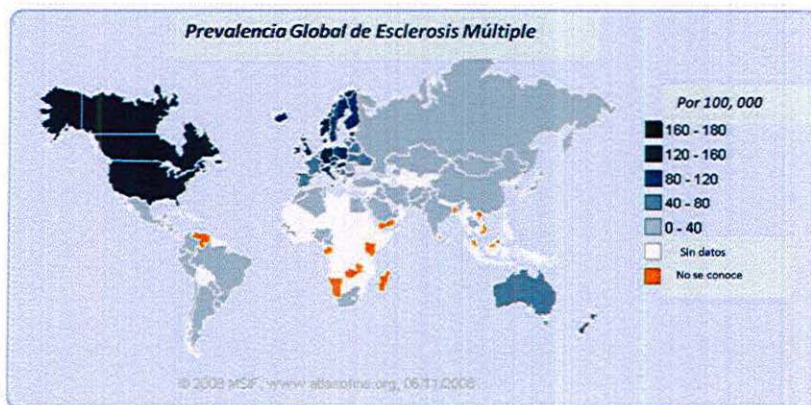
Entre los síntomas más frecuentes de la enfermedad se encuentran: la neuritis óptica unilateral, la mielopatía no traumática, la ataxia, la oftalmoplejía internuclear, la neuralgia trigémina, el vértigo, el signo de Lhermitte, la flacidez de miembros, disfunciones en general, reducción del campo visual. Además, pueden presentarse otros signos y padecimientos que reflejan el daño en las distintas regiones cerebrales tales como: motoras, sensitivas, cerebello, nervios craneales y sistema autónomo. Después de 15 años del inicio de la enfermedad, el 80% de los pacientes con EM tienen limitaciones cognoscitivas y del 50-60% necesitan ayuda para caminar. Mientras, las afectaciones psicológicas y cognoscitivas leves se observan desde el inicio de la enfermedad (Noteworthy *et al.*, 2000; Porras-Betancourt *et al.*, 2007; Rinker y Cross, 2007; Oksenberg *et al.*, 2008).

En el presente estudio se determinaron las frecuencias de los alelotipos y diplotipos *HLA-DRB1*^{*}, en 69 pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente y 189 personas sana, atendidas en el Centro Médico Nacional de Occidente (CMNO-IMSS).

2. ANTECEDENTES

Aproximadamente 2.5 de millones de personas en el mundo son afectadas por la EM y en Latinoamérica se estima la existencia de alrededor de 50,000 casos. México tiene aproximadamente 6,800 personas con EM. En Canadá, EUA y Norte de Europa, la EM tienen una prevalencia de 100 a 180 casos por cada 100,000 habitantes. En el resto de Europa y Australia se estima una prevalencia de 40 a 100 casos por cada 100,000 habitantes. En Latinoamérica, Asia y parte de África se estima una prevalencia menor de 40 casos por cada 100,000 habitantes (Figura 1; www.atlasofms.org, 2008; Luetic, 2008; Fugger *et al.*, 2009). En el caso de México, la prevalencia de la esclerosis múltiple ha ido en ascenso desde 1.6/100,000 habitantes reportada en 1970 (Alter y Olivares, 1970), a 12/100,000 habitantes reportada en el 2002 (Velázquez *et al.*, 2002).

Figura 1. Mapa de Prevalencia de EM



Tomado de www.atlasofms.org

2.1 Tipos de EM

La EM presenta básicamente dos vías de desarrollo: una caracterizada por episodios de remisión y recurrencia de la enfermedad (tipo remitente-recurrente) y otra caracterizada por la progresión gradual del curso clínico de la enfermedad (Noteworthy *et al.*, 2000;

Murray, 2006). Con base en estas vías de desarrollo se han determinado cinco tipos de EM, descritas generalmente en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tipos de EM y sus características

TIPO DE EM	CARACTERÍSTICAS
EM Remitente- Recurrente (EMRR)	Presente en aproximadamente el 85% de los pacientes. Se caracteriza por presentar periodos de remisión y recurrencia parciales o totales continuos entre sí.
EM Primariamente Progresiva (EMPP)	Presente en aproximadamente el 15% de los pacientes. Se caracteriza por la ausencia de remisiones con un desarrollo lento y progresivo de la enfermedad.
EM Secundariamente Progresiva (EMSP)	Inicia como EMRR y posteriormente (meses o años) entra en una fase progresiva, con o sin acompañamiento de ataques.
EM Progresiva Recurrente (EMPR)	Presenta un periodo de remisión después de un largo periodo de progresión primaria.
EM Benigna (EMB)	Presente en 15 de cada 100 pacientes con EMRR. Se caracteriza por un desarrollo moderado de la EM, con mínima discapacidad motora después de 10-15 años de iniciar la enfermedad.

Elaborado con base en: Noteworthy *et al.*, 2000; Murray, 2006.

2.2 Diagnóstico de la EM

El diagnóstico de EM no es sencillo, debido a la gran cantidad de padecimientos con signos y síntomas en común como: infecciones virales o bacterianas, otros padecimientos autoinmunes, deficiencias nutricionales, anomalías estructurales y algunas condiciones genéticas. Por lo que es necesario apoyar el diagnóstico médico con pruebas como: perfil inmunológico, perfil reumatológico y búsqueda de agentes infecciosos (Ponras-Betancourt *et al.*, 2007; Rinker y Cross, 2007). La enfermedad se diagnostica por medio de los criterios de McDonald, que en el 2005, fueron reestructurados al incorporar el análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) e imágenes de resonancia magnética (IRM) medular. Esto ocasionó modificaciones en la valoración e interpretación de las lesiones observadas a través de IRM medular (particularmente en T2); al determinar la diseminación del daño en relación al tiempo y el espacio (Polman *et al.*, 2005). Esta reestructuración de los criterios de McDonald ha permitido una mejoría y una rápida identificación del tipo de EM presente en los pacientes; así como, confirmar o rechazar su diagnóstico (Rinker y Cross, 2007). Por otro lado, la valoración

primaria del diagnóstico y la progresión de la EM, se realiza por medio de la Escala Ampliada del Estado de Discapacidad (EDSS, por sus siglas en inglés), creada a mediados del siglo pasado por John Kurtzk, y actualizada hasta nuestros días. La escala integra los resultados de la exploración neurológica de los pacientes en sistemas neuroanatómicos independientes y excluyentes entre sí, que al ser sumados da como resultado un valor numérico de 0-10 (Cuadro 2), que permite catalogar a los pacientes en un gradiente de discapacidad progresiva (Cadavid *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Esquema de los diferentes estadios, valores y características valoradas en la Escala Amplia del Estado de Discapacidad (EDSS)

Escala Ampliada del Estado de Discapacidad (EDSS)																					
	Estadio 0	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4	Estadio 5	Estadio 6	Estadio 7	Estadio 8	Estadio 9	Estadio 10	Estadio 11	Estadio 12	Estadio 13	Estadio 14	Estadio 15	Estadio 16	Estadio 17	Estadio 18	Estadio 19	Estadio 20
Valores de EDSS	0-3						4-7						8-9			10					
Características valoradas	Cambios en la exploración neurológica independientes de la deambulación						Conicionados a la capacidad deambulatoria del paciente						Pacientes graves sin movilidad			MUERTE					

Nota: En color oscuro se marcan los estadios y valores correspondientes a las formas progresivas de la EM, mientras, en claro se identifican los estadios y valores recidivantes de la enfermedad (elaborado con base en: Cadavid *et al.*, 2010).

2.3 Patogénesis de la EM

Inicialmente, la EM se considero un desorden episódico caracterizado por el desarrollo discreto de focos de lesión o placas de desmielinización en la materia blanca del SNC con una preservación relativa de los axones. Actualmente, se sugiere una participación general de la materia blanca y la materia gris con diferentes grados de daño axonal, el cual se relaciona directamente con el aumento de discapacidad y la transición de la EMRR a las formas progresivas de la enfermedad. Por lo que, la desmielinización se considera el aspecto más importante y básico de la progresión eventual e irreversible de la enfermedad (Ludwin, 2006; Murray, 2006). El daño ocasionado por la EM en el SNC se distingue por la formación de placas o lesiones en la materia blanca que se prolongan hasta la materia gris. Estas lesiones se encuentran primordialmente en el cuerpo calloso,

en el *centrum* y en los hemisferios, así como en áreas del tallo cerebral, la medula espinal, los nervinos ópticos y el cerebelo. En las lesiones se puede observar desmielinización, gliosis (exceso de tejido fibroso formado por astrocitos), pérdida de oligodendrocitos en el centro y frecuentemente cicatrices con macrófagos y linfocitos. Además, en la mayoría de los cerebros de pacientes se ha identificado la presencia del complejo terminal del complemento: C5b-9 (Ludwin, 2006; Ingram *et al.*, 2008).

2.4 El proceso autoinmune en la EM

Los eventos exactos que suceden dentro del SNC cuando los linfocitos T (LT) activados entran a éste no son claros, pero se conoce que hay similitud en el proceso inflamatorio de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE, por sus siglas en inglés) y la EM. En ambas se ha observado que el ataque autoinmune contra los componentes de la mielina en el SNC es mediado por linfocitos CD4⁺: Th₁ y Th₁₇ (principalmente Th₁₇) (Ludwin, 2006; Goverman, 2009). Los linfocitos CD4⁺ son células capaces de crear un medio promotor de la inflamación a través de la de citoquinas y la coestimulación con células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), además, de inducir citotoxicidad y tener una gran capacidad proliferativa (Dittel, 2008). Para explicar el origen del proceso autoinmune en la EM se han propuesto al mimetismo molecular y a la proliferación de linfocitos autorreactivos como posibles mecanismos causales. En el primero, las secuencias peptídicas homólogas entre patógenos y los elementos proteicos de la mielina originan una reacción cruzada de los anticuerpos dirigidos a los epítopes de los patógenos (Sotgiu, *et al.*, 2004; Rose y Carlson, 2007). En el segundo, el axón es afectado por algún agente lesivo que ocasiona degeneración de la pared axonal o daña la unión axón-oligodendrocito. La zona lesionada es fagocitada, procesada y los productos presentados a los LT autorreactivos que desencadenan una respuesta autoinmune contra los elementos de la mielina, los axones y los oligodendrocitos (Peterson y Fujinami, 2007).

2.4.1 El inicio de la inflamación en la EM

Se han propuesto una serie de procesos desencadenados durante el ataque autoinmune y el proceso neurodegenerativo de la EM. Estos procesos se basan en lo observado en

modelos experimentales (*in vivo et in vitro*), estudios de LCR e inmunohistoquímicos de biopsias y necrópsias; y son descritos a continuación.

El ataque autoinmune contra los componentes de la mielina en el SNC inicia cuando los LT activados ($CD4^+$ y $CD8^+$) cruzan la barrera hematoencefálica (BHE) (Figura 2), a través de una discontinuidad de la misma. Después de establecerse el proceso inflamatorio, el paso de los demás elementos celulares del sistema inmune al SNC es facilitado por las células endoteliales del vaso sanguíneo (mecanismo de adhesión), destacando la infiltración de linfocitos $CD8^+$ (Ludwin, 2006; Peterson y Fujinami, 2007; Rose y Carlson, 2007; Frischer *et al.*, 2009; Goverman, 2009). Una vez dentro del SNC, los linfocitos $CD4^+$ activados secretan al factor estimulador de crecimiento colonial de granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) y al interferón- γ (INF- γ). El GM-CSF activa a la microglía, para establecer un contacto célula-célula con el linfocito $CD4^+$ y producir más factores solubles en ambas células; mientras que el INF- γ estimula la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) en el parénquima neuronal y dispara la producción de quimiocinas que atraen y activan a los macrófagos (Dittel, 2008; Goverman, 2009).

En la EM la microglía activada sobre expresa CD45, MHC clase II y B7.2 (CD86), moléculas que son esenciales para el reconocimiento del complejo MHC clase II/péptido por el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) del linfocito $CD4^+$ (Figura 3). El linfocito $CD4^+$ acopla su molécula CD28 con el B7.2 de la microglía, que su vez une su molécula CD40 con la molécula ligando para CD40 (CD40L) del linfocito $CD4^+$ (Dittel, 2008). Una vez formada esta interacción inicia una coestimulación entre el linfocito $CD4^+$ y la microglía por las citoquinas: factor de necrosis tumoral α (TNF- α), INF- γ e interleuquina 2 (IL-2) (Ludwin, 2006).

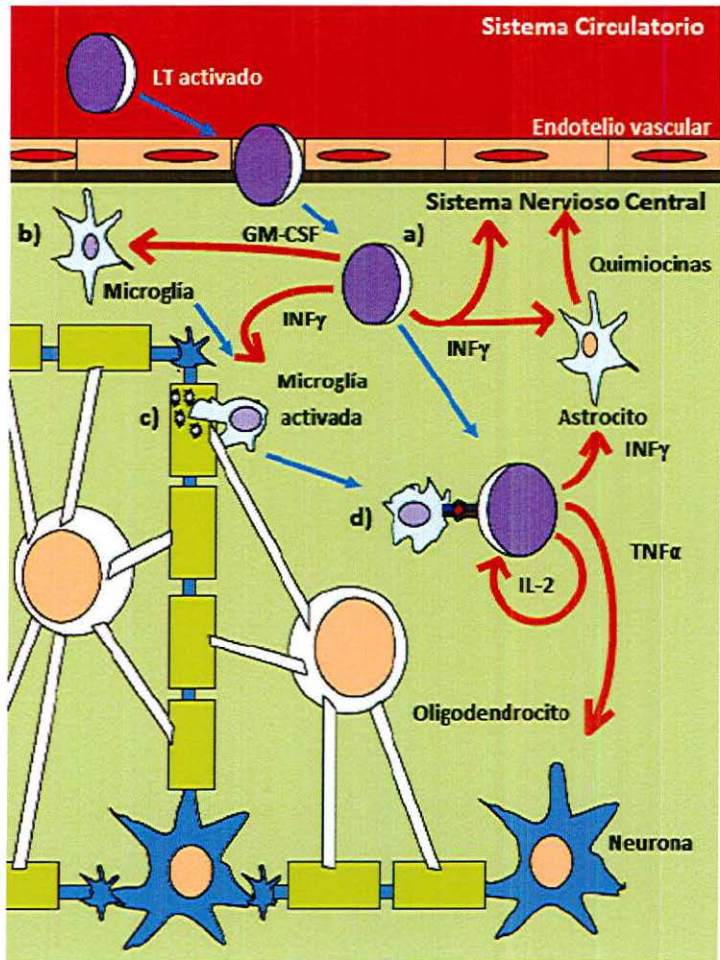


Figura 2. Esquema del establecimiento del proceso inflamatorio en el SNC que se asocia a la EM. a) El linfocito CD4⁺ entra al SNC y produce GM-CSF e INF- γ , que activan a la microglía, a los astrocitos y células del endotelio vascular. b) GM-CSF activa a la microglía, la cual cambia de forma hasta parecer un macrófago; c) La microglía activada localiza y fagocita un área axonal dañada, mientras INF- γ estimula la expresión del MHC clase II en ella. d) La microglía procesa y presenta el antígeno al linfocito CD4⁺, que reacciona ante él al generar el ambiente inflamatorio (TNF- α e INF- γ) y promover la proliferación de Linfocitos (IL-2) (elaborado con base en: Ludwin, 2006; Peterson y Fujinami, 2007; Dittel, 2008; Goverman, 2009).

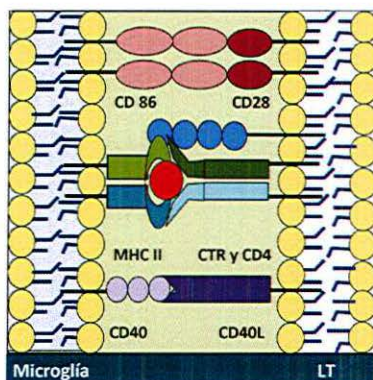


Figura 3. Interacción molecular entre el LT y la microglía activada, durante la presentación del antígeno(s) procesado(s). (elaborado con base en: Dittel, 2008; Goverman, 2009).

2.4.2 Proceso crónico-inflamatorio y daño neuronal

Al establecerse el proceso inflamatorio la BHE sufre una serie de alteraciones que la vuelven disfuncional y la conducen a mantener el proceso crónico-inflamatorio. Los factores que afectan a la BHE son: el $\text{INF-}\gamma$, la interleuquina 1β ($\text{IL-1}\beta$) y el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A, por sus siglas en inglés); el $\text{INF-}\gamma$ estimula la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular (EV); mientras que la $\text{IL-1}\beta$ y el VEGF-A incrementan la permeabilidad de la BHE (Rose y Carlson, 2007; Dittel, 2008). La inflamación induce en el EV, la expresión de osteopontina o fosfoproteína secretada I (SPP1, por sus siglas en inglés), que es liberada al área perivascular del vaso sanguíneo (Figura 4).

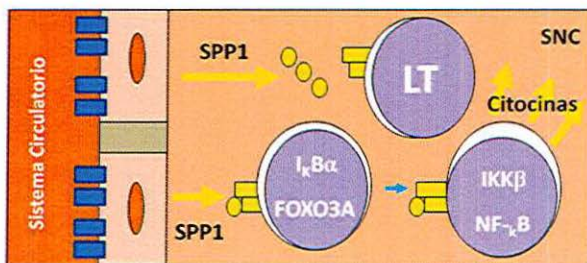


Figura 4. El EV en un medio inflamatorio produce SPP1. La SPP1 se une a la $\alpha_4\beta_1$ -integrinas del LT, promoviendo la degradación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (inhibidor de $\text{NF-}\kappa\text{B}$) e inactiva a FOXO3A; además, de promover la producción de $\text{IKK}\beta$, que intensifica la transcripción de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (elaborado con base en: basado en: Steinman, 2009).

La SPP1 se une a las $\alpha 4\beta 1$ -integrinas de los linfocitos CD4⁺ estimulando la expresión de citocinas proinflamatorias y la transcripción de NF- κ B (molécula de supervivencia celular) e inactivando a FOXO3A (molécula proapoptótica) (Steinman, 2009). Mientras que la producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, factor transformador del crecimiento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, por sus siglas en inglés), linfotoxina, C3a, óxido nítrico (NO), ácido glutámico y especies reactivas de oxígeno tiene un efecto sinérgico en el mantenimiento del proceso inflamatorio y el daño neuronal (Cuadro 3 y Figura 5).

La inflamación altera la homeostasis del ácido glutámico, que favorece la producción de óxido nítrico, inhibe la remielinización axonal y afecta el metabolismo energético (síntesis de ATP), al dañar la actividad del complejo enzimático en la cadena transportadora de electrones (Chang *et al.*, 2002; Dutta y Trapp, 2007). El daño oxidativo en oligodendrocitos, axones y neuronas en la EM puede desencadenar la apoptosis o la producción de epítopes que contribuyen al proceso autoinmune-neurodegenerativo de la enfermedad. Además, la acumulación de los fosfolípidos oxidados en axones puede ocasionar distrofia del transporte axonal en conjunto con la acumulación anormal del precursor de proteína amiloide (Haider *et al.*, 2011). Por otra parte, la sobre expresión de canales iónicos sensibles a voltaje Nav1.6 en la microglía y los macrófagos se relaciona con su actividad fagocitaria y en los axones dañados se coexpresa con los intercambiadores Na⁺/Ca⁺⁺, condición que produce un flujo continuo de sodio y la acumulación deletérea de Ca⁺⁺ en la neurona (Craner *et al.* 2004; Peterson y Fujinami, 2007). Mientras, en astrocitos la sobre expresión de los canales iónicos sensibles a voltaje Nav1.5 y GFAP tiene relación con la secreción de quimiocinas, citocinas y la formación de la cicatriz glial en el SNC (Black *et al.*, 2010)

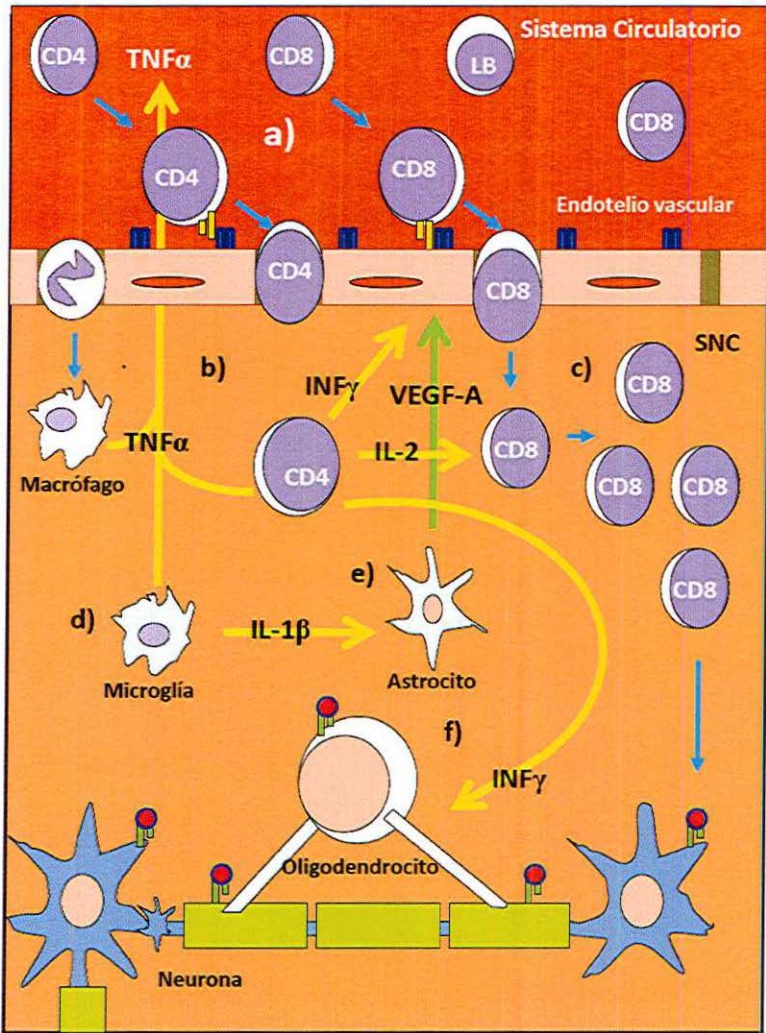


Figura 5. La participación sinérgica de distintos linajes celulares durante el proceso crónico-inflamatorio de la EM. a) La BHE pierde la capacidad de regular el paso de elementos celulares del sistema inmune en el sistema circulatorio hacia el SNC, por efecto de la secreción INF- γ , VEGF-A. b) La secreción de TNF- α por microglía y los LT induce la migración de CD4⁺ al SNC. c) La propagación monoclonal de linfocitos CD8⁺ es inducida por IL-2. d) La microglía induce la secreción de VEGF-A y secreta TNF- α . e) El astrocito activa la secreción de VEGF-A por el efecto de IL-1 β . f) La secreción de INF- γ al parénquima cerebral induce la expresión de MHC clase I en oligodendrocitos y neuronas (elaborado con base en: Pathak y Palan, 2005; Rose y Carlson, 2007; Dittel, 2008; Goverman, 2009).

Cuadro 3. Moléculas secretadas durante el proceso crónico-inflamatorio de la EM.

Molécula	Tipo	Origen	Efecto
TNF- α	Citocina	CD4 ⁺ Endotelio vascular Microglía Macrófago	Desencadena la migración de CD4 ⁺ del espacio perivascular al SNC e inducción de apoptosis en oligodendrocitos y neuronas (Dittel, 2008; Goverman, 2009).
IFN- γ	Citocina	CD4 ⁺	Estimula la expresión las moléculas de adhesión en el endotelio vascular, dispara la producción de quimiocinas para macrófagos y monocitos (Dittel, 2008; Goverman, 2009).
IL-1 β	Interleuquina	Microglía Macrófago	Incrementa la permeabilidad de la BHE e induce la producción de VEGF-A (Rose y Carlson, 2007).
IL-2	Interleuquina	CD4 ⁺	Estimula la proliferación de LT (Pathak y Palan, 2005).
IL-6	Interleuquina	Microglía Macrófago	Tiene un papel clave en la diferenciación Th ₁₇ (Serada <i>et al.</i> , 2008).
IL-8	Interleuquina	Macrófago	Actividad quimiotáctica para monocitos (Ramos-Cejudo y Oreja-Guevara, 2010).
IL-12	Interleuquina	Microglía Macrófago	Proinflamatoria, activa Th ₁ y NK, aumenta la respuesta de Th ₁ , acción sinérgica con IL-8 e induce la producción de INF- γ (Pathak y Palan, 2005; Ramos-Cejudo y Oreja-Guevara, 2010).
IL-17	Interleuquina	Th ₁₇	Regula la producción de IL-23 y IL-21, induce la producción de quimiocinas proinflamatorias y promueve la infiltración de células inmunes al SNC (Dittel, 2008).
IL-21	Interleuquina	Th ₁₇	Aumenta su actividad autócrina (Ramos-Cejudo y Oreja-Guevara, 2010).
IL-23	Interleuquina	Microglía Macrófago	Induce la diferenciación y segregación de Th ₁₇ (Rose y Carlson, 2007; Ramos-Cejudo y Oreja-Guevara, 2010).
VEGF-A	Factor de crecimiento	Astroцитos	Altera la permeabilidad de la BHE (Rose y Carlson, 2007)
TGF- β	Factor de crecimiento	Linfocitos	Impide la maduración de las células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) y promueve la diferenciación de Th ₁₇ (Dittel, 2008; Imitola <i>et al.</i> , 2006).
Linfotoxina	Citocina	LT	Induce la apoptosis en oligodendrocitos y neuronas (Dittel, 2008)
C3a	Quimiocina	Neuronas Astrocitos	Actividad quimiotáctica en macrófagos y microglía (Ingram <i>et al.</i> , 2008).
Oxido nítrico y ERO's	Radical libre	Microglía Macrófago	Daño axonal (Dutta y Trapp, 2007).
Ácido glutámico	Neurotransmisor	Microglía LT Astrocitos	Excitotoxicidad (Dittel, 2008)

2.4.3 La respuesta adaptativa en la EM

En tejido cerebral, LCR y suero sanguíneo obtenido de pacientes con EM se han identificado autoanticuerpos (aAc) dirigidos contra epítopes de la proteína de proteolípido (PLP, por sus siglas en inglés), la proteína básica de mielina (MBP, por sus siglas en inglés), la glucoproteína mieloide de oligodendrocitos (MOG, por sus siglas en inglés), la tubulina y los neurofilamentos (Ludwin, 2006; Peterson y Fujinami, 2007). La PLP y MBP son las proteínas más abundantes en las vainas de mielina del SNC; el PLP es requerido para el mantenimiento axonal independientemente de su papel durante la formación de la mielina; la función primaria de la MBP es mantener la compactación de la vaina de mielina y mantener la integridad axonal (Musse *et al.*, 2006; Dutta y Trapp; 2007 Goverman, 2009). Mientras, MOG forma parte de la membrana plasmática de oligodendrocitos, que recubren varios segmentos de axones con mielina; así como, de soportar la actividad y estabilidad neuronal (Dittel, 2008). Además, los aAc dirigidos contra epítopes de MOG y MBP, se encuentran en concentraciones elevadas en LCR y suero sanguíneo de pacientes con formas progresivas de la enfermedad (EMPP y EMSP), donde se ha establecido una correlación entre el aumento de concentración de estos aAc y el grado de progresión de la enfermedad, principalmente para los aAc dirigidos a epítopes en MOG y para la región aminoacídica 130-156 de la MBP (Musse *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Belogurov *et al.* 2008).

A pesar de la presencia de aAc en pacientes y el uso de su identificación para el diagnóstico de la enfermedad; así como, de la identificación de linfocitos B (LB) en tejido cerebral, LCR y suero sanguíneo obtenido de pacientes con EM, la contribución de LB reactivos específicos a mielina en el desarrollo de la EM es poco conocida (Ludwin, 2006; Rinker y Cross, 2007; Belogurov *et al.*, 2008; Frischer *et al.*, 2009). Sin embargo, recientemente, se ha reportado una correlación entre población clonal de LB en meninges y LB infiltrados al SNC, lo que sugiere que la maduración y propagación de LB autoreactivos se localizan en áreas extra parenquimales del SNC (nodos linfoides periféricos o meníngeas), desde donde subsecuentemente se difunden a través del LCR a

diferentes localidades del SNC, para contribuir al daño tisular de la lesión activa (Lovato *et al.*, 2011).

2.5 Ambiente, genes y EM

Los estudios de EM han encontrado un grado de asociación positiva o negativa de la enfermedad con factores ambientales y genéticos. Por lo cual, además de tener una predisposición génica, uno o más de los eventos ambientales de riesgo (asociación positiva) son necesarios para el desarrollo de la enfermedad (Fugger *et al.*, 2009; Goodin, 2009; Ramagopalan y Ebers 2009b).

La influencia ambiental (IA) puede suceder en una o varias de las etapas de la vida: pre-*post*natal (primera IA), niñez-adolescencia (IA del nacimiento a la juventud) y adulto (IA que desencadena los padecimientos clínicos de la enfermedad) (Goodin, 2009). Entre los factores ambientales de riesgo para la EM se ha reportado el vivir en latitudes más cercanas a los polos geográficos y las infecciones virales y bacterianas; destacando los virus EBV (virus Epstein-Barr), HHV-6 (herpes-virus 6 humano) y HSV-1 (herpes-virus simple). Mientras que como factor protector o de asociación negativa, se ha descrito a la relación entre exposición solar y concentración de vitamina D (Sotgiu, *et al.*, 2004; Ebers, 2008); principalmente en la etapa pre-*post*natal y como posible prevención durante la etapa juventud-adulthood en personas genéticamente susceptibles (Ramagopalan, *et al.*, 2009a; McDowell, *et al.*, 2010; Staples, *et al.*, 2010).

Por otro lado: entre los factores genéticos se han reportado alelos de genes que codifican proteínas neuronales e inmunológicas, de los cuales, destaca la región génica del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MIIC, por sus siglas en inglés). Al proporcionar un riesgo más elevado de desarrollar EM que otra región génica conocida (Fugger *et al.*, 2009; Ramagopalan, *et al.*, 2009). Esta relación de riesgo con la enfermedad del *MHC* es constante en la mayoría de las poblaciones donde se ha estudiado, con un valor *odds ration* (*OR*) de 5.4 para el desarrollo de EM (DeLuca *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2008). Los valores *OR* representan el riesgo que confiere llevar una variante génica determinada para desarrollar una enfermedad específica. Los valores ≤ 0 implica un asociación negativa o efecto protector a la enfermedad, el valor 1 implica una

asociación neutra y los valores > 1 implican una asociación positiva a la enfermedad, donde el riesgo aumenta proporcionalmente al valor del número (Fugger *et al.*, 2009).

2.6 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad

La región génica del complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*, por sus siglas en inglés) se nombro así, por sus peculiares características. Primero, el término complejo se le otorgó porque está conformada por numerosos *loci* estrechamente relacionados entre sí y con subfunciones diferentes. Mientras, que los términos mayor e histocompatibilidad se refieren al papel fundamental que tiene en el rechazo de trasplantes (Pathak y Palan, 2005).

Los genes de la región génica del *MHC* (Figura 6), también conocida como Antígeno Leucocitario Humano (HLA, por sus siglas en inglés) se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 en el *locus* 6p21.3 y abarca alrededor de 4 Mb con 150 genes aproximadamente (Oksenberg y Hauser, 2005; Schmidt *et al.*, 2007). En el extremo cercano al telómero se encuentran los genes de clase I (*HLA-A* y *HLA-B*), mientras en la región próxima al centrómero se encuentran los genes de clase II (*HLA-DR*, *HLA-DP* y *HLA-DQ*) y en la región intermedia se encuentran los genes de clase III (Barcellos *et al.*, 2006) (Figura 6).

Las regiones génicas del *MHC* clase I y II, poseen zonas polimórficas en los exones 2 y 3, y los productos de ambas regiones génicas son glucoproteínas de superficie celular que intervienen directamente en el reconocimiento inmunológico de las células (Oksenberg y Hauser, 2005; Barcellos *et al.*, 2006). Los genes de la región HLA clase II codifican glucoproteínas, que se estructuran en un complejo heterodimérico (Figura 7) formado por una cadena α y una cadena β , a su vez cada una tiene un dominio transmembranal y dos dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$) que se alinean y confrontan, para generar un espacio a nivel de los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ donde se incorpora el péptido procesado por las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) que muestran el antígeno principalmente a linfocitos $CD4^+$ cooperadores (Pathak y Palan, 2005).

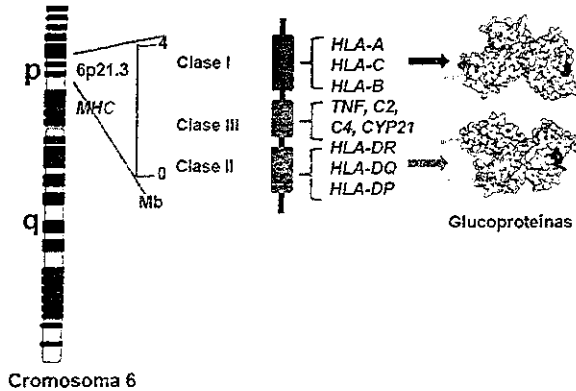


Figura 6. Esquema del locus 6p21.3 y las glucoproteínas codificadas por el MHC clase I y clase II (elaborado con base en: Oksenberg y Hauser, 2005; Barcellos *et al.*, 2006).

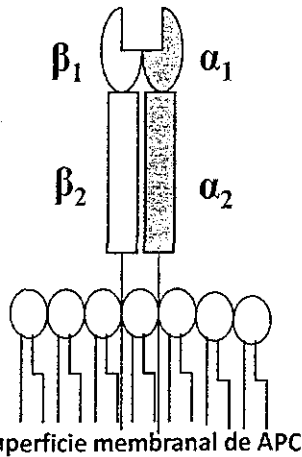


Figura 7. Esquema del HLA clase II. En color claro se observa la cadena β y en color oscuro a la cadena α , así como, a sus subunidades correspondientes. En la parte superior se observa el espacio generado por la interacción de los dominios β_1 y α_1 para la incorporación del antígeno procesado por alguna APC (elaborado con base en: Pathak y Palan, 2005).

2.7 El gen *HLA-DRB1** y su nomenclatura

El gen *HLA-DRB1** codifica al dominio $\beta 1$ (antes mencionado) o DR $\beta 1$ del MHC clase II, este gen presenta varios alelos (1,017) que pueden codificar alguna de las diferentes isoformas del péptido. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos en la DR $\beta 1$ determinan las capacidades de unión y presentación del antígeno(s) que pueden desencadenar la enfermedad por el MHC clase II. Por lo que, los alelos *HLA-DRB1** se han relacionado estrechamente con la susceptibilidad a padecer EM (Ramagopalan, *et al.*, 2009b; Ramagopalan y Ebers, 2009b; www.hla.alleles.org, 2012). Los alelos del *HLA-DRB1** se nombran (Figura 8) de la siguiente forma: los primeros dos dígitos designan la familia alélica (alelotipo), determinada por el antígeno serológico o alotipo (producto proteico de un alelo que puede ser antigénico en miembros de la misma especie; cuadro 4). El tercero y el cuarto dígitos designan diferencias en la secuencia de nucleótidos de la familia alélica, que cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. El quinto y sexto dígitos designan variaciones de un nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) en las regiones codificantes (RCs). El séptimo y octavo dígitos designan variaciones presentes en las regiones intrónicas 5' y 3' no codificantes (RNCs). Además, se separa cada set de dígitos por dos puntos y seguido. La diagonal (/) separa un alelo del otro presente en el mismo *loci* y el punto y coma (;) separa los alelos de diferentes *locus* en un haplotipo (Holdsworth *et al.*, 2009; Ramagopalan y Ebers, 2009b; Marsh *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2011).

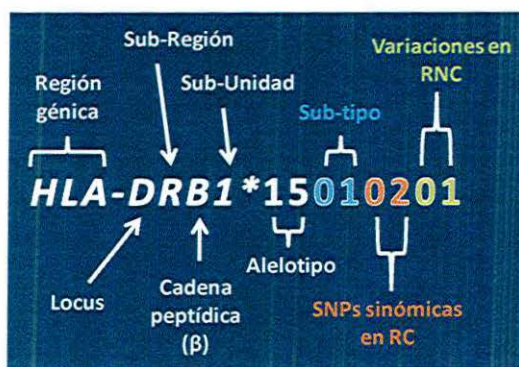


Figura 8. Ejemplo del sistema de nomenclatura de los alelos del *HLA* (elaborado con base en: Holdsworth *et al.*, 2009).

Cuadro 4. Alelos *HLA-DRB1** y alotipos (DR) correspondientes

Alelos	Antígeno sérico	Alelos	Antígeno sérico
*01:Y	DR1	*10:01	DR10
*01:03	DR103	*10:02,-:03	Desconocido
*01:X	Desconocido		
		*11:Y	DR11(5)
*03:Y	DR17(3)	*11:X	Desconocido
*03:02,-:03	DR18(3)		
*03:Z	DR3	*12:01-:03,-:05,-:06	DR12(5)
*03:X	Desconocido	*12:X	Desconocido
*04:Y	DR4	*13:Y	DR13(6)
*04:81N	Sin expresión	*13:54	DR14(6)
*04:X	Desconocido	*13:X	Desconocido
		*14:Y	DR14(6)
*07:01-:04,-:09	DR7	*14:03	DR1403
*07:10N	Sin expresión	*14:04	DR1404
*07:X	Desconocido		
*08:Y	DR8	*14:16-:18	DR6
*08:31	DR11(5)	*14:15	DR8
*08:X	Desconocido	*14:53	DR13(6)
		*14:92N	Sin expresión
*09:01,-:05	DR9	*14:X	Desconocido
*09:X	Desconocido		
*16:Y	DR16(2)	*15:01-:07	DR15(2)
*16:03	DR2	*15:08	DR2
*16:13N	Sin expresión	*15:17N	Sin expresión
*16:X	Desconocido	*15:X	Desconocido

- X = cualquier subtipo no especificado
- *01:Y = *01:01, :02, :04, :07, :09, :13,
- *03:Y = *03:01, :04, :10, :11, :43
- *03:Z = *03:05-:07, :12, :14, :15, :23, :36, :40
- *04:Y = *04:01-:11, :13-:17, :19-:26, :28, :29, :31, :32, :42, :64
- *08:Y = *08:01-:07, :09-:12, :14, :16, :17
- *11:Y = *11:01-:09, :10-:02, :11, :13-:16, :19-:21, :23, :25-:27, :29, :37, :52
- *13:Y = *13:01-:08, :10-:14, :16-:20, :22, :27, :29, :36, :42, :52, :57, :66
- *14:Y = *14:01, :02, :05-:08, :10-:14, :19-:22, :26, :27, :29, :49, :50, :60
- *16:Y = *16:01, :02, :04, :05 :09

2.8 La EM y alelos *HLA-DRB1**

El locus *HLA-DRB1** de la región génica del *MHC* posee la mayor asociación con la susceptibilidad o resistencia a la EM (Lincoln *et al.*, 2005). En varios estudios se han determinado los alelos del *HLA* clase II que se relacionan con el desarrollo de la EM en su población (Cuadro 5). En la mayoría de estos estudios, el alelotipo *HLA-DRB1*15* se ha asociado con el riesgo de padecer EM y en algunas poblaciones, también los alelotipos *HLA-DRB1*08*, *HLA-DRB1*03* y *HLA-DRB1*04* se han relacionado con dicho riesgo. Por otro lado, el alelotipo *HLA-DRB1*01* se ha considerado como protector contra la EM por mostrar una relación negativa con la enfermedad. Además, otros estudios (Fusco *et al.*, 2001; Weatherby *et al.*, 2001; Zabay-becerril *et al.*, 2004; Oksenberg y Hauser, 2005; DeLuca *et al.*, 2007; Smestada *et al.*, 2007; Hafler *et al.*, 2007; Ramagopalan *et al.*, 2007; Ramagopalan, *et al.*, 2009b; Sombekke *et al.*, 2009) han reportado la asociación positiva del alelotipo *HLA-DRB1*15* con:

- La progresión rápida de la enfermedad (EMPP)
- Una frecuencia elevada del alelotipo en mujeres
- La respuesta favorable al tratamiento con acetato de glatirámero (conocido también como copolímero I o copaxone)
- El inicio temprano de la enfermedad
- Una frecuencia elevada en familias con EM
- La presencia de SPNs relacionados con la enfermedad en su *locus*
- La sobre expresión del MHC clase II disparado por 1,25-dihidroxidada vitamina D₃ (1,25(OH)₂D) en concentraciones elevadas

En pacientes que poseen el alelotipo *HLA-DRB1*04* (Weatherby *et al.*, 2001; DeLuca *et al.*, 2007; Hoffmann *et al.*, 2008) se ha observado una asociación con:

- La EMPP
- La progresión lenta de la enfermedad (EMB)
- La producción de anticuerpos (Ac) a INF-β

Por otra parte, el alelotipo *HLA-DRB1*01* en pacientes con EM se ha asociado con el desarrollo de la EMB (DeLuca *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha observado en estudios de diplotipos (ambos alelotipo) en pacientes, el aumento de los valores *OR* de algunos diplotipos al más del doble del valor obtenido al analizar solo un alelotipo. Estas observaciones han llevado a proponer que el balance entre susceptibilidad y protección a

la EM es determinado, por la integración de las interacciones en *trans* y *cis* entre los alelos del *MHC* clase II heredados en cada individuo (Dyment *et al.*, 2005; Barcellos *et al.*, 2006; Ramagopalan *et al.*, 2007; Caillier *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2008).

Cuadro 5. Alelos *HLA-DRB1 y su relación con la enfermedad**

Población	<i>HLA-DRB1*</i> asociados	<i>HLA-DRB1*</i> no asociados
Hemisferio Norte**	*03, *08, *15, *16	*01, *07, *10, *11 y *14 (‡)
Sur de Europa	*03, *04, *08 *10:01, *13 *14, *15	*01 *06 *11 *13 (†)
Asia Occidental	*03, *04, *13:03, *15	*04, *10, *14 (¥)
Asia Oriental	*04, *08, *15, *16	*09 (±)
México	*03, *04:03, *08, *08:02, *15	*07 (§)
Sudamérica	*01:03, *15	*07:01 (ó)
Origen Africano	*03:01, *15, *15:03	*11 (■)
Origen Caucásico***	*03, *15	*01, *04, (○)

** Canadá, E.U.A. y Norte de Europa

*** (Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica)

‡ Hawkins *et al.*, 1990; Coraddu *et al.*, 1998; Fusco *et al.*, 2001; Ligers *et al.*, 2001; Weatherby *et al.*, 2001; Dyment *et al.*, 2005; Barcellos *et al.*, 2006; Ramagopalan *et al.*, 2007.

† Marrosu *et al.*, 1998; Pina *et al.*, 1999; Villoslada *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2004; Brassat *et al.*, 2005; Dean *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2009; Pastorino *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009.

¥ Karni *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 1999; Kalanic *et al.*, 2000; Kankonkar *et al.*, 2003; Al-Shammri *et al.*, 2004; Ghabaee 2009; Flechter *et al.*, 2011.

± Fukazawa *et al.*, 1992; Ono *et al.*, 1998; Fukazawa *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2010.

§ Gorodezky *et al.*, 1986; Alvarado-de la Barrera *et al.*, 2000; Aláez *et al.*, 2005.

ó Alves-León *et al.*, 2007; Patrucco *et al.*, 2009. Rojas *et al.*, 2010.

■ Oksenberg *et al.*, 2004; Alves-León *et al.*, 2007; Deschamps *et al.*, 2011.

○ Stewart *et al.*, 1997; Stankovich *et al.*, 2009.

2.9 Epistasis en la EM

El modelo de epistasis explica que un alelo en un *locus* puede amplificar, neutralizar, enmascarar o disminuir el efecto de un segundo *locus*. Por lo cual, el riesgo de asociación de un alelo con una enfermedad depende de la presencia o ausencia de un segundo alelo (Lincoln *et al.*, 2009). En la EM se han determinado tres tipos de epistasis entre los alelotipos de *HLA-DRB1** (Cuadro 6): dominante negativa, en la cual la presencia de un alelotipo disminuye el riesgo que representa poseer otro alelotipo determinado; sinérgica, donde un alelotipo en presencia de otro, aumenta su relación de riesgo con la enfermedad; y fenotipo clínico, donde la presencia de un genotipo en un paciente se relaciona con el inicio, la respuesta al tratamiento, la evolución o las características de la enfermedad (Ramagopalan y Ebers, 2009a).

Cuadro 6. Epistasis entre los alelotipos *HLA-DRB1 y EM.**

Tipo de Epistasis	Población.	Diplotipo <i>DRB1*</i>	Objetivo del estudio
Sinérgica	México	*08:02/*08:02	Definir los alelos HLA clase II asociados con la enfermedad en población Mestiza (Aláez <i>et al.</i> , 2005)
Dominancia negativa	Canadá	*15/*01	Comparar los alelos <i>HLA-DRB1*</i> heredados entre afectados y familiares sanos (Dyment <i>et al.</i> , 2005)
Sinérgica		*08/*15	
Sinérgica	Europa y E.U.A	*08/*15 *15/*15	Conocer el riesgo e interacción fenotípica del <i>HLA-DRB1*15</i> con los demás <i>DRB1*</i> entre afectados y familiares sanos (Barcellos <i>et al.</i> , 2006)
Dominancia negativa		*14/*15	
Fenotipo Clínico	Canadá	*15/*15	Comparar los alelos <i>HLA-DRB1*</i> presentes en pacientes con EMB, EMM y población sana (DeLuca <i>et al.</i> , 2007)
*EMM ⁺ *EMB ⁺		*01/*X	
Fenotipo Clínico	España		Determinar los alelos HLA clase II asociados con EM en el norte de España (Fernández <i>et al</i> 2009)
*EMPP ⁺		*04/X	
Fenotipo Clínico	Australia	*04/*15	Comparar los alelos del <i>HLA-DRB1*</i> presentes en pacientes con EMPP y población sana (Stankovich <i>et al.</i> , 2009)
*EMPP ⁺		*01/*15 *04/03	
		*15/*15 *03/*03	
Sinérgica Fenotipo Clínico	Australia		Determinar la relación de los alelos <i>HLA-DRB1*</i> y la edad de los pacientes al iniciar la enfermedad (Wu <i>et al.</i> , 2010)
*Inicio temprano ⁺ *Inicio temprano ⁻		*04:01/*15:01 *08:01/*04:01	

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas ha aumentado drásticamente el número de casos de EM en nuestro país y desde 1998, es considerada como una de las principales causas de consulta neurológica (De la Maza *et al.*, 2000; Velázquez-Quintana *et al.*, 2003; Cordova *et al.*, 2007; Corona y Flores, 2009). En el 2007, se reportó a la EM como la primera causa de discapacidad neuronal en mujeres adultas-jóvenes (Boletín 7 de Junio 2007, IMSS). En nuestro país los estudios genéticos del *HLA-DRB1** presente en pacientes han asociado a alelos *HLA-DRB1*15:01*, *HLA-DRB1*08:02*, *HLA-DRB1*04:03* y *HLA-DRB1*03:01* con el riesgo de padecer EM (Alvarado-de la Barrera *et al.*, 2000; Aláez *et al.*, 2005). Por otro lado, los estudios filogenéticos han revelado que alrededor del 28% de nuestra población mestiza posee alguno de los alelos *HLA-DRB1** que se han asociado a la EM (*HLA-DRB1*15:01* del 5.5-10.5 %; *HLA-DRB1*08:02* del 7.8-16.2%; *HLA-DRB1*04:03* del 1.5-4.5%; y *HLA-DRB1*03:01* del 2-10.5%) (Gorodezky *et al.*, 2001; Vargas-Alarcón *et al.*, 2010). Particularmente, en el caso de la población de Guadalajara alrededor del 9% posee alguno de los alelotipos *HLA-DRB1*15* (3.7%) y *HLA-DRB1*03:01* (5.6%) (Cortes *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque en Jalisco se encuentra una de las clínicas especializadas en EM que más pacientes atiende en el país, con una población de 400 pacientes aproximadamente registrados hasta el 2010, la distribución y frecuencias genéticas del *HLA-DRB1** en personas con EM del Occidente de México (OM) es desconocida.

4. JUSTIFICACIÓN

La determinación de las frecuencias genéticas de los diplotipos *HLA-DRB1** en pacientes con EM del OM podría favorecer el desarrollo y estandarización del tratamiento y manejo clínico más eficientes para el paciente, así como conocer las frecuencias genotípicas del *HLA-DRB1** en pacientes con EM del OM. Por otro lado, la determinación de las frecuencias genéticas de los diplotipos *HLA-DRB1** de la población sana permitirá tener una mejor perspectiva de la diferencia genotípica entre ellos y los pacientes, lo que ayudaría en el desarrollo de estudios moleculares para el diagnóstico de la enfermedad.

5. HIPÓTESIS

H₁: La frecuencia génica de alelotipos y diplotipos, así como la función de similitud del *HLA-DRB1** entre pacientes con EM y población sana (PS), son diferentes.

H₀: La frecuencia génica de alelotipos y diplotipos, así como la función de similitud del *HLA-DRB1** entre pacientes con EM y población sana (PS), no son diferentes.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la asociación de riesgo y la función de similitud de los alelotipos y diplotipos del *HLA-DRB1** entre pacientes con EM y la población sana del Occidente de México.

6.2 Objetivos particulares

1. Establecer las frecuencias de alelotipos y diplotipos del *HLA-DRB1** en pacientes con EM y población sana (PS) del Occidente de México y comprobar si se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.
2. Evaluar la asociación de alelotipos y diplotipos *HLA-DRB1** con la EM por medio de las pruebas estadísticas *ji* cuadrada y prueba exacta de Fisher.
3. Calcular los valores *OR* de los alelotipos y diplotipos de *HLA-DRB1** en cada grupo para determinar si representan ser factor de riesgo o de protección al desarrollo de EM.
4. Comparar las frecuencias génicas del *HLA-DRB1** (alelotipo y diplotipo) entre ambos grupos para establecer las similitudes entre ellos.
5. Realizar un análisis por subgrupos de diplotipos en pacientes y población sana para determinar la similitud entre ambas poblaciones a este nivel.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio

Casos y controles

7.2 Universo de estudio

El grupo de pacientes fue captado en la Clínica de Esclerosis Múltiple del Centro Médico Nacional de Occidente bajo los siguientes criterios:

- *Inclusión*: pacientes con diagnóstico de EMRR de acuerdo con los criterios de McDonald (revisión 2005), que presenten un valor EDSS de 5 o menos (sin importar tiempo de evolución; ni tratamiento de la enfermedad); con padres y abuelos originarios del Occidente de México; y que lean y firmen la carta de consentimiento informado.
- *No inclusión*: pacientes con alguna otra enfermedad autoinmune.
- *Exclusión*: casos en los cuales la muestra obtenida fue insuficiente o con condición inadecuada para la obtención y purificación del DNA.

El grupo de pacientes tuvo una edad promedio de 36.26 años (DE = 9.84 años); el 68 % de los pacientes fueron mujeres; y el valor promedio de la escala del estado de discapacidad ampliada (EDSS) fue de 2.48 puntos (DE = 2).

El grupo de población sana (PS) fue captado u obtenido de la base de datos de donadores de la unidad de transplante del Centro Médico Nacional de Occidente (con previo consentimiento del donador) con padres y abuelos originarios del Occidente de México. El grupo tuvo una edad promedio de 36.19 años (DE = 8.9) y el 60 % fueron mujeres.

7.3 Tamaño de muestra

Tamaño de muestra: 59 casos de EM y 189 controles; se determinaron los valores antes mencionados por medio de la ecuación de Fleiss para estudios de casos y controles (Fleiss, 1981).

$$n_1 = \frac{\left[Z_{\alpha/2} \sqrt{(r+1)\bar{p}q} + Z_{1-\beta} \sqrt{rp_1q_1 + p_2q_2} \right]^2}{r(p_1 - p_2)^2}$$

$$n_2 = r n_1$$

n_1 = Número de casos

n_2 = Número de controles

$Z_{\alpha/2}$ = Error alfa (intervalo de confianza de la prueba): 0.05

Z_{β} = Error beta (poder de la prueba): 60%

r = Relación entre controles y casos: 3

p_1 = Porcentaje de controles con exposición y $q_1 = 1-p_1$: 16.7%*

p_2 = Porcentaje de testigos con exposición y $q_2 = 1-p_2$: 6%*

$$\bar{p} = \frac{p_1 + rp_2}{r+1} \quad \text{y} \quad \bar{q} = 1 - \bar{p}$$

$$n_1 = 53$$

$$n_2 = 159$$

* Los valores p_1 y p_2 corresponden al rango de frecuencia para el alelotipo *HLA-DRB1*15* a nivel mundial, consideradas como referencia para este cálculo.

7.4 Procedimiento

Se colectaron de 3-4 ml (por duplicado) de sangre venosa por punción en tubos con EDTA como anticoagulante de pacientes de la Clínica de Esclerosis Múltiple en el Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS (Guadalajara, Jal.), con padres y abuelos originarios del Occidente de México. Las muestras obtenidas se transportaron en una

hiera al Laboratorio de Desarrollo, Envejecimiento y Enfermedades Neurodegenerativas de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CIBO-IMSS para la inmediata extracción del DNA. La extracción y purificación del DNA a partir de sangre (Anexo I) se realizó por medio de la combinación del protocolo de Miller para el aislamiento de leucocitos de la sangre y el protocolo de Gustincich para la obtención final del DNA (Miller *et al.*, 1988; Gustincich *et al.*, 1991). La concentración del DNA obtenido se estimó por medio de espectrofotometría de luz UV (Anexo III) a 260 nm, la valoración de su calidad por medio del índice de absorbancia 260/280 nm y su integridad se analizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% con SYBER-SAFE (Anexo II). Después de la electroforesis los geles se observaron en un transiluminador para el análisis de la imagen.

La tipificación de los alelotipos y diplotipos de las muestras se realizó por medio de la prueba **RELI™ SSO HLA-DRB TYING Kit** de Invitrogen (Anexo IV), que se basa en la amplificación del fragmento genómico de interés por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987), seguida de un proceso de desnaturalización química e hibridación de los productos de PCR con una serie de 54 diferentes oligonucleótidos de secuencia específica (SSO, por sus siglas en inglés) separados entre sí a lo largo de un soporte y sujetos a una membrana de nylon. Entonces los fragmentos de DNA lineales se hibridaron con el SSO correspondiente por complementariedad de bases, quedando atrapados dentro de la membrana. Al finalizar el proceso de hibridación se realizó una serie de lavados para estabilizar la reacción de hibridación y eliminar los fragmentos de DNA que no reaccionaron.

La visualización de los distintos complejos de hibridación se realizó por la reacción del conjugado estreptavidina-peroxidasa con los fragmentos lineales del DNA, al añadir agua oxigenada (H_2O_2) y el sustrato tetrametilbenzidina (TMB), que originó un complejo de color azul con el DNA hibridado. De esta forma, el resultado se compone de bandas que reaccionaron (color azul) y sin reacción (sin color) a lo largo de un soporte (Figura 9), de acuerdo a los alelos presentes en la muestra. Finalmente, se

comparó cada soporte con una tabla de patrones para su interpretación (Invitrogen™, 2008). La determinación de la frecuencia de los alelotipos y diplotipos *HLA-DRB1** en PS se realizó analizando los resultados de las pruebas de compatibilidad del HLA (específicamente *HLA-DRB1**), que se practican en la unidad de trasplantes del Centro Médico Nacional de Occidente (CMNO, IMSS), debido a que utilizan el kit mencionado anteriormente.



Figura 9. Imagen de dos soportes con SSO después de pasar por el proceso de hibridación. Arriba, la secuencia de bandas que reaccionaron son correspondientes con el genotipo *HLA-DRB1*04/*15* y abajo con el genotipo *HLA-DRB1*01/*12*.

Las frecuencias de los alelotipos y diplotipos presentes en pacientes y población sana, se analizaron y graficaron por medio de Excel, además se obtuvo la similitud existente entre ambos grupos por medio del análisis de similitud Bray-Curtis. Con los datos de los diplotipos se realizaron subgrupos con las diferentes familias alélicas del *HLA-DRB1**, y se estableció la similitud de ambos grupos estudiados a este nivel. Se determinó el equilibrio Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas *HLA-DRB1**, en ambas poblaciones, utilizando el programa GENPOP versión 4.0.10 (Guo y Thompson, 1992; Rousset y Raymond, 1995). La significancia estadística entre las frecuencias de alelotipos y diplotipos entre pacientes y PS, se estableció mediante la prueba de *ji* cuadrada y prueba *post-hoc* de Fisher (integrando los valores de *P*). Los valores de *OR* se obtuvieron por medio de cuadros de 2x2. Para realizar el análisis de similitud Bray-Curtis se calculó la raíz cuadrada de los datos de los alelotipos y diplotipos *HLA-DRB1** como pretratamiento.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis de alelotipos *HLA-DRB1**

El análisis de las familias alélicas *HLA-DRB1** en 59 pacientes (118 cromosomas) y 189 personas sanas (378 cromosomas) demostró que: la frecuencia del alelotipo *HLA-DRB1**04 (34.74% en pacientes y 27.25% en controles) en ambos grupos es elevada. Mientras que los alelotipos *HLA-DRB1**15 (12.71% en pacientes y 6.35% en controles) y *HLA-DRB1**09 (3.38% en pacientes y 0.52% en controles), fueron significativamente más frecuentes en pacientes que en el grupo control. Por otro lado, los alelotipos *HLA-DRB1**10 (0% en pacientes y 3.17% en controles), *HLA-DRB1**08 (4.23% en pacientes y 8.46% en controles), *HLA-DRB1**03 (5.08% en pacientes y 10.05% en controles) y *HLA-DRB1**01 (3.38% en pacientes y 7.4% en controles), se presentaron con menor frecuencia en los pacientes que en individuos del grupo control (Figura 10).

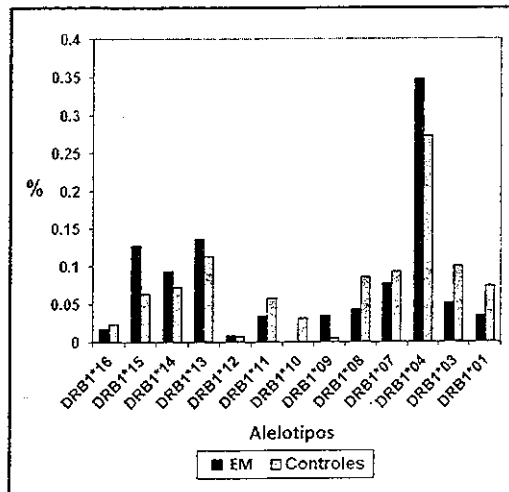


Figura 10. Frecuencia de los alelotipos *HLA-DRB1** en pacientes y población sana.

Al realizar la prueba de Fisher de una cola y dos colas se determinó que los alelotipos *HLA-DRB1*15* ($P = 0.04$; IC = 1.03-4.45) y *HLA-DRB1*09* ($P = 0.03$; IC = 1.03-52.51) se asocian con el riesgo a desarrollar EM con un valor de *OR* de 2.15 y 6.6 respectivamente; ninguno de los alelos *HLA-DRB1** mostró una asociación de protección contra EM; sin embargo, en la prueba de Fisher de una cola, el alelotipo *HLA-DRB1*10* presento un valor de $P = 0.03$ (IC = 0.0-1.36; *OR* = 0) (Cuadro 7). Por otro lado, se determinó una similitud del 85.82% de las frecuencias de los alelotipos *HLA-DRB1** presentes, en pacientes y el grupo control.

Cuadro 7. Tipificación del *HLA-DRB1 en pacientes y población sana**

Alelotipo	EM %	Con. %	X²	P 1 cola	P 2 colas	IC	OR
<i>DRB1*16</i>	2 (1.7)	9 (2.38)	0.01	0.5	1	0.10-3.57	0.71
<i>DRB1*15</i>	15 (12.71)	24 (6.35)	4.19		0.04**	1.03-4.45	2.15
<i>DRB1*14</i>	11 (9.32)	27 (7.14)	0.33		0.562	0.6-2.92	1.34
<i>DRB1*13</i>	16 (13.55)	43 (11.37)	0.26		0.61	0.64-2.37	1.23
<i>DRB1*12</i>	1 (0.84)	3 (0.08)	0.28	0.66	1	0.11-10.37	1.07
<i>DRB1*11</i>	4 (3.38)	22 (5.82)	0.67		0.42	0.16-1.79	0.57
<i>DRB1*10</i>	0	12 (3.17)	2.61	0.03**	0.078	0.0-1.36	0
<i>DRB1*09</i>	4 (3.38)	2 (0.52)	4	0.03**	0.03**	1.03-52.51	6.6
<i>DRB1*08</i>	5 (4.23)	32 (8.46)	1.76		0.18	0.16-1.33	0.48
<i>DRB1*07</i>	9 (7.62)	35 (9.26)	0.13		0.72	0.35-1.82	0.81
<i>DRB1*04</i>	41 (34.74)	103 (27.25)	2.1		0.15	0.89-2.26	1.42
<i>DRB1*03</i>	6 (5.08)	38 (10.05)	2.17		0.14	0.18-1.22	0.48
<i>DRB1*01</i>	4 (3.38)	28 (7.4)	1.79		0.18	0.13-1.35	0.44

X² = Yates
P = Fisher

IC = Intervalo de confianza (95%)
** = Valores significativos

8.2 Análisis de diplotipos *HLA-DRB1**

En el análisis de diplotipos *HLA-DRB1** se determinaron 60 genotipos diferentes, de los cuales, 27 (45%; 27/60) se presentaron en pacientes con EM y 54 (90%; 54/60) en el grupo control. Además, se observaron 21 (35%; 21/60) de estos genotipos presentes en ambos grupos. El análisis estadístico (Cuadro 8) realizado a los diplotipos *HLA-DRB1** muestra que los genotipos *HLA-DRB1*15/*04* ($P = 0.0046$; IC = 1.56-26.49) y *HLA-DRB1*04/*14* ($P = 0.02$; IC = 1.15-31.47) se asocian estrechamente con el riesgo a desarrollar EM con un valor de OR de 6.23 y 5.74 respectivamente; ninguno de los genotipos *HLA-DRB1** se pudo asociar con la protección a EM. Mientras, el análisis de similitud entre ambas poblaciones, a nivel genotipos, revela una similitud del 53.44% entre pacientes y población sana.

Cuadro 8. Genotipos del *HLA-DRB1 en pacientes y población sana**

<i>DRB1*</i>	EM %	Con. %	X ²	P 1 cola	P 2 colas	IC	OR
<i>*15/*15</i>	1 (1.7)	1 (0.53)	0		0.42	0-120.67	3.24
<i>*16/*16</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
<i>*15/*14</i>	1 (1.7)	2 (1.05)	0.08		0.559	0.14-18.1	1.61
<i>*15/*13</i>	4 (6.78)	3 (1.58)	2.73	0.057	0.057	0.82-26.31	4.51
<i>*15/*11</i>	0	2 (1.05)	0	0.58	1	0-13.24	0
<i>*15/*08</i>	1 (1.7)	4 (2.11)	0.11	0.658	1	0.08-7.276	0.8
<i>*15/*07</i>	0	2 (1.05)	0	0.58	1	0-13.24	0
<i>*15/*04</i>	7 (11.86)	4 (2.11)	7.91	0.0046**	0.0046**	1.56-26.49	6.23
<i>*15/*03</i>	0	3 (1.58)	0.08	0.44	1	0-7.26	0
<i>*15/*01</i>	0	2 (1.05)	0	0.58	1	0-13.24	0
<i>*14/*14</i>	0	3 (1.58)	0.08	0.44	1	0-7.26	0
<i>*13/*16</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
<i>*13/*14</i>	2 (3.39)	7 (3.7)	0.08	0.63	1	0.18-4.51	0.91
<i>*13/*13</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
<i>*11/*16</i>	1 (1.7)	1 (0.53)	0		0.42	0-120.67	3.24
<i>*11/*14</i>	1 (1.7)	3 (1.58)	0.29	0.66	1	0.12-10.47	1.07
<i>*11/*13</i>	1 (1.7)	5 (2.64)	0	0.561	1	0.03-5.76	0.63
<i>*11/*11</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
<i>*11/*04</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
<i>*10/*16</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
<i>*09/*14</i>	2 (3.39)	0	2.92	0.05	0.05	Idefinito	Idefinito
<i>*09/*11</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
<i>*09/*09</i>	1 (1.7)	0	0.38	0.23	0.23	Idefinito	Idefinito
<i>*08/*13</i>	0	4 (2.11)	0.29	0.33	0.57	0-4.96	0
<i>*08/*12</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
<i>*08/*10</i>	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0

GENOTIPIFICACION DE *HLA-DRB1** EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE Y POBLACIÓN GENERAL DEL OCCIDENTE DE MÉXICO

<i>DRB1</i> *	EM %	Con. %	χ^2	P 1 cola	P 2 colas	IC	OR
*08/*08	0	2 (1.05)	0	0.58	1	0-13.24	0
*08/*07	2 (3.39)	2 (1.05)	0.42	0.24	0.24	0.32-33.47	3.28
*08/*01	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
*07/*16	1 (1.7)	0	0.38	0.23	0.23	Idefnido	Idefnido
*07/*14	0	3 (1.58)	0.08	0.44	1	0-7.26	0
*07/*13	1 (1.7)	2 (1.05)	0.08		0.559	0.14-18.1	1.61
*07/*11	0	3 (1.58)	0.08	0.44	1	0-7.26	0
*07/*10	0	2 (1.05)	0	0.58	1	0-13.24	0
*07/*09	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
*07/*07	1 (1.7)	4 (2.11)	0.11	0.658	1	0.08-7.276	0.8
*04/*16	0	3 (1.58)	0.08	0.44	1	0-7.26	0
*04/*14	5 (8.47)	3 (1.58)	4.8	0.02**	0.02**	1.15-31.47	5.74
*04/*13	6 (10.17)	12 (6.55)	0.49	0.235	0.387	0.53-5.09	1.67
*04/*12	0	2 (1.05)	0	0.58	1	0-13.24	0
*04/*10	0	7 (3.7)	1.1	0.145	0.202	0-2.5	0
*04/*08	2 (3.39)	11 (5.82)	0.16	0.364	0.738	0.08-2.83	0.57
*04/*07	2 (3.39)	8 (4.23)	0.01	0.56	1	0.11-4.21	0.79
*04/*04	7 (11.86)	15 (8)	0.44		0.493	0.54-4.37	1.56
*04/*01	1 (1.7)	9 (4.76)	0.44	0.26	0.46	0.02-2.75	0.34
*03/*14	0	3 (1.58)	0.08	0.44	1	0-7.26	0
*03/*13	1 (1.7)	4 (2.11)	0.11	0.658	1	0.08-7.276	0.8
*03/*11	0	4 (2.11)	0.29	0.334	0.575	0.0-4.97	0
*03/*08	0	4 (2.11)	0.29	0.334	0.575	0.0-4.97	0
*03/*07	1 (1.7)	0	0.38	0.23	0.23	Idefnido	Idefnido
*03/*04	4 (6.78)	13 (6.87)	0.07	0.621	1	0.26-3.43	0.98
*03/*03	0	2 (1.05)	0	0.58	1	0-13.24	0
*01/*16	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
*01/*13	1 (1.7)	3 (1.58)	0.29	0.665	1	0.12-10.47	1.07
*01/*12	1 (1.7)	0	0.38	0.23	0.23	Idefnido	Idefnido
*01/*11	1 (1.7)	0	0.38	0.23	0.23	Idefnido	Idefnido
*01/*10	0	1 (0.53)	0.38	0.76	1	0-56.25	0
*01/*07	0	4 (2.11)	0.29	0.334	0.575	0.0-4.97	1
*01/*03	0	3 (1.58)	0.08	0.44	1	0-7.26	0
*01/*01	0	2 (1.05)	0	0.58	1	0-13.24	0

χ^2 = Yates
P = Fisher

IC = Intervalo de confianza (95%)
** = Valores significativos

En cuanto a la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para el locus *HLA-DRB1** se encontró que debido a un déficit de heterocigotos, la población control no alcanza el equilibrio de H-W para los alelotipos observados. Mientras, la población de pacientes con EM sí alcanza el equilibrio de H-W (Cuadro 9).

Cuadro 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus *HLA-DRB1**

Población	Tipo de prueba	Valor de P	Simulaciones
Control	Proporción H-W	0.0262**	1,000
Pacientes con EM	Proporción H-W	0.1146	1,000
Control	Déficit de heterocigotos	0.0272**	1,000
Pacientes con EM	Déficit de heterocigotos	0.1956	1,000
Control	Exceso de heterocigotos	0.9728	1,000
Pacientes con EM	Exceso de heterocigotos	0.8045	1,000

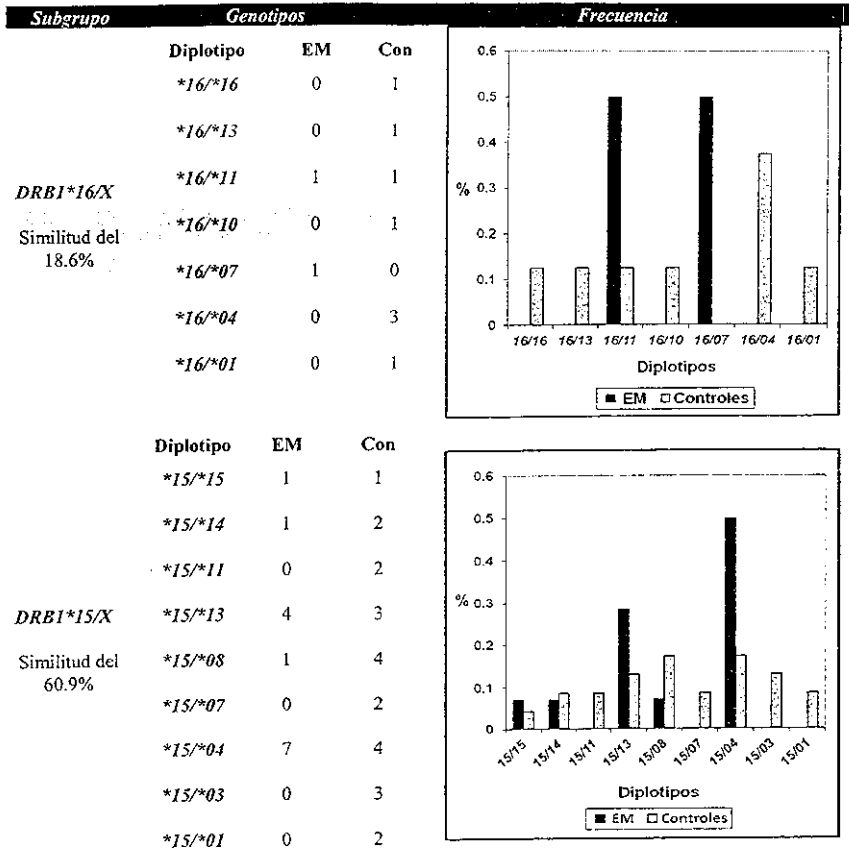
Estimación de los valores de P por el método de cadenas de Markov

** = Valores significativos

H-W = Hardy-Weinberg

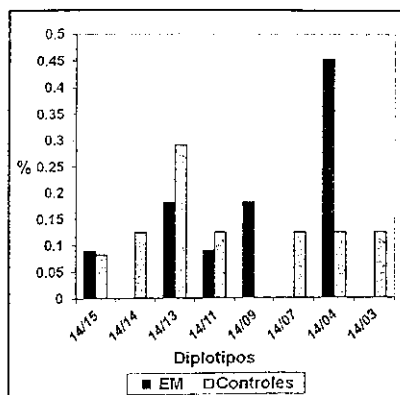
Por otra parte, a través del análisis de frecuencia y similitud para los genotipos del *HLA-DRB1** por subgrupos, se observa que *HLA-DRB1*01*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*10* y *HLA-DRB1*11* tienden a relacionarse con la protección para no padecer EM, pues su presencia disminuye la similitud al compararse con los demás alelotipos en los diferentes genotipos (revisar Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis por subgrupos de los genotipos HLA-DRB1*.

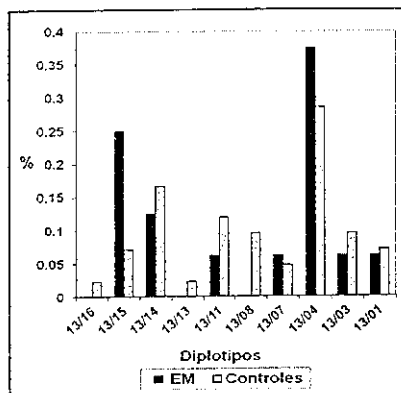


GENOTIPIFICACIÓN DE *HLA-DRB1** EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE Y POBLACIÓN GENERAL DEL OCCIDENTE DE MÉXICO

	Diptotipo	EM	Con
<i>DRB1*14/X</i> Similitud del 57.9%	<i>*14/*15</i>	1	2
	<i>*14/*14</i>	0	3
	<i>*14/*13</i>	2	7
	<i>*14/*11</i>	1	3
	<i>*14/*09</i>	2	0
	<i>*14/*07</i>	0	3
	<i>*14/*04</i>	5	3
	<i>*14/*03</i>	0	3

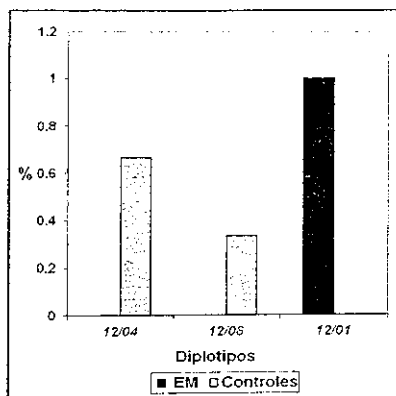


	Diptotipo	EM	Con
<i>DRB1*13/X</i> Similitud del 78.2%	<i>*13/*16</i>	0	1
	<i>*13/*15</i>	4	3
	<i>*13/*14</i>	2	7
	<i>*13/*13</i>	0	1
	<i>*13/*11</i>	1	5
	<i>*13/*08</i>	0	4
	<i>*13/*07</i>	1	2
	<i>*13/*04</i>	6	12
	<i>*13/*03</i>	1	4
	<i>*13/*01</i>	1	3

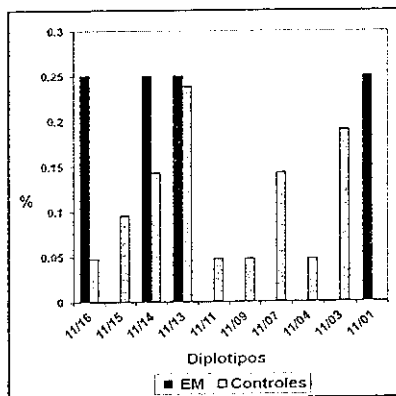


GENOTIPIFICACION DE *HLA-DRB1** EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE Y POBLACION GENERAL DEL OCCIDENTE DE MÉXICO

	Diplotipo	EM	Con
<i>DRB1</i> *12/X	*12/*04	0	2
Similitud del 0%	*12/*08	0	1
	*12/*01	1	0

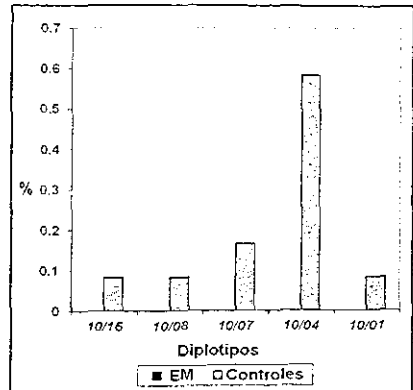


	Diplotipo	EM	Con
<i>DRB1</i> *11/X	*11/*16	1	1
	*11/*15	0	2
	*11/*14	1	3
	*11/*13	1	5
	*11/*11	0	1
	*11/*09	0	1
	*11/*07	0	3
	*11/*04	0	1
	*11/*03	0	4
	*11/*01	1	0
Similitud del 45%			

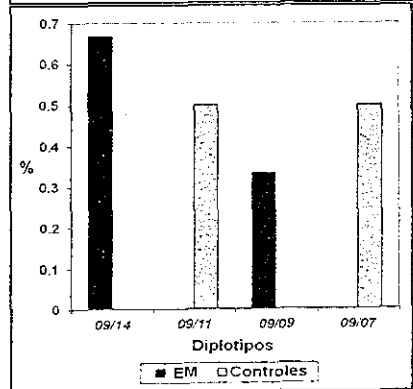


GENOTIPIFICACION DE *HLA-DRB1** EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MULTIPLE REMITENTE-RECURRENTE Y POBLACION GENERAL DEL OCCIDENTE DE MEXICO

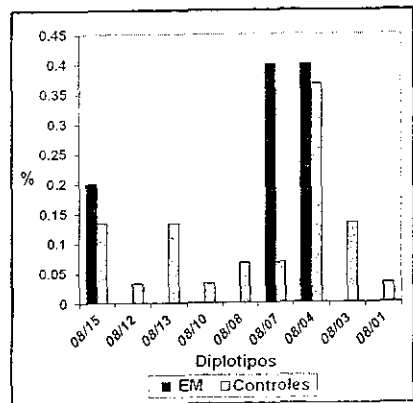
	Diplotipo	EM	Con
	<i>*10/*16</i>	0	1
<i>DRB1*10/X</i>	<i>*10/*08</i>	0	1
Similitud del 0%	<i>*10/*07</i>	0	2
	<i>*10/*04</i>	0	7
	<i>*10/*01</i>	0	1



	Diplotipo	EM	Con
<i>DRB1*09/X</i>	<i>*09/*14</i>	2	0
Similitud del 0%	<i>*09/*11</i>	0	1
	<i>*09/*09</i>	1	0
	<i>*09/*07</i>	0	1



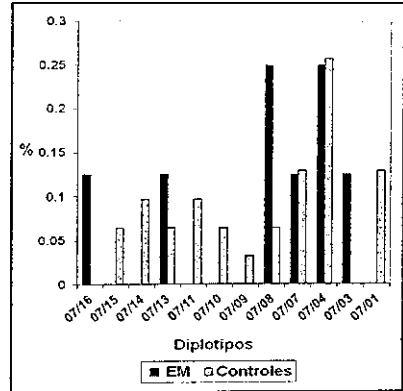
	Diplotipo	EM	Con
	<i>*08/*15</i>	1	4
	<i>*08/*12</i>	0	1
	<i>*08/*13</i>	0	4
<i>DRB1*08/X</i>	<i>*08/*10</i>	0	1
Similitud del 54.9%	<i>*08/*08</i>	0	2
	<i>*08/*07</i>	2	2
	<i>*08/*04</i>	2	11
	<i>*08/*03</i>	0	4
	<i>*08/*01</i>	0	1



GENOTIPIFICACIÓN DE *HLA-DRB1** EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE Y POBLACIÓN GENERAL DEL OCCIDENTE DE MÉXICO

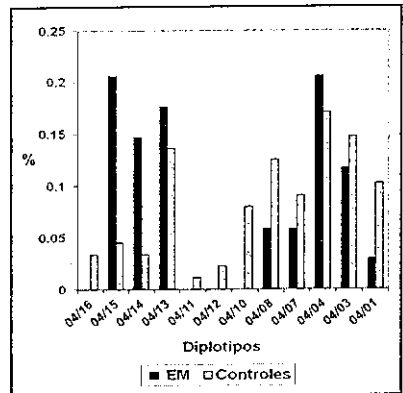
	Diplotipo	EM	Con
<i>DRB1</i> *07/X	*07/*16	1	0
	*07/*15	0	2
	*07/*14	0	3
	*07/*13	1	2
	*07/*11	0	3
	*07/*10	0	2
	*07/*09	0	1
	*07/*08	2	2
	*07/*07	1	4
	*07/*04	2	8
	*07/*03	1	0
	*07/*01	0	4

Similitud del
38.7%



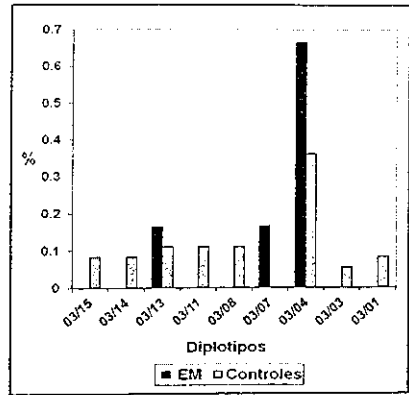
	Diplotipo	EM	Con
<i>DRB1</i> *04/X	*04/*16	0	3
	*04/*15	7	4
	*04/*14	5	3
	*04/*13	6	12
	*04/*11	0	1
	*04/*12	0	2
	*04/*10	0	7
	*04/*08	2	11
	*04/*07	2	8
	*04/*04	7	15
	*04/*03	4	13
	*04/*01	1	9

Similitud del
73%

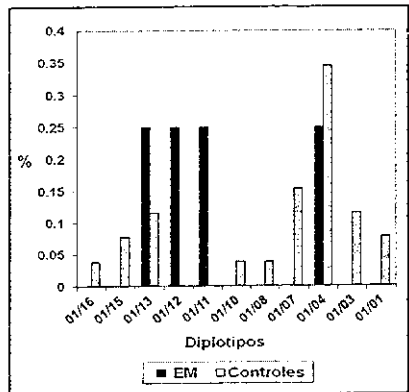


GENOTIPIFICACIÓN DE *HLA-DRB1* EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE REMITENTE-RECURRENTE Y POBLACIÓN GENERAL DEL OCCIDENTE DE MÉXICO

	Diplotipo	EM	Con
<i>DRB1*03/X</i> Similitud del 43.1%	<i>*03/*15</i>	0	3
	<i>*03/*14</i>	0	3
	<i>*03/*13</i>	1	4
	<i>*03/*11</i>	0	4
	<i>*03/*08</i>	0	4
	<i>*03/*07</i>	1	0
	<i>*03/*04</i>	4	13
	<i>*03/*03</i>	0	2
	<i>*03/*01</i>	0	3



	Diplotipo	EM	Con
<i>DRB1*01/X</i> Similitud del 34.9%	<i>*01/*16</i>	0	1
	<i>*01/*15</i>	0	2
	<i>*01/*13</i>	1	3
	<i>*01/*12</i>	1	0
	<i>*01/*11</i>	1	0
	<i>*01/*10</i>	0	1
	<i>*01/*08</i>	0	1
	<i>*01/*07</i>	0	4
	<i>*01/*04</i>	1	9
	<i>*01/*03</i>	0	3
<i>*01/*01</i>	0	2	



9. DISCUSIÓN

*Análisis de alelotipos HLA-DRB1**

En este estudio se determinó que los alelotipos *HLA-DRB1*15* y *HLA-DRB1*09* constituyen un factor de riesgo para desarrollar EM en la población del Occidente de México. Por otro lado, no se encontró asociación de riesgo con los alelotipos: *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*04* y *HLA-DRB1*08*, reportada previamente en pacientes de la región centro del país (Alvarado-de la Barrera *et al.*, 2000; Aláez *et al.*, 2005), lo cual pudiera deberse a la heterogeneidad genética de la población mexicana a lo largo de las diferentes regiones del país. Además, de la estrecha asociación entre el alelotipo *HLA-DRB1*15* y el desarrollo de la EM ($OR=2.15$; $P = 0.04$; $IC = 1.03-4.45$), se observó que su frecuencia del 12.71% en pacientes y del 6.35% en población sana (PS), es similar a su frecuencia observada en poblaciones de origen caucásico (12-20 %, Dean *et al.*, 2008), situación que también puede contribuir a la diferencia de alelotipos *HLA-DRB1** asociados a EM, determinados en nuestra población y los determinados en el centro del país. En otros estudios, se ha observado que el *HLA-DRB1*15* se transmite con mayor frecuencia, que otros alelotipo *HLA-DRB1** de una generación a otra (Dyment *et al.*, 2005; Barcellos *et al.*, 2006; Ramagopalan *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2010). Por lo cual, es probable que la frecuencia del *HLA-DRB1*15* en el Occidente de México continúe con su tendencia a la alza en los años venideros, favoreciendo un aumento en la incidencia y prevalencia de la EM, así como de otros trastornos también relacionados con dicho alelotipo.

Respecto a la asociación encontrada del *HLA-DRB1*09* con el riesgo a desarrollar EM con un valor OR de 6.6 ($P = 0.03$; $IC = 1.03-52.51$), es totalmente diferente a lo determinado en la población China; donde el alelotipo se relacionó con la protección a padecer EM (Wu *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2010). Esta diferencia se debe en mayor o menor grado al mestizaje de nuestra población, en comparación con la población China. Así, las frecuencias de los subtipos del alelotipo *HLA-DRB1*09* y los haplotipos de las personas que lo portan; en ambas poblaciones son diferentes y determinan la asociación del *HLA-DRB1*09* a desarrollar EM en nuestra población. Esta condición podría determinar la susceptibilidad a factores epigenéticos diferentes, si se compararan con los

de otras poblaciones en los que la enfermedad no se asocia ni positiva, ni negativamente con el alelotipo *HLA-DRB1*09*. Por otro lado, el aumento del tamaño de muestra podría proporcionar datos más robustos para poder determinar, si el *HLA-DRB1*10* (0 % en pacientes y 3.17 % en controle) puede relacionarse negativamente con la EM y constituir una condición de protección a padecer la enfermedad.

*Análisis de diplotipos HLA-DRB1**

El análisis de diplotipos *HLA-DRB1** permitió determinar a los genotipos *HLA-DRB1*15/*04* y *HLA-DRB1*04/*14*, como de riesgo a padecer EM en nuestra población; el *HLA-DRB1*04* en presencia de *HLA-DRB1*15* o de *HLA-DRB1*14*, constituye una epistasis sinérgica para el riesgo de desarrollar EM; al determinarse un valor *OR* de 6.23 ($P = 0.0046$; IC = 1.56-26.49) para el genotipo *HLA-DRB1*15/*04*; y un valor *OR* de 5.74 ($P = 0.02$; IC = 1.15-31.47) para el genotipo *HLA-DRB1*04/*14*. En otros estudios el genotipo *HLA-DRB1*15/*04* se ha asociado con características clínicas de la EM tales como: inicio temprano de la enfermedad y con una asociación negativa con la EMPP (Stankovich *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Por lo que, sería interesante corroborar estas observaciones en los individuos de nuestra población que padecen la enfermedad y portan este genotipo.

*Análisis por subgrupos de los diplotipos HLA-DRB1**

Por medio de este análisis, se pudo apreciar la tendencia de protección contra la EM de los alelotipos: *HLA-DRB1*01* (3.38 % en pacientes y 7.4 % en PS), *HLA-DRB1*07* (7.62 % en pacientes y 9.26 % en PS), *HLA-DRB1*10* (0 % en pacientes y 3.17 % en PS) y *HLA-DRB1*11* (3.38 % en pacientes y 5.82 % en PS) (Cuadro 10), lo cual concuerda con lo reportado en otras poblaciones del mundo (Dyment *et al.*, 2005; Barcellos *et al.*, 2006; Ramagopalan *et al.*, 2007) (ver Cuadro 5). Por otro lado, también se observó la similitud entre la población de pacientes y de personas sanas de los subgrupos *HLA-DRB1*01/X*, *HLA-DRB1*07/X*, *HLA-DRB1*10/X* y *HLA-DRB1*11/X*, la cual fue menor al 45 %.

*Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg del locus HLA-DRB1**

En este estudio encontramos que la población de pacientes cumple el equilibrio H-W, mientras, la población sana presenta desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. Este fenómeno sucede, cuando hay un déficit o exceso de individuos heterocigotos en la población de estudio, que es causado por el incumplimiento de alguno de los postulados de la población ideal; y se ha observado en varias poblaciones del mundo (Chen *et al.*, 1999; Arias-Murillo *et al.*, 2010). El déficit de heterocigotos sucede cuando en la población, no hay entrecruzamientos al azar entre sus integrantes, formando subpoblaciones divididas entre sí por: distancia, ríos, fallas geográficas, etc. (Hartl y Clark 1997). Esto concuerda con nuestros resultados, por que en la unidad de trasplantes del Centro Médico Nacional de Occidente, se atienden a personas de los diferentes estados y regiones que conforman únicamente al Occidente del país.

Perspectivas

El análisis del gen *HLA-DRB1** con resolución de cuatro dígitos y/o el análisis de haplotipos *HLA* clase II, permitiría determinar más alelotipos y/o haplotipos asociados con la EM, que complementarían los determinados en nuestra población a través de este trabajo. Condición que permitiría mejorar la diferenciación de las familias alélicas presentes en los diplotipos *HLA-DRB1*04/X* y asociarlos de forma más clara con los riesgos de padecer EM. Finalmente, este tipo de análisis podrían dar origen a nuevas estrategias terapéuticas, al determinar que genotipos se asocian con la evolución clínica de la EM, y cuáles factores epigenético podrían acelerarla o desacelerarla (Weatherby *et al.*, 2001; DeLuca *et al.*, 2007; Hoffmann *et al.*, 2008).

10. CONCLUSIONES

1. En la población analizada a través de este estudio, los alelotipos *HLA-DRB1*15* y *HLA-DRB1*09*; y los genotipos *HLA-DRB1*15/*04* y *HLA-DRB1*04/*14*, se asocian con el riesgo a desarrollar EM.
2. La asociación del *HLA-DRB1*15* con riesgo a padecer EM observado en nuestra población de estudio, es común a las otras poblaciones del mundo analizadas.
3. El efecto sinérgico del *HLA-DRB1*04*, en conjunto con *HLA-DRB1*15* o *HLA-DRB1*14*, que aumenta considerablemente el riesgo a padecer EM, es un hallazgo particular de nuestra población de estudio, por lo que debe ser mejor caracterizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Shammri S., Nelson R. F., Al-Muzairi I. y Akanji A. O. 2004. *HLA determinants of susceptibility to multiple sclerosis in an Arabian Gulf population*. Multiple Sclerosis 10:381-386.
- Aláez C, Corona T, Ruano L, Flores H, Loyola M y Gorodczyk C. 2005. *Mediterranean and Amerindian MHC class II alleles are associated with multiple sclerosis in Mexicans*. Acta Neurol Scand 112:317-322.
- Alter M y Olivares L. 1970. *Multiple sclerosis in Mexico. An epidemiologic study*. Arch Neurol 23:451-459.
- Alvarado-de la Barrera C, Zúñiga-Ramos J, Ruiz-Morales J.A, Estañol B, Granados J y Llorente L. 2000. *HLA class II genotypes in Mexican Mestizos with familial and nonfamilial multiple sclerosis*. Neurology 55:1897-1900.
- Alves-León S. V., Papais-Alvarenga R., Magalhães M., Alvarenga M., Thuler L. C. S., y Fernández y Fernández O. 2007. *Ethnicity-dependent association of HLA DRB1-DQA1-DQB1 alleles in Brazilian multiple sclerosis patients*. Acta Neurol Scand 115:306-311.
- Arias-Murillo R. Y., Jiménez-Castro M. Á., Ríos-Espinosa M. F., López-Rivera J. J., Echeverry-Coral S. J. y Martínez-Nieto O. 2010. *Analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allelic, genotypic, and haplotypic frequencies in colombian population*. Colomb Med 41:336-343.
- Barcellos L.F, Sawcer S, Ramsay P.P, Baranzini S.E, Thomson G, Briggs F, Cree B, Begovich A.B, Villosada P, Montalban X, Uccelli A, Savettieri G, Lincoln R.R, DeLoa C, Haines J.L, Percak-Vance M.A, Compston A, Hauser S.L y Oksenberg J. R. 2006. *Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis*. Hum Mol Gen 15:2813-2824.
- Belogurov A.A, Kurkova I.N., Friboulet A., Thomas D., Misikov V.K., Zakharova M.Y., Suchkov S.V., Kotov S.V., Alehin A.I., Avalle B., Souslova E.A., Morse III H.C., Gabibov A.G., y Ponomarenko N.A. 2008. *Recognition and Degradation of Myelin Basic Protein Peptides by Serum Autoantibodies: Novel Biomarker for Multiple Sclerosis*. J Immunol 180:1258-1267.
- Brassat, D., Salemi, G., Barcellos, L. F., McNeill, G., Proia, P., Hauser, S. L., Oksenberg, J. R. y Savettieri G. 2005. *The HLA locus and multiple sclerosis in Sicily*. Neurology 64:361-363.
- Black J.A., Newcombe J. y Waxman S.P. 2010. *Astrocytes within multiple sclerosis lesions upregulate sodium channel Nav1.5*. Brain 133:835-846.
- Cadavid D., Tang Y. y O'Neill G. 2010. *Sensibilidad de la escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) a la progresión de la enfermedad y la intervención terapéutica en las formas progresivas de la esclerosis múltiple*. Rev Neurol 51:321-329.
- Caillier S.J., Briggs F., Cree B.A.C., Baranzini S.E., Fernandez-Viña M., Ramsay P.P., Khan O., Royal III W, Hauser S.L., Barcellos L.F. y Oksenberg J.R. 2008. *Uncoupling the Roles of HLA-DRB1 and HLA-DRB5 Genes in Multiple Sclerosis*. J Immunol 181:5473-5480.
- Chao M.J., Barnardo M., Lincoln M.R., Ramagopalan S.V., Herrera B.M., Dymnt D.A., Montpetit A., Dossa Sadovnick A, Knight J.C. y Ebers G.C. 2008. *HLA class I alleles tag HLA-DRB1*1501 haplotypes for differential risk in multiple sclerosis susceptibility*. PNAS 105:13069-13074.

- Chao M. J., Herrera B. M., Ramagopalan S. V., Deluca G., Handunethi L., Orton S. M., Lincoln M. R., Sadovnick A. y Ebers G. 2010. *Parent-of-origin effects at the major histocompatibility complex in multiple sclerosis*. Hum Immunol 19:3679-3689.
- Chang A., Tourtellotte W.W., Rudick R. y Trapp B.D. 2002. *Premyelinating Oligodendrocytes in Chronic Lesions of Multiple Sclerosis*. N Engl J Med 346:165-173.
- Chen, J. J., Hollenbach, J. A., Trachtenberg, E. A., Just, J. J., Carrington, M., Ronningen, K. S., Begovich, A., King M., Mcweeny S., Mack S. J., Erlich H. A. y Thomson G. 1999. *Hardy-Weinberg testing for HLA class II (DRB1, DQA1, DQB1, AND DPB1) loci in 26 human ethnic groups*. Tissue Antigens 54:533-542.
- Coraddu F., Sawcer S., Feakes R., Chataway J., Broadley S., Jones H. B., Clayton D., Gray J., Smith S., Taylor C., Goodfellow P N. y Compston, A. 1998. *HLA typing in the United Kingdom multiple sclerosis genome screen*. Neurogenetics 2:24-33.
- Cordova J, Vargas S, Sotelo J. 2007. *Western and Asian features of multiple sclerosis in Mexican Mestizos*. Clin Neurol Neurosurg 109:146-151.
- Corona T y Flores J. 2009. *Esclerosis múltiple (EM) en América Latina*. Revista Española de Esclerosis Múltiple 1(12):5-8.
- Corona T, Rodríguez J.L, Otero E. y Stopp L. 1996. *Multiple sclerosis in Mexico. Epidemiology and clinical funding at the National Institute of Neurology and Neurosurgery (Mexico)*. Neurology (Español) 11:170-173.
- Cortes L., Baltazar L., Lopez-Cardona M., Olivares N., Ramos C., Salazar M., Sandoval L., Lorenz M., Chakraborty R., Paterson A. y Rivas F. 2004. *HLA class II haplotypes in Mexican systemic lupus erythematosus patients*. Hum Immunol 65:1469-1476.
- Cortes L., Baltazar L., Perea F., Gallegos-Arreola M. P., Flores S. E., Sandoval L., Olivares N., Lorenz M. G. O., Xu H., Barton S. A., Chakraborty R. y Rivas F. 2004. *HLA-DQB1, -DQA1, -DRB1 linkage disequilibrium and haplotype diversity in a Mestizo population from Guadalajara, Mexico*. Tissue Antigens 63:458-465.
- Craner M.J., Newcombe J., Black J.A., Hartle C., Cuzner M.L. y Waxman S.G. 2004. *Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: Altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger*. PNAS 101:8168-8173.
- Dean G., Yeo T., Goris A., Taylor C., Goodman R. S., Elian M., Galea-Debono A., Aquilina A., Felice A., Vella M. Sawcer S. y Compston, D.A.S. 2008. *HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Malta*. Neurology 70:101-105.
- De la Maza M, Garcia J, Bernal J, Fuentes M. 2000. *Revisión de la epidemiología de la esclerosis múltiple en México*. Rev Neurol 31:494-495.
- DeLuca G.C., Ramagopalan S.V., Herrera B.M, Dymnt D.A., Lincoln M.R., Montpetit A., Pugliatti M., Barnardo M.C.N., Risch N.J., Sadovnick A.D., Chao M., Sotgiu S., Hudson T.J. y Ebers G.C. 2007. *An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus*. PNAS 104:20896-20901
- Deschamps R., Patrel L., Jeannin S., Chausson N., Olindo S., Béra O., Bellance R., Smadja D., Césaire D. y Cabre P. 2011. *Different HLA class II (DRB1 and DQB1) alleles determine either*

susceptibility or resistance to NMO and multiple sclerosis among the French Afro-Caribbean population. Multiple Sclerosis 17:24-31.

Dittel B.N. 2008. *CD4 T Cells: Balancing the Coming and Going of Autoimmune-Mediated Inflammation in the CNS. Brain Behav Immun* 22:421-430.

Dutta R. y Trapp B.D. 2007. *Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. Neurology* 68 (Supl 3):22-31.

Dyment D.A, Herrera B.M, Cader M.Z, Willer C.J, Lincoln M.R, Sadovnick A.D, Rish N. y Ebers G.C. 2005. *Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. Hum Mol Gen* 14:2019-2026.

Ebers G.C. 2008. *Environmental factors and multiple sclerosis. Lancet Neurol* 7:268-277.

Fernández O., Fernández V., Alonso A., Caballero A., Luque G., Bravo M., Mayorga C. y Leyva L. 2004. *DQB1 * 0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. Journal of Neurology* 251:440-444.

Fernández O., R-Antigüedad A., Pinto-Mendel M. J., Mendibe M. M., Acosta N., Oliver B., Guerrero M., Papais-Alvarenga M., Fernández-Sánchez V. y Leyva L. 2009. *HLA class II alleles in patients with multiple sclerosis in the Biscay province (Basque Country, Spain). J Neurol* 256:1977-1988.

Fjæchter S., Klein T. y Pollak L. 2011. *Influence of histocompatibility genes on disease susceptibility and treatment response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon β -1a. Neurol Int* 3:e5.

Fleiss J. L., 1981. *Statistical Methods for Rates and Proportions*, segunda edición. Formulas 3.18 y 3.19. John Wiley & Sons, New York.

Frischer J.M., Bramow S., Dal-Bianco A., Lucchinetti C.F., Rauschka H., Schmidbauer M., Laursen H., Sorensen P.R. y Lassmann H. 2009. *The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain* 132:1175-1189.

Fukazawa T., Hamada T., Tashiro K., Moriwaka F., Yanagihara T. Sugiyama K. y Tsukada Y.1992. *HLA profiles of multiple sclerosis in Hokkaido, the northernmost island of Japan. Acta Neurol Scand* 86:517-520.

Fukazawa, T., Yamasaki, K., Ito, H., Kikuchi, S., Minohara, M., Horiuchi, I., Tsukishima, E., Sasaki H., Hamada T., Nishimura Y., Tashiro K. y Kira J. 2000. *Both the HLA-DPB1 and -DRB1 alleles correlate with risk for multiple sclerosis in Japanese: clinical phenotypes and gender as important factors. Tissue Antigens* 55:199-205.

Fusco C., Andreone V., Coppola G., Luongo V., Guerini F., Pace E., Florio C., Pirozzi G., Lanzillo R., Ferrante P., Vivo P., Mini M., Macri M., Orefice G. y Lombardi M.L. 2001. *HLA-DRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. Neurology* 57:1976-1979.

Fugger L, Friese M.A y Bell J.I. 2009. *From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. Nat Revs Immunol* 9:408-417.

Ghabae M., Bayati A., Saroukolaci S. A., Sahraian M. A., Sanaati M. H., Karimi P., Houshmand M., Sadeghian H. y Chelaviaper L. H. 2009. *Analysis of HLA DR2&DQ6 (DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602) Haplotypes in Iranian Patients with Multiple Sclerosis. Ccl Mol Neurobiol* 29:109-114.

- Goodin D.S. 2009. *The Causal Cascade to Multiple Sclerosis: A Model for MS Pathogenesis*. PlosOne 4:e4565.
- Górodezky C, Alaez C, Vázquez-García M.N, De la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Pérez-Luque E y Muñoz L. 2001. *The genetic Structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems and microsatellites*. Hum Immunol 62:979-991.
- Gorodezky, C., Najera, R., Rangel. B. E., Castro, L. E., Flores, J., Velázquez, G., Granados, J. y Sotelo J. 1986. *Immunogenetic profile of multiple sclerosis in Mexicans*. Human Immunology, 16:364-374.
- Goverman J. 2009. *Autoimmune T cell responses in the central nervous system*. Nat Rev Immunol 9:393-407.
- Guo S. W., y Thompson E. A. 1992. *Performing the Exact test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles*. Biometrics 48:361-372.
- Gustincich S, Manfoletti G.M, De Sai G, Schneider C y Carninci P. 1991. *Fast Method for High-quality genomic DNA Extraction from whole human blood*. Biotechniques 11:298-302.
- Hafler D.A, Compston A., Sawcer S., Lander E.S., Daly M.J., De Jager P.L., I.W. de Bakker P., Gabriel S.B., Mirel D.B., Ivinson A.J., Pericak-Vance M.A., Gregory S.G., Rioux J.D., McCauley J.L., Haines J.L., Barcellos L.F., Cree B., Oksenberg J.R. y Hauser S.L. 2007. *Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genome-wide Study*. N Engl J Med 357:851-862.
- Haider L., Fischer M.T., Frischer J.M., Bauer J., Höfberger R., Botond G., Esterbauer H., Binčar C.J., Witztum J.L. y Lassmann H. 2011. *Oxidative damage in multiple sclerosis lesions*. Brain 134:1914-1924.
- Hartl D. L. y Clark A. G. 1997. *Principles of Population Genetics* (Tercera Ed.). Pag. 111-162. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
- Hawkins S. A., Cullen C., Middleton D., y Morrow J. I. 1990. *HLA antigens and multiple sclerosis in Northern Ireland*. Irish J Med Sci 159:68-70.
- Hoffmann S., Cepok S., Grummel V., Lehmann-Horn K, Hackermueller J., Stadler P.F., Hartung H.P., Berthele A., Deisenhammer F., Wasmuth R. y Hemmer B. 2008. *HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 Are Strongly Associated with the Development of Antibodies against Interferon- β Therapy in Multiple Sclerosis*. Am J Hum Gen 83:219-227.
- Holdsworth R., Hurley C. K., Marsh S. G. E., Lau M., Noreen H. J., Kempnich J. H., Setterholm M. y Maier M. 2009. *The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens*. Tissue Antigens 73:95-170.
- Imitola J., Chitnis T. y Khoury S.J. 2006. *Insights Into the Molecular Pathogenesis of Progression in Multiple Sclerosis Potential Implications for Future Therapies*. Arch Neurol 63:25-33.
- IMSS. *La Esclerosis Múltiple, Primera Causa de Incapacidad en Mujeres Adultas Jóvenes*. BOLETÍN IMSS. 2007 Jueves 7 de Junio;Sect. 1.
- Ingram G., Hakobyan S., Robertson N.P. y Morgan B.P. 2008. *Complement in multiple sclerosis: its role in disease and potential as a biomarker*. Clin Exp Immunol 155:128-139.

Invitrogen™. 2008. RELI™ SSO HLA-DRB TYING Kit Instructions for use. Impresión 10.08 Revisión 012.

Kalanie H., Kamgooyan M., Sadeghian H. y Kalanie A. R. 2000. *Histocompatibility antigen (HLA) associations with multiple sclerosis in Iran*. Multiple Sclerosis 6:317-319.

Kankonkar S., Jayanti G., Singhal B. S., y Shankarkumar U. 2003. *Evidence for Novel DRB1 * 15 Allele Association Among Clinically Definite Multiple Sclerosis Patients From Mumbai, India*. Hum Immunol 64:478-482.

Karni A., Kohn Y., Abramsky O., Barcellos L., Kahana E., Karussis D., Chapman J. y Brautbar C. 1999. *Evidence for the genetic role of human leukocyte antigens in low frequency DRB1 * 1501 multiple sclerosis patients in Israel*. Multiple Sclerosis 5:410-415.

Kwon O. J., Karni A., Israel S., Brautbar C., Amar A., Meiner Z., Abramsky O. t Karussis D. 1999. *HLA Class II Susceptibility to Multiple Sclerosis Among Ashkenazi and Non-Ashkenazi Jews*. Arch Neurol 56:555-560.

Ligers A., Dymont D. A., Willer C. J., Sadovnick A. D., Ebers G., Risch N. y Hillert J. 2001. *Evidence of linkage with HLA-DR in DRB1*15-negative families with multiple sclerosis*. Am J Hum Gen 69:900-903.

Lincoln M. R., Montpetit A., Cader M. Z., Saarela J., Dymont D. A., Tiislar M., Ferretti V., Tienari P. J., Sadovnick A. D., Peltonen L., Ebers G. C. y Hudson T.J. 2005. *A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis*. Nat Gen 37:1108-1112.

Lincoln M.R., Ramagopalan S.V., Chao M.J., Herrera B.M., DeLuca G.C., Orton S.M., Dymont D.A., Sadovnick A.D. y Ebers G.C. 2009. *Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility*. PNAS 106:7542-7547.

Lovato L., Willis S.N., Rodig S.J., Caron T., Almendinger S.N., Howell O.W., Reynolds R., O'Connor K.C. y Hafler D.A. 2011. *Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis*. Brain 134:534-541.

Ludwin S.K. 2006. *The Pathogenesis of Multiple Sclerosis: Relating Human Pathology to Experimental Studies*. J Neurophathol Exp Neurol 65:305-318.

Luetic G. 2008. *MS in Latin America*. Int MS J 15:6-11.

Marrosu, M. G., Murru, M. R., Costa, G., Murru, R., Muntoni, F., & Cucca, F. 1998. *DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population*. Hum Mol Gen 7:1235-1237.

Marsh S. G. E., Albert E. D., Bodmer W. F., Bontrop R. E., Dupont B., Erlich H. A., Fernández-Viña M., Geraghty D. E., Holdsworth R., Hurley C. K., Lau M., Lee K.W., Mach, B., Majers M., Müller R. C., Parham P., Petersdorf E.W., Sasazuki T., Strominger J. L., Svejgaard A., Terasaki P. I., Tiercy J. M., y Trowsdale J. 2010. *Nomenclature for factors of the HLA system, 2010*. Tissue Antigens 75:291-455.

McDowell T.Y., Amr S., Langenberg P., Royal W., Bever C., Culpepper W.J. y Bradham D.D. 2010. *Time of Birth, Residential Solar Radiation and Age at Onset of Multiple Sclerosis*. Neuroepidemiology 34:238-244.

- Miller S.A, Dykes D.D, Polesky H.F. 1988. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res 16:1215.
- Müllis K.B y Faloona F.A. 1987. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol. 155:335-350.
- Murray T.J. 2006. *Diagnosis and treatment of multiple sclerosis*. BMJ 332:525-527.
- Musse A.A., Boggs J.M. y Harauz G. 2006. *Deimination of membrane-bound myelin basic protein in multiple sclerosis exposes an immunodominant epitope*. PNAS 103:4422-4427.
- Noteworthy J.H, Lucchinetti C, Rodriguez M. y Weinshenker B.G. 2000. *Multiple Sclerosis*. N England J Med 343:938-952.
- Nunes E., Heslop H., Fernandez-Vina M., Taves C., Wagenknecht D. R., Eisenbrey A. B., Fischer G., Poulton K., Wacker K., Katovich C., Noreen H. y Sacchi N. 2011. *Definitions of histocompatibility typing terms: Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working Group*. Hum Immunol 72:1214-1216.
- Oksenberg J.R., Baranzini S.E., Sawcer S. y Hauser S.L. 2008. *The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis*. Nat Rev Gen 9:516-526.
- Oksenberg J. R., Barcellos L. F., Cree B. A. C., Baranzini S. E., Bugawan T. L., Khan O., Lincoln R. R., Swerdlm A., Mignot E., Lin L., Goodin D., Erlich, H., A., Schmidt S., Thomson G., Reich D. E., Pericak-Vance M. A., Haines J. L. y Hauser S. L. 2004. *Mapping Multiple Sclerosis Susceptibility to the HLA-DR Locus in African Americans*. American J Hum Gen 74:160-167.
- Oksenberg J.R. y Hauser S.L. 2005. *Genetics of Multiple Sclerosis*. Neurol Clin 23:61-75.
- Ono T., Zambenedetti M. R., Yamasaki K., Kawano Y., Kamikawaji N., Ito H., Sakurai M., Nishimura Y., Kira J., Kanazawa I. y Sasazuki T. 1998. *Molecular analysis of HLA class I (HLA-A and -B) and HLA class II (HLA-DRB1) genes in Japanese patients with multiple sclerosis (Western type and Asian type)*. Tissue Antigens 52:539-542.
- Pastorino R., Menni C., Barca M., Foco L., Saddi V., Gazzaniga G., Ferrai R., Mascaretti L., Dudbridge F., Berzuini C., Murgia S. B., Piras M. L., Ticca A., Bitti P. P. y Bernardinelli L. 2009. *Association between Protective and Deleterious HLA Alleles with Multiple Sclerosis in Central East Sardinia*. PLoS ONE 4:e6526.
- Pathak S. y Palan U. 2005. *Immunology: Essential and Fundamental second edition*. Pag. 131-151. Science Publishers, Inc. India.
- Patrucco L., Larriba J., Redal M. A., Rojas J. I., Argibay P. F. y Cristiano E. 2009. *HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Argentina*. Eur J Neurol 16:427-429.
- Peterson L.K. y Fujinami R.S. 2007. *Inflammation, Demyelination, Neurodegeneration and Neuroprotection in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis*. J Neuroimmunol. 184:37-44.
- Pina M. A., Ara J. R., Lasierra P., Modrego P. J., y Larrad L. 1999. *Study of HLA as a predisposing factor and its possible influence on the outcome of multiple sclerosis in the Sanitary District of Calatayud, Northern Spain*. Neuroepidemiology, 18:203-209.
- Polman C.H., Reingold S.C., Edan G., Filippi M., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D. Metz L.M., McFarland H.F., O'Connor P.W., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Weinshenker B.G. y.

Wolinsky J.S. 2005. *Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the "McDonald Criteria"*. *Ann Neurol* 58:840–846.

Porras-Betancourt M, Núñez-Orozco L, Plascencia-Aguilar S. y Sauri-Suárez S. 2007. *Esclerosis múltiple*. *Rev Mex Neuroci* 8:57-66.

Qiu W., James I., Carroll W. M., Mastaglia F. L. y Kermod A. G. 2010. *HLA-DR allele polymorphism and multiple sclerosis in Chinese populations: a meta-analysis*. *Multiple Sclerosis* 17:382-388.

Ramagopalan S.V., Link J., Byrnes J.K., Dymment D.A., Giovannoni D., Hintzen R.Q., Sundqvist E., Kockum I., Smestad C., Lie B.A., Harbo H.F., Padyukov L., Alfredsson L., Olsson T., Sadovnick A.D., Hillert J. y Ebers G.C. 2009a. *HLA-DRB1 and month of birth in multiple sclerosis*. *Neurology* 73:2107-2111.

Ramagopalan S.V., Maugeri N.J., Handunnetthi L., Lincoln M.R., Orton S.M., Dymment D.A., DeLuca G.C., Herrera B.M., Chao M.J., Sadovnick A.D., Ebers G.C., Knight J.C. 2009b. *Expression of the Multiple Sclerosis-Associated MHC Class II Allele HLA-DRB1*1501 Is Regulated by Vitamin D*. *PLoS Gen* 5:e1000369.

Ramagopalan S.V., Morris A.P., Dymment D.A., Herrera B.M., DeLuca G.C., Lincoln M.R., Orton S.M., Chao M.J., Sadovnick A.D. y Ebers G.C. 2007. *The Inheritance of Resistance Alleles in Multiple Sclerosis*. *PLoS Gen* 3:e150.

Ramagopalan S.V. y Ebers G.C. 2009a. *Epistasis Multiple sclerosis and major histocompatibility complexity*. *Neurol* 72:566-567.

Ramagopalan S.V. y Ebers G.C. 2009b. *Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation*. *Genome Medicine*. 1:105.

Ramos-Cejudo J. y Oreja-Guevara C. 2010. *El papel de las células Th-17 en la esclerosis múltiple*. *Rev Española de Esclerosis Múltiple* 2:5-12.

Rinker y Cross. 2007. *Diagnosis and Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis*. *Continuum Lifelong Learning Neurol* 13:13–34.

Rose J.W. y Carlson N.G. 2007. *Pathogenesis of Multiple Sclerosis*. *Continuum Lifelong Learning Neurol* 13(5):35–62.

Rousset F., y Raymond M. 1995. *Testing Heterozygote Excess and Deficiency*. *Genetics* 140:1413–1419.

Rojas O.L, Rojas-Villarraga A, Cruz-Tapia P, Sánchez J.L, Suárez-Escudero J.C, Patarroyo M.A. y Anaya J.M. 2010. *HLA class II polymorphism in Latin American Patients with multiple sclerosis*. *Autoimmunity Reviews* 9:407-413.

Schmidt H., Williamson D., y Ashley-Koch A. 2007. *HLA-DR15 Haplotype and Multiple Sclerosis: A HuGE Review*. *Am J Epidemiol* 165:1097-1109.

Serada S., Fujimoto M., Mihara M., Koike N., Ohsugi Y., Nomura S., Yoshida H., Nishikawa T., Terabe F., Ohkawara T., Takahashi T., Ripley B., Kimura A., Kishimoto T. y Naka T. 2008. *IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *PNAS* 105:9041-9046.

- Silva A. M., Bettencourt A., Pereira C., Santos E., Carvalho C., Mendonça D., Costa P. P., Monteiro L. y Martins B. 2009. *Protective role of the HLA-A* 02 allele in Portuguese patients with multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis 15:771-774.
- Smestadå C., Brynedalb B., Jonasdottirc G., Lorentzena Å. R., Mastermanb T., Åkessonb E., Spurklände A., Lie B. A., Palmgren J., Celiusa E. G., Hillert J. y Harbo H. F. 2007. *The impact of HLA-A and -DRB1 on age at onset, disease course and severity in Scandinavian multiple sclerosis patients*. Eur J Neurol 14:835-840.
- Sombekke M. H., Lukas C., Crusius J. B. A., Tejedor D., Killestein J., Arteta D., Martínez A., Uitdehaag B. M. J., Knol D. L., Salvador-Peña A., Geurts J. J. G., De Jager P. L., Barkhof F., Vrenken H. y Polman C. 2009. *HLA-DRB1*1501 and Spinal Cord Magnetic Resonance Imaging Lesions in Multiple Sclerosis*. Arch Neurol 66:1531-1537.
- Sotgiu S., Pugliatti M., Fois M.L., Arru G., Sanna A., Sotgiu M.A. y Rosati G. 2004. *Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis*. Neurobiol Dis 14:131-143.
- Stankovich J., Butzkueven H., Marriott M., Chapman C., Tubridy N., Tait B. D., Varney M. D., Taylor B. V., Foote S. J., Kilpatrick T. J. y Rubio J. P. 2009. *HLA-DRB1 associations with disease susceptibility and clinical course in Australians with multiple sclerosis*. Tissue Antigens 74:17-21.
- Staples J., Ponsonby A.L. y Lim L. 2010. *Lowmaternal exposure to ultraviolet radiation in pregnancy, month of birth, and risk of multiple sclerosis in offspring: longitudinal analysis*. BMJ 340:c1640.
- Steinman L. 2009. *A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis*. Nat Rev Immunol 9:440-447.
- Stewart G. J., Teutsch S. M., Castle M., Heard R. N., y Bennetts B. H. 1997. *HLA-DR, -DQA1 and -DQB1 associations in Australian multiple sclerosis patients*. Eur J Immuno gen 24:81-92.
- Vargas-Alarcón G., Granados J., Rodríguez-Pérez J., Parga C., Pérez-Hernández N., Rey D., Zúñiga J y Arnaiz-Villena A. 2010. *Distribution of HLA class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizo population: Comparison with other populations*. Immunol Inves 39:268-283.
- Velázquez M., López-Prieto, Márquez J.C, Rivera-Castaño M. y Vargas-Myrna L. 2002. *Características epidemiológicas de la esclerosis múltiple en un estado fronterizo con los Estados Unidos de Norteamérica*. Arch Neurocién (Mex) 7:147-150.
- Velázquez-Quintana M, Macías-Islas M.A, Rivera-Olmos V. y Lozano-Zárte J. 2003. *Esclerosis múltiple en México: un estudio multicéntrico*. Rev Neurol 11:1019-1022.
- Villoslada P., Barcellos L. F., Rio J., Begovich A. B., Tintore M., Sastre-Garriga J., Baranzini S. E., Casquero P., Hauser S., Montalban X. y Oksenberg J. 2002. *The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon-beta*. J Neuroimmunol 130:194-201.
- Weatherby S. J. M., Thomson W., Pepper L., Donn R., Worthington J., Mann C. L. A., Davies M. B., Frycr A. A., Boggild M. D., Young C. A., Jones P. W., Strange R. C. Ollier W. E. R. y Hawkins C. P. 2001. *HLA-DRB1 and disease outcome in multiple sclerosis*. J Neurol 248:304-310.
- Wu X., Wang C., Zhang K., Lin A., Kira, J., Hu G., Qu X., Xiong Y., Cao W., y Gong L. 2009. *Association of susceptibility to multiple sclerosis in Southern Han Chinese with DPB1 haplotypes: distinct from other populations*. Multiple Sclerosis 15:1422-1430.

Wu J., Qiu W., Castley A., James I., Mastaglia F. L., Christiansen F. T., Carroll M., Joseph J. y Kermode A. G. 2010. *Modifying effects of HLA-DRB1 allele interactions on age at onset of multiple sclerosis in Western Australia*. Multiple Sclerosis 16:15-20.

www.atlasofms.org, 2007. Consultado el 12/05/2011.

www.hla.alleles.org, 2012. Consultado el 15/01/2012.

Zabay-becerril J. M., Burcet-dardé J., Mulet-ferrer J., Soler-farré J. y Viader-farré C. 2004. *Relación entre el alelo HLA-DRB1 * 1501 y la gravedad de la esclerosis múltiple en una muestra de población española perteneciente a las Islas Baleares: influencia del sexo*. Rev Neurol 38:118-122.

Zhou D., Srivastava R., Nessler S., Grummel V., Sommer N., Bru W., Hartung H.P., Stadelmann C. y Hemmer B. 2006. *Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis*. PNAS 103:19057-19062.

ANEXOS

Anexo I: Extracción de DNA

Obtención y purificación de DNA por método combinado Miller-Gustincich.

- a) Obtención de leucocitos de sangre periférica por macrométodo (Miller *et al.*, 1988):

Procedimiento:

1. Tomar 5 ml de sangre periférica en un tubo con anticoagulante. Pasar la muestra a un tubo de plástico de 50 ml.
 2. Agregar 15 ml de la solución para lisis de eritrocitos ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 10:1). Mezcla suavemente y refrigerar a 4°C por 10 min.
 3. Centrifugar a 3,900 rpm por 15 min y decantar el sobrenadante.
 4. Resuspender el botón de leucocitos con 10 ml de solución para lisar eritrocitos y centrifugar a 3,900 rpm por 15 min.
 5. Decantar el sobrenadante y repetir desde el paso 4, hasta que el botón de leucocitos quede blanco.
- b) Obtención del DNA a partir del botón de leucocitos por micrométodo (Gustincich *et al.*, 1991).

Procedimiento:

- 1- Pasar la pastilla de leucocitos a un microtubo de 2.0 ml previamente rotulado.
- 2- Añadir 750 µl de buffer de lisis DTAB y mezclar suavemente.
- 3- Incubar durante 5 min. a 68°C.
- 4- Retirar los tubos de la incubación e inmediatamente añadir 550 µl de cloroformo, tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 5 min.
- 5- Centrifugar por 15 min. a 13,000 rpm. (se formarán tres capas) y recuperar el sobrenadante en microtubo de 1.5 ml, con el cuidado de no tomar nada de la fase intermedia y/o basal.
- 6- Adicionar 100 µl de solución CTAB y mezclar suavemente. Luego añadir 750 µl de agua inyectable fría y agitar suavemente hasta que precipite el DNA.
- 7- Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min y decantar el sobrenadante suavemente.

- 8- Añadir 100 µl de NaCl 1.2 M más 1 ml de etanol absoluto frío y mezclar suavemente hasta desprender el botón de AND.
- 9- Centrifugar a 5,000 rpm por 5 min. y decantar.
- 10- Añadir 1,000 ml de etanol al 70% y mezclar suavemente hasta desprender el botón de AND.
- 11- Centrifugar a 5,000 rpm por 5 min. y decantar el sobrenadante.
- 12- Repetir los pasos 10 y 11 dos veces.
- 13- Permitir que la pastilla de DNA se seque a temperatura ambiente destapando el microtubo y cubriéndolo con una gasa estéril.
- 14- Añadir 300 µl de solución TE y agitar hasta desprender el botón de DNA e incubar a 36°C por 12 horas.
- 15- Agitar suavemente el DNA resuspendido y refrigerar a 4°C hasta su procesamiento

Preparación de soluciones

Buffer para lisar eritrocitos

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
NH ₃ Cl	0.144 M
NH ₄ HCO ₃	0.01 M

Procedimiento:

Tomar un volumen de solución de NH₄HCO₃, por cada nueve volúmenes de solución de NH₃Cl y agitar suavemente hasta que la nueva solución se homogenice. Pasar el buffer a un recipiente para su etiquetado y almacenamiento en refrigeración.

Buffer de lisis DTAB (bromuro de dodeciltrimetilamonio)

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
Tris	0.1 M
EDTA	0.5 M
NaCl	1.2 M.
DTAB	8% p/v

Procedimiento:

En material estéril disolver el Tris lentamente en la mitad del volumen final, con agua desionizada y ajustar el pH a 8.6. Añadir el EDTA lentamente hasta disolver, de la misma forma disolver el NaCl y el DTAB. Aforar al volumen determinado y pasar la solución a un recipiente para su etiquetado; y almacenamiento en refrigeración.

Buffer CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
NaCl	0.4 M.
CTAB	5% p/v

Procedimiento:

En material estéril disolver el NaCl en ½ del volumen final con agua desionizada. Añadir el CTAB lentamente hasta disolver y aforar al volumen determinado. Pasar la solución a un recipiente para su etiquetado y almacenamiento a temperatura ambiente.

Solución de cloruro de sodio

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
NaCl	1.2 M.

Procedimiento:

En material estéril disolver el NaCl en ½ de volumen final con agua desionizada y aforar al volumen determinado, para pasar la solución un recipiente. Etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer TE (buffer para resuspender el DNA)

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
Tris	0.01 M
EDTA	0.001 M

Procedimiento:

En material estéril disolver el Tris lentamente en la mitad del volumen final con agua desionizada. Agregar el EDTA lentamente hasta disolver y ajustar el pH a 7.5. Aforar al volumen determinado y pasar la solución a un recipiente de mayor volumen para su esterilización en autoclave. En varios envases etiquetados tomar alícuotas de la solución estéril y almacenarlos en refrigeración.

Anexo II: Electroforesis en gel de agarosa

Gel de agarosa al 1%

1. Pesar la agarosa de acuerdo al volumen del molde a utilizar.
2. En solución TBE 1X (volumen determinado para el gel) fundir la agarosa con calor, en recipiente del doble de volumen, hasta observar una solución cristalina.
3. Bajar la temperatura hasta 60°C y añadir 1 µl de la dilución de SYBER-SAFE® por cada ml de gel. Agitar hasta homogenizar el SYBER-SAFE® en el gel. Vaciar el gel al molde evitando la formación de burbujas y colocar los peines del molde.
4. Cubrir el gel de la luz y dejar reposar hasta que solidifique (de 30-45 min) a temperatura ambiente.
5. Una vez gelificada la agarosa retirar los peines y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis (orientando los pozos hacia el polo negativo de la cámara).

Electroforesis

1. Llenar la cámara de electroforesis hasta cubrir totalmente el gel de agarosa con buffer TBE 1X.
2. Tomar 5 µl de DNA total y mezclarlos con 5 µl de buffer de carga. Tomar los 10 µl resultantes y colocarlos en uno de los pozos del gel (repetir el procedimiento por cada muestra a analizar).
3. Colocar la tapa de la cámara de electroforesis y conectarla a la fuente de poder.
4. Correr el gel cargado con las muestras a 60 volts por una hora 30 min.
5. Visualizar el DNA con un transiluminador de luz UV.

Preparación de soluciones:

Buffer TBE 10x

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
EDTA	0.02 M
Tris	0.89 M
Ácido Bórico	0.89 M

Procedimiento:

Disolver lentamente el Tris en la mitad del volumen final en agua destilada o bidestilada. Agregar el ácido bórico lentamente hasta que se disuelva. Añadir el EDTA lentamente hasta que se disuelva y aforar al volumen determinado. Pasar la solución a un recipiente opaco o en uno envuelto con papel aluminio. Etiquetar el recipiente y almacenarlo en refrigeración.

Buffer de corrimiento (buffer TBE 1x)

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
Buffer TBE 10X	10% v/v
Agua destilada	90% v/v

Procedimiento:

Tomar una porción de volumen de buffer TBE 10X y mezclarla con nueve porciones de volumen de agua destilada. Pasar la solución a un recipiente, etiquetarlo y almacenarlo en refrigeración.

Dilución de SYBER-SAFE® (1:20)

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
SYBER SAFE®	5% v/v
Agua inyectable	95% v/v

Procedimiento:

En cuarto oscuro tomar el volumen determinado de SYBER-SAFE® y colocarlo en un microtubo envuelto con papel aluminio. Añadir el volumen determinado de agua y mezclar suavemente para homogenizar la dilución. Colocar el microtubo en un recipiente opaco etiquetado para su almacenamiento a temperatura ambiente.

Jugo azul 6x (buffer de carga)

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
Azul de bromofenol	0.25% p/v
Xilen-cianol	0.25% p/v
Glicerol	30.0% v/v

Procedimiento:

Mezclar en un tubo de plástico con ayuda del vortex el glicerol y los colorantes hasta que se homogenicen los colorantes en el glicerol. Finalmente, aforar con agua inyectable y mezclar con el vortex hasta obtener un homogenizado completo en toda la solución. Luego, pasar alícuotas del buffer a varios tubos de plástico, etiquetarlos y almacenarlos a temperatura ambiente.

Anexo III: Espectrofotometría de luz UV

Procedimiento:

Colocar 5 μ l de la muestra de DNA en una celda de cuarzo conteniendo 1 ml de agua destilada, mezclar suavemente y leer a 260 y 280 nm. Mediante la aplicación de la siguiente fórmula se determina la concentración del DNA:

- $\text{DNA ng/ml} = \text{DO } 260 \text{ nm} \times \text{dilución (1005 / 5 } \mu\text{l)} \times 50 \text{ (factor constante)}$.
- 50 es el coeficiente de extinción molar de 50 ng/ml de DNA que tienen la máxima absorbancia de 1.0 unidad de densidad óptica (DO) a 260 nm.

Para determinar la pureza del DNA (cantidad de proteínas), el valor de la relación DO 260 nm/DO 280 nm debe ser de 1.8 a 2.0 para considerarse satisfactoria.

Anexo IV: Prueba RELI™ SSO HLA-DRB TYING Kit

Procedimiento:

A) PCR

1. Agregar a un tubo de 0.5 ml; 15 µl de solución de MgCl₂ (6.0 mM), 30 µl de Mastermix y 15µl de ADN, con una concentración de 13-15 ng/µl.
2. Pasar las muestras a un termociclador y realizar la PCR con los siguientes parámetros:

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	15 segundos
Hibridación	60°C	45 segundos
Elongación	72°C	15 segundos
35 ciclos		
Elongación final	72°C	5 minutos
Enfriamiento	15°C	-----

3. Añadir a cada muestra 60µl de solución desnaturalizante e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Nota: El amplicon desnaturalizado, se puede almacenar a -20°C por 3 meses.

B) Prueba de hibridación

1. Colocar las tiras en bandejas y añadir 5 ml de buffer de hibridación (precalentado a 50°C).
2. Añadir 70 µl de amplicon desnaturalizado, tapar la bandeja e incubar por 30 minutos a 50°C (con agitación suave).
3. Descartar el líquido y añadir 5 ml de buffer de lavado; inmediatamente, agitar suavemente por 45 segundos y descartar el líquido.
4. Añadir 5 ml de buffer de lavado (precalentado a 50°C), tapar la bandeja e incubar 15 minutos a 50°C (agitando vigorosamente).

Nota: los siguientes pasos se realizan en agitación suave.

5. Descartar el líquido, añadir 5ml de solución de conjugado, tapar la bandeja e incubar por 5 minutos.

6. Descartar el líquido y enjuagar con agua. Añadir 5 ml de buffer de lavado, tapar la bandeja e incubar por 5 minutos.
7. Repetir el paso 5 y 6.
8. Descartar el líquido, añadir 5 ml de buffer de citrato, tapar la bandeja e incubar por 5 minutos.
9. Descartar el líquido, añadir 5 ml de sustrato, tapar la bandeja e incubar 10 minutos.
10. Descartar el líquido, añadir 5 ml de agua des-ionizada, tapar la bandeja e incubar 5 minutos.
11. Repetir dos veces el paso 10
12. Descartar el líquido y añadir 5 ml de buffer de citrato.

Nota: la tira con el sustrato puede almacenarse a 8°C por 3 días

C) Revelado de la tira

1. Pasar la tira a una bandeja, añadir 10 ml de etanol al 70% y tapar la bandeja. Luego agitar suavemente por un minuto. Finalmente, descartar el líquido.

Nota: si la tira no se coloreo de bandas azules, repetir el proceso.

Preparación de soluciones:

Nota: de los reactivos necesarios para realizar las soluciones, solo el agua desionizada no es producto de catálogo.

Buffer de hibridación (para 50 pruebas)

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Agua desionizada	275 ml
SSPE concentrado	71 ml
SDS concentrado	9 ml

Procedimiento:

En un envase agregar los reactivos en el orden de la lista y mezclar hasta homogenizar la solución. Etiquetar el recipiente y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de lavado (para 50 pruebas)

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Agua des-ionizada	1228.5 ml
SSPE concentrado	65 ml
SDS concentrado	6.5 ml

Procedimiento:

En un envase agregar los reactivos en el orden de la lista, mezclar hasta homogenizar la solución. Etiquetar el recipiente y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de citrato (para 50 pruebas)

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Agua des-ionizada	570 ml
Concentrado de citrato	30 ml

Procedimiento:

En un envase agregar los reactivos en el orden de la lista, mezclar hasta homogenizar la solución. Etiquetar el recipiente y almacenar a temperatura ambiente.

Solución de conjugado (para 50 pruebas)

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Agua des-ionizada	276 ml
Streptavidina HRP	832 μ l

Procedimiento:

En un envasé agregar los reactivos en el orden de la lista, mezclar hasta homogenizar la solución.

Nota: la solución pierde su actividad después de 15 minutos de su elaboración.

Sustrato (para 50 pruebas)

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Sustrato A	228.8 ml
Sustrato B	57.2 μ l

Procedimiento:

En un envasé agregar los reactivos en el orden de la lista, mezclar hasta homogenizar la solución. Etiquetar el envasé y almacena a temperatura ambiente en cuarto oscuro.

Nota: la solución se puede utilizar tres horas después de su elaboración.