



11233

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA

287775

CARACTERIZACIÓN DE ALELOS HLA EN LA ESCLEROSIS
MÚLTIPLE EN PACIENTES MESTIZOS MEXICANOS

T E S I S

PARA OBTENER EL POSGRADO DE:
NEUROLOGÍA
PRESENTA:
DR. LUIS ÁNGEL RUANO CALDERÓN

TUTORAS: DRA. TERESA CORONA VÁZQUEZ
DRA. CLARA GORODEZKY

CO-AUTORES: M. EN C. CARMEN ALAEZ
QBP MANUEL ARROYO



MEXICO, D.F.

FEBRERO 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

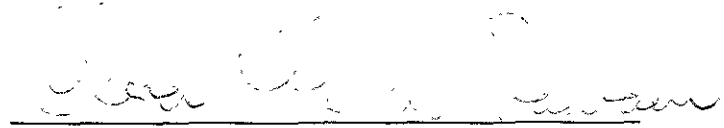
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tutoras de Tesis

Dra Teresa Corona




Dra Clara Gorodezky



Directora de Enseñanza

Dra. Teresa Corona





INSTITUTO NACIONAL
DE NEUROLOGIA Y
NEUROCIQUIRIA
DIRECCION DE ENSEÑANZA

Agradecimiento a CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por apoyo parcial

LAS DETERMINACIONES MOLECULARES DEL PRESENTE ESTUDIO SE LLEVARON A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOGENÉTICA DEL INdRE BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. CLARA GORODEZKY.

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres y hermanos,
A quienes debo este logro, por su apoyo incondicional.

A la Dra. Teresa Corona Vazquez,
Por la confianza y apoyo en estos tres años en el I.N.N.N.

A los médicos de base el I.N.N.N.,
Por sus enseñanzas.

A la Dra. Clara Gorodezky,
Por el gran apoyo y ayuda para realizar esta tesis y por darme la oportunidad de conocer el inmenso e interesantísimo campo de la investigación inmunogenética.

A la M en C Carmen Alaez,
Por la gran ayuda en el análisis de los datos de esta tesis.

A la Dra. Miriam Vázquez García,
Por su ayuda en las determinaciones moleculares.

Al M en C Hilario Flores,
Por su ayuda en el análisis estadístico de los datos de esta tesis.

Al resto del personal a cargo de la Dra. Gorodezky, en especial al Sr. Arturo Hernández y al Sr Lucas (mi primer contacto con los laboratorios del InDRE), a la QFB Andrea Munguia Saldaña (por su tolerancia y por ser mi primer “maestra” del InDRE) y por supuesto a todos los demás (QBP Blanca Ibarrola, QBP Manuel Arroyo, QBP Rosa Toribio, Enna Moreno, la Sra. Felicitas, etc, etc, ect....).

A la Dra. Mariana Loyola Zarate,
Por ayudarme en las determinaciones y por su amistad.

Al Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán,
Por mis bases y principios como Internista.

A los pacientes,
Incluidos y no en este estudio, por ser... “pacientes”.

RESUMEN.

Se realizó la determinación molecular a nivel de alelo de los genes clase I y clase II del HLA de 51 pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de Esclerosis Múltiple para conocer su influencia en la presentación, manifestaciones, evolución y pronóstico de la enfermedad. Se integró además un grupo control con 170 testigos sanos. En todos los pacientes se tomó en cuenta sus características epidemiológicas y las características clínicas de su patología, además a todos se les tomó una muestra de sangre periférica para determinación del grupo sanguíneo ABO, los genes clase I por microlinfocitotoxicidad y los genes clase II por PCR-SSOP.

De los 51 pacientes el 55% eran mujeres; la edad promedio de todos los pacientes fue 36 años (18-61), de las características epidemiológicas llamó la atención la escolaridad ya que 92% de los pacientes tenían al menos la primaria, 59% más de secundaria y 26% con licenciatura o postgrado. Clínicamente el 82% inició con manifestaciones antes de los 40 años; el síntoma inicial fue motor en el 37% y la forma clínica más frecuente fue brote-remisión en el 67% de los casos.

En el grupo sanguíneo no se encontró ningún paciente con grupo B, observándose una compensación de esta falta de B en los grupos A y AB, lo cual se interpretó como un dato que apoya un mayor componente étnico de origen blanco en el grupo de pacientes. Se encontró una asociación de susceptibilidad franca con el DRB1*0403 predominantemente con la forma brote-remisión. No se estableció una asociación de protección franca, aunque si se sugiere probable protección con genes DRB1*1402 y DRB1*1406 de origen amerindio.

Se concluyó que la contribución genética en la expresión de la EM en pacientes mestizos mexicanos es de origen caucasoide de ancestros mediterráneos más que nórdicos, con una probable protección dependiente de genes de origen amerindio.

INDICE.

Agradecimientos.....	I
Resumen	II
Indice	III
I - Introducción	1
II - Antecedentes.....	1
2.1) Aspectos históricos.....	1
2.2) Curso clínico y subdivisiones.....	2
2.3) Síntomas iniciales.....	3
2.4) Diagnóstico.....	6
2.5) Fisiopatología.....	8
2.5.1) Hipótesis de autoinmunidad	8
2.5.1.1) Papel de linfocitos Th CD4+ vs los TC CD8+.....	10
2.5.1.2) Macrófagos y microglia	11
2.5.1.3) Astrocitos.....	12
2.5.1.4) Proteína básica de mielina.....	12
2.5.1.5) Inmunoglobulinas.....	12
2.5.1.6) Complemento.....	13
2.5.1.7) Factor de necrosis tisular.....	13
2.5.1.8) Mutaciones mitocondriales.....	14
2.5.1.9) Otros genes.....	14
2.5.2) Las infecciones en la esclerosis múltiple.....	14
2.5.3) Genética y esclerosis múltiple	17
2.6) Distribución geográfica y epidemiología de la esclerosis múltiple.....	20
2.6.1) Factores ambientales.....	21
2.6.1.1) Distribución geográfica	21
2.6.1.2) Migración.....	22
2.6.1.3) Factores genéticos.....	23
2.6.1.4) Grupo étnico.....	24
2.6.1.5) Otros factores asociados.....	24
III - Complejo Principal de histocompatibilidad.....	25
3.1) Estructura de las moléculas clase I.....	26
3.2) Región clase II.....	28
3.3) Función de las moléculas HLA.....	28
3.4) Procesamiento y presentación de antígenos por moléculas clase I.....	29
3.5) Procesamiento y presentación de antígenos por moléculas HLA clase II	30
3.6) Nomenclatura de los genes HLA.....	31
3.7) HLA y enfermedad.....	33
3.8) HLA y esclerosis múltiple.....	34
3.8.1) Asociación con HLA-Dw2.....	35
3.8.2) HLA y subtipos de EM	36
3.8.3) Asociación con clase I.....	37
3.8.4) HLA y esclerosis múltiple en México	37
IV - Protocolo de estudio	39
4.1) Planteamiento del problema.....	39

4 2) Hipótesis.....	39
4 3) Objetivos	39
4.4)Material y Métodos.....	40
4.5) Procedimientos.....	43
4 5.1) Obtención de DNA	43
4 5.2) Separación de linfocitos T con perlas magnéticas.....	45
4 5.3) Tipificación de antígenos HLA mediante doble fluorescencia.....	46
4.5.4) Tipificación de genes clase II por PCR-SSOP.....	48
4 6) Análisis estadístico.	52
V.- Resultados.....	55
VI.- Discusión.	63
VII.- Conclusiones.....	68
VIII.- Apéndice.....	69
IX.- Bibliografía.. ..	73

INTRODUCCIÓN.

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria de la sustancia blanca del sistema nervioso central (SNC) con carácter de brotes y remisiones o bien progresiva y frecuente en pacientes jóvenes. Patológicamente se caracteriza por áreas multifocales de desmielinización con preservación de los axones y pérdida de oligodendrocitos y astrogliosis.^{1,2,3,4,5,6}

Es una enfermedad autoinmune que ocurre en pacientes jóvenes y es de las más frecuentes del ser humano, afecta hasta un 0.2% de la población en zonas de alta prevalencia (7). Su causa se desconoce, sin embargo, se han implicado en su etiología factores ambientales y genéticos; en apoyo a los factores ambientales se tiene el hecho de que la prevalencia tiene una distribución geográfica distinta por zonas, siendo mayor conforme más se aleja del Ecuador y la migración puede afectar el riesgo de manifestarla.⁷ Los eventos que se han propuesto en apoyo a los factores genéticos son: a) la EM se presenta predominantemente en caucásicos, b) dentro de los caucásicos existen grupos más vulnerables, c) es más frecuente entre familiares de pacientes con EM que en la población general y d) la EM se asocia intensamente a ciertos tipos de HLA.^{2,5}

ANTECEDENTES

ASPECTOS HISTÓRICOS.

La descripción clínica precisa de EM fue dada casi al mismo tiempo por Jean Cruveilhier y Robert Carswell, el primero de ellos también describió la anatomopatología de las lesiones.^{10,11} Charcot, en 1868 fue el primero en correlacionar los hallazgos clínicos con la topografía de las lesiones histopatológicas.¹² Sin embargo, la primera descripción clínica parece remontarse al siglo XIV (1380-1433) época en que se describió una enfermedad similar en una religiosa llamada Santa Lidwina de Achiedan.¹¹ Otros autores¹³ describen que el primer caso en la literatura médica es el que aparece en el libro *Maladies de la moelle épinière* de Charles Prosper Olivier en 1824. Otros informes incluyen el realizado en 1831 por Richard Bright que describe un caso indiscutiblemente con EM y Robert Carswell en 1838 publica un atlas de patología describiendo en uno de sus dibujos "una enfermedad peculiar de la médula y puente de Varolio". Tres décadas más tarde, la descripción clínica se dió en Inglaterra por Moxon.¹³ A mediados del siglo XIX algunos autores

INTRODUCCIÓN.

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria de la sustancia blanca del sistema nervioso central (SNC) con carácter de brotes y remisiones o bien progresiva y frecuente en pacientes jóvenes. Patológicamente se caracteriza por áreas multifocales de desmielinización con preservación de los axones y pérdida de oligodendrocitos y astrogliosis.^{1,2,3,4,5,6}

Es una enfermedad autoinmune que ocurre en pacientes jóvenes y es de las más frecuentes del ser humano; afecta hasta un 0.2% de la población en zonas de alta prevalencia (7). Su causa se desconoce, sin embargo, se han implicado en su etiología factores ambientales y genéticos; en apoyo a los factores ambientales se tiene el hecho de que la prevalencia tiene una distribución geográfica distinta por zonas, siendo mayor conforme más se aleja del ecuador y la migración puede afectar el riesgo de manifestarla.⁷ Los eventos que se han propuesto en apoyo a los factores genéticos son: a) la EM se presenta predominantemente en caucásicos, b) dentro de los caucásicos existen grupos más vulnerables, c) es más frecuente entre familiares de pacientes con EM que en la población general y d) la EM se asocia intensamente a ciertos tipos de HLA^{2,5}

ANTECEDENTES.

ASPECTOS HISTORICOS.

La descripción clínica precisa de EM fue dada casi al mismo tiempo por Jean Cruveilleir y Robert Carswell; el primero de ellos también describió la anatomopatología de las lesiones.^{10,11} Charcot, en 1868 fue el primero en correlacionar los hallazgos clínicos con la topografía de las lesiones histopatológicas.¹² Sin embargo, la primera descripción clínica parece remontarse al siglo XIV (1380-1433) época en que se describió una enfermedad similar en una religiosa llamada Santa Lidwina de Achiedan.¹¹ Otros autores¹³ describen que el primer caso en la literatura médica es el que aparece en el libro *Maladies de la moelle epinière* de Charles Prosper Ollivier en 1824. Otros informes incluyen el realizado en 1831 por Richard Bright que describe un caso indiscutiblemente con EM y Robert Carswell en 1838 publica un atlas de patología describiendo en uno de sus dibujos "una enfermedad peculiar de la médula y puente de Varolio" Tres décadas más tarde, la descripción clínica se dió en Inglaterra por Moxon.¹³ A mediados del siglo XIX algunos autores

alemanes describieron casos de EM. Fue particularmente importante el caso de Frerichs a quien se considera el primero en diagnosticar esclerosis espinal. En 1866, Vulpian estableció el término de esclerosis en placa diseminada y uno de los tres casos que describió se presentó en 1868 en las lesiones de Charcot. Si bien Charcot no fue el primero en informar un caso de EM o sus características patológicas, si se piensa que sus alumnos Bourneville, Guérard y Ordenstein son una extensión de su pensamiento y tal vez hasta de sus palabras. En Norte América, Morris publicó el primer caso de EM y posteriormente otros autores como Hammond y Osler en Canadá contribuyeron a dar a conocer las grandes series de casos de EM.^{13, 14}

CURSO CLINICO Y SUBDIVISIONES.

La esclerosis múltiple puede tener una amplia variedad de manifestaciones clínicas. Muchos signos y síntomas son característicos pero ninguno patognomónico.⁵ El curso clínico también es variable. Se caracteriza clínicamente por episodios de alteración local del nervio óptico, médula espinal y cerebro que remiten a una secuela o recurren en un periodo de tiempo variable. Las manifestaciones clínicas son determinadas por la variedad de localización y extensión de los focos de desmielinización. Las manifestaciones clásicas son motoras con paresia o plejía, parestesias, alteraciones visuales, diplopia, nistagmo, disartria, temblor de acción, ataxia, alteraciones en la sensibilidad profunda, disfunción vesical y alteración en la respuesta emocional.^{1,2,5,6}

Se describen cuatro patrones clínicos de EM.^{3,4}

- 1 - Brote-remisión.- cuando hay síntomas de la enfermedad que aparecen durante un periodo de una o dos semanas y se resuelven en el transcurso de cuatro a ocho semanas con o sin tratamiento esteroideo. La recuperación final regresa hasta el estado previo al ataque
- 2 - Progresiva secundaria.- cuando inicia en forma de brote-remisión y posteriormente presenta detenore continuo sin periodos de remisión o estabilidad.
- 3 - Progresiva primaria.- es con detenore progresivo desde el inicio de la enfermedad, sin periodos de estabilidad ni de recuperación parcial.
- 4.- Recurrente-progresiva.- existen síntomas en forma de brote con recuperación incompleta que ocasiona incapacidad progresiva

En la figura 1 se esquematizan los diferentes patrones clínicos.

En relación con las definiciones que se utilizan, un brote se define como la presentación *de novo* o reaparición de un síntoma o signo durante un periodo mayor de 24 horas continuas, en ausencia de fiebre, progresión es el síntoma o signo cuya intensidad se incrementa paulatinamente durante un periodo mayor de 30 días.

El 85% de los pacientes tiene una forma brote- remisión o secundariamente progresiva. En más del 50% de los pacientes con una forma brote-remisión pueden tener un mayor y continuo deterioro siendo la forma progresiva secundaria. Aproximadamente el 10 a 15% tiene una forma progresiva primaria, iniciando habitualmente sus primeros síntomas a los 40 o 60 años de edad.¹⁵

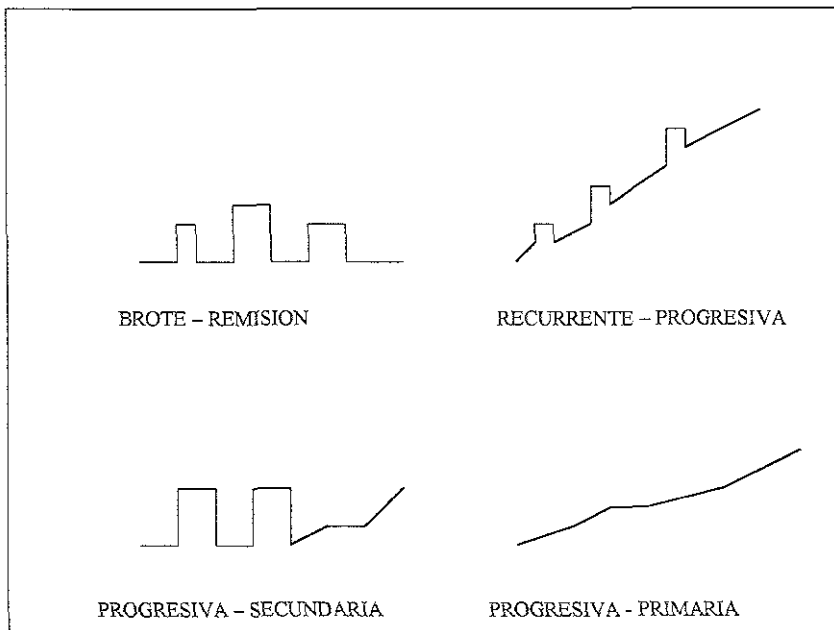


Figura 1 - Formas clínicas de la EM

SÍNTOMAS INICIALES.

La debilidad y/o entumecimiento en una o más extremidades son los síntomas iniciales casi en la mitad de los casos. Es habitual que los pacientes noten parestesias o pérdida de la sensibilidad en un pie o una mano que se extiende de manera próxima en horas o días, y puede involucrar la otra

extremidad ipsilateral o contralateral y ascender al tronco. Esto sugiere desmielinización inflamatoria centrífuga de los cordones posteriores de la médula espinal.^{1,2,5,16} El resultado puede ser arrastre de la extremidad o pérdida del control de una o ambas piernas hasta paraparesia espástica o atáxica. Los reflejos de estiramiento muscular se exaltan, los reflejos abdominales desaparecen con una alteración en la sensibilidad superficial de diferente intensidad y una respuesta plantar extensora como evidencia además de afección a la vía piramidal bilateral.¹⁶

La flexión pasiva del cuello produce una sensación de hormigueo o como toque eléctrico irradiado hacia la región sacra. Esta manifestación es conocida como signo de Lhermitte, frecuente en pacientes con EM.^{1,2,5,17}

Aproximadamente en el 25% de los pacientes, la manifestación inicial es un episodio de neuritis óptica o retrobulbar caracterizada por ser indolora, de rápida evolución en un periodo de horas o días, con una pérdida parcial o total de la visión de uno (con más frecuencia) o ambos ojos. En raras ocasiones la pérdida visual se mantiene progresiva por algunos meses semejando una lesión compresiva del nervio óptico.¹⁸ También se puede evidenciar un escotoma que ocupa el área macular una amplia variedad de alteraciones en el campo visual. Hasta un 50% de los pacientes con neuritis óptica pueden desarrollar otras manifestaciones de EM. El riesgo es menor si el ataque ocurre en la infancia.^{19,20,21}

Otras manifestaciones iniciales son inestabilidad en la marcha, síntomas de tallo cerebral (diplopia, vértigo, vómito) y alteraciones en la micción. En una pequeña proporción de pacientes se pueden presentar síntomas paroxísticos como neuralgia del trigémino y otros síndromes dolorosos, parálisis facial, hipoacusia o convulsiones.¹⁷ Un inicio con nistagmo y ataxia es poco frecuente, con o sin debilidad y espasticidad de las piernas, indicando lesión cerebelosa y del tracto corticoespinal. La combinación de nistagmo, lenguaje escándido y temblor de intención se conoce como tríada de Charcot, la cual es habitual en etapas avanzadas de la enfermedad.¹

Las alteraciones en las funciones mentales, presentes en el 40 a 70% de los pacientes, incluyen euforia (la estúpida indiferencia definida por Charcot), relacionada con lesiones en lóbulos frontales, depresión, alteración de memoria y demencia. En un 2 a 3% se pueden presentar crisis

convulsivas, quizá condicionadas por lesiones a nivel de corteza cerebral o sustancia blanca subyacente ⁵

Los síntomas iniciales de EM son inducidos por calor o ejercicio, se pueden acompañar de un patrón de fatiga diurno y pueden tener un inicio postparto (durante el embarazo se pueden mejorar o estabilizar las manifestaciones) ^{1,22}

Las 5 variantes descritas de EM son:²³

1 - Esclerosis concéntrica de Baló. Una rara condición que afecta a adultos jóvenes y tiene un curso corto, usualmente de meses. Parece ser más frecuente en regiones de Filipinas y China. Tiene una adecuada respuesta a esteroides ²⁴

2.- Neuromielitis óptica (enfermedad de Devic) Se refiere a una entidad en la que las lesiones de la médula espinal y del nervio óptico se desarrollan de manera simultánea o sucesivamente. La resonancia magnética de cráneo habitualmente es normal.²³

3.- Enfermedad de Marburg Es una forma aguda o hiperaguda de EM. El curso es progresivo y fulminante, pero en ocasiones sobrepuesto a una enfermedad crónica. La mayoría de los pacientes son jóvenes.²⁵

4.- Esclerosis difusa mielinoclástica (enfermedad de Schilder). Es una forma diferente de adrenoleucodistrofia o encéfalomiелitis postinfecciosa Es una enfermedad rara que afecta niños. Se presenta con problemas visuales, convulsiones, cefalea y vómito ²⁶

5 - Síndromes monofásicos que pueden presentar el inicio de la EM o ser auto-limitados y nunca presentar eventos posteriores. Incluyen neuritis óptica aislada, mielopatía transversa aguda y encéfalomiелitis diseminada aguda ²³

La presencia de afasia, apraxia, alteración de campo visual sin escotoma, coma, convulsiones, demencia temprana, encefalopatía, uveítis, manifestaciones extrapiramidales, desarrollo temprano de amiotrofia con arreflexia y mielitis transversa aguda dolorosa son consideradas poco comunes de EM ^{5 27}

En relación con el curso clínico, aproximadamente dos tercios de los pacientes inician antes de los 30 años de edad y presentan en su inicio una forma brote-remisión Las exacerbaciones tardan de 4 a 16 semanas Algunos factores clínicos al inicio se han asociado a un peor pronóstico

funcional como la presencia de más de cuatro brotes en los primeros dos años de evolución, un intervalo corto entre el primer segundo brote (menos de dos años) y el desarrollo de incapacidad física moderada en los primeros tres años.²⁷ Otros factores de mal pronóstico son una edad avanzada al inicio, género masculino, progresión lenta del déficit motor como síntoma principal, disfunción cerebelosa temprana y un curso progresivo.

DIAGNOSTICO

Se han reportado un gran número de criterios diagnósticos como se señala en el Cuadro 1.

Categorías diagnósticas	Año	Referencia
Probable	1954	28
Probable temprana		
Latente posible		
Clínicamente definida	1965	29
Definida	1972	30
Probable		
Posible		
Clínicamente definida	1976	31
Clínicamente probable		
Clínicamente posible		
Probada	1977	32
Clínicamente definida		
Temprana probable		
Latente progresiva		
Posible sospechada		
Probable	1983	33
Clínicamente definida		

Cuadro1 - Criterios diagnósticos para EM.

Los criterios de Schumacher, son los que articularon el espectro clínico que se toma en cuenta aun en la actualidad; sin embargo, fueron propuestos en una era sin estudios de imagen sensibles.

Para la EM definida, los criterios de Schumacher incluyen lo siguiente:

- 1 - Edad apropiada (10 a 50 años).
- 2 - Enfermedad de sustancia blanca del sistema nervioso central.
- 3.- Lesiones diseminadas en tiempo espacio
- 4.- Alteraciones objetivas en la exploración.
- 5 - Evolución: ataques al menos de 24 horas, separados por un mes o progresión lenta.
- 6 - Más de 6 meses de duración.
- 7 - No otra mejor explicación.
- 8.- El diagnóstico debe ser hecho por un neurólogo experto.

Los criterios del comité de Washington (Poser) se desarrollaron hace dos décadas, abarcan información clínica, de los resultados de laboratorio y de imagen (incluyendo resonancia magnética), estos criterios son los que actualmente se utilizan en todos os estudios de EM.^{23,30}

Los criterios de Poser para EM incluyen las características que se enlistan a continuación:

- 1.- Alteración específica y objetiva del SNC en la exploración neurológica.
- 2 - La alteración debe incluir predominantemente tractos largos de la sustancia blanca, incluyendo vía piramidal, vías cerebelosas, fascículo longitudinal medio, nervio óptico y columnas posteriores.
- 3.- Por historia o al examen físico afección de dos o más áreas del Sistema Nervioso Central:
 - a) La Imagen por Resonancia Magnética (IRM) puede ser utilizada para documentar la segunda lesión. Las lesiones en IRM deben ser cuatro lesiones involucrando sustancia blanca o tres si una de ellas es periventricular. Deben ser mayores de 3mm. Para pacientes mayores de 50 años, deben cumplir al menos dos de los siguientes criterios por imagen: a) lesiones \geq 5mm, b) lesiones periventriculares y c) lesiones en fosa posterior
 - b) Los potenciales evocados pueden ser utilizados para documentar la segunda lesión cuando el examen físico no la documente.
- 4.- El patrón clínico debe consistir en a) dos o más episodios separados de afección al SNC en diferentes sitios, de una duración al menos de 24 horas y con un mes de separación, o b)

progresión gradual en un lapso de 6 meses si se acompaña de aumento en la síntesis de IgG en dos o más bandas oligoclonales en el Líquido Cefalorraquídeo (LCR)

5 - Inicio entre los 15 y 60 años de edad.

6 - Las manifestaciones del paciente no deben ser atribuibles a otra enfermedad, incluyendo la determinación de: análisis del LCR, IRM de cráneo y/o médula espinal, niveles de B12, virus de inmunodeficiencia humana, VSG, factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, VDRL, enzima convertidora de angiotensina (cuando exista sospecha de sarcoidosis), serología para Borrelia (enfermedad de Lyme), ácidos grasos de cadena muy larga adrenoleucodistrofia) y lactato en LCR, biopsia muscular o análisis de DNA mitocondrial (para mitocondriopatías).

Los criterios diagnósticos determinan diferentes categorías diagnósticas:

- EM definida.- si se cumplen los seis criterios.
- EM probable.- si se cumplen los seis criterios excepto: a) una anomalía objetiva a pesar de dos episodios sintomáticos o b) un episodio sintomático a pesar de dos o más anomalías objetivas.
- Riesgo de EM.- si se cumplen los seis criterios excepto solo un episodio sintomático y una anomalía objetiva

FISIOPATOLOGÍA.

La fisiopatología de la EM no está bien determinada, se han propuesto múltiples mecanismos para explicar la desmielinización que no excluyen uno del otro y tal vez todos con alguna importancia en el desarrollo de la enfermedad. Los mecanismos implican a la autoinmunidad, infecciones diversas y a diferentes factores genéticos.⁵ Por lo que la EM es indudablemente una enfermedad poligénica y multifactorial.

HIPÓTESIS DE AUTOINMUNIDAD

Actualmente hay un sinnúmero de evidencias que apoyan a la EM como una enfermedad de naturaleza autoinmune, en la cual una reacción inmunológica va dirigida contra antígenos propios de mielina.⁷ En este paradigma, la interacción del receptor de la célula T (TCR) cooperadoras (Th)

CD4+ con antígenos de mielina presentados por ciertas moléculas HLA clase II que se hallan en la superficie de los macrófagos y posiblemente por los astrocitos. Ambas células funcionan como células presentadoras de antígeno (CPA) y la interacción entre ellas y el Th resulta en la activación de células T cooperadoras con la consecuente, secreción de citocinas, proliferación de células T específicas y activación de macrófagos y de células B. Esta cascada de activación de células del sistema inmunológico es la que interviene la destrucción de mielina.^{7,34} Algunos estudios recientes sugieren que un estímulo ambiental puede jugar un papel importante en la iniciación de la autoinmunidad en la EM, posiblemente a través de mecanismos de mimetismo molecular o producción de superantígenos.^{7,35,36} El mimetismo molecular es el fenómeno mediante el cual algunas estructuras similares entre epítopes de células virales y epítopes antigénicos del hospedero tienen una reacción cruzada y conducen a la inducción de una respuesta autoagresiva mediada por las células T que reconocen estos epítopes en la periferia para posteriormente migrar estas células T activadas hacia el sistema nervioso central.⁷ Los superantígenos moléculas inmunoestimuladoras derivadas de bacterias y virus que pueden inducir la activación de un gran número de células T en forma inespecífica.⁷ Un elemento esencial en ambas hipótesis es la migración y expansión de células T CD4+ autoreactivas en el sistema nervioso central. Estas teorías han sido demostradas *in vitro* y en la encefalitis alérgica autoinmune que es el modelo experimental de la EM³⁵, sin embargo, hay pocos datos *in vivo* que se han publicado sobre todo en relación con el mimetismo molecular^{7,37} pues es mucho más difícil su demostración *in vivo*. Aunque el concepto de que la respuesta inmunológica celular contribuye a la destrucción tisular en la EM es generalmente aceptado, aun no es claro si la respuesta inmunológica inicia el daño o es consecuencia del proceso propio de la enfermedad. Además, continua el debate sobre cual de los componentes del sistema inmunológico son los que tienen el papel clave en la EM.⁷ La mayoría de los investigadores enfatiza el papel de los linfocitos Th CD4+ en ocasionar desmielinización a través de la activación de macrófagos, que atacan a la unidad mielina-oligodendrocito, sin embargo, la contribución de las células T citotóxicas (Tc) CD8+, microglia, astrocitos, citocinas y complemento aún no se define por completo.^{7,38}

- *Papel de linfocitos Th CD4+ vs los Tc CD8+.*

Las células T se dividen en dos categorías funcionales como se señala en el Cuadro 2 por la presencia de dos antígenos en sus superficie, el CD4 que marca a las cooperadoras y el CD8 que define a los T citotóxicos.^{7,35} Estos subtipos interactúan con moléculas MHC específicas para regular y activar la respuesta inmunológica. Las moléculas HLA clase II son restringidas a los linfocitos T CD4+ que son los mayores productores de citocinas y se asocian con la hipersensibilidad retardada y determinan la síntesis de anticuerpos generados contra péptidos proteicos. Las moléculas HLA clase I son restringidas a células T CD8+ y son asociados a citotoxicidad. Algunas investigaciones sugieren que las células Th son las iniciadoras de la destrucción tisular en la EM, y otra vez la evidencia más contundente deriva de estudios en la encefalitis experimental autoinmune (EAE).³⁵ La inmunización de animales con clonas de células Th CD4+ específicas contra proteína básica de mielina (PBM) produce una enfermedad "EM-like" denominada EAE.³⁹ Los ratones transgénicos hechos con células Th CD4+ expresan un receptor de células T (TCR) transgénico específico para PBM, pero no para otros linfocitos. En la EAE, los estudios inmunocitoquímicos revelan que predominantemente se hallan linfocitos con de TCR alfa-beta, además de que hay una sola expresión de moléculas HLA clase II en los macrófagos y en las células gliales.³⁹ Además la EAE puede ser prevenida o revertida en ratones o primates usando anticuerpos dirigidos contra el CD4.^{7,35}

Algunos estudios en humanos corroboran que las células Th CD4+ son los mediadores principales en la EM. Se observan células CD4+ y moléculas HLA clase II alrededor de los vasos en la lesiones activas de EM, especialmente cerca de los bordes y las moléculas clase I se localizan ultraestructuralmente en pericitos, macrófagos perivasculares, microglia y astrocitos.⁷ Como una prueba directa de la hipótesis de la participación de las células Th CD4+, se llevó a cabo un tratamiento que disminuía sustancialmente el número de células T CD4+ en pacientes con EM usando un anticuerpo monoclonal híbrido ratón-humano, sin lograr alguna influencia en la historia natural de la enfermedad.⁴⁰ La mayoría de las investigaciones se enfocan al papel de la células CD4+, sin embargo algunos trabajos sugieren que la respuesta por moléculas HLA clase I-células CD8+ puede tener un papel importante en la patogénesis de las enfermedades desmielinizantes

Además de las células CD4+, las Tc CD8+ también se encuentran en las lesiones activas de EM.⁴¹ Estas células T CD8+ reconocen péptidos presentados por moléculas HLA clase I, y los oligodendrocitos adultos expresan moléculas clase I pero no clase II, aún cuando se estimulan con interferon-gamma.⁷ Esta situación apoya que los oligodendrocitos adultos son las células blanco de los linfocitos, siendo reconocidos por moléculas clase I y no por clase II del HLA. En la EAE las células Tc han mostrado tener un efecto inmunorregulador en el curso de la enfermedad.⁴²

Tipo célula T	Subtipo	Moléculas MHC	Tipo HLA que restringen la respuesta	Citocinas producidas	Papel potencial en la EM
Th CD4+	Células Th1	Clase II	DP, DQ, DR	IFN- γ , TNF- α	Inflamación, desmielinización
Th CD4+	Células Th2	Clase II	DP, DQ, DR	IL-4, IL-10	Inhibe Th1
Tc CD8+	Células citotóxicas	Clase I	A, B, C	Perforina	Lisis de oligodendrocitos
Tc CD8+	Células supresoras	Clase I	A, B, C	TGF- β	Inhibe Th1

Cuadro 2.- Tipos de células T³⁵

- Macrófagos y microglia

En las lesiones activas de EM se observa la presencia de gran número de macrófagos y microglia;⁷ esto sugiere que dichas células tienen un papel importante en la desmielinización. Aunque su función como barredores de mielina es aceptada, no se ha establecido si juegan un papel primariamente patológico en la inducción de la desmielinización de los humanos. También en la EAE se ha encontrado que estas células son mediadores de la destrucción tisular. La depleción de macrófagos o la administración de sustancias antimacrófagos previene la inducción de EAE; además en la EAE se ha demostrado la activación, proliferación y migración de la microglia.^{43,44} Los macrófagos y la microglia secretan algunas citocinas como interleucina-1(IL-1), la IL-6 y el TNF-alfa, que pueden romper la barrera hematoencefálica.⁷ También expresan HLA-DR y por lo tanto pueden funcionar como células presentadoras de antígeno.⁷

-Astrocitos.

La evidencia actual sugiere que los astrocitos pueden tener un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica de destrucción que ocurre en la EM. La hipertrofia reactiva astrocítica es una característica común de las lesiones activas de EM y la gliosis se incrementa con la maduración de las lesiones.^{7,36} La posibilidad de que los astrocitos participen en la destrucción de mielina se basa en la actividad incrementada de enzimas lisosomales y la observación de material semejante a mielina degradada en la ultraestructura de ellos. También pueden producir una gran variedad de citocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias y mediadores que pueden contribuir a la lesión tisular en la EM.⁷

-Proteína básica de mielina (PMB).

De los diferentes antígenos potenciales en la EM para el sistema nervioso central, la PMB ha sido la más estudiada. Por el análisis de la EAE, es una respuesta inmunológica dirigida contra la PMB el mecanismo patogénico posible en la EM. La autoinmunidad a MBP podría resultar del mimetismo molecular o de la liberación de PMB de diferentes sitios dentro de la barrera hematoencefálica en personas susceptibles. En pacientes con EM se encuentra una respuesta inmunológica detectable contra PMB en sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y posiblemente en el cerebro.³⁸ La PMB se codifica en el cromosoma 18, ha sido investigada como un locus candidato de susceptibilidad para EM sin lograr encontrar alguna asociación.⁴⁵ Las diferencias entre PMB de pacientes con y sin EM también han sido estudiadas, sin lograr encontrar que tengan alguna asociación con el desarrollo de la enfermedad.³⁶

-Inmunoglobulinas.

La inmunoglobulina G puede estar involucrada en la patogénesis de la EM. En pacientes con EM se encuentran niveles aumentados de IgG en suero, LCR y cerebro.³⁸ La IgG en LCR es oligoclonal y frecuentemente restringida a subclase IgG 1.⁴⁶ La cadena pesada de IgG está codificada en el cromosoma 14 y es altamente polimórfica; consiste en segmentos llamados V, D, J

y C. La región C de la IgG incluye genes clase 1, 2 y 3. Cada una de estas clases es polimórfica. Los estudios más tempranos del polimorfismo de IgG en pacientes con EM han utilizado métodos serológicos. Algunos han reportado asociación, siendo inconsistente.⁴⁷ Otros estudios no han confirmado la asociación otros han reportado un aparente mayor riesgo con el fenotipo Gm en pacientes portadores del HLA-DQ1³⁸ Sin embargo, después de estratificar clínicamente la EM o el HLA no ha sido posible confirmar alguna asociación significativa o persistente.⁷

- *Complemento.*

El complemento es un mediador importante de la inflamación. Los oligodendrocitos de ratas adultas son susceptibles a la lisis ocasionada por anticuerpos independientemente de la acción del complemento.³⁸ El depósito de complemento en los vasos del SNC de pacientes con EM se asocia a la ruptura de la barrera hemato.-encefálica⁴⁸ Se ha identificado la presencia de complejos inmunes circulantes, niveles bajos de complemento y factores activados por la cascada del complemento en el suero y en el LCR de pacientes con EM, cuyos niveles fluctúan con la actividad de la enfermedad.^{49,50} La hipocomplementemia de C2 en pacientes con EM ha sido asociada a la presencia de un gen no funcional o nulo.⁵¹ Debido a que el gen de C2 se localiza en la región de genes clase III del MHC, la asociación con el alelo C2 nulo se explica por desequilibrio de unión con ciertas moléculas HLA clase II; sin embargo, esto no ha sido confirmado. Aunque no se ha confirmado la relación con genes de C4 que también se ubican en la región de clase III, existe un trabajo que describe la asociación de la EM con el haplotipo C4A4/C4B2³⁸; otros autores encontraron incrementado el alelo C4Q0 en gitanos al comparar con población húngara con EM.⁵²

- *Factor de necrosis tumoral.*

El factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) es una citosina inflamatoria cuyos genes también se localizan en la región de clase III del MHC. Es directamente tóxico para la mielina *in vitro* y produce una lesión selectiva de oligodendrocitos e induce la proliferación de astrocitos.⁵³ También se encuentra en las áreas activas de EM. Los niveles de TNF detectables en LCR correlacionan con la actividad de la enfermedad y su progresión.⁵⁴ Tampoco se ha confirmado una asociación

con el polimorfismo de TNF y la presencia y curso de la EM. Por lo tanto, aunque algunas investigaciones sugieren que el TNF está involucrado en la patogénesis de la EM y ciertos polimorfismos del TNF son asociados de manera no consistente con altos niveles de expresión, las variantes genéticas de TNF no están involucradas de manera convincente en la expresión de la EM.⁷

- Mutaciones mitocondriales.

En algunas ocasiones, los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) tiene síntomas neurológicos adicionales como espasticidad y ataxia. Se ha investigado si existen las alteraciones mitocondriales encontradas en LHON en pacientes con EM sin lograr evidenciarlas; por lo anterior parece poco probable que las mutaciones asociadas a LHON puedan contribuir a mayor susceptibilidad para desarrollar EM. Se ha descrito una alteración en la función mitocondrial en algunos pacientes con síndrome "parecido a la EM"^{55,56,57}

- Otros genes.

Se han implicado otros genes polimórficos como los transportadores asociados con el procesamiento del antígeno (TAP1 y TAP2) localizados entre las regiones HLA-DP y HLA-DQ del MHC. No se ha logrado establecer alguna asociación evidente de estas moléculas y su polimorfismo con la presencia y el curso de la EM.^{36,58,59} El polimorfismo en los genes para una gran proteasa multifuncional, el proteosoma de bajo peso molecular (LMP2 y LMP7), también involucrado en el procesamiento del antígeno y situado muy cerca de los genes TAP, no se ha asociado a la EM.⁶⁰ Los estudios de variantes de alotipos y genotipos de alfa1-antitripsina tampoco parecen participar en la expresión de la EM.⁶¹

LAS INFECCIONES EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los patrones de inflamación multifocal vistos en la sustancia blanca de pacientes con EM, la epidemiología de la enfermedad y los avances en el estudio de infecciones persistentes han aumentado el interés en el concepto de que la EM es el resultado de una infección lenta. Esto no

es nuevo, pues fue propuesto por Marie desde 1884.⁶² Desde esa época, muchos agentes infecciosos han sido considerados como posibles candidatos etiológicos. El abordaje diagnóstico utilizado para documentar las causas infecciosas en otras enfermedades neurológicas no ha sido útil en el estudio de la EM. La investigación extensa de tejido de pacientes con EM no ha mostrado organismos infecciosos. Aunque se han descrito una variedad de partículas⁶² presentes en autopsias y biopsias de tejido, estos probablemente representan los productos de degradación de la mielina o cambios no específicos en astrocitos reactivos.⁷

Es posible que un virus sea responsable de la enfermedad y que se integra primariamente al genoma de la célula del hospedero de modo que no puede ser reconocida por técnicas convencionales. Recientemente se encontró por técnicas de hibridación *in situ* el genoma del virus del sarampión integrado en los cerebros de algunos pacientes con EM.⁶³ Algunos estudios posteriores mostraron este material en otros pacientes con EM y en sujetos sanos.⁶² Es interesante que otros como el genoma del virus herpes simple también se ha identificado por el método de Southern blot en sangre de sanos y de pacientes con EM. Los resultados de estos estudios establecen que el material genético viral persiste en el SNC aunque las partículas virales no puedan visualizarse.

Se han hecho estudios de aislamiento directo y con los años se han propuestos varios agentes infecciosos como candidatos etiológicos. Incluyen espiroquetas, micoplasma, protozoarios y algunos virus como el de la rabia, herpes simple, parainfluenza 1, corona y un agente relacionado antígenicamente con el virus aislado de la mielopatía-opticoneuropatía subaguda. Sin embargo estos hallazgos no han sido confirmados.⁶⁴

Hay muchas formas en las que un virus puede estar involucrado en la patogénesis de la EM: 1) Una infección transitoria o persistente fuera del SNC puede activar células T autoreactivas por medio de mimetismo molecular o por otros mecanismos inespecíficos; 2) Una infección transitoria del SNC puede iniciar una cascada de eventos que fomenta la autoinmunidad (ruptura de la barrera hemato-encefálica, etc.), 3) Infecciones recurrentes del SNC pueden precipitar inflamación repetida y desmielinización; y 4) Una infección viral persistente en el SNC puede provocar reacciones inflamatorias que dañen a los oligodendrocitos o puede dañarlos directamente.⁵

Fuera de la especulación y de los datos epidemiológicos, hay escasa evidencia que demuestre la contribución de una infección viral en la EM. Los estudios serológicos tempranos son difíciles de interpretar debido a que la elevación de títulos de anticuerpos y la activación de la respuesta humoral son inespecíficos a diferentes virus. Muchos pacientes con EM tienen en el LCR títulos elevados de anticuerpos contra virus del sarampión o del herpes simple, pero no parecen ser específicos. Rara vez se han cultivado virus directamente del LCR de pacientes con EM, pero se aisló una nueva cepa del herpes simple y un nuevo virus (virus Inoue-Melnick) a partir del LCR de pacientes con EM.^{65,66} Muchos otros virus se han identificado por la presencia de anticuerpos en pacientes con EM sin lograr establecer una asociación real persistente.^{67,68,69,70} Los hallazgos se observan en el Cuadro 3.

Virus	Año	Referencia
Rabia	1946	71
Herpes simplex	1964	72
Sarampión	1972	73
Parainfluenza 1	1972	74
Agente de EM	1975	75
Paramixovirus	1976	76
Coronavirus	1979	77
HTLV-1	1985	78

Cuadro 3 .- Virus aislados en EM (modificado de 79).

GENÉTICA Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

Los factores genéticos parecen ser relevantes en la susceptibilidad para desarrollar EM, sugiéndose por la alta prevalencia de la enfermedad en parientes de primer grado de pacientes y por el alto índice de concordancia en gemelos monocigóticos contra los dicigóticos. Recientemente, algunos loci, incluyendo la región variable de cadena pesada, el polimorfismo del TCR α y β y la región 5' del gen de la proteína básica de mielina han sido implicados en la susceptibilidad para desarrollar EM.^{60,80}

En el Cuadro 4 se indican los rasgos que por análisis de historia clínica llevaron a la búsqueda de genes involucrados en la enfermedad.

La Esclerosis Múltiple como una enfermedad genética.

- 1 - Agregación familiar
 - 2 - Baja incidencia de EM conyugal.
 - 3 - Alta concordancia en gemelos monocigotos (25-30%) comparada con dicigotos o no gemelos (3-5%)
 - 4 - Efecto no detectable de factores ambientales en la susceptibilidad de parientes de primer grado de pacientes con EM.
 - 5 - Correlación con algunos loci y la susceptibilidad para desarrollar EM.
-

Cuadro 4.- Factores que apoyan origen genético de la EM.¹⁴

El posible papel de los factores hereditarios en el desarrollo de EM se empezó a sospechar desde hace más de un siglo cuando en 1896, Eichhorst la llamó una enfermedad "hereditaria y transmisible".⁸¹ Posteriormente, la evidencia de que se trata de una enfermedad hereditaria se ha establecido de la observación de la presencia de la EM en parientes. En 1950 se estudiaron las genealogías y se hizo el análisis genético clínico a 85 familias que tenían al menos dos miembros con EM y se estableció que su patrón hereditario era de penetrancia incompleta, lo que implicaba la existencia de un sólo gen influido por factores externos o la participación de genes múltiples. En la misma época se publicó que la susceptibilidad para la EM aumentaba por la presencia de dos o

más genes independientes, sugiriendo el concepto de herencia poligénica⁸² Posteriormente se estableció que la interacción de factores genéticos y ambientales es crucial en el establecimiento de la enfermedad.⁸³

Sin embargo, la evidencia de la complejidad de la transmisión genética de la EM es importante, basada en observaciones como el índice de sólo el 30% de concordancia en gemelos dicigóticos, baja incidencia de EM en esposos, la relativamente alta presencia de EM en parientes de segundo y tercer orden de pacientes con EM comparada con la población general y la identificación de grupos resistentes a EM en áreas de alto riesgo como los aborígenes de la Isla Torres en Australia⁸⁴, en los amerindios de Norte América⁸⁵, las poblaciones asiáticas como los chinos y los japoneses en Norte América⁸⁶, los afroamericanos⁸⁷, los gitanos en Hungría, los Maoris de Nueva Zelanda^{88 89}, y los Yakutes en el norte de Rusia.²

El análisis genético de la EM se ha enfocado tradicionalmente a estudios de asociación de genes candidatos, en los cuales las frecuencias de alelos en grupos de pacientes y testigos sanos se comparan y la diferencia se somete a análisis estadístico. La asociación a menudo se expresa como el riesgo relativo que tiene un individuo para desarrollar la EM si es portador de algún alelo o marcador, comparado con un individuo que no es portador. Los genes candidatos se definen como genes que tiene posibilidades lógicas de tener algún papel en la enfermedad; para la EM, los genes candidatos incluyen citocinas, receptores inmunológicos y proteínas involucradas en el control de virus⁹⁰ Con excepción del locus MHC, los estudios de asociación de casos y controles han contribuido muy poco en la identificación de genes asociados a la EM. Estos genes se muestran en el Cuadro 5.

Los estudios basados en familias, por otro lado, permiten la identificación de haplotipos que segregan junto con la enfermedad y dan una información genética más certera en términos de que detecta ligamiento y no para asociación. Este método permite la localización precisa de genes candidatos y es de gran valor para determinar la penetrancia de los genes de susceptibilidad para EM⁹⁰

	Posición	Familiar (F) / Esporádico (E)
Cromosoma 1		
IL-10		
TGF-beta	q31-q32	F/E
HRES-1retroelemento	q31	F/E
Grupos Rhesus	q32-q42	E
	p36-p34	E
Cromosoma 2		
IL-1	q14 2	F/E
Cromosoma 3		
CCR5	p21	E
TGF R3	p22	F
Cromosoma 4		
IL-2	q26-q27	F/E
FGF R	p16 3	F
PDGF	p11-p12	F
FGF 2	q25	F
Cromosoma 5		
IL-4	q23-q31	F/E
FGF 1	q31 1-q33.2	F
Cromosoma 6		
HLA DR/DQ/DM	p21 3	F/E
MOG	p21 3	F/E
Pc 1 Duarte	p21	E
Factor de necrosis tumoral	p21 3	E
TAP	p21 3	E
HSP 70	p21 3	E
Cromosoma 7		
TCR B	q35	F/E
ERV3 retro-elemento		E
Erb-B	p12	F
PDGF	p22	F
Cromosoma 8		
FGF	p12	F
GGF	p21	F
Cromosoma 10		
Ag Fas Apo-1	q24 1	E
FGF BR2	q25	F
Cromosoma 12		
IFN-gamma	q14-q15	F/E
Neurotrofina 3	p13	F
Erb B3	p12	F
ILGF 1	q23	F
Cromosoma 14		
TCR A/D	q11 2	F/E
Genes de Ig	q32	F/E
Alfa-1-antitripsina	q24	E
TGF B3	q24	F

Cromosoma 15		
IGF 1R	q25	F
TRK-C	q24-q25	F
Cromosoma 16		
Receptor de IL-4	p12 1-p11 2	F/E
Cromosoma 17		
Mieloperoxidasa	q23.1	E
OMGP	q11 2	F/E
Integración viral acotrópica	q11	E
Cromosoma 18		
PBM	q22	F/E
Cromosoma 19		
C3	p13	E
APO-E	q13	F/E
ICAM-1	p13 3-p13 2	E
TGF-beta	q13	F/E
MAG	q13.1	F/E
Cromosoma 22		
PDGF B	q12 3-q31	F
CYP2D6	q13	E
Cromosoma X		
PLP	q22	F/E
GABRA3	q22-q28	E
		E

Secuencias mitocondriales

Cuadro 5.- Genes candidatos de EM en estudios de casos controles.⁹⁰

IL Interleuquina, TGF Factor de transformación del crecimiento, CCR Receptor de quimocinas, TNF Factor de necrosis tumoral, TAP Transportadores asociados a presentación del antígeno, MOG Glicoproteína de oligodendrocito mielina, HSP Proteína de choque térmico, APO Apoproteína, TCR Receptor de la célula T, INF Interferon, Ig inmunoglobulina, ICAM Molécula de adhesión tracetular, PBM Proteína básica de mielina, MAG Glicoproteína asociada a mielina, GABRA3 Receptor A3 del ácido gamma-aminobutírico, PLP Proteína proteólípida, FGF Factor de crecimiento de fibroblastos PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas, GGF Factor de crecimiento glial, IIGF Factor de crecimiento parecido a la insulina, IGF Factor de crecimiento de insulina

DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA Y EPIDEMIOLOGIA DE LA EM.

Desde los estudios originales de Kurtzke, en la década e los ochenta se estableció una elevada prevalencia de la enfermedad en las latitudes al norte del ecuador, en donde es mayor de 80 por 100,000 habitantes y ha llegado a ser hasta de 300 por 100,000 habitantes, mientras que en Africa y Asia se ha considerado de 5 por 100,000 habitantes⁹¹ Según las cifras anteriores, Kurtzke⁹² clasificó las tasas prevalencia de EM en grupos de alto, mediano y bajo riesgo. Los grupos de alto riesgo, como el norte de Europa, Estados Unidos, Canadá, sur de Australia y Nueva Zelanda se caracterizan por cifras de 30 por 100,000 habitantes. En cambio, las regiones de mediano riesgo se caracterizan por una prevalencia entre y 25 por 100,000 habitantes e incluyen el sur de Europa,

y Estados Unidos y el norte de Australia. Las áreas de bajo riesgo son aquellas con prevalencias por abajo de 5 por 100,000 habitantes e incluyen Asia y algunos países de Sudamérica.

Se ha identificado un aumento de la prevalencia de la EM en otras latitudes, así como brotes o epidemias, como la ocurrida en las Islas Faroe.⁹³ Se han establecido numerosas hipótesis sobre los factores que contribuyen a la presencia de EM en diferentes áreas del mundo. Si bien se ha asociado la EM a un origen caucásico, también se le ve en Latinoamérica y países orientales, aunque se les considera áreas de menor frecuencia.

Los eventos que apoyan a la teoría ambiental de la EM incluyen: 1) la prevalencia de EM que varía con la localización geográfica, generalmente aumentada conforme aumenta la distancia del Ecuador⁶⁴; 2) la migración puede alterar el riesgo de ocurrencia de EM y el efecto del riesgo depende de la edad de migración⁹⁵; 3) la progenie de los migrantes a menudo tiene tasas de prevalencia similares a las de su nueva residencia y difiere de las de su lugar de origen⁹⁶; 4) la concordancia en gemelos monocigóticos es menor al 100%; 5) la existencia de epidemias de EM⁹⁴ y 6) el aumento acelerado en algunas áreas geográficas específicas.⁹⁷

Por otro lado, la teoría genética, se apoya en hallazgos como: 1) la EM es una enfermedad primariamente de caucásicos⁸⁶; 2) dentro de los caucásicos algunos grupos étnicos son más vulnerables⁹⁸; 3) hay grupos étnicos "resistentes" a la EM, 4) la EM es más común en familiares de pacientes afectados⁹⁹; 5) la concordancia entre gemelos monocigóticos es de 6 a 10 veces mayor que en dicigóticos⁸¹; 6) la presencia de grupos raciales con mayor riesgo⁹¹; y 7) la EM segrega con haplotipos HLA⁸¹⁻¹⁰⁰. Finalmente el otro factor referido, es la teoría viral ya descrita.

FACTORES AMBIENTALES.

A) DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA.

Desde los estudios de Kurtzke donde identificó y clasificó a las áreas de prevalencia de la EM, se ha observado un aumento en las tasa de prevalencia, lo que obligó a un reajuste de las definiciones dadas (vide supra). Actualmente se consideran zonas de bajo riesgo aquellas con <50 por 100,000 habitantes, de riesgo medio entre 50 y 100 por 100,000 habitantes y de alto riesgo con >100 por 100,000 habitantes. Las áreas subtropicales tienen una baja prevalencia que se eleva

hacia latitudes norte y sur Este gradiente se ha confirmado en Europa, Estados Unidos de Norteamérica, Japón, Australia y Nueva Zelanda.^{93,101}

Estos datos se han ampliado recientemente, identificando otros lugares de baja prevalencia. Milanov publicó entre los gitanos de Bulgaria una prevalencia de 19.1 por 100,000 y 18.4 por 100,000 habitantes¹⁰². En chinos de Hong Kong la prevalencia es de 0.88 por 100,000 habitantes¹⁰³, Hoffman informó 3.4 a 3.7 por 100,000 habitantes en Nuevo México ¹⁰⁴ y En Rusia se notificó una prevalencia de 11.5 por 100,000 habitantes.

Otros autores han descubierto nuevas áreas de riesgo medio en Valladolid de 58.3 por 100,000 habitantes¹⁰⁵, en Key West Florida 70.1 por 100,000 habitantes (doce veces la calculada en esas latitudes por modelos experimentales, de 7 a 44 veces más el promedio de áreas de latitud similar, incluyendo la ciudad de México, Hawai, Nueva Orleáns, Louisiana y Carolina del Sur), en Francia se reporta una prevalencia estable e 50 por 100,000 habitantes¹⁰⁶ y en Hungría de 65 por 100,000 habitantes¹⁰⁷.

Las nuevas áreas de alto riesgo son, entre otras: Escocia con 203-219 por 100,000 habitantes¹⁰⁸, Cerdeña, Italia con 143.9 por 100,000 habitantes¹⁰⁹ e Irlanda con 168 por 100,000 habitantes¹¹⁰.

Las conclusiones que hasta el momento se pueden establecer de los estudios epidemiológicos son: 1) existe un gradiente norte-sur independientemente de factores raciales o genéticos⁹², 2) existe una mayor diferencia en la prevalencia en ausencia de diferencias de latitud⁸¹; 3) individuos de un mismo grupo étnico tienen un índice de prevalencia semejante o muy diferente en áreas geográficas ampliamente separadas¹¹¹, y 4) existen grupos de resistencia aislada independientemente de la latitud^{112,113}. En la Figura 2 se observa claramente las áreas de prevalencia alta, media y baja descritas hasta ahora

B) MIGRACIÓN.

Se ha observado que la migración constituye un elemento que altera el riesgo de presentar EM. Los migrantes tienden a adquirir el riesgo de su nuevo lugar de residencia. Sin embargo, esto no ocurre inmediatamente después de cambiar de residencia, habitualmente se modifica para los

descendientes de los inmigrantes, lo que señala que el medio ambiente actúa primordialmente en los primeros años de vida⁹³.

Los datos que apoyan estas conclusiones incluyen hallazgos como que los emigrantes del Reino Unido a Sudáfrica mantienen la prevalencia de 36 por 100,000 habitantes, a diferencia de sus descendientes nacidos en dicha nación en quienes disminuyen el riesgo 11 por 100,000 habitantes¹¹¹. El análisis posterior de los inmigrantes de Sudáfrica reveló que quienes emigraban antes de los 15 años de edad tenían un riesgo más bajo⁹³.

Los japoneses emigrantes a Estados Unidos de Norteamérica mantienen la baja prevalencia de la EM, aunque un poco más elevada que los residentes en Japón; pero sin adquirir la elevada tasa propia al nuevo lugar de residencia⁸⁶. Por otro lado, los descendientes de japoneses nacidos en Hawai continúan con una baja prevalencia y con especial afección medular y del nervio óptico¹¹⁴. También se han estudiado a los hijos de madres vietnamitas y padres franceses migrantes a Francia en los primeros 18 años de vida, que presentan un incremento en el riesgo para EM¹⁰⁹.

Se han publicado hallazgos controvertidos como el caso de los judíos sefarditas quienes mantienen la prevalencia de EM si emigran después de los 15 años a Asia y África; y adquieren el riesgo bajo cuando emigran antes de dicha edad. Sin embargo, los judíos emigrantes a América y Europa mantienen la prevalencia de la enfermedad incluso en sus descendientes¹¹⁵. En la actualidad se describe que el periodo susceptible con relación a la migración es entre los 10 y 15 años de edad, que el periodo mínimo de exposición es de 2 años y que el de latencia puede llegar a ser hasta de 19 años⁹³. Estos hallazgos indican que los patrones genéticos son evidentes y que la expresión de la EM depende también de la exposición a factores externos.

C) FACTORES GENETICOS

Después de sus observaciones sobre la prevalencia de la EM, Kurtzke propuso el "origen" geográfico-genético de la enfermedad. En 1994 publicó la alta prevalencia en Islandia, Escandinavia, Islas Británicas y las ciudades originalmente pobladas por vikingos y aquellas a donde llegaron sus descendientes como Estados Unidos e Norteamérica, Canadá, Australia y Nueva Zelanda. Propuso que los vikingos habían diseminado la susceptibilidad genética al resto

del mundo a través de sus viajes. Ellos llegaron a la mayoría de las ciudades europeas y se establecieron en Normandia, Sicilia y sur de Italia. También mediante el comercio con los árabes, alcanzaron Persia, India y quizá China. Por otra parte, migraron a Mongolia, donde se ha encontrado una alta prevalencia de EM.^{116,117}

Aunque la etiología exacta no se conoce, es muy probable que la susceptibilidad a esta patología esté codificada en varios genes dentro fuera del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

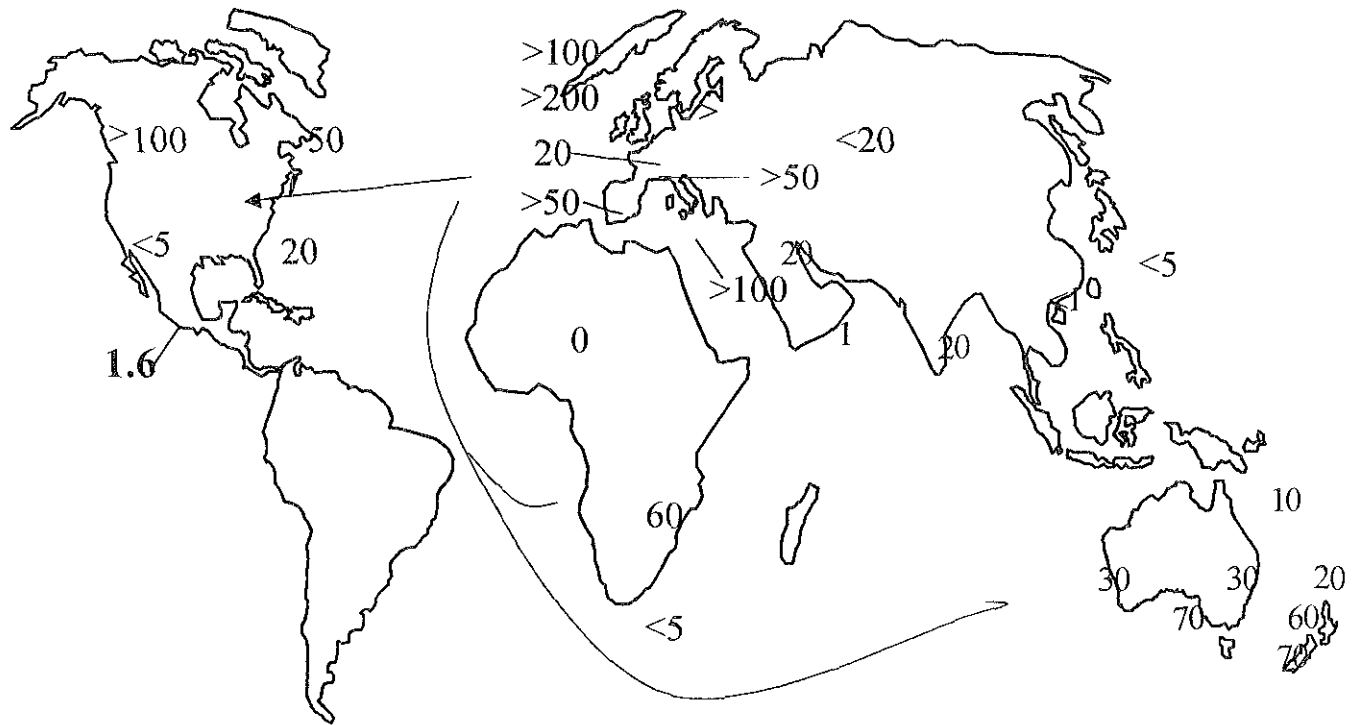
D) GRUPO ETNICO

Se ha manifestado una elevada prevalencia de EM en los raza caucásicos, a diferencia del resto de los grandes grupos raciales (orientales y negros). Más aún, entre los caucásicos hay algunos grupos especialmente vulnerables y otros con relativa resistencia a la enfermedad. Entre los primeros están habitantes el norte de Europa, especialmente Escandinavia, Suecia, Noruega, Dinamarca, Islandia, Irlanda, Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda¹¹⁸. La resistencia racial explica, por otro lado, la baja prevalencia de la enfermedad en países de África^{96,119,120}, en la raza negra, en India, China¹²¹, Japón¹²² y sureste de Asia¹²². Se han establecido algunos aspectos clínicos de presentación han sido establecidos en relación a la raza, especialmente la mayor presencia de afección opticomedular en japoneses y asiáticos^{122,123,124,125}. Además de lo ya mencionado, se han identificado algunos grupos humanos o zonas específicas de alta prevalencia de EM como: Key West en Florida¹²⁶, Los Alamos County en Nuevo México, Vaasa en Finlandia¹²⁷, Hordaland en Noruega¹²⁸ y Colchester County en Nueva Escocia.

E) OTROS FACTORES ASOCIADOS.

Se han sugerido algunos factores de riesgo de manera aislada a la EM. En Alcoi se detectó relación con el contacto con perros y ropa en los pacientes con EM¹²⁹, así como a la ingesta de ácidos grasos saturados, animales obesos y la latitud. Algunos han mostrado interacción de factores socioeconómicos y geoclimáticos en la probable etiología de la EM, en especial hábitos higiénicos, la dieta y el clima¹³⁰.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA EM



Números=prevalencia por 100,000 habitantes.

2.- COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC).

El complejo principal de histocompatibilidad o MHC (del inglés: Major Histocompatibility Complex) es el sistema genético más polimórfico que se ha estudiado y el segmento del genoma humano más investigado; sus productos se expresan en la superficie de todas las células nucleadas. Sus genes están localizados en el brazo corto del cromosoma 6, en la banda 6p21.3, ocupando 8000Kb (8 megabases) y numerosos genes^{131,132,133}. En 1948 se descubrió el MHC murino denominado región de histocompatibilidad-2 o H-2¹³³ cuya región homóloga en el humano se denomina HLA (del inglés: Human Leucocyte Antigens). Fue descubierta en la década de los 50's por Dausset por aglutinación de glóbulos blancos con sueros de individuos genéticamente diferentes mezclados con suero de un paciente politransfundido, condicionada por la presencia de anticuerpos dirigidos contra los aloantígenos desarrollados por el paciente; los antígenos se denominaron antígenos de leucocitos humanos (HLA), por encontrarse por primera vez sobre la superficie de los leucocitos^{132,133}. Desde su descripción se han llevado a cabo 12 conferencias internacionales y se han publicado múltiples investigaciones para describir la estructura, función y papel biológico de las moléculas del HLA¹³¹.

La región MHC se subdivide en tres clases principales, basándose en sus características estructurales y funcionales. La más centromérica es la región clase II, de aproximadamente 1 megabase, contiene los loci que codifican para los antígenos HLA-DP, DQ y DR que se encuentran en pares y codifican para las cadenas alfa y beta que se expresan en la superficie de las células CPA, de los linfocitos T activados y de los linfocitos T cooperadores¹³¹. Estas moléculas derivaron ancestralmente de la superfamilia de las inmunoglobulinas y están especializadas en la presentación de péptidos antigénicos derivados de proteínas extracelulares a los linfocitos T CD4+^{131 132}. En la región clase II se localizan también los loci HLA-DM y DO, que tiene como función facilitar el ensamble del péptido a las moléculas clase II y de los loci de las moléculas TAP que codifican para los transportadores asociados a presentación de antígenos y moléculas LMP que intervienen en el transporte y degradación de fragmentos proteicos que sirven de anclaje a las

moléculas clase I^{131,132,133}. Para la asociación entre TAP y las moléculas MHC en el retículo endoplásmico, se requiere la molécula tapasina, cuyo locus está en la posición centromérica de HLA-DP, entre los genes HSET y HKE 1.5¹³²

La región de clase I contiene los loci HLA-A, B y C y mide aproximadamente 2 megabases. Sus genes se expresan en la superficie de todas las células nucleadas y están involucrados en la presentación de péptidos derivados predominantemente de proteínas intracelulares a linfocitos T CD8+. La región clase I también contiene a los genes no clásicos HLA-E, F y G que parecen tener funciones relacionadas con la maduración fetal y con el reconocimiento de células NK^{131,132}.

La región clase III, localizada entre clase I y clase II, contiene diversos genes, incluyendo C2, C4A, C4B y Bf de la cascada del complemento, los genes Cyp21A y 21B para la síntesis de 21-hidroxilasa, el factor de necrosis tumoral y el gen que codifica para la proteína HSP-70 (proteína de choque térmico)¹³⁴. Se ha sugerido la presencia de una nueva región llamada clase IV, entre las regiones clase I y clase III; en ella se ubican genes como TNF, LFA y los que se expresan en células especializadas del sistema inmunológico como LST1/B144 y 1C7¹³⁴. El esquema del mapa del MHC se muestra en la Figura 3:

ESTRUCTURA DE MOLECULAS CLASE I

Es la región más telomérica y contiene a los loci HLA-A, B y C denominados la o genes clásicos clase I. Cada uno de ellos codifica una cadena α o cadena pesada (44kD) que se une a una β 2 microglobulina (12kD), codificada en el cromosoma 15, formando una molécula Clase I que presenta péptidos endógenos a linfocitos T CD8^{131,135}. La cadena α tiene una región intracitoplasmática, una transmembranal y tres dominios extramembranales α -1, α -2 y α -3. La β -2 microglobulina se une no covalentemente con la cadena α , es una proteína no soluble presente en sangre y orina que le da estabilidad a la cadena α y ayuda en su expresión sobre la superficie de las células^{131,133}. Los segmentos alfa forman una plataforma de ocho hebras betaplegadas que sirve de apoyo a dos hebras de hélices alfa paralelas. Las dos hélices alfa forman los lados de una hendidura cuya base está constituida por las hebras de la lámina beta. La hendidura es del tamaño apropiado para unirse a péptidos de entre 9 a 11 aminoácidos. El segmento alfa y la beta-

2 microglobulina forman un dominio tipo inmunoglobulina. La beta-2 microglobulina interactúa con la plataforma de la lámina beta plegada y el dominio no polimórfico alfa-3 contiene un "bucle" que se proyecta y es responsable de la unión al Tc CD8+^{131,132}. La diversidad de las moléculas de clase I en los sitios de unión al péptido permite la unión a un repertorio grande de péptidos, derivados de antígenos endógenos propios y extraños.

Los HLA-A, B y C son altamente polimórficas; este polimorfismo es mayor que cualquier otro sistema genético dentro del genoma humano. Hay más de 250 variantes alélicas del HLA-B, 120 de HLA-A y 70 de HLA-C. Las moléculas clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Los loci no clásicos HLA-E, F y G, denominados Ib o no clásicos, son poco polimórficos y codifican para moléculas con una distribución muy restringida, algunos se expresan en trofoblastos y tejido placentario, además E y G participan en la inhibición de la citotoxicidad mediada por NK y su expresión aberrante es uno de los mecanismos de evasión de tumores^{131,132}.

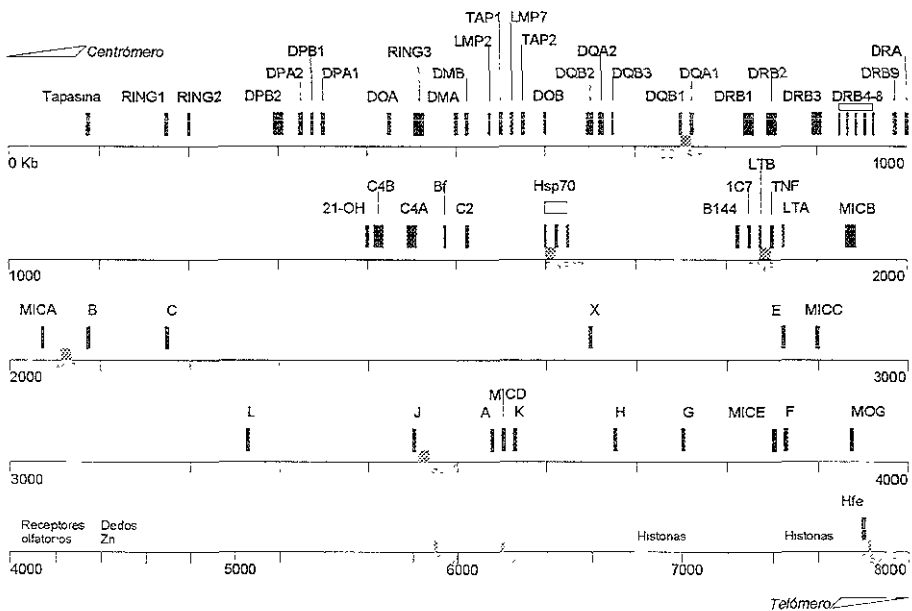


Figura 3. Mapa genético del MHC.

(Tomado de Rhodes DA, Trowsdale J Genetics and molecular genetics of the MHC Rev Immunogenetics 1999,1 21-31)

REGION DE CLASE II

La estructura de las moléculas clase II es similar a la de la clase I, pero son dos cadenas unidas a la membrana conocidas como α y β que se ensamblan no covalentemente para formar una hendidura de unión a antígenos que interactúa con los CD4 de las células T. La cadena alfa es más grande que la cadena beta debido a una mayor glucosilación. En las moléculas clase II, ambas tienen un extremo aminoterminal extracelular y un extremo carboxiterminal intracelular¹³³. Contiene a los genes α y β que codifican para las moléculas DR, DQ y DP. Estos se encuentran organizados en pares en el cromosoma: DRA1 y DRB1, DQA1 y DQB1, DPA1 y DPB1. Los loci DR, DQ y DP son muy polimórficos, pero en DR, la diversidad se limita a la cadena DR β dado que la cadena DR α es monomórfica¹³¹

a) FUNCION DE LAS MOLÉCULAS HLA

Las moléculas HLA son receptores para antígenos propios y extraños que son capturados por estas moléculas y son presentados a las células T.

Las moléculas clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas, mientras las moléculas clase II son confinadas a células especializadas en la presentación de antígenos (células B, células dendríticas, macrófagos). El nivel de expresión de las dos moléculas se aumenta por las citocinas como la interleucina-4, γ -interferón y TNF-alfa. Estas citocinas actúan sobre elementos reguladores principalmente en la región 5' de los genes de HLA y pueden inducir la expresión de moléculas clase II en células que normalmente no las expresan como las células endoteliales vasculares^{131 133}

Las moléculas clase I generalmente capturan péptidos endógenos generados en el citoplasma; por lo tanto, los péptidos que interactúan con las moléculas clase I requieren infección intracelular o una transcripción genética que conduzca a una traslación citoplasmática de proteínas para la presentación ante el sistema inmune. Los péptidos presentados por las moléculas clase I son generalmente reconocidos por células T antígeno-específicas con el fenotipo CD8. Entonces, las moléculas clase I son utilizadas para presentar antígenos a células T asesinas. Sin embargo,

algunas moléculas clase I no-clásicas como las HLA-E y HLA-G se especializan en la presentación de péptidos a las células asesinas naturales (natural killer, NK) para eliminar células HLA-negativas

131 133

PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS POR MOLÉCULAS CLASE I.

Los linfocitos Tc reconocen péptidos endógenos derivados de antígenos proteicos que son procesados en el interior de las células presentadoras de antígenos y posteriormente se expresan en su superficie asociadas con moléculas clase I. Las proteínas virales y los productos de genes mutados en las células tumorales representan antígenos endógenos. El requisito para la entrada de una proteína en la vía de procesamiento que conduce a la unión péptido-MHC clase I es la localización en el citosol.¹³³

La generación de péptidos en el citosol depende de su proteólisis por el proteosoma, un complejo multiprotéico con una amplia gama de actividades proteolíticas que como ya se comentó, se encuentra en el citoplasma de la mayoría de las células. Las dos subunidades catalíticas llamadas LMP2 y LMP7 están codificadas por genes de MHC. La expresión de LMP2 LMP7 está regulada positivamente por IFN-gamma. El proteosoma degrada muchas proteínas citoplasmáticas distintas mediante un enlace covalente de varias copias de un pequeño polipéptido llamado ubiquitina, proceso que requiere ATP y varias enzimas y que es el que rompe el antígeno. Después los LMP generan mayormente péptidos de una longitud de entre 5 a 11 aminoácidos que son los que mejor ajustan a las hendiduras de unión al péptido de las moléculas clase I.^{132,136}

La unión de las moléculas clase I sucede en el retículo endoplásmico. El transporte de los péptidos del citosol al retículo endoplásmico depende de TAP-1 y TAP-2.^{131,136} La cadena alfa y la beta-2 microglobulina sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso son transportadas hacia el retículo endoplásmico liso como cadenas polipeptídicas separadas; la cadena alfa se asocia con las moléculas chaperonas moleculares BiP y calnexina que impiden la degradación y facilitan el correcto plegamiento de la proteína.^{133,136} La beta-2 microglobulina se une a la cadena alfa parcial o completamente plegada y las chaperonas se disocian. Esta nueva unión cadenas alfa-beta-2 microglobulina son inestables y la calreticulina, el ERp57 y la tapasina las estabilizan para ser

transportadas con eficiencia fuera del reticuloendoplásmico. Después se asocian con las caras lumenales las TAP. Esto garantiza que los péptidos transportadores al reticuloendoplásmico por TAP se unan a las moléculas clase I vacías. Los complejos estables péptido-MHC clase I se trasladan a través del Golgi, donde las moléculas MHC sufren una modificación adicional por hidratos de carbono, y después se transportan a la superficie de la célula mediante vesículas exocíticas. En ese momento, los complejos de superficie pueden ser reconocidos por la célula T CD8+^{132,136}.

Además de la vía clásica de presentación descrita, existe una vía alterna para circunstancias determinadas. Esta vía alterna juega un importante papel en la vigilancia de patógenos intracelulares como *Mycobacterium*, *Plasmodium* y *Leishmania*, que son capaces de sobrevivir en los fagosomas, con destrucción de las células infectadas.

PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTIGENOS POR MOLÉCULAS HLA CLASE II.

Las células presentadoras de antígenos presentan los complejos péptido-MHC a células Th, induciendo a expresar citocinas y nuevas moléculas de superficie, iniciándose el proceso de expansión clonal de células T y de sus funciones efectoras. Las células T activadas estimulan funciones de presentación del antígeno por células próximas atrayendo así CPAs y estimulando las funciones efectoras de las células B¹³⁷. El paso inicial es la unión de un antígeno nativo a una célula presentadora. Los macrófagos y las células dendríticas unen muchas proteínas diferentes, a las moléculas de superficie se internalizan a través de un proceso de fagocitosis o pinocitosis. Las moléculas de superficie median también la unión y posterior internalización del antígeno a través del Fc de las inmunoglobulinas y los receptores para C3b del complemento presentes en la superficie de los macrófagos o de la Ig receptora de antígeno sobre el linfocito B. Los antígenos internalizados se localizan en vesículas intracelulares unidas por membranas llamadas endosomas^{132,136}. En los endosomas y lisosomas se lleva a cabo el procesamiento del antígeno pues tienen el pH ácido necesario para que se activen las proteasas como cathepsina y leucopentina, generando péptidos con una longitud de 10 a 30 aminoácidos y que se unen a las hendiduras de unión de las moléculas clase II. Las cadenas alfa y beta de las moléculas clase II se

sintetizan y asocian entre sí de forma coordinada en el reticuloendoplásmico. Los heterodímeros se unen a calnexina que funciona como chaperona molecular para un adecuado plegamiento de las cadenas alfa y beta y también se unen a una proteína no polimórfica llamada cadena invariable (Ii)^{132,133}. La Ii nativa es homotrímero y cada subunidad se une a un heterodímero alfa y beta de clase II recién sintetizados, formando un complejo catenario de 9 polipéptidos. Una vez realizada esta unión se libera calnexina y el complejo sale del reticuloendoplásmico, la Ii impide que los péptidos nacientes no plegados se unan a los heterodímeros clase II recién formados y los dirige también hacia los organelos endosómicos/lisosómicos donde serán degradados mediante proteólisis. Estos organelos se denominan compartimentos MHC clase II o MIIC, y poseen propiedades de una vesícula en transición entre endosoma y lisosoma. La proteólisis libera la mayor parte de la Ii, permaneciendo en la mayoría de los alelos fragmentos llamados péptidos de la cadena invariable asociados a clase II (CLIP)¹³⁷. En el interior del MIIC, los CLIP son eliminados de las moléculas MHC clase II por la acción combinada de enzimas proteolíticas y la molécula HLA-DM dándole estabilidad a clase II, pues actúa como molécula de intercambio de péptidos, facilitando la eliminación de CLIP¹³⁶. La molécula HLA-DO se asocia a HLA-DM regulando su actividad y plegando correctamente a clase II para que pueda unir péptidos formando complejos estables. Cuando los CLIP son eliminados, los péptidos se unen a clase II. Los complejos estables péptido-MHC clase II son transportados a la superficie de la célula mediante la fusión de la membrana con vesículas exocíticas, donde son expuestos a las células Th CD4+¹³³.

NOMENCLATURA DE LOS GENES HLA.

Por el constante incremento en el número de genes y alelos presentes del CMH, su nomenclatura se modifica frecuentemente. Existen 268 variantes alélicas de las moléculas HLA-B, 124 alelos de HLA-A y 74 alelos de HLA-C, las variantes alélicas de DR son 273, 58 DQ y 99 alelos de DP¹³⁸. Para la proteína que se define por serología o por técnicas celulares, sólo se indica el locus y un número, por ejemplo: HLA-A24, B7, Cw2, DR1, etc. Cuando la determinación del alelo se hace por técnicas moleculares, se denomina con la letra del locus y un asterisco seguido de números que representan: los dos primeros indican la especificidad, la cual representa

la definición serológica; los siguientes dos indican su subtipo molecular, por ejemplo: DRB1*0101 que es una de las 6 variantes descritas para DR1; el quinto dígito identifica variantes que solo se diferencian por una mutación sinónima (DQA1*03011, por ejemplo); finalmente el sexto y séptimo números identifican polimorfismos en los intrones o en las secuencias que flanquean al alelo, por ejemplo A*0301102. Un alelo nulo se expresa con una "N" final y uno que tiene niveles de expresión disminuidos se le añade una "L"^{131,139}. En el Cuadro 6 se ejemplifica el método de la nomenclatura del HLA y en el Cuadro 7 se muestra la nomenclatura de diferentes alelos.

Cuadro 6. Nomenclatura HLA

Nomenclatura	Indica:
HLA	Región HLA y prefijo del gen HLA
HLA-DRB1	Un locus particular del MHC, Ej DRB1
HLA-DRB1*13	Un grupo de alelos que codifican para el antígeno DR13
HLA-DRB1*1301	Alelo HLA específico
HLA-DRB1*1301N	Alelo nulo
HLA-DRB1*1301L	Alelo de baja expresión
HLA-DRB1*13012	Alelo que difiere en una mutación sinónima
HLA-DRB1*1301102	Alelo que contiene una mutación fuera de la región codificante
HLA-DRB1*1301102N	Alelo nulo que contiene una mutación fuera de la región codificante

Tomado del IMGT Website <<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>>

Cuadro 7 - Ejemplos de nomenclatura de alelos HLA

	Serología	Alelos
HLA-A	A1	A*0101-03
HLA-B	B7	B*0702-07013
HLA-C	Cw1	Cw*0102-0103
HLA-E		E*0101-0104
HLA-G		G*01011-01018
HLA-DR	DR4	DR1B*0401-0430
HLA-DQ	DQ2	DQB1*0201-0203
HLA-DP	DPw3	DPB1*0301

b) HLA Y ENFERMEDAD.

Los alelos HLA frecuentemente se asocian a enfermedades^{131 140,141}, particularmente, autoinmunes. Las asociaciones descritas hasta ahora en la mayoría de los casos no son absolutas y la susceptibilidad depende de alelos o haplotipos que también están presentes en individuos sanos por lo que la autoinmunidad no resulta de mutaciones raras que ocurran en los pacientes. Basados en las descripciones de las más de 400 enfermedades relacionadas a HLA, se han descrito algunas características de las patologías asociadas a HLA:

- 1) Son poligénicas y multifactoriales.
- 2) La mayoría son de naturaleza autoinmune, pero con enfermedades infecciosas y metabólicas también relacionadas.
- 3) Los factores ambientales tienen un importante papel en la expresión de la enfermedad.
- 4) La susceptibilidad está determinada por múltiples genes, ligados y no ligados a HLA.
- 5) No se conoce el evento desencadenante.
- 6) Las enfermedades no ejercen presión selectiva sobre la población

La diabetes mellitus-insulino dependiente se asocia a HLA DR3 y DR4, esta asociación puede ser secundaria a una asociación con HLA DQ2 y DQ3¹⁴². Muchas de las enfermedades reumatológicas se han asociado a HLA DR3 y DQ2¹³¹.

El mecanismo subyacente en la asociación de HLA con enfermedades autoinmunes no se conoce, sin embargo, una posibilidad es que esas formas alélicas de las moléculas clase II pueden presentar de manera selectiva autoantígenos a las células T. Esto podría representar mayor predisposición o susceptibilidad para manifestar las enfermedades en los individuos portadores de dichos alelos¹³¹

Algunas asociaciones de enfermedad con HLA son de importancia diagnóstica. El mejor ejemplo es la asociación de HLA B27 con la espondilitis anquilosante. Más del 95% de los pacientes con espondilitis anquilosante pueden expresar el HLA B27, independientemente del grupo étnico del que procedan. Sin embargo, la presencia de HLA B27 no es diagnóstica de espondilitis anquilosante ya que puede ser encontrado hasta en el 7% de caucásicos¹⁴³. Incluso, se ha

reportado la contribución de los subtipos de B27 en diferentes grupos etarios de pacientes con espondilitis anquilosante¹⁴⁴. En esta misma patología, se ha reportado la influencia de ciertos alelos como HLA-DRB1*08 para determinar el fenotipo de la espondiloartritis en pacientes mexicanos¹⁴⁵; para tener un mayor riesgo de desarrollar uveítis anterior aguda asociado al polimorfismo de LMP2¹⁴⁶. La asociación del HLA DR2 con narcolepsia es semejante a la del HLA B27 con espondilitis anquilosante; más del 90% de los pacientes con narcolepsia son portadores de este alelo¹⁴⁷. La presencia de ciertos alelos HLA pueden aumentar el riesgo para desarrollar ciertas enfermedades siendo importante en algunas situaciones. Por ejemplo, en una familia con varios miembros afectados con diabetes mellitus insulino-dependiente, la presencia de HLA DR3 o DR4 puede predecir cual de los individuos asintomáticos está en mayor riesgo de manifestar la patología.

La fuerte asociación de HLA DR4 con artritis reumatoide (en 70% de los pacientes) puede tener implicaciones pronósticas, ya que se describe que los pacientes homocigotos para ciertos alelos DR4 tienen mayor posibilidad de manifestar una forma agresiva de la artritis reumatoide¹⁴⁸. En pacientes mexicanos con artritis reumatoide también se ha demostrado que la severidad correlaciona con la presencia de DQA1*0311-DQB1*0302 en combinación con cualquier subtipo DR4¹⁴⁹. Hay enfermedades que se heredan con un patrón Mendeliano simple que se han asociado con ciertos alelos del HLA. Estas incluyen la hemocromatosis hereditaria, la deficiencia congénita de 21-hidroxilasa y la deficiencia de C2¹³¹.

La asociación de HLA con enfermedades neurológicas es extraordinaria. Esta incluye la asociación más fuerte conocida del HLA, la narcolepsia; también la más estudiada, en esclerosis múltiple. Otras asociaciones documentadas son la miastenia gravis y la epilepsia mioclónica juvenil¹⁴¹.

HLA Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

La esclerosis múltiple, como ya se comentó, es una enfermedad del sistema nervioso central con características inflamatorias considerada de etiología autoinmune^{150 151}. Su asociación con HLA se demostró desde 1972, primero con clase I con los alelos A3 y B7, posteriormente con clase II,

específicamente Dw2. La asociación con Dw2, DR15 y DQ6 ha sido confirmada en múltiples estudios, especialmente en poblaciones de Europa occidental. Se han descrito otras asociaciones, sin ser totalmente confirmadas ^{34,38,35}

ASOCIACIÓN CON HLA-Dw2.

Con los nuevos métodos en la identificación de los alelos y la determinación del HLA por métodos celulares primero y luego genómicos, la asociación con Dw2 se mantiene en la mayoría de las poblaciones estudiadas. En nomenclatura genómica, la especificidad celular Dw2 corresponde a DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102 y DQB1*0602. Para determinar asociaciones del HLA en EM, se deben utilizar técnicas moleculares con suficiente resolución para distinguir al menos el DRB1*1501 de otros subtipos de DR2. Utilizando solamente métodos serológicos para determinación de DR2, los resultados pueden ser confusos especialmente en poblaciones donde otros haplotipos DR2 diferentes al Dw2 sean comunes. Con técnicas celulares o moleculares, es posible distinguir Dw2 de otros DR2 específicamente el Dw12, el Dw21 y el Dw22, que por serología se determinan como DR2. Por estas razones, la impresión general es que la asociación con DR2 esta confinada a los europeos. Un ejemplo de lo anterior es un estudio publicado de población gitana húngara, donde se demostró una alta frecuencia de DR2, pero sin evidenciar una asociación de EM con este haplotipo; sin embargo, por técnicas moleculares se demostró que la población expresaba DRB1*1601 en lugar de DRB1*1501.¹⁴¹

Con el uso de estas técnicas se ha demostrado un incremento significativo del haplotipo DRB1*1501-DRB5*0101-DQA1*0102-DQB1*0602 en la mayoría de poblaciones estudiadas¹⁵².

Se ha determinado, que la asociación en caucásicos con DRB1*1501, DQB1*0602 y DQA1*0102 confiere un riesgo relativo de 4.0 para desarrollar EM^{60,153}.

La secuencia de DNA de los genes DR y DQ de los haplotipos Dw presente en pacientes con EM es idéntica a la secuencia de los controles Dw2-positivos. El análisis del polimorfismo en los pacientes con EM y Dw2 en los sanos muestra resultados idénticos. Lo anterior indica que se trata de un Dw2 normal y no de una variante mutante que aumenta el riesgo de EM ^{154,155}

En poblaciones europeas, este haplotipo es primario en la EM. Alrededor del 60% de los pacientes son portadores. Sin embargo, si se hace a un lado esta asociación se pueden observar otros alelos secundarios involucrados. Una de estas posibles asociaciones es con el haplotipo DR17 y DQ2, que corresponden a DRB1*0301, DRB3*0101, DQA1*0501 y DQB1*0201¹⁴¹.

Se ha publicado también con mayor frecuencia, una aparente asociación de pacientes con EM y DR3 sin llegar a confirmarse aún^{156,157,158,159,160}. La asociación con otros haplotipos ha sido publicada en diferentes grupos étnicos. Se ha sugerido la asociación con DR4 en árabes y en pacientes de Cerdeña^{161,162}. Estudios posteriores en Cerdeña demostraron una fuerte asociación con DRB1*0301 y menos con DRB1*04, especialmente en subtipo DRB1*0405. El DR6 ha sido informado en japoneses y mexicanos^{163,164}. Recientemente, sin embargo, la asociación de DR6 en japoneses no se confirmó, pero si la asociación con DR2 y DQB1*0602¹⁶⁵. Recientemente se encontró un incremento de los alelos DR15-DQ6 y DR13-DQ7 y una disminución de DR1-DQ5 en España¹⁶⁶. En población judía se describe la susceptibilidad definitiva condicionada por DRB1*1501, DQA1*0102 y DQB1*0602 en Ashkenazis y no-Ashkenazis; sin embargo, en los sefaraditas el gen de susceptibilidad es DRB1*1303. Este alelo está serológicamente relacionado con DR6 y DR13 (un subtipo de DR6) que se encontró en la población mexicana¹⁶⁷. Por otro lado, se ha involucrado también al DPw4. Tampoco se ha demostrado una asociación específica con DPA y DPB independiente del Dw2.¹⁴¹

HLA Y SUBTIPOS CLINICOS DE EM.

Como se describió previamente, la EM se divide en subtipos clínicos. Se han propuesto diferentes asociaciones de HLA con cada subtipo¹⁶⁸, sin embargo son controvertidas¹⁶⁹. En un estudio reciente de población japonesa, los pacientes se dividieron en dos subtipos clínicos de EM, una forma europea y otra forma asiática. Se demostró que los alelos DRB1*1501 y DRB5*0101 son de susceptibilidad en el tipo europeo (41%), vs sanos (14%) y no en los del tipo asiático (0%)¹⁷⁰. Por otro lado, el DRB1*0403 se halla incrementado en la forma occidental aunque al corregir el valor de p, la asociación se pierde. Otras investigaciones en japoneses han postulado al

DRB1*0802. Recientemente, se evidenció que la forma oculo-espinal en japoneses se asocia a DPB1*0501 que no se encuentra habitualmente en la EM convencional y en la que la susceptibilidad depende en parte del DPB1*0301¹⁷¹. En estudios previos con pacientes con neuritis óptica con la posibilidad de desarrollar EM, no se ha podido confirmar mayor riesgo que para la población general portadora de Dw2^{172,173}. En relación al pronóstico de la EM según su asociación con los diferentes alelos del HLA, se ha sugerido que DR1, DQ5 y DR17, DQ2 se asocian con peor pronóstico.¹⁷⁴

ASOCIACIÓN CON HLA CLASE I.

Usando técnicas genómicas de determinación del HLA clase I, recientemente se ha encontrado que la asociación descrita originalmente con HLA-A3 es, sorprendentemente, independiente de la asociación con Dw2, mientras que con B7 no lo es¹⁴¹. No se han encontrado asociaciones adicionales con HLA-C. Un dato también interesante es el hecho que el alelo A2 está disminuido independientemente del Dw2. Lo anterior sugiere una influencia protectora de los genes en HLA clase I, fenómeno descrito previamente en la EAE. Recientemente se publicó en un grupo de pacientes suecos con EM que el alelo HLA-A*0301 aumenta el riesgo de EM independientemente de DRB1*15 y DQB1*06. Además que el HLA-A*0201 disminuye el riesgo en general y para los portadores de DRB1*15 y DQB1*06 de 3.6 a 1.5¹⁷⁵. Por otro lado, interesantemente, en un estudio reciente de pacientes en una región de España se evidenció la asociación de HLA-Cw7 en 48% de los pacientes contra 21% en los controles sanos.¹⁷⁶

En relación con genes relacionados a moléculas clase I, específicamente las moléculas TAP ya mencionadas, que se habían propuesto como probables condicionantes de mayor susceptibilidad para la EM no se han confirmado^{58,59}.

HLA Y EM EN MÉXICO

En México se observó el incremento de la EM en poblaciones hospitalarias en los últimos 20 años, con el propósito de definir la situación real de la enfermedad, ya que en 1970 Alter y Olivares

¹⁷⁷ publicaron una prevalencia de 1.6 por 100,000 habitantes, una de las tasas más bajas del mundo. Sin embargo, este estudio se realizó solo con pacientes que tiene acceso al servicio médico de los trabajadores del estado y no en población abierta. La prevalencia real de EM en México no está definida, pero los estudios recientes han propuesto un aumento en la prevalencia de EM ^{8,9,178}, implicando hechos como un mejor diagnóstico por contar con la infraestructura necesaria para el mismo, sin embargo, la determinación del HLA en estos pacientes no ha sido totalmente descrita. En un estudio publicado en 1986 por Gorodezky y cols.¹⁶⁴ de 52 pacientes con diagnóstico de EM, se publicó asociación clara de DR6 (semejante a los hallazgos en población japonesa), DR13 y la combinación de A3, B7 y DR2. También se propone una asociación de los marcadores DR con la gravedad de la enfermedad.

En este mismo estudio¹⁶⁴ se propuso que la "mezcla" de raza y cultura son los factores más importantes en determinar el riesgo de manifestar la enfermedad, influenciados por una mayor urbanización y la mejoría de los hábitos dietéticos. También se determinó que la genética racial tiene influencia más importante en la etiología de la EM que la localización geográfica^{8, 9,164}.

PROTOCOLO DE ESTUDIO.

Planteamiento del problema

¿Existe contribución de los genes Clase I y Clase II determinados a nivel molecular a nivel de alelo del HLA en la presentación clínica y pronóstico de la Esclerosis Múltiple en pacientes mestizos mexicanos?

HIPOTESIS.

H₀: Los genes del HLA no contribuyen en la presentación, manifestaciones y pronóstico de la Esclerosis Múltiple en mestizos mexicanos.

H_a: Los genes del HLA si contribuyen en la presentación, manifestaciones y pronóstico de la Esclerosis Múltiple en mestizos mexicanos.

OBJETIVOS

General.

1.- Demostrar cuales son los genes del HLA Clase I y Clase II que contribuyen a la expresión de la Esclerosis Múltiple en mestizos mexicanos.

Particulares.

- 1.- Clasificar los aspectos clínicos y epidemiológicos de la Esclerosis Múltiple en un grupo de pacientes mestizos mexicanos.
- 2.- Tipificar los alelos a nivel molecular de los genes Clase II del HLA y los antígenos clase por técnicas de doble fluorescencia.
- 3 - Demostrar mediante un análisis estadístico si al comparar la distribución alélica entre pacientes y sanos existe alguna asociación significativa

MATERIAL Y METODOS.

Tipo de estudio.

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, experimental de casos y controles.

Población en estudio

Se incluyeron 51 pacientes con diagnóstico establecido de EM, según los criterios aceptados internacionalmente, que nacieron, viven y han vivido en México sin antecedente de familiares extranjeros hasta la tercera generación o el antecedente de un familiar español solamente; vistos en la clínica de EM y servicio de Neurología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (I.N.N.N.) de México, D.F. de abril de 1999 a abril del 2000.

Grupo testigo.

Se integró un grupo control integrado por 170 individuos aparentemente sanos, familiarmente no relacionados, sin antecedentes familiares o personales de la enfermedad estudiada o algún otro padecimiento autoinmune. Todos ellos son mestizos mexicanos originarios en su mayoría de la zona del altiplano, cuyos padres, abuelos bisabuelos fueron y son mestizos mexicanos nacidos en México y con apellidos hispánicos. Los sujetos incorporados forman parte del personal del INBRE, estudiantes y donadores voluntarios de médula ósea.

Los análisis del MHC se llevaron a cabo en el Departamento de Inmunogenética del INBRE.

Criterios de Inclusión:

- Mestizos mexicanos con diagnóstico clínico de Esclerosis Múltiple (EM).
- Ambos sexos.
- Criterios diagnósticos para Esclerosis Múltiple

1.- Alteración específica y objetiva del SNC en la exploración neurológica.

2.- La alteración debe incluir predominantemente tractos largos de la sustancia blanca, incluyendo: vía piramidal, vías cerebelosas, fascículo longitudinal medio, nervio óptico y columnas posteriores

3.- Por historia o al examen físico afección de dos o más áreas del SNC.

- c) La IRM puede ser utilizada para documentar la segunda lesión. Las lesiones en IRM deben ser cuatro lesiones involucrando sustancia blanca o tres si una de ellas es periventricular

Deben ser mayores de 3mm Para pacientes mayores de 50 años, se deben de cumplir al menos 2 de los siguientes criterios por imagen: a) lesiones \geq 5mm; b) lesiones periventriculares y c) lesiones en fosa posterior

d) Los potenciales evocados pueden ser utilizados para documentar la segunda lesión cuando el examen físico no la documente

4.- El patrón clínico debe consistir en a) dos o más episodios separados de afección al SNC en diferentes sitios, de una duración al menos de 24 horas y con un mes de separación, o b) progresión gradual en un lapso de 6 meses si se acompaña de aumento en la síntesis de IgG en dos o más bandas oligoclonales en el LCR.

5 - Inicio entre los 15 y 60 años de edad.

6.- Las manifestaciones del paciente no deben ser atribuibles a otra enfermedad, incluyendo la determinación de: análisis del LCR. IRM de cráneo y/o médula espinal, niveles de B12, virus de inmunodeficiencia humana, VSG, factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, VDRL, enzima convertidora de angiotensina (cuando exista sospecha de sarcoidosis), serología para Borrelia (enfermedad de Lyme), ácidos grasos de cadena muy larga adrenoleucodistrofia) y lactato en LCR, biopsia muscular o análisis de DNA mitocondrial (para mitocondriopatías).

Según estos criterios, se determinan diferentes categorías diagnósticas:

- EM definitiva.- si se cumplen los seis criterios.
- EM probable.- si se cumplen los seis criterios excepto: a) una anomalía objetiva a pesar de dos episodios sintomáticos o b) un episodio sintomático a pesar de dos o más anomalías objetivas.
- Riesgo de EM.- si se cumplen los seis criterios excepto solo un episodio sintomático y una anomalía objetiva.

Criterios de Exclusión:

- Padres o abuelos extranjeros.
- No autorización para participar en el estudio.
- Muestras incompletas.

Variables:

Se tomaron en cuenta datos clínicos y epidemiológicos:

- Género: masculino y femenino.
- Edad.
- Estado civil: soltería, matrimonio, unión libre, divorcio, separación, viudez.
- Lugar de nacimiento.
- Lugar de residencia.
- Lugar de nacimiento de padres y abuelos.
- Antecedente de familiares con EM.
- Historia de viajes al extranjero (incluyendo el lugar y tiempo de permanencia)
- Escolaridad: ninguna, primaria incompleta, primaria completa, secundaria, preparatoria, carrera técnica, licenciatura, postgrado, otros
- Ocupación: ninguna, hogar, estudiante, obrero, empleado, negocio propio, agricultor, profesionalista, otra.
- Edad de inicio de la EM
- Primer síntoma: motor, sensitivo, neuritis óptica, diplopia, ataxia, mielitis transversa, dolor o vértigo.
- Factor desencadenante identificado: embarazo, puerperio. Vacunación, cirugía, infección, traumatismo, tensión emocional, otro.
- Fecha de diagnóstico con el tiempo de evolución
- Forma clínica: brote-remisión, progresiva-primaria, progresiva-secundaria y recurrente-progresiva.
- Número de ataques previos: uno, de dos a cinco, de seis a nueve y más de diez.
- Tratamiento de los brotes: bolos de metilprednisolona, prednisona V.O, otro inmunosupresor
- Respuesta al tratamiento de brotes: recuperación total, recuperación con secuela y ausencia de efecto

- Enfermedades asociadas: diabetes mellitus, hipertensión arterial, epilepsia, trastorno psiquiátrico, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, distiroidismo, hepatitis autoinmune, otra.
- Tratamiento actual: rehabilitación, esteroide, interferon, ninguno, otro
- Respuesta al tratamiento actual: recuperación total, recuperación con secuela, no efecto.

Se revisaron los estudios paraclínicos realizados, tomando en cuenta su normalidad o anormalidad de:

- Tomografía de cráneo.
- Imagen de Resonancia Magnética de cráneo.
- Potenciales Multimodales (PEMM)
- LCR: medición de glucosa, proteínas, presencia de bandas oligoclonales y celularidad

Aspectos genéticos y moleculares

- Determinación del grupo sanguíneo ABO.
- Determinación de los alelos HLA: Clase I mediante la técnica linfomicrocitotoxicidad por doble tinción de fluoresceína sobre linfocitos T separados por perlas magnéticas y los Clase II mediante PCR-SSOP.

PROCEDIMIENTOS

Obtención de DNA.

La purificación se realizó por el método de proteinasa K, fenol-cloroformo-álcohol isoamílico.

- 1 A cada uno de los individuos estudiados se le extrajeron 20 mL de sangre periférica utilizando EDTA como anticoagulante.
- 2 La sangre total se centrifugó a 3 000 rpm (1600 g) durante 15 min a 4°C y se desechó el plasma

3. La capa superior de glóbulos blancos o "buffy coat" se transfirió a otro tubo (pueden pasar también algunos eritrocitos). Se agregó solución de lisis I hasta llenar el tubo y se agitó suavemente.
4. Se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante.
5. Los dos pasos anteriores se repitieron hasta que las células blancas quedaron libres de eritrocitos (generalmente dos lisis fueron suficientes).
6. Al paquete de células blancas se le agregó solución de lisis II y se agitó para desprenderlo del tubo. Se completó el volumen con la solución de lisis II.
7. Se centrifugó nuevamente a 3 000 rpm durante 15 min a 4°C y se desechó cuidadosamente el sobrenadante. El paquete de núcleos que estaba en el fondo del tubo se resuspendió en 1 mL de SSC 1X.
8. Se añadieron 4 mL del amortiguador de lisis para glóbulos blancos (WCLB) y se dejó incubando toda la noche a 53°C en baño maría.
9. Se añadió un volumen equivalente (v/v) de fenol saturado y se agitó suavemente hasta obtener una emulsión completa.
10. Se centrifugó nuevamente 15 min a 3 000 rpm a 4°C y la fase superior se pasó a un tubo limpio cuidando de no tomar la interfase donde se encontraban las proteínas precipitadas.
11. Se repitió una vez esta extracción con fenol saturado de la misma manera y después se hizo una vez más con solución de fenol-cloroformo y otra con cloroformo/alcohol isoamílico.
12. La fase superior de la última extracción se pasó a un tubo nuevo y se añadió NaCl 5M para obtener una concentración final de 100 mM (aprox. 200 µL) e isopropanol absoluto frío volumen a volumen.
13. Se agitó suavemente hasta que el DNA formó un precipitado blanco que parece una medusa. Esta se recogió con la punta de una varilla.
14. Se enjuagó con etanol al 70% frío sumergiendo y sacando la varilla con el DNA y se dejó secar el DNA. Posteriormente se resuspendió en TE 1X en un tubo eppendorf (el volumen dependió del tamaño de la medusa).
15. La concentración del DNA se obtuvo leyendo la absorbancia que tiene a 260 nm contra un blanco de TE 1X. Al multiplicar la lectura por 50 y por el factor de dilución se obtuvo la concentración que se expresa en µg/mL.

Separación de linfocitos T con perlas magnéticas

Las perlas superparamagnéticas son partículas de menos de 1 micra de diámetro que se cubren con anticuerpos monoclonales, y se concentran mediante el uso de un campo magnético. Cuando se deja de aplicar el campo magnético, las perlas pierden cualquier magnetismo residual y pueden ser magnetizadas y dispersadas repetidamente. La especificidad del anticuerpo monoclonal que se les acopla a las perlas, determina el tipo de célula que se colecta.

Para la separación de linfocitos T se le acopla a la superficie de las perlas magnéticas el anticuerpo monoclonal anti CD2 que se une específicamente al receptor de rosetas E que está sobre los linfocitos T. El uso de un "revelador" funciona como anti-aglutinante y facilita la función de las perlas magnéticas.

Método

- 1.- Tomar 20-30 mL de sangre en tubos vacutainer con ACD. De estos, se utilizan dos tubos (12 mL) para la separación de linfocitos T
- 2.- Centrifugar 10 min a 2000 rpm.
- 3.- Aspirar el concentrado celular del paquete globular ("buffy coat") y transferirlo a un tubo de vidrio de 10 mL.
- 4.- Resuspender el reactivo de Fluorobeads T agitando intensamente en el vortex durante 10 segundos.
- 5.- Adicionar 100 mL (se pueden usar 45 mL para 12 mL) de la suspensión de fluorobeads T a la muestra.
- 6.- Mezclar bien por inversión de 2 a 3 veces.
- 7.- Agitar durante 3 minutos en un agitador rotatorio.
- 8.- Añadir de 2 a 3 mL de la solución de trabajo del revelador "developer T" y mezclar bien por inversión.
- 9.- Colocar el tubo en la barra magnética durante 3 minutos.
- 10.- Extraer el sobrenadante del tubo sin retirarlo de la barra magnética.
- 11.- Adicionar alrededor de 5 mL de PBS, y colocar durante un minuto en la barra, con el objeto de lavar las células.
- 12.- Descartar todo el sobrenadante
- 13.- Lavar una vez más con 2 mL PBS durante un minuto.
- 14.- Descartar todo el sobrenadante.

- 15 - Resuspender en 1 mL de medio McCoy modificado y pasar la suspensión a un tubo Fisher
- 16 - Colocarlo en la barra magnética
- 17 - Descartar absolutamente todo el sobrenadante.
- 18.- Adicionar 0.5 mL de acetato de carboxifluoresceína.
- 19 - Mezclar bien e incubar el tubo en forma horizontal (a 37° C durante 15 minutos, en la oscuridad).
- 20.- Colocar el tubo Fisher en la barra magnética durante un minuto.
- 21 - Descartar el sobrenadante.
- 22 - Hacer 2 lavados de un minuto cada uno de ellos con 1 mL de medio McCoy modificado.
- 23 - Resuspender las células en 0.5 mL de medio McCoy modificado
- 24.- Colocar entre porta y cubreobjetos una gota de la muestra y una gota de naranja de acridina/bromuro de etidio. Observar al microscopio, verificando que la viabilidad sea mayor del 90% y que haya una concentración alta de células.

Tipificación de antígenos HLA Clase I mediante doble fluorescencia

Este método consiste en la tipificación de antígenos HLA mediante la técnica de microinfocitotoxicidad. Se usan los linfocitos T separados con perlas magnéticas. La reacción de citotoxicidad se hace evidente mediante una tinción de doble fluorescencia.

El acetato de carboxifluoresceína es un colorante vital, capaz de atravesar la membrana intacta de las células por lo que da una fluorescencia verde cuando el colorante se excita a 490 nm debido a que ciertas enzimas celulares inespecíficas lo convierten en carboxifluoresceína polar. Otros colorantes como el naranja de acridina, bromuro de etidio y el yoduro de propidio tiene una acción similar; el primero da una coloración verde que indica que las células están viables. Los otros dos tiñen de rojo a las células muertas.

El bromuro de etidio y el yoduro de propidio son casi idénticos. Ambos se incorporan al DNA y emiten una fluorescencia roja a 650 nm y a 620 nm respectivamente, cuando la excitación de luz es de 490 nm. Estos reactivos incrementan la intensidad de la fluorescencia 100 veces después de su integración al DNA. Son tinciones vitales, por lo que las membranas intactas los excluyen.

Nota: Debido a que estos últimos dos colorantes son oncogénicos, es importante manejarlos con guantes y tomar todas las precauciones necesarias.

Así mismo es necesario el uso de un "quenched" (apoyador de emisiones de electrones) para minimizar el fondo de la fluorescencia, y es importante agregar EDTA a éste, para detener la activación de la cascada de complemento.

Método

1 - Con una microjeringa múltiple se toma de la suspensión de los linfocitos T (1.5×10^6 cel/mL) obtenidos mediante el método de purificación con perlas magnéticas. Colocar 1 mL en cada una de las excavaciones de la microplaca, que previamente se llenó con los antisueros correspondientes. Se agita unos segundos en el vortex. En las cajas con antisueros específicos para los antígenos de clase I se colocan las muestras de linfocitos T.

2.- Incubar las placas con antisueros para loci A, B y C 30 minutos a temperatura ambiente

3.- Agregar 5 μ L de complemento de conejo a cada pozo. El tipo de complemento depende de la clase de linfocitos que se van a tipificar.

Nota el yoduro de propidio se añade al complemento antes de ponerlo en las placas. Se utilizan 20 μ L de yoduro de propidio por cada mL de complemento.

4.- Incubar ambas microplacas con antisueros para clase I durante una hora a temperatura ambiente en la oscuridad.

5.- Adicionar 5 mL de tinta china en las microplacas para clase I.

6.- Leer las placas en un microscopio invertido de fluorescencia a 250 aumentos. Calcular el número de células vivas y muertas. Si la reacción Ag/Ac/complemento se llevó a cabo, las células vivas se verán con una fluorescencia verde y las células muertas roja.

7.- Los resultados se informan como el porcentaje de mortalidad utilizando el código oficial de todos los laboratorios de histocompatibilidad del mundo que incluye valores de símbolo (- y +) y numéricos (1, 2, 4, 6 y 8) para definir el resultado de la prueba de microlinfocitotoxicidad

0 al 10% de mortalidad	-	(1)	Negativo
11 al 20% de mortalidad	-/+	(2)	Negativo dudoso
21 al 50% de mortalidad	+/-	(4)	Positivo dudoso
51 al 80% de mortalidad	++	(6)	Positivo
81 al 100% de mortalidad	+++	(8)	Positivo intenso
	(0)		No definible

Nota. Las placas se pueden almacenar a 2-5° C un máximo de 3 días para su lectura.

Tipificación de genes clase II por PCR-SSOP

Para la tipificación de los loci DQA1 y DQB1 de pacientes y testigos se realizó la amplificación genérica por PCR del segundo exón de dichos genes. Para la tipificación de DRB1 se siguió la estrategia que se indica en la Figura 3.

Una vez obtenido el producto de PCR, se colocó en membranas y se hibridó con sondas de oligonucleótidos secuencia específicas. El revelado de la hibndación se efectuó por quimioluminiscencia. Los iniciadores, sondas y condiciones empleadas fueron las recomendadas, en los protocolos desarrollados para el 12vo Taller Internacional de Histocompatibilidad. Se emplearon un total de 100 sondas para la tipificación DRB1, 29 para DQA1 y 36 para DQB1. Las secuencias de los iniciadores empleados se muestran en el Cuadro 10.

La estrategia para la tipificación del locus DRB1 incluye:

- Amplificación genérica del gen DRB1 e hibridación con un grupo de sondas que identifican los grupos de alelos presentes.
- Análisis de resultados.
- Segunda amplificación con iniciadores grupo específicos según resultados obtenidos para cada muestra en la primera amplificación e hibridación con el grupo de sondas correspondientes a la amplificación realizada.
- Análisis de resultados y asignación de los alelos.

A. Amplificación

1.- Los componentes de la mezcla de reacción que se muestran en el cuadro 8, se descongelaron y se añadieron a un tubo eppendorf, utilizando los iniciadores correspondientes al locus que se va a amplificar .

2- Los tubos con las mezclas de reacción se colocaron en el termociclador y se corrió el programa que se indica en el de acuerdo al locus que se iba a amplificar

3.- Una vez terminada la amplificación se verificó que se haya obtenido una cantidad adecuada de producto mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

4.- A 8 μ L del producto amplificado se le añadió 5 μ L de amortiguador LB. Los productos se colocaron en los pozos del gel junto con un marcador de peso molecular y se corrieron durante 30 min a 130V.

5.- Para corroborar la presencia de las bandas el gel se colocó sobre un transiluminador de luz UV. Debían observarse bandas intensas y del peso molecular esperado; en caso contrario se repitió la amplificación.

B. Hibridación con sondas alelo específicas

1. Los productos de PCR se diluyeron 1:10 en TE
2. Mediante un aparato de Dot-Blot manual, se sembraron 50 µL de la dilución en membranas de nylon cargadas positivamente.
3. Se desnaturalizó el DNA incubando las membranas en NaOH 0.4M 10 min.
4. Se neutralizó con SSPE 10X durante 10 min, se expusieron a luz UV en un aparato de "cross-linking" en el programa adecuado. En este aparato se irradiaron con luz ultravioleta las membranas de forma tal que el DNA que se colocó en ellas quedara covalentemente unido a la membrana y no se desprendiera durante las hibridaciones y lavados subsecuentes.
5. Las sondas se marcaron con ddUTP-dig en su extremo 3' se preparó la siguiente mezcla para 95 picomoles de oligonucleótido:

Tailing Buffer 5X		4.0	µL
CoCl ₂ (25 mM)	4.0	µL	
Oligonucleótido (10 pmol/µL)	9.5	µL	
dd UTP-Dig (1 nmol/µL)	1.0	µL	
TdT (25 U/µL)	1.5	µL	
	20.0	µL	

6. Se incubaron a 37°C durante 30' y se ajustaron a 1 pmol de sonda marcada/ µL.
7. Las membranas con el producto de PCR se colocaron en tubos de 50 mL y se añadió solución de prehibridación.
8. Se incubaron al menos durante 2 horas a 42°C.
9. Transcurrida la incubación se añadió la cantidad de sonda necesaria y se hibridó durante toda la noche a 42°C
10. Transcurrido el tiempo de hibridación la membrana se enjuagó 2 veces con SSPE 2X/SDS 1% a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con SSPE 5X/SDS 0.1% a la temperatura específica de la sonda utilizada (T_m). La T_m se calculó de acuerdo a la composición de bases de la sonda según la fórmula empírica: $T_m = 4(G+C) + 3(A+T)$

C. Quimioluminiscencia

1. Las membranas se enjuagaron en amortiguador 1 dos veces y una en amortiguador 2

2. Se incubaron las membranas en amortiguador dos con anticuerpo anti-Digoxigenina (DIG) 1:10 000 durante 30 min a temperatura ambiente.
3. Se enjuagó dos veces en el amortiguador 1 por 2 min y una vez en el amortiguador 3
4. Se incubó en el amortiguador 3 con CSPD (disodium3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)Tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]Decan}-4-yl)) Phenylphosphate (1:500) durante 5 minutos.
5. Se escurrió el exceso de CSPD y se introdujeron las membranas en una bolsa de plástico que se selló con calor.
6. Se incubaron las membranas 30 min a 37°C y se colocaron en un cassette de exposición con una placa radiográfica durante 15 min (En un cuarto oscuro).
7. Se retiró la placa radiográfica y se reveló 2 minutos en revelador, se enjuagó en agua y se colocó durante 2 min en fijador, se enjuagó y se dejó secar.
8. Si la intensidad no es adecuada se volvió a exponer un tiempo diferente, de acuerdo a si se deseaba una mayor o menor intensidad en la radiografía

Cuadro 8. Mezclas de reacción

	Locus DRB1 genérico y grupo específicos	Locus DQA1	Locus DQB1	Final
dNTP's 200mM	10 µL	10 µL	10 µL	20 mM
Amortiguador 10X s/MgCl ₂	10 µL	10 µL	10 µL	1X
MgCl ₂ 25mM	6 µL	6 µL	8µL	1.5 mM / 2 mM
Iniciadores (25 pmol/µL)	2 µL(c/u)	2 µL(c/u)	2 µL(c/u)	50 pmoles totales
Taq polimerasa (5 U/µL)	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL	2 U/µL
DNA (≈250 ng/µL)	2 µL	2 µL	2 µL	≈1µg
ddH ₂ O	cbp 100 µL	cbp 100 µL	cbp 100 µL	

Cuadro 9. Condiciones de amplificación.

	Locus DRB1				Locus DQA1	Locus DQB1
	DR genérico	DR1	DR2 y DR4	DR52-DRB1		
Desnaturalización	96 °C 45''	96 °C 45''	96 °C 45''	96 °C 45''	96 °C 45''	96 °C 45''
Alineación	55 °C 45''	64 °C 45''	60 °C 45''	58 °C 45''	55 °C 45''	55 °C 45''
Extensión	72 °C 1'	72 °C 1'	72 °C 1'	72 °C 1'	72 °C 1'	72 °C 1'
Repeticiones	35	35	30	30	35	35
Extensión final	72 °C 10'	72 °C 10'	72 °C 10'	72 °C 10'	72 °C 10'	72 °C 10'

Cuadro 10. Iniciadores para la tipificación de clase II

Iniciadores	Codón	Secuencia
HLA-DRB1 genérico		
2DRBAMP-A	(ITR8)-8	5'-ccc.cac.agc acg.ttt.ctt.g.-3' 5'-...-...-...-...-...-...-...-...-3' mezcla degenerada
2DRBAMP-B	87-94	5'- ccg ctg cac tgt gaa gct ct.-3'
Iniciadores para subtipificar los subgrupos DR		
DR1-DRB1		
2DRBAMP-1	8-14	5'-.ttc ttg tgg cag ctt aag tt.-3'
2DRBAMP-B		el mismo de la amplificación genérica
DR2-DRB1		
2DRBAMP-2	7-13	5'-.ttc ctg tgg cag cct aag agg.-3'
2DRBAMP-B		el mismo de la amplificación genérica
DR4-DRB1		
2DRBAMP-4	6-13	5'-.gt ttc ttg gag cag gtt aaa c.-3'
2DR86AMP-GR	86-92	5'-.ctg cac tgt gaa gct ctc ac.-3'
2DR86AMP-VR	86-92	5'-.ctg cac tgt gaa gct ctc ca -3'
DR52-DRB1		
2DRBAMP3	5-12	5'-.ca.cgt.ttc.ttg.gag.tac.tct.ac 3'
2DR86AMP-GR	86-92	5'-.ctg cac tgt gaa gct ctc ac.-3'
2DR86AMP-VR	86-92	5'-.ctg cac tgt gaa gct ctc ca -3'
DQA1		
2DQA AMP-A	11-17	5'-.at.ggt.gta.aac.ttg.tac.cag -3'
2DQA AMP-B	80-87	5'-.tt ggt.agc.ggt.aga.gtt.g-3'
DQB1		
2DQB AMP-A	13-20	5'-.cat.gtg.cta.ctt.cac.caa.cgg -3'
2DQB AMP-B	78-84	5'-.ctg gta.gtt.gtg.tct.gca.cac.-3'

Análisis estadístico

Cálculo de frecuencias alélicas en la población y frecuencias génicas

La frecuencia en la población (FP) representa el porcentaje de individuos portadores de un alelo en el total de individuos estudiados y la frecuencia génica (FG) es la frecuencia del gen en la población. Para calcular a partir de población familiarmente no relacionada se aplica la fórmula de Haldane. Los datos que se obtienen son exactos siempre y cuando el sistema genético que se está probando se encuentre en equilibrio de Hardy Weinberg en la población en cuestión (i, ii). La fórmula que se aplicó para calcular la FG es:

$$FP_i = \frac{n_i}{N} \quad FG_i = 1 - \sqrt{1 - FP_i}$$

En donde n_i = número de individuos portadores del alelo i , N = tamaño de la población, FP_i = Frecuencia de i en la población, FG_i = Frecuencia génica de i .

Prueba de Chi cuadrada con corrección de Yates X^2Y

La comparación de las frecuencias entre dos poblaciones (enfermos y testigos) se efectuó utilizando la prueba de Chi cuadrada (X^2) lo que permite evaluar la significancia estadística de una probable asociación entre el marcador y la enfermedad. Si la frecuencia de un alelo se encuentra significativamente elevada en los pacientes, dicho alelo se asocia a susceptibilidad y por el contrario, si se encuentra significativamente disminuida quiere decir que es un probable alelo de protección.

Es importante usar la corrección de Yates cuando el número de grados de libertad es igual a uno y se trabaja con un universo de datos discretos, para corregir la continuidad de la distribución. En este caso en el que se comparan dos poblaciones la de sanos con la de enfermos, el número de grados de libertad (v) corresponde a uno que se deduce de: $v=N-1$, donde N = número de observaciones independientes (dos poblaciones) (iii).

Para el cálculo de la X^2Y , se usó una tabla de 2×2 y se empleó la fórmula que se indica a continuación (iii).

Cuadro 1. Tabla de 2x2 para el cálculo de χ^2

	Con el alelo	Sin el alelo	Total
No. Pacientes	a	b	a+c
No. Testigos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N=a+b+c+d

$$\chi^2 Y = \frac{(ad - bc - N/2)^2 N}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

Una vez que se obtuvo la $\chi^2 Y$, se comparó con el valor esperado para la distribución de χ^2 estableciendo el valor límite de significancia de 0.05 y los grados de libertad de 1. La comparación de estos datos revela si existe o no diferencia entre ambas poblaciones. En el caso en que el valor de χ^2 obtenido sea igual o mayor que el valor límite de significancia existirá una asociación. El programa de análisis estadístico calcula el valor de significancia estadística (p) que corresponde al valor de χ^2 obtenido, en el caso que sea menor a 0.05 se tratará de una asociación real no debida al azar

Para hacer la evaluación más estricta se corrigió el valor de p (pc) multiplicando la p por el número de comparaciones hechas, es decir por el número de alelos detectados en cada locus. La razón de utilizar métodos estrictos de análisis estadísticos es que el sistema HLA es extraordinariamente polimórfico y al haber tantos alelos podríamos observar significancia estadística sin que corresponda a una asociación real.

Alternativamente se puede usar la prueba exacta de Fisher (pf) que es importante usar en los casos en los que alguno de los valores de la tabla 2x2 sea menor de 5.

$$pf = \frac{(a + b)!(a + c)!(b + d)!(c + d)!}{n!a!b!c!d!}$$

Una vez que se ha demostrado que un antígeno está incrementado o disminuido significativamente en alguno de los padecimientos, se calcula lo siguiente

Razón de Mornios según Haldane (OR)

Es una estimación de la intensidad de la asociación e indica cuantas veces más riesgo tiene un individuo sano portador del alelo en cuestión de desarrollar la enfermedad. Mientras mayor

sea este valor mayor será el riesgo de desarrollar la enfermedad en presencia del alelo. La fórmula es la siguiente

$$OR = \frac{(2a + 1)(2d + 1)}{(2b + 1)(2c + 1)}$$

Fracción etiológica (FE)

Cuando un alelo se halla significativamente incrementado en los enfermos, se calcula la FE que es una medida relativa de cuanto de la asociación se debe al marcador en cuestión. Mientras más se acerca el valor a 1, más se debe la enfermedad al marcador.

$$FE = \frac{OR - 1}{OR} \times hp \qquad hp = \frac{a}{a + b}$$

Fracción preventiva (FP)

Cuando un alelo se encuentra significativamente disminuido en los enfermos se evaluó la FP que es también, una medida relativa que en este caso indica cuanto de la protección se debe al marcador. Mientras más cercano a 1 sea este valor más se debe la protección al marcador .

$$FP = \frac{(1 - OR) hp}{OR (1 - hp) + hp}$$

RESULTADOS:

Las características clínicas y generales de los pacientes se enlistan en el cuadro 11. De los 51 pacientes estudiados 28 fueron mujeres y 23 hombres, lo que representa un 55% y 45% respectivamente. La edad promedio fue de 36 años (18-61 años). Según el género, el 35% de las mujeres y el 27% de los hombres fueron menores de 40 años. El 45% eran casados y 41% solteros. El 92% de los pacientes tenía al menos estudios de educación primaria, el 59% tenía estudios mayores a secundaria y el 26% tenía una licenciatura o postgrado. Estos datos se observan en la Figura 4. Únicamente un paciente tenía el antecedente de un familiar con EM (por rama paterna sin especificar) y tres habían vivido en el extranjero por más de 6 meses.

Características generales		%	Características clínicas		%
Género:	Hombres	45	Edad de inicio:	15-20 años	31
	Mujeres	55		21-30 años	27
				31-40 años	24
Edad:	15-20 años	8		41-50 años	14
	21-30 años	31		> 50 años	4
	31-40 años	24	Primer síntoma:	Motor	37
	41-50 años	29		Neuritis óptica	19
	> 50 años	8		Sensitivo	14
Estado civil:	Matrimonio	45		Diplopia	14
	Soltera	41		Ataxia	12
	Viudez	6		Mielitis transversa	2
	Unión libre	4		Vértigo	2
	Separados	4	Forma clínica:	Brote-remisión	67
Escolaridad:	Ninguna	4		Progresiva primaria	15
	Primaria	22		Recurrente progresiva	14
	Secundaria	15		Progresiva secundaria	4
	Preparatoria	19	Paracrínicos*	Normal	
	Técnica	14		Anormal	
	Licenciatura	18	IRM cráneo	8%	94%
	Postgrado	8	PEV	-	90%
Ocupación:	Ninguna	33	PEAT	4%	86%
	Hogar	23	PESS	2%	92%
	Empleado/obrero	18	LCR	63%	29%
	Estudiante/profesionista	10			
	Otros	16			

Cuadro 11 - Características clínicas y generales de los pacientes con EM

IRM Imagen por resonancia magnética, PEV Potenciales evocados visuales, PEAT Potenciales evocados auditivos de tallo, PESS Potenciales evocados somatosensoriales, LCR Líquido cefalorraquídeo

*En resto de los pacientes no se realizó el examen

El 82% de los pacientes iniciaron su enfermedad antes e los 40 años de edad y solo el 18% después de esta edad. Los síntomas más frecuentes al inicio fueron motores en un 37%, neuritis óptica en un 19% y sensitivo o diplopia en un 14%, hallazgos que se grafican en la Figura 5. En el 76% de los pacientes no se identificó un factor desencadenante y del 24% restante, el más frecuente fue la tensión emocional. La forma clínica prevalente fue la de brote remisión en el 67% de los casos, progresiva primaria en 15%, recurrente progresiva en 14% y el 4% progresiva secundaria. Estos datos están incluidos en el Cuadro 1 y se ejemplifican en la Figura 6. El tiempo de evolución al diagnóstico de la enfermedad fue menor de un año en el 51% de los pacientes; el 37% tenía una evolución de 1 a 6 años y el 12% de más de 6 años. En relación con el número de brotes previos, el 51% de los pacientes manifestó haber padecido de dos a cinco, un 27% refirió un solo brote y el 22% más de 5 brotes; en el 61% de los pacientes se presentaron de dos a nueve brotes. Del tratamiento que recibieron, en un 88% de los pacientes manifestó no haber recibido ninguno y solamente el 12% recibió metilprednisolona IV. No se encontró enfermedad asociada en el 94% de los casos.

De los estudios paraclínicos, la IRM fue anormal en el 96% de los casos, los PEMM (que incluyeron PEV, PESS y PEAT) en el 90% y un 29% de los pacientes presentaron n LCR anormal, siendo la principal alteración un discreto aumento de proteínas. Las BOC se informaron positivas en el 57% de las muestras

El 47% de los pacientes no recibía tratamiento en su última evaluación, el 18% recibía esteroides, el 10% rehabilitación física y un 6% interferón. La condición clínica referida fue con al menos una secuela en el 57%, asintomáticos en un 37% y un 6% no refirió cambio de sus manifestaciones con el tratamiento.

Los resultados de la determinación del grupo sanguíneo ABO se muestran en el Cuadro 12. Es evidente que el componente caucasoide está presente en mayor frecuencia en los pacientes. Hay 4.1% de alelos AB y 28.6% de A vs 22.3% y 3.0% en los sanos. La única diferencia significativa fue para el grupo B que está ausente en los pacientes ($p=0.01$).

Grupo ABO	Pacientes n=49	FA %	Testigos n=166	FA %	X2	Yates	PFisher	Yates
A	14	28.6	37	22.3	0.83	0.51	0.36	0.47
B			18	10.9	5.80	4.47	0.016	0.03
AB	2	4.1	5	3	0.14	0.01	0.71	0.93
O	33	67.4	106	63.9	0.20	0.08	0.65	0.78

Cuadro 12 - Distribución del grupo sanguíneo ABO en pacientes y controles
FA: Frecuencia antigénica

Figura 4.- Escolaridad (n=51)

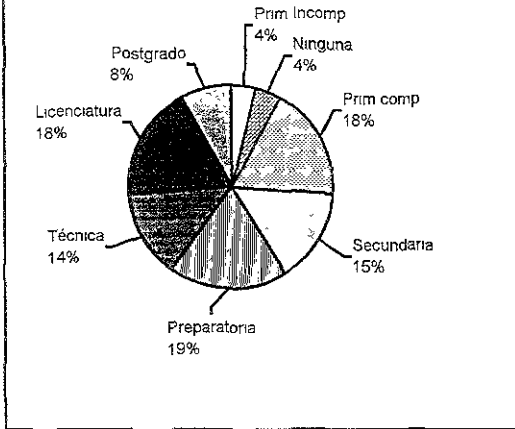


Figura 5.- Primer síntoma (n=51)

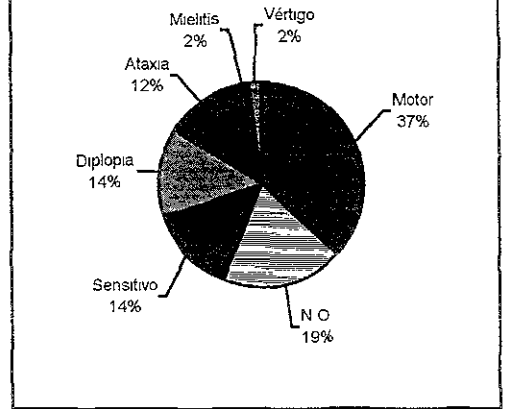
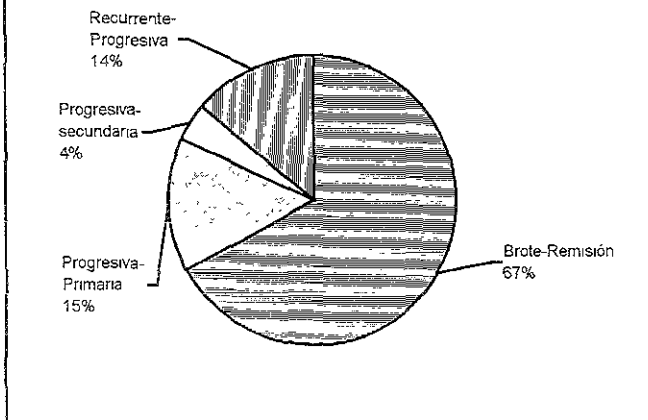


Figura 6.- Forma clínica de la EM en los pacientes. n=51



DETERMINACIÓN DE HLA-A, B y C y DE LOS ALELOS MOLECULARES DRB1 Y DQA1

En el Cuadro 13, se muestra la distribución de los alelos DRB1 en el total de pacientes, comparados con los testigos sanos. Existen varios alelos que es importante resaltar, aun cuando las desviaciones estadísticas son discretas. Se observa un incremento significativo del DRB1*0403 ($\chi^2=10.22$, $p= 0.001$, $RR=5.65$) lo cual indica un gen de susceptibilidad, Además hay varios cuya frecuencia está disminuida en los pacientes: DRB1*1101 ($\chi^2=4.02$, $RR=0.18$, $p=0.04$), DRB1*1301 ($\chi^2=4.02$, $RR=0.18$, $p=0.04$), DRB1*1302 ($\chi^2=4.02$, $RR=0.18$, $p=0.04$) y DRB1*1402 ($\chi^2=5.64$, $RR=0.11$, $p=0.01$). Sin embargo estos datos que sugieren protección, hay que tomarlos con cautela pues la ausencia total de individuos con el alelo puede reflejar simplemente el azar. La única asociación que se mantiene significativa después de corregir la p por el número de comparaciones hechas (30 alelos DRB1) es el DRB1*0403 ($pc=0.03$).

DRB1 Locus	Pacientes N=51	FG %	Testigos n=170	FG %	χ^2 Y	RR	p	pc
*0101	5	5.02	23		0.88	0.74		
*0301	4	4.00	14	4.2	0.14	1.02		
*0401	1	0.98	0	0	0.41	10.12		
*0402	0	0	7	2.1	3.71	0.21		
*0403	9	9.25	6	1.8	10.22	5.65	0.001	0.03
*0404	4	4.00	13	3.9	0.06	1.10		
*0405	2	1.98	9	2.7	0.58	0.85		
*0407	8	8.17	45	14.2	3.12	0.53		
*0411	2	1.98	9	2.7	0.58	0.85		
*0701	6	6.06	22	6.7	0.21	0.94		
*0801	1	0.98	5	1.5	0.75	0.89		
*0802	18	19.56	42	13.2	1.72	1.66		
*0804	1	0.98	0	0	0.41	10.12		
*1001	0	0	2	0.6	2.62	0.65		
*1101	0	0	8	2.4	4.02	0.18	0.04	NS
*1102	0	0	1	0.3	3.02	1.09		
*1104	1	0.98	7	2.1	1.32	0.64		
*1201	0	0	2	0.6	2.62	0.65		
*1301	0	0	8	2.4	4.02	0.18	0.04	NS
*1302	0	0	8	2.4	4.02	0.18	0.04	NS
*1303	1	0.98	0	0	0.41	10.12		
*1305	2	1.98	0	0	3.06	17.22		
*1401	1	0.98	5	1.5	0.75	0.89		
*1402	0	0	13	3.9	5.64	0.11	0.01	NS
*1406	2	1.98	19	5.7	3.31	0.39		
*1501	3	2.98	17	5.1	1.38	0.63		
*1502	1	0.98	0	0	0.41	10.12		
*1503	1	0.98	0	0	0.41	10.12		
*1601	0	0	3	0.9	2.70	0.46		
*1602	7	7.11	18	5.4	0.13	1.38		

Cuadro 13 - Distribución de los alelos DRB1 en pacientes con EM y testigos

En el Cuadro 14 se muestra la distribución de los alelos DQA1 en los 51 pacientes y en el total de testigos sanos. No se observa ninguna desviación significativa en la distribución de los genes DQA1.

DQA1 Locus	Pacientes n=51	FG %	Testigos n=170	FG %	X ² Y	RR	P
*0101/4	6	6.07	29	8.9	1.27	0.68	NS
*0102	5	5.03	30	9.2	2.44	0.54	NS
*0103	3	2.99	9	2.7	0.03	1.22	NS
*0201	7	7.12	22	6.7	0.008	1.11	NS
*03011/02	24	27.24	87	30.2	0.45	0.85	NS
*0401	19	20.79	48	15.3	1.30	1.56	NS
*0501	24	27.24	83	28.5	0.14	0.93	NS

Cuadro 14 - Distribución de los alelos DQA1 en el total de pacientes y sanos.
p= ningún alelo presenta desviación significativa.

En relación con clase I, la distribución de los alelos HLA-A, B y C en el total de pacientes y testigos sanos, se muestran en los Cuadros 15, 16 y 17 respectivamente, donde se observa una disminución significativa de A 69 ($X^2=4.19$, $p=0.04$, $RR=0.27$). Del mismo cuadro también es evidente una aparente disminución significativa de A 26 en los pacientes, sin embargo dichos valores están posiblemente condicionados por la falta de presencia del alelo en los pacientes por lo que la significancia es probablemente por azar. En el caso de HLA-B, cuyas frecuencias se enlistan en el Cuadro 16, hay un aumento de B39 sin que sea significativo pero con un riesgo moderado ($RR=2.31$) en los pacientes, y un aumento significativo de B41 ($X^2=6.98$, $p=0.008$, $RR=4.24$). Finalmente para HLA-C no se observa ningún incremento significativo en la distribución de los alelos.

HLA-A Locus	Pacientes n=51	FG %	Testigos n=170	FG %	X ² Y	RR	P
1	6	6.07	19		0.18	0.95	
2	29	34.32	82		0.004	1.07	
3	9	9.25	13		2.24	2.26	
11	3	2.99	12		0.66	0.79	
23	1	0.99	4		0.64	0.96	
24	18	19.56	41		0.76	1.44	
25	0	0	3		2.85	0.40	
26	0	0	8		4.42	0.16	0.03
28	1	0.99	3		0.36	1.24	
29	1	0.99	11		3.05	0.35	
30	2	1.98	8		0.61	0.84	
31	10	10.34	14		2.84	2.36	
32	1	0.99	8		1.97	0.49	
33	9	9.25	11		3.38	2.69	
36	0	0	2		2.71	0.57	
68	5	5.03	27		2.65	0.52	
69	1	0.99	14		4.19	0.27	0.04

Cuadro 15 - Distribución de los alelos HLA-A en pacientes y sanos

HLA-B Locus	Pacientes n=51	FG %	Testigos n=149	FG %	X ² Y	RR	p	pc
7	4	4.00	13		0.23	0.95		
8	3	2.99	9		0.14	1.06		
13			12		5.91	0.10	0.01	NS
14	1	0.99	13		3.81	0.30		
15	2	1.98	4		0.008	1.63		
18	4	2.99	10		0.009	1.25		
27	3	2.99	5		0.145	1.89		
35	16	17.16	55		0.78	0.79		
37	1	0.99	1		0.000	2.94		
38	2	1.98	10		1.13	0.67		
39	14	14.82	21		3.81	2.31		
40	2	1.98	1		0.96	5		
41	9	9.25	7		6.98	4.24	0.008	NS
42			1		3.01	0.96		
44	4	4.00	11		0.04	1.14		
45			7		4.06	0.18	0.04	NS
48	4	4.00	13		0.23	0.95		
49	1	0.99	4		0.64	0.96		
50	1	0.99	5		0.95	0.78		
51	3	2.99	14		1.13	0.67		
52	1	0.99	2		0.12	1.75		
53	1	0.99	7		1.62	0.56		
55			2		2.71	0.57		
58	2	1.98	2		0.31	2.97		
59			1		3.01	0.96		
60	5	5.03	4		2.97	3.82		
61	5	5.03	15		0.10	1.02		
62	8	8.18	14		0.96	1.82		
63			2		2.71	0.57		
64			1		3.01	0.96		
65	2	1.98	4		0.000	1.63		
67			1		3.01	0.96		
70			1		3.01	0.96		
73			2		2.71	0.57		
74			1		3.01	0.96		
77			1		3.01	0.96		

Cuadro 16 - Distribución del alelo HLA-B en sanos y pacientes

HLA-C Locus	Pacientes n=51	FG %	Testigos n=149	FG %	X ² Y	RR	p	pc
1	11	11.68	20		1.49	1.83		
2	2	2.02	17		3.31	0.39		
3	1	1.01	11		2.98	0.36		
4	18	20.00	59		0.38	0.86		
5			14		6.59	0.09	0.01	NS
6	2	2.02	14		2.29	0.48		
7	25	29.29	68		0.13	1.18		
8	8	8.35	17		0.36	1.51		
9	5	5.13	13		0.000	1.22		
10	5	5.13	5		2.21	3.17		

Cuadro 17.- Distribución de alelo HLA-C en sanos y pacientes.

El total de los pacientes se dividió en tres grupos según las características clínicas. Se formó un grupo de 17 pacientes que tenía una forma progresiva de la EM, otro de 30 pacientes con una forma de brote –remisión y otro de 26 con historia de haber padecido previamente de dos a cinco brotes de la enfermedad. Este es el rango de número de brotes más frecuente, dado que el 51% de los pacientes manifestó esta característica.

En el grupo de los 17 pacientes con una forma progresiva, surgieron varios subtipos de DR14: *1401 ($X^2=2.64$, RR=0.66, p=NS), *1402 ($X^2=2.93$, RR=0.35, p=NS) y *1406 ($X^2=3.19$, RR=0.28, p=NS), que parecerían de protección porque están disminuidos en los pacientes, pero otra vez no puede considerarse como un dato certero por estar totalmente ausentes en ellos, y porque el tamaño de muestra es pequeño; sin embargo el DRB1*0802 (RR=3.14) y el 1303 (RR=2.12) mostraron una tendencia a la susceptibilidad sin alcanzar ninguna significancia estadística, pero los resultados sugieren ligamento a un gen de susceptibilidad especialmente para el DRB1*0802 (Cuadro 18).

Para los pacientes con la forma de brote-remisión, descritos en el cuadro 19, el DRB1*0101 ($X^2=3.95$, RR=0.20, p=0.04, IC=0.02-3.51) tiende a ser un alelo de protección por encontrarse significativamente disminuido en los pacientes, sin embargo, habrá que tomar el dato con cautela, debiendo continuar con la determinación de más casos con esta forma clínica para confirmar o no este hallazgo. Valga mencionar que el DRB1*0403 observado como se susceptibilidad en el grupo total, se reforzó como gen de susceptibilidad relacionado con la aparición de brotes ($X^2=5.02$,

RR=6.55, p=0.02) Estos datos concuerdan con la distribución en el cuadro 20 en el que se indica en el análisis de pacientes con historia de dos a cinco brotes encontrando el DRB1*0403 también incrementado en los pacientes ($\chi^2=8.87$, RR=13.22, p=0.002). El análisis de clase I sugiere la posible contribución del B41 ($\chi^2=3.82$, RR=5.25, p=0.05) y del A33 ($\chi^2=4.00$, RR=7.26, p=0.04) en los casos de brote remisión con valores de RR que se incrementan en los casos con historia de 2 a 5 brotes. El B39 se haya incrementado en estos últimos ($\chi^2=5.26$, RR=3.65, p=0.02)

DRB1 Locus	Pacientes n=17	FG %	Testigos n=60	FG %	X ² Y	RR	p	IC
*0802	8	27.24	13	11.49	3.12	3.14	-	0.90-11.6
*1401	0	0	2	1.68	2.64	0.66	-	
*1402	0	0	4	3.39	2.93	0.35	-	
*1406	0	0	5	4.26	3.19	0.28	-	
*1303	1	2.99	2	1.68	0.05	2.12	-	

Cuadro 18.- Distribución de alelos significativos en 17 pacientes con una forma progresiva de EM y en 60 testigos sanos. p= NS

Locus	Pacientes n=30	FG %	Testigos n=60	FG %	X ² Y	RR	p	IC
DRB1*0101	0	0	4	3.39	3.95	0.20	0.04	0.02-3.51
DRB1*0403	5	8.71	1	0.84	5.02	8.55	0.02	2.33-110.9
A 33	5	8.71	1	0.99	4.00	7.26	0.04	1.01-482.1
B 41	6	10.56	2	1.98	3.82	5.25		

Cuadro 19.- Distribución de alelos Clase I y Clase II de HLA significativos en 30 pacientes con forma brote-remisión de EM y 60 testigos sanos.

Locus	Pacientes n=26	FG %	Testigos n=60	FG %	X ² Y	RR	p	IC
DRB1*0403	6	12.82	1	0.84	8.87	13.22	0.002	1.99-870
A 33	5	10.56	1	0.99	5.23	9.03	0.02	
B 39	12	27.89	10	10.34	5.26	3.65	0.02	1.18-12.36

Cuadro 20.- Distribución de alelos Clase I y Clase II de HLA en 26 pacientes con historia de haber padecido de 2 a 5 brotes de EM en su evolución y 60 testigos sanos

DISCUSION.

Como ya se ha descrito, la EM es una enfermedad cuyo comportamiento clínico, epidemiológico y hallazgos genético-inmunológicos muestran que se trata de una enfermedad con un componente genético importante influido por factores externos aun no determinados

Las características epidemiológicas del grupo de pacientes incluidos en este estudio concuerdan con lo ya dicho con respecto a la baja frecuencia de EM en grupos asiáticos⁹⁸, estos datos sostienen la hipótesis de la contribución de genes orientales en los enfermos mestizos que disminuyen la probabilidad de expresión de la EM y llama la atención la prevalencia baja en Nuevo México de 5². En nuestro grupo no se observó ninguna diferencia significativa entre el género de los pacientes ya que correspondieron a un 55 el porcentaje de mujeres, con una relación de 1.2:1, respectivamente; en la literatura se describe una relación mujer:hombre de 2:1⁵ y aquí se ve solo una tendencia a tener una frecuencia mayor en mujeres. Quizás esto se debe a un sesgo en el tipo de pacientes que acuden al Instituto o en que por ser pacientes de un solo hospital no representan totalmente las características epidemiológicas de la enfermedad. La EM característicamente se presenta en la segunda o tercer décadas de la vida, en este grupo más del 60% de los pacientes tuvo una edad entre los 10 y 40 años con un promedio de 38 años y el 82% inició con las manifestaciones antes de los 40 años. Con relación a la edad de inicio, se observó que los pacientes con una forma de brote remisión iniciaron a una edad promedio de 26 años y los que cursaban con una forma progresiva de la EM, iniciaron a un promedio de edad de 33 años. Los reportes en la literatura mencionan que un factor de mal pronóstico para la EM es un inicio en edad avanzada; sin embargo, no se ha definido la edad de inicio según la forma clínica de la EM, salvo en el caso de la forma primariamente progresiva que característicamente inicia en la quinta o sexta décadas de la vida

En el estudio previo publicado de población mexicana con EM por parte de este grupo¹⁶⁴, se estableció en 1986 que las características de la EM eran compatibles con estar relacionada a un ambiente industrializado dado que los pacientes no tenían historia familiar de EM y la gran mayoría (90%) pertenecían a la clase media con estudios académicos mayores a secundaria. Los resultados del presente trabajo concuerdan con los hallazgos previos, pues tampoco se encontró ningún antecedente de EM en la familia de los pacientes y el 59% tenía una educación mayor que el promedio de la población, ya que el 26% tenía desde licenciatura hasta postgrado y sólo 4% eran analfabetas.

Las características clínicas también corresponden con otras series informadas previamente. Estos pacientes manifestaron como síntomas iniciales los motores como los más frecuentes (37%), seguidos por neuritis óptica (19%) y síntomas sensitivos o diplopía (14%). El porcentaje de neuritis óptica como síntoma inicial también corresponde con los de otros grupos, ya que se describe ésta manifestación en un 20 a 25% de todos los pacientes^{1,5}. En relación a la forma clínica, la más frecuente, igual que en otras series, fue brote-remisión en un 67%. Llama la atención, sin embargo, el alto porcentaje de formas progresivas que se encontró (33%), ya que si bien en la literatura se informa hasta un 20% de formas primariamente progresivas, es muy probable que en este estudio el porcentaje hallado se encuentre influido por el momento en la evolución de los pacientes en que se incorporaron al estudio. Así, algunos de los que se consideraron como primariamente progresivos se podrán definir como brote-remisión con el paso del tiempo. Finalmente, 51% de los pacientes presentó historia de dos o más brotes.

Los resultados en cuanto a los estudios paraclínicos practicados a los pacientes corresponden a los esperados internacionalmente³³ en pacientes con diagnóstico establecido de EM.

Con respecto al análisis inmunogenético valga enfatizar que en este trabajo se hizo un análisis hasta el nivel del alelo de los genes DRB1 y DQA1 y se reanalizaron los antígenos de clase I. En el trabajo previo¹⁶⁴ el análisis tanto de clase I como de clase II fue solo por tipificación serológica.

Llama la atención que como ya se había señalado el componente caucasoide de origen mediterráneo se confirma en este grupo de pacientes por la frecuencia mayor de grupo A y AB en los pacientes. Interesantemente ninguno fue portador del grupo B, sin embargo, la ausencia de B

se compensó incrementándose la frecuencia de A y de AB, pero no la del grupo O, lo que sostiene que sí hay un componente étnico mayor de origen blanco en los pacientes mexicanos con EM, pues el grupo O es típicamente Amerindio¹⁷⁹.

En el estudio previo¹⁶⁴ sobre la inmunogenética de la EM en México se publicó la asociación con DR6 con el subtipo DR13 en los pacientes y se encontró elevada también la combinación A3, B7 y DR2. En la mayoría de los grupos de pacientes con EM en el ámbito mundial se informa por lo general una asociación con DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102 y DQB1*0602¹⁵². Sin embargo, este dato es de grupos caucasoides y en la actualidad hay mucho más trabajos hechos a nivel molecular que permiten un análisis más certero de la genética de la EM y sobre todo en poblaciones con otros fondos étnicos que muestran otros genes HLA involucrados.

El análisis de la distribución del DRB1 en nuestro estudio demostró un incremento significativo del DRB1*0403 al comparar el grupo total de pacientes con los testigos sanos con un RR bastante alto que es de 5.65, demostrando que la asociación es real puesto que no pierde significancia al corregir el valor de p. Esta asociación significativa se mantiene al separar los tres grupos descritos sobre la base de las características clínicas y de evolución de la EM, pues se observa un incremento en el RR en el grupo con una forma de brote remisión (8.55) y mayor aun en los pacientes con historia de dos a cinco brotes (13.22), lo que apoya el hecho de que el DRB1*0403 corresponde a un alelo de susceptibilidad franco, relacionado con la aparición de brotes y representando un mayor riesgo de expresión en los pacientes que manifiestan de dos a cinco brotes, que fue la evolución en más del 50% de estos pacientes. La asociación con DR4 se ha sugerido en árabes y en pacientes de Cerdeña^{161,162}, en ésta última población, se informa una asociación especialmente con DRB1*0405. En un estudio reciente de población japonesa donde se dividió la EM en una forma occidental y otra asiática, se encontró asociación de la forma occidental con DRB1*0403 que pierde su significancia al corregir el valor de p¹⁷⁰. Es importante hacer notar que el alelo DRB1*0403 se considera de origen caucasoides, fundamentalmente de contribución mediterránea más que de ancestros nórdicos.

En el grupo de formas progresivas, se encontró una asociación no significativa, pero con un RR alto en el caso del DRB1*0802 y DRB1*1303, siendo importante mencionar que este último alelo fue relacionado con susceptibilidad en los sefaraditas¹⁶⁷, además de que el DRB1*1303 es una variante del DR6, que fue el que previamente se había publicado asociado a EM en pacientes mexicanos¹⁶⁴. El caso del *0802 es interesante pues en primer lugar es un gen clásicamente amerindio, aunque, en poblaciones como los Lacandones en México este alelo ha desaparecido por deriva génica o efecto de cuello de botella¹⁷⁹.

No se demostró una franca asociación de protección con ningún gen DRB1, sin embargo algunas asociaciones mostraron cierta tendencia a este aparente papel protector, pero, como se mencionó en los resultados, estos datos deben ser tomados con cautela dado que esto puede ser influido por no estar presentes en los pacientes por el tamaño de la muestra y porque al ser un sistema con tanto polimorfismo, si el tamaño no es importante, cualquier alelo puede resultar significativo, por azar. Por esta razón es importante corregir el valor de p. También se acepta en la literatura internacional de HLA que si una asociación en particular ya ha sido descrita precisamente, entonces la que se propone sí puede ser válida. Será necesario por lo tanto tener un número mayor de pacientes tipificados para poder apoyar alguna de las posibilidades descritas. En este contexto, en la comparación del total de pacientes con el grupo de sanos, los alelos del DRB1: *1101, *1301, *1302 y *1402 mostraron una disminución aparentemente significativa en los pacientes. En los casos de formas progresivas, la asociación de aparente protección correspondió a los alelos DRB1*1401, DRB1*1402 y DRB1*1406, siendo importante mencionar que algunos subtipos del DR14 se consideran de alta frecuencia en Amerindios¹⁷⁹, especialmente *1402 y *1406. En el grupo de pacientes con forma de brote-remisión fue el DRB1*0101 el que se mostró con una disminución significativa en los pacientes y una aparente papel protector. El DR1 fue sugerido recientemente por los españoles como protector¹⁷⁶.

Con relación a las moléculas clase I, al analizar su distribución en nuestros pacientes, se encontró una disminución significativa de A26 y A69 en el grupo total de pacientes, significancia que se pierde al corregir p y que no permite apoyar por completo la posibilidad de un papel protector. En los subgrupos integrados, el A33 se encontró incrementado en los casos de brote remisión y con

historia de dos a cinco brotes, que podría estar relacionado con un efecto de susceptibilidad. Curiosamente en el mismo trabajo de los españoles ¹⁷⁶ se encontró al A19 como un gen de susceptibilidad. Valga mencionar que el A33 es una variante del A19. Estos hallazgos confirman la fuerte influencia de genes mediterráneos en la expresión de la EM. Finalmente también el B41, alelo también mediterráneo, se encontró incrementado en los casos de brote remisión sin ser significativo y el B39 en los de dos a cinco brotes de manera significativa. La asociación de las moléculas clase I con EM ha sido poco explorada; desde los 70s, se consideraba la asociación con A3 y B7, recientemente se confirmó la asociación con el primero, pero no con B7 (141). En un grupo de pacientes suecos se encontró que el alelo HLA-A*0301 aumenta el riesgo de EM independientemente de DRB1¹⁷⁵, y fue el A*0201 el que se informó confiere protección en pacientes suecos¹⁷⁵. Estos hallazgos no se confirmaron en la población que estudiamos, en parte porque clase I no se determinó a nivel molecular, lo cual será motivo de investigaciones futuras.

De los resultados anteriores se desprende que en el grupo de pacientes con EM estudiados en este trabajo, las características clínicas y epidemiológicas concuerdan con las de otros grupos a nivel mundial; se corrobora el mayor componente caucasoide mediterráneo en los pacientes comparados con los sanos y una franca asociación de susceptibilidad con DRB1*0403 que es de origen mediterráneo más que nórdico. No fue posible establecer asociaciones de protección significativas con ningún alelo en particular pero sí una tendencia a manifestaría con alelos considerados como de origen Amerindio (DRB1*1402, *1406). Es pues necesario aumentar el número de pacientes para poder definir si la protección por estos genes es real.

CONCLUSIONES.

- 1.- Las características clínicas y epidemiológicas del grupo de pacientes estudiado concuerdan con lo informado en otras series.
- 2.- Es evidente que la EM es una enfermedad poligénica con la participación de diferentes loci y alelos del MHC
- 3.- Existe susceptibilidad franca asociada al alelo DRB1*0403 cuyo RR es mayor en la forma brote remisión y con historia de haber presentado de 2 a 5 brotes de EM. Dicho alelo está involucrado en españoles y la forma occidental de los japoneses con EM.
- 4.- No se estableció ningún gen de protección evidente y estará por confirmar con un número mayor de casos si el DRB1*1402 y DRB1*1406, genes de origen amerindio están ligados a protección.
- 5.- En las formas progresivas se sugiere un gen de susceptibilidad asociado al DRB1*0802 y DRB1*1303 (subtipo del DR6, publicado previamente por parte del grupo).
- 6.- Se confirma que la contribución genética a la susceptibilidad de expresión de la EM es de origen caucasoide en los pacientes mestizos mexicanos, fundamentalmente de ancestros mediterráneos más que nórdicos.
- 7.- La protección probablemente está relacionada con genes de origen amerindio (DRB1*1402 y DRB1*1406).
- 8.- Se empiezan a identificar genes en el locus A y B de clase I que probablemente contribuyen a la expresión de la EM
- 9.- Los resultados sugieren que la asociación con DRB1*0403 parece contribuir más a la expresión de una forma más severa de la EM que a la enfermedad misma

Apéndice

Reactivos

Solución de lisis I

MgCl₂ 5 mM

Solución de lisis II

MgCl₂ 5 mM
NONIDET (NP-40) 0.1 %

Amortiguador para lisis de células blancas (WCLB)

Tris-HCl, pH 7.6 10 mM
EDTA, pH 8.0 10 mM
NaCl 50 mM
SDS 0.2 %
Proteínasa K (sigma) 300 µg/mL

Esterilizar por filtración. Guardar la solución en alícuotas de 15 mL a -20°C

Fenol saturado equilibrado

Antes de usar el fenol debe equilibrarse a pH mayor de 7.8, porque el DNA puede quedarse dentro de la fase orgánica (fenólica) si el pH es ácido.

1. El fenol bidestilado se debe almacenar a -20°C. Cuando se prepara el fenol equilibrado se funde a 68°C (Baño maría). Al fenol líquido se adiciona 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%. La 8-hidroxiquinolina es un antioxidante, un inhibidor parcial de RNAsa y un quelante débil de iones.
2. Añadir un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 a temperatura ambiente. Agitar con una barra magnética durante 15 min, permitir que se separen las dos fases, eliminar la fase superior (acuosa)
3. Adicionar a la fase inferior (fenólica) un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0. Agitar de igual forma que en el punto 2, remover la fase acuosa.
4. Repetir el paso 3, hasta que la fase fenólica alcance un pH mayor de 7.8 (aproximadamente pH 8.0).
5. Después de que el fenol está equilibrado, remover la fase acuosa y adicionar 0.1 volumen de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 conteniendo 0.2 % de 2-mercaptoetanol.
6. Guardar en un frasco ámbar a 4°C por períodos mayores de 1 mes.

Fenol/cloroformo

Para preparar el fenol/cloroformo debe eliminarse la fase superior del fenol saturado o tomar sólo la fase fenólica y mezclar cantidades iguales de fenol saturado y cloroformo/alcohol isoamílico. Mezclar, dejar a 4°C toda la noche. Utilizar la fase inferior.

Cloroformo/alcohol isoamílico

Tomar 24 partes de cloroformo puro y añadir una parte de alcohol isoamílico, mezclar y guardar a 4°C

TE1 X

Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM

SDS 10%

EDTA 0.5 M pH 8.0

TAE 50 X

Tris-Base (Sigma)	242.0 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.25 M, pH 8.0	200.0 mL
H ₂ O cbp	1 L

NaOH 0.4M

SSPE 20X

(esterilizar por autoclave)

NaCl	3.0 M
Fosfato de sodio monobásico	0.2 M
EDTA (pH 8.0)	20.0 mM
Ajustar el pH a 7.4 como en el SSC 20X y aforar.	

Denhart 50X

Albúmina sérica bovina, pH 7.5	1 %
Polivinil pirrolidona (PVP-40)	1 %
Ficoll 400	1 %

ssDNA 10 mg/mL

DNA de esperma de salmón El ssDNA (1 g) se disuelve en 100 mL de agua destilada dejándolo con agitación continua durante 12 h. Una vez disuelto el DNA se pasa varias veces por una jeringa de 10 mL que tenga una aguja de no. 27, hasta que la solución caiga en gotas, cuando esto suceda, el ssDNA estará listo para su uso

Solución de prehibridación (Quimioluminiscencia)

SSPE	6 X
Denhardt	5 X
ss DNA	100 µg/mL
Lauroil Sarcosina de Sodio	0.1 %
SDS	0.02 %
H ₂ O destilada cbp	

SSPE 2X, SDS 0.1%

SSPE 5X, SDS 0.1%

Amortiguador 0

Ácido maléico	0.1 M
NaCl	0.15 M

Esterilizar en autoclave

Puede utilizarse Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5 en lugar de ácido maléico.

Ajustar a pH 7.5 con NaOH

Amortiguador 1

Amortiguador 0 + Tween 20 al 0.3%

Amortiguador 2

Reactivo bloqueador (Boehringer) al 1% solubilizado en amortiguador 0.

Se recomienda preparar una solución madre al 10% en amortiguador 0, distribuir en alícuotas de 100 mL y guardarlas a -20°C hasta su uso

La solución de trabajo se prepara diluyendo 100 mL de la solución madre a 1 L con amortiguador 0

Amortiguador 3

Tris pH 9.5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM

Anticuerpo

Anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina

Dilución 1:10,000 en amortiguador 2

CSPD Dilución 1:500 en amortiguador 3

Anticoagulante se puede utilizar ACD o la siguiente fórmula:

Citrato trisódico 13.2 g/L

Acido cítrico 4.8 g/L

Dextrosa 24.5 g/L

PBS(solución amortiguadora de fosfatos-solución salina).

Para preparar un litro 1L (5X).

NaCl 40.0 g

KH₂PO₄ 0.75 g

KCl 2.0 g

Na₂HPO₄ 1.875 g

Agua (cbp) 1 L

Ajustar el Ph a 7.4

Citrato de sodio al 0.6% en PBS.

Citrato de sodio (dihidratado) 3.7 g

PBS 475 mL

Aforar el PBS a 500 mL

Ajustar el pH a 7.4

Filtrar

Medio de McCoy modificado

A 500mL de medio añadir:

Gentamicina 40mg/mL 1mL

Suero fetal bovino 25 mL

Penicilina/estreptomina 10 mL

Hepes 1M 25 mL

(5000U/mL de penicilina G, 5000 mg/mL de sulfato de estreptomina).

Ajustar pH a 7.2

Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA)

Acetona 2 5mL
CDFA 25 mg
Disolver suavemente
PBS 417 mL
Mezclar
Alicuotar en frascos de 50 mL
Guardar de -70 a -85° C en la obscuridad

Naranja de acridina/bromuro de etidio (AO/EB)

Naranja de acridina 14 mg
Bromuro de etidio 50mg
Etanol 95% 1 mL
Adicionar 49 mL de PBS
Guardar a -20° C +/- -5° C en alícuotas de 1 mL en microtubos
Solución de trabajo: a 1 mL de solución madre, se le adicionan 9 mL de PBS. Guardar en frascos ámbar en la obscuridad, hasta su uso

Yoduro de propidio (PI).

PI 250mg
PBS 250mL (frasco ámbar 500 mL)
Disolver por calentamiento en baño maria a 56-62° C
Alicuotar 50 mL en frascos
Guardar de -70° C

Tinta china: reactivo para la tinción

Disolver 1 g de BSA (seroalbúmina bovina) en 10 mL de EDTA/PBS 5%
A 9.8mL BSA/5% EDTA/PBS se le adicionan 0.1 mL de azida de sodio al 1% Y 0 1 mL de tinta china
Azida de sodio al 1% Disolver 1g de azida de sodio en 100 mL de PBS.

EDTA/PBS 5%

Adicionar 5 g de EDTA a 90 mL de PBS. Disolver por calentamiento a 37° C
Ajustar el pH a 7.2 con NaOH para disolver el EDTA
Aforar a 100mL con PBS.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology, Sixth Ed. McGrawHill, 1997:902-927.
- 2.- Matthews WB (ed): McAlpine's Multiple Sclerosis, New York, Churchill Livingstone, 1985:96-145.
- 3.- Lublin FD, Reingold SC. National Multiple Sclerosis Society (USA). Defining the clinical course of Multiple Sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996;46:900-911.
- 4.- Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, et al. Primary progressive multiple sclerosis *Brain* 1997;120:1085-1096.
- 5.- Goetz ChC, Pappert EJ. Textbook of Clinical Neurology. Philadelphia, Saunders, 1999:970-989.
- 6 - Gilroy J. Basic Neurology, Third Ed. McGrawHill, 2000:199-223.
- 7.- Lecchinetti CF, Rodríguez M. The controversy surrounding the pathogenesis of the multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 1997;72:665-678.
- 8.- Gonzalez O, Sotelo J. Is the frequency of múltiple sclerosis increasing in Mexico? *J neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;59:528-530.
- 9.- Corona T, Rodríguez JL, Otero E, Stopp L. Múltiple sclerosis in México:hospital cases at the National Institute of Neurology and Neurosurgery, México City. *Neurología* 1996;11(5):170-173
- 10.-Rodríguez-García A, Sotelo-Morales J. Esclerosis múltiple en México. *Sal Publ Mex* 1981;XXIII:451-456.
- 11-Medar R. Does the history of múltiple sclerosis go back as far as the 14th century?. *Acta Neurol. Scandinav* 1979;60:189-192)
- 12-DeJoung R: Múltiple Sclerosis History, definition and general considerations. *Handbook of Clinical Neurology*, ed. Vinken and Bruyn, vol. 9. Elsevier, North Holland, 1977).
- 13.-Ebers GC. introduction a historncal overview In:Multiple Sclerosis, ed. Paty and Ebers. F A. Davis Company. Philadelphia, 1998)
- 14 - Ebers GC: Osler and neurology. *Can J Neurol Sci*, 1985,12:236-242).

- 15 - Rudick RA: Múltiple Sclerosis and its masquerades: diagnostic dilemmas: making the diagnosis of múltiple sclerosis. Syllabi on CD-ROM. American Academy of Neurology, 1999).
- 16 - Ruano-Calderón L, Corona T. Manifestaciones clínicas En: Series del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Esclerosis Múltiple. México, 2000.
- 17 - Miller A, Bourdette D, Cohen JA, Coyle PK, et al. Clinical features of multiple sclerosis. Continuum American Academy of Neurology 1999;35-49.
- 18.- Ormerod IEC. McDonald WI. Multiple sclerosis presenting with progressive visual failure. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1984;47:943.
- 19.- Ebers GC. Optic neuritis and multiple sclerosis. Arch Neurol 1985;42:702-4
- 20.- Kurtzke JF. Optic neuritis or multiple sclerosis Arch Neurol 1985;42:705-710
- 21.- Corona-Vazquez T, Ruiz-Sandoval J, Arriada -Mendioca N. Optic neuritis progressing to múltiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1995;91:1-5.
- 22 - Birk K, Rudick R Pregnancy and multiple sclerosis. Arch Neurol 1986;43:719-26.
- 23.- Rudick RA. Multiple sclerosis and its masquerades: diagnosis dilemmas: making the diagnosis of múltiple sclerosis Syllabi on CD-ROM. American Academy of Neurology, 1999.
- 24 - Garben J, Spence AM, Alvord E. Baló's concentric demyelination diagnosed premortem. Neurology 1986;36:1610-4.
- 25.- Johnson MD, Lavin P, Whetsell WO. Fulminant monophasic multiple sclerosis Marburg's type. J Neurol Neurosurg Psychiat 1990;53:918-21.
- 26.- Eblen F, Poremba M, Grodd W, Optiz H, Roggendorf W, Dichgans J. Myelinoclastic diffuse sclerosis (Schilder's disease): cliniconeuroradiologic correlations. Neurology 1991;41:589-91
- 27.- Munsat TL, Mancall EL. Demyelinating and immune disease: Múltiple Sclerosis. Continuum American Academy of Neurology. 1994.45-76.
- 28.- Allison RS, Millar JHD. Prevalence and familial incidence of disseminated sclerosis: Prevalence of disseminated sclerosis in Northern Ireland. Ulster Med J 1954;23:5-27
- 29.- Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on evaluation of experimental trial of therapy in multiple sclerosis Ann NY Acad Sci 1965; 122:552-568

- 30.- McAlpine D, Lumsden CE, Acheson ED. Multiple sclerosis: A reappraisal Churchill Livingstone, Edinburgh, 1997.
- 31.- Rose AS, Ellison GW, Myers LW, Tourtellotte et al. Criteria for the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology* 1976;26:20-22.
- 32.- McDonald WI, Halliday AM. Diagnosis and classification of multiple sclerosis. *Br Med Bull* 1977;33:4-9.
- 33.- Poser ChM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald I, et al. New Diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13(3):227-231
- 34.- Jersild C, Fog T, Hansen GS, Thomsen M, et al. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis with special reference to clinical course. *Lancet* 1973;Dec 1:1221-1224
- 35 - Miller A, Bourdette D, Cohen JA, Coyle PK, et al. Immunopathogenesis: Multiple Sclerosis. *Continuum American Academy of Neurology*. 1999:7-21.
- 36.- McFarlin DE, McFarland HF. Multiple Sclerosis. *N Eng J Med* 1982;307(19):1183-1188
- 37.-Oldstone MBA: Virus-induced autoimmunity molecular mimicry as a route to autoimmune disease. *J Autoimmun* 1989,2(Suppl):187-194, 39)
- 38.- Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinschenker BG. Identification of Multiple Sclerosis-associated genes. *Mayo Clin Proc* 1997;72:965-976
- 39.- Zamvil SS, Steinman L: The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579-621.
- 40 -Lindsey JW, Hodgkinson S, Mehta R, Mitchell D, Enzmann D, Steinman L. Repeated treatment with chimeric anti-CD4 antibody in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;36:183-189
- 41.- McCallum K, Esiri MM, Tourtellone WW, Booss J: T cell subset in multiple sclerosis gradients at plaque borders and differences in nonplaque regions. *Brain* 1987;110:1297-1308
- 42.- Jiang H, Zhang Si, Pernis B. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1992;256:1213-1215.
- 43.- Brosnan CF, Bornstein MB, Bloom BR. The effects of macrophage depletion on the clinical and pathologic expression of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1981;126:614-620

- 44 - Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M. Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental allergic encephalomyelitis in the rat central nervous system. *J Neuroimmunol* 1992;37:23-33.
- 45 - Tienan PJ, Wikstrom J, Sajantila A, Palo J, Peltonen L: Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet* 1992;340:987-991.
- 46.-Palmer DL, Minard BJ, Cawley LP. IgG subgroups in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1976;294:447-448.
- 47 - Blanc M, Clanet M, Berr C, Dogoujon JM, Ruydavef B, Ducos SJ, et al: Immunoglobulin allotypes and susceptibility to multiple sclerosis: an epidemiological and genetic study in the Hautes-Pyrenees county of France. *J Neurol Sci* 1986;75:-5.
- 48.- Gay D, Esiri M. Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. an immunocytological study. *Brain* 1991;114:557-572.
- 49.- Procaccia S, Lanzanova D, Caputo D, Ferrante P, Papini E, Gasparini A, et al. Circulating immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis: characterization and correlation with the clinical course. *Acta Neurol Scand* 1988;77:373-381.
- 50.- Compson DA, Morgan BP, Oleesky D, Fifield R, Campbell AK. Cerebrospinal fluid C9 in demyelinating disease. *Neurology* 1986;36:1503-1506.
- 51.- Bertrams J, Opferkuch W, Grosse-Wilde H, Luboldt W, Schuppen W, Kuwert E. C2 hypocomplementaemia in multiple sclerosis. *Lancet* 1976;2:1358-1359.
- 52.-Kalman B, Takacs K, Gyodi E, Kramer J, Fust G, et al. Aclerosis multiple en Gypies. *Acta Neurol Scand* 1991;84 181-185.
- 53.- Selmaj KW, Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology* 1995;45 (Suppl 6):S44-S49
- 54.- Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:467-472.

- 55 - Harding AE, Sweeney MG, Miller DH, Mumford CJ, Kellar-Wood H, Menard D, et al. Occurrence of a multiple-sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *Brain* 1992;115:979-989.
- 56 - Kellar-Wood H, Robertson N, Govan GG, Compston DAS, Harding AE. Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;36:109-112.
- 57.- Powell BR, Kennaway NG, Rhead WJ, Reece CJ, Burlingame TG, Buist NR Juvenile multiple sclerosis-like episodes associated with a defect of mitochondrial beta oxidation. *Neurology* 1990;40:487-491.
- 58.- Middleton D, Megaw G, Cullen C, Hawkins S, et al. TAP1 and TAP2 polymorphism in multiple sclerosis patients. *Human Immunol* 1994;40:131-134.
- 59.- Bell RB, Ramachandran S. The relationship of TAP1 and TAP2 dimorphisms to multiple sclerosis susceptibility. *J Immunol* 1995;59:201-204
- 60.- Liblau R, van Ender PM, Sandberg-Wollheim M, Patel SD, et al. Antigen processing gene polymorphisms in HLA-DR2 multiple sclerosis. *Neurology* 1993;43:1192-1197
- 61.- Lolín YI, Ward AM. Alpha-1-antitrypsin phenotypes and associated disease patterns in neurological patients. *Acta Neurol Scand* 1995;91:394-398.
- 62.- McFarling DE, McFarland HF. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1982;307:1246-1251.
- 63.-Haase AT, Ventura P, Gibbs CJ Jr, Tourtellotte WW. Measles virus nucleotide sequences: detection by hybridization in situ. *Science* 1981;212:672-5.
- 64 - Johnson RT. The possible viral etiology of multiple sclerosis. In:Friedlander WJ, ed. *Advances in neurology* (NY) 1980;30:437.
- 65.- Bergstrom T, Andersen O, Vahlne A. Isolation of herpes simplex virus type 1 during first attack of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1989;26:283-285.
- 66.- Melnick JL, Seidel E, Inoue YK, et al. Isolation of virus from the spinal fluid of three patients with multiple sclerosis and one with amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 1982;1:830-833.
- 67.- Compston A. Non-infective inflammatory, demyelinating, and paraneoplastic disease of the nervous system. In: *Brain's diseases of the Nervous System*. Walton J (Ed). Tenth Ed. Oxford, 1993:351-392.

- 68.- Compston DAS, Vakarelis BN, Paul E, et al. Viral infection in patients with multiple sclerosis and HLA-DR matched controls. *Brain* 1986;109:325.
- 69.- Operskalski EA, Visscher BR, Malmgren RM, Detels R. A case control study of multiple sclerosis. *Neurology* 1989;39:825
- 70.- Martyn C, Cruddas M, Compston DAS. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56:167.
- 71.- Mangolis MS, Soloviev VD, Schubladze AK. Aetiology and pathogenesis of acute sporadic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1946;9:63
- 72.- Gudnadottir M, Helgadottir H, Bjarnason O. Virus isolated from the brain of a patient with multiple sclerosis. *Exp Neurol* 1964;9:85.
- 73.- Field EJ, Cowshall S, Narang HK, Bell TM. Viruses in multiple sclerosis?. *Lancet* 1972;2:280.
- 74.- Ter Meulen V, Koprowski H, Iwasaki Y, Kackell YM, Muller D. Fusion of cultured multiple sclerosis brain cells with indicator cells: Presence of nucleocapside and virions and isolation of parainfluenza type virus. *Lancet* 1972;2:1-5.
- 75 - Kolodovsky V, Koldovsky P, Henle G, Ackermann R, Haase G. Multiple sclerosis-associated agent: transmission to animals and some properties of the agent. *Infect Immun* 1975;12:1355.
- 76.- Pertschuk LP, Cook AW, Gupta J. Measles antigen multiple sclerosis: identification in the jejunum by immunofluorescence. *Life Sci* 1976;19 1603.
- 77.- Burks JS, Devald-Macmillan B, Jankovsky L, et al. Characterization of coronaviruses isolated using multiple sclerosis autopsy brain material. *Neurology* 1979;29:547.
- 78.- Koprowski H, DeFreitas EC, Harper ME, et al. Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. *Nature* 1985;318:154.
- 79 - Kastrukoff LF, Rice GPA. *Virology*, In Paty DW and Ebers GC ed. *Multiple Sclerosis*. FA Davis Company, Philadelphia, 1998.
- 80.- Schrijver HM, Crusius JBA, Uitdehaag BMJ, Garcia González MA, et al. Association of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist genes with disease severity in multiple sclerosis. *Neurology* 1999;52:595-599.

- 81 - Sadovnick AD, Ebers GC. Genetic of Multiple Sclerosis. In: Antel JP (Ed). Neurologic Clinics Multiple Sclerosis 1995;13(1):99-118.
- 82.- Pratt RTC, Compston ND, McAlpine D. The familial incidence of múltiple sclerosis and its significance. Brain 1952;74:191-232.
- 83.- Sadovnick AD, Ebers GC, Dyrment DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of múltiple sclerosis Lancet 1996;347:1728-30).
- 84.- Miller DH, Hammond SR, McLeod JG, et al. Múltiple sclerosis in Australia and New Zealand: Are the determinants genetic o environmental?. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1990;53:903-905
- 85.- Hader WJ, Feasby TE, Noseworthy JH, et al. Múltiple sclerosis in canadian native people. Neurology 1985;35:300
- 86.- Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE. Epidemiology of múltiple sclerosis in U.S. veterans. I: race, sex and geographic distribution. Neurology 1979; 29 1228-1235
- 87.- Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE. Epidemiology of múltiple sclerosis in U.S veterans. I: race, sex and geographic distribution. Neurology 1979; 29:1228-1235
- 88.- Miller DH, Hammond SR, McLeod JG, et al. Múltiple sclerosis in Australia and New Zealand: Are the determinants genetic o environmental?. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1990;53:903-905
- 89.- Skegg DCG, Corwin PA, Craven RS, et al. Ocurrance of multiple sclerosis in the north and south of New Zealand. J Neurol Neurosurg Psych 1987;50:134-139.
- 90.- Oksenberg JR, Barcellos LF, Hauser SL. Genetic aspect of Múltiple Sclerosis. Sem Neurol 1999;19(3):281.
- 91.-Sadovnick AD, Ebers GC. Epidemiology of múltiple sclerosis: a critical overview. Can J Neurol Sci 1993;20:17-29.
- 92.- KurtzkeFJ. A reassessment of the distribution of múltiple sclerosis . Acta Neurol Scand 1975;51:110-136.
- 93.- Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG. The epidemiology of multiple sclerosis Mayo Clin Proc 1997,72:871-878.
- 94 - Kurtzke JF. MS epidemiology worldwide. one view of current status Acta Neurol Scand 1995;161 (Suppl) 23-33.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- 95 - Dean G, Kurtzke JF On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa *BMJ* 1971;3:725.
- 96.- Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:906.
- 97.- Wyn DR, Rodriguez M, O'Fallon WM, Kurland LT. A reappraisal of the epidemiology of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota. *Neurology* 1990;40:780.
- 98.- Poser CM The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Ann Neurol* 1994;36(Suppl 2):S180.
- 99 - Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH Multiple sclerosis: update risk for relatives *Am J Med Genet* 1988;29:533.
- 100.- Ebers GC, sadovnick AD The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol* 1994;54:1-17.
- 101.- Ebers GC, Sadovnick AD. The geographic distribution of multiple sclerosis: a review. *Neuroepidemiology* 1993;12(1):1-5
- 102.- Milanov I, Topalov N, Kmetski T. Prevalence of multiple sclerosis in Gypsies and Bulgarians. *Neuroepidemiology* 1999;18(4):218.
- 103 - Yu YL, Woo E, Hawkins BR, Ho HC, Huang CY. Multiple sclerosis amongst Chinese in Hong Kong *Brain* 1989;112:1445.
- 104.-Hoffman RE, Zack MM, Davis LE, Burchfiel CM. Increased incidence and prevalence of multiple sclerosis in Los Alamos County, New Mexico. *Neurology* 1981;31(11):1489.
- 105.- Tola MA, Yugueros MI, Fernández-Buey N, Fernández Herranz R Prevalence de multiple sclerosis in Valladolid, northern Spain
- 106 - Helmick CG, Wringley JM, Zack MM, Bigler WJ, et al. Multiple sclerosis in Key West, Florida. *Am J Epidemiol* 1989;130(5):935.
- 107.- Bencsik K, Rajda C, Klivenyi P, Jardenhazy T, Vecseri L The prevalence of multiple sclerosis in the Hungarian city of Szeged. *Acta Neurol Scand* 1998;97(5):315.

- 108.- Rothwell PM, Charlton D High incidence and prevalence of multiple sclerosis in south east Scotland: evidence of a genetic predisposition. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64(6):730.
- 109 - Kurtzke JF, Bui-Quoc-Houng. Multiple sclerosis in a migrant population:2. Half orientals immigrating in childhood. *Ann Neurol* 1980;8(3):256.
- 110.- McDonnell GV, Hawkins SA. An epidemiologic study of multiple sclerosis in Northern Ireland *Neurology* 1998;50(2):423.
- 111.- Dean G. Annual incidence, prevalence and mortality of multiple sclerosis in white south african-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J* 1967;2:724-730.
- 112.- Gronning M, Mellgren SI. Multiple sclerosis in the two northernmost counties of Norway. *Acta Neurol Scand* 1985; 72:321-327
- 113.- Müller DH, Hammond SR, McLeod JG, et al. Multiple sclerosis in Australia and New Zealand: Are the determinants genetic or environmental?. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:903-905
- 114 - Alter M, Okihira M, Rowley W, Morris T. Multiple sclerosis among orientals and caucasians in Hawai. *Neurology* 1971;21:122-130.
- 115 - Kahana E, Zilber N, Abramson JH, Biton V, Leibowitz Y, Abramsky O. Multiple sclerosis: genetic versus environmental aetiology: epidemiology in Israel update. *J Neurol* 1994;214:341-346.
- 116.- Poser CM. Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta Neurol Scand* 1995;161(Suppl):11-22.
- 117.- Poser CM. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga. A historical essay. *Ann Neurol* 1994;36(Suppl12):S231.
- 118 - Page WF, Kurtzke JF, Murphy FM. Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans V. Ancestry and the risk of multiple sclerosis *Ann Neurol* 1993;33:632.
- 119 - Dean G, Bhigjee AI, Bill PL et al. Multiple sclerosis in black South Africans and Zimbabweans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(9):1064
- 120 - Mbonda E, Larnaout A, Maertens A, Appel B et al. Multiple sclerosis in a black Cameroonian woman *Acta Neurol Belg* 1990;90(4):218.
- 121.- Hou JB, Zhang ZX Prevalence of multiple sclerosis. a door-to-door survey in Lan Cang La Hu Zu Autonomous County, Yuman Province of China. *Neuroepidemiology* 1992;11:52.

- 122.- Kuroiwa Y, Igata A, Iihara K, Koshijima S, et al. Nationwide survey of múltiple sclerosis in Japan: clinical analysis of 1084 cases. *Neurology* 1975;25:845.
- 123.- Tan CT. Multiple sclerosis in Malaysia *Arch Neurol* 1988;45:624.
- 124 - Shibasaki H, McDonald WI, Kuroiwa Y Rational modification of clinical picture of multiple sclerosis:comparasion between British and Japanese patients *J Neurol Sci* 1981;49:253.
- 125 - Kuroiwa Y, Hung TP, Lansborough D, Park CS, et al. Multiple sclerosis in Asia. *Neurology* 1977,27:188.
- 126 - Sheremata WA, Poskanzer DC, Withum DG,MacLeod CL. Unusual occurrence on a tropical island of multiple sclerosis. *Lancet* 1985;2:618.
- 127.- Kinnunen E. Multiple sclerosis in Finland:evidence of increasing frequency and uneven geographic distribution. *Neurology* 1984;34:457.
- 128.- Larsen JP, Riise T, Nyland H, Kvale G, Aarly JA. Clustering of multiple sclerosis in the county of Hordaland, Estern Norway. *Acta Neurol Scand* 1985;71:390.
- 129.- Beltran I, Molto-Jorda JM, Diaz-Marín C, Marín R, Matias-Guiu J. Analytical epidemiological study of multiple sclerosis in Alcoi. *Rev Neurol* 1998;26(149):67.
- 130 - Lauer K. The risk of multiple sclerosis in the U.S.A. In relation to sociogeographic features: a factor-analytic study. *J Clin Epidemiol* 1994;47(1):43.
- 131.- McCluskey J, Peh ChA. The human leucocyte antigens and clinical medicine:an overview. *Rev Immunogenetics* 1999;1:3-20.
- 132.- Eren E, Travers P. The structure of the major histocompatibility complex and its molecular interactions. In:HLA in healt and disease. Lechler R and Warrens A (Eds.) Second ed Academic Press: 2000:23
- 133.- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y Molecular*. Ed McGrawHill Interamericana 1999:105-148.
- 134.- Rhodes DA, Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenetics* 1999;1:21
- 135.- Natarajan K, Li H, Mariuzza RA, Margulies DH. MCH class I molecules, structure and function *Rev immunogenetics* 1999;1:32-46.

- 136 - Watts C, Powis S. Pthway of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenetics* 1999;1:60.
- 137.- Nelson CA, Fremont DH. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev Immunogenetics* 1999,1:47-59.
- 138.- Steven GE The HLA Facts Books. Marsh Parham Peters.
- 139.- Bodmer JG, Bodmer WF, Marsh SGE. HLA nomenclature The name of the rose. In: Lechler R and Warrens A ed. HLA in health and disease. Academic Press 2000:147-161.
- 140.- Howard MC, Spack EG, Choudhury K, et al. MHC-based diagnostics and therapeutics-clinical applications for disease-linked genes. *Trends Immunology Today* 1999,20(4):161-165
- 141.- Hillert J, Fogdell-Hahn A. HLA and neurological disease. In: HLA in health and disease. Lechler R and Warrens A (Eds.) Second ed. Academic Press; 2000 219
- 142.- Nepom GT. HLA and type I diabetes. In: HLA in health and disease, Lechler R, Warrens A ed. Second ed. Academic Press; 2000:231.
- 143.- López de Castro JA. The pathogenic role of HLA-B27 in chronic arthritis. *Curr Opin Immunol* 1998;10(1):59-66.
- 144.- López-Larrea C, Gonzalez-Roces S, Peña M, Domínguez , Coto E, Alvarez V, Moreno M, Hernández O, Burgos-Vargas R, Gorodesky C. Characterization of B27 haplotypes by oligotyping and genomic sequencing in the Mexican mestizo population with ankylosing spondylitis: juvenile and adult onset. *Human Immunology* 1995,43:174-180.
- 145 -Maksymowych WP, Gorodezky C, Olivo A, Alaez C, Wong C, Burgos-Vargas R, eta al HLA-DRB1*08 influences the development of disease in mexican mestizo with spondyloarthropathy *J Rheumatol* 1997;24:904-7
- 146.- Maksymowych WP, Jhangri GS, Gorodezky C, Luong M, Wong C, Burgos-Vargas R, Morenot M, et al. The LMP2 polymorphism is associated with susceptibility to acute anterior uveitis in HLA-B27 positive juvenile and adult Mexican subjects with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:488-92.
- 147.- Langdon N, Welsh KI, Miller K et al. Genetic markers in narcolepsy. *Lancet* 1984,2:1178-1180

- 148.- Nepom GT HLA and rheumatoid arthritis In: HLA in health and disease, Lechler R, Warrens A ed Second ed Academic Press; 2000:231
- 149.- Debaz H, Olivo A, Vazquez-García MN, de la Rosa G, Hernández A, Lino L, Burgos R, Fernández-Viña M, Stasny P, Gorodesky C. Relevant residues of DRβ1 third hypervariable region contributing to the expression and to severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *Human Immunol* 1998;59:287-294.
- 150.- Tourbah A, Ciapin A, Gout O, et al Systemic autoimmune features and multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1998;55:517-521
- 151.- De Keyser J Autoimmunity in multiple sclerosis. *Neurology* 1988;38:371-374
- 152.- Miller DH, Hornabrook RW, Dagger J, Fong R. Class II HLA antigens in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:575-577.
- 153.- Fogdell-Hahn A, Ligers A, Gronning M, Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* 2000;55:140-148
- 154.- Cowan EP, Pierce ML, McFarland HF, McFarlin DE. HLA-DR and -DQ allelic sequences in multiple sclerosis patients are identical to those found in the general population. *Hum Immunol* 1991;32:203-210
- 155.- Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15, DQ6, Dw2 haplotype. *Neurology* 1993;43:163-168
- 156.- de Moerloose P, Jeannet M, Martins-da-Silva B. Increased frequency of HLA-DRw2 and DRw3 in multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 1979;13:357-360
- 157.- Cullen CG, Middleton D, Savage DA, Hawkins S. HLA-DR and DQ DNA genotyping in multiple sclerosis patients in Northern Ireland. *Hum Immunol* 1991;30:1-6
- 158.- Spurkland A, Ronningen KS, Vandvik B, et al. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes may jointly determine susceptibility to develop multiple sclerosis. *Hum Immunol* 1991;30:69-75
- 159.- Duquette P, Décarv F, Pleines J, Boivin D, et al. Clinical sub-groups of multiple sclerosis in relation to HLA: DR allele as possible markers of disease progression. *Can J Neurol Sci* 1985;12:106-110

- 160.- Engell T, Raun NE, Thomsen M, Platz P. HLA and heterogeneity of multiple sclerosis
Neurology 1982;32:1043-6
- 161.- Kurdi A, Ayesb I, Abdaller A, et al. Different B-lymphocyte alloantigens associated with
múltiple sclerosis in Arabs and North Europeans. *Lancet* 1977;1:1123-1125
- 162.- Marrosu MG, Muntoni F, Murru MR, et al. Sardinian múltiple sclerosis is associated with HLA-
DR4: a serologic and molecular analysis. *Neurology* 1988;38:1749-1753
- 163 - Naito S, Kuroiwa Y, Itoyama T, et al HLA and japanese múltiple sclerosis. *Tissue Antigens*
1978;12:19-24
- 164.- Gorodedezy C, Najera R, Rangel BE, et al. Immunogenetic profile of múltiple sclerosis in
Mexicans. *Hum Immunol* 1986;16:364-374
- 165.- Hao Q, Saida T, Kawakami H, et al HLAs and genes in Japanese patients with multiple
sclerosis:evidence for increased frequencies of HLA-Cw3, HLA-DR2 and HLA-DQB1*0602. *Hum*
Immunol 1992;35:116-124
- 166.- Pina MA, Ara JR, Lasierra P, Larrad L, et al. Major histocompatibility complex class II alleles
and the course ant outcome of MS. *Neurology* 1999;52:1923
- 167.- Kwon OJ, Karni A, Israei S, Brautbar Ch, et al. HLA class II susceptibility to múltiple sclerosis
among Ashkenazi and non-Ashkenazi jews *Arch Neurol* 1999;56:555-560
- 168.- Hillert J, Gronning M, Nyland H, et al. An immunogenetic heterogeneity in múltiple sclerosis.
J Neurol Neurosurg Psychiat 1992;55:887-890
- 169.- Spurkland A, Ronningen KS, Vandvik B, et al. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes may jointly
determine susceptibility to develop multiple sclerosis. *Hum Immunol* 1991;30:69-75
- 170.- Kira J, Kanai T, Nishimura Y, et al. Western versus Asian types of múltiple sclerosis:
immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol* 1996;40:569-574
- 171.- Fukusawa T, Yamasaki K, Ito H, Kikuchi S, et al Both the HLA-DPB1 and –DRB1 alleles
correlate with risk for multiple sclerosis in Japanese. clinical phenotypes and gender as important
factors. *Tissue Antigens* 2000;55:199-205
- 172 - Söderstrom M, Ya-Ping J, Hillert J, Link H Optic neuritis. Prognosis for multiple sclerosis
from MRI, CSF and HLA findings. *Neurology* 1998;50:708-714

173.- Hauser SL, Oksenberg JR, Lincoln R, Garovoy J, et al. Interaction between HLA-DR2 and abnormal brain MRI in optic neuritis and early MS. *Neurology* 2000;54:1859-1861

174.- Runmarker B, Martinsson T, Wahlström J, Andersen O. HLA and prognosis in multiple sclerosis. *J Neurol* 1994;241 385-391

175.- Fogdell-Hahn A, Ligers A, Gronning M, Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease *Tissue Antigens* 2000;55:140-148

176.- Pina MA, Ara JR, Lasiera P, Modrego PJ, Larrad L. 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* 1999;18:203-209

177.- Alter y Olivares. Múltiple sclerosis in México. *Arch Neurol* 1970;23:451-460.

178.- Rodríguez-Gracia A, Sotelo-Morales J. Esclerosis múltiple en México. *Salud Pública de México* 1981;XXIII (5):451-456.

179.- Gorodezky C. Genetic difference between Europeans and Indians: tissue and blood types. *Allergy Proc* 1992;13(5):243-250.

i Zachary AA. *Statistical Analysis of Genetic Data*. ASHl Quarterly, Winter 1995: 4-7.

ii Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ration of frequencies. *Ann Hum Genet* 1956, 20: 309-311.

iii Spiegel MR. *Schaum's. Outline of Theory and Problems of Statics*. En: *Schaum Publishing Company*. New York. 1961: 191-203.