



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION  
"SALVADOR ZUBIRAN"  
DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA Y PSIQUIATRIA**

**PERFIL INMUNOGENETICO DE ENFERMOS  
MESTIZOS MEXICANOS CON ESCLEROSIS  
MULTIPLE EN RELACION AL COMPLEJO  
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
ESPECIALISTA EN NEUROLOGIA**

**PRESENTA:**

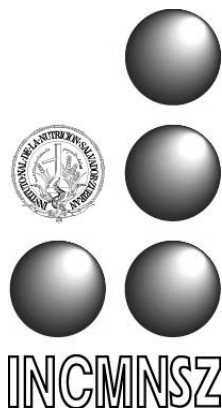
**DR. HUMBERTO GONZALEZ MERCADO**

**TUTOR:**

**DR. BRUNO ESTAÑOL VIDAL**

**CO-TUTOR:**

**DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA**



**MEXICO, D.F.**

**AGOSTO DEL 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

**Biblioteca Central**

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

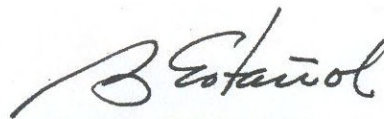
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

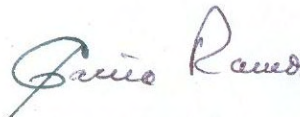
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



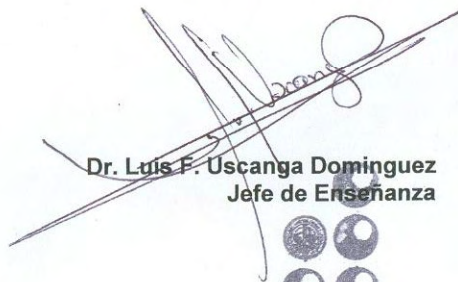
**Dr. Julio Granados A.**  
**Asesor de Tesis**



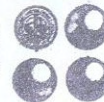
**Dr. Bruno Estañol Vidal**  
**Asesor de Tesis**



**Dr. Guillermo García Ramos**  
**Jefe del Departamento**  
**de Neurología y Psiquiatría**



**Dr. Luis F. Uscanga Dominguez**  
**Jefe de Enseñanza**



**INCMNSZ**  
**INSTITUTO NACIONAL**  
**DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION**  
**"DR. SALVADOR ZUBIRAN"**  
**DIRECCION DE ENSEÑANZA**

SEDE: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán  
México, D.F.

## **DEDICATORIA**

A Dios:

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas.”  
Josué 1:9

A mi esposa Elda Gabriela y a nuestro hijo Daniel Humberto:

Por el amor, la paciencia y el apoyo incondicionales que he recibido en  
todo momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

A toda la familia

Mis padres, hermanos, sobrinos, abuelas, tíos, primos, suegros y cuñados

A los médicos adscritos al departamento de  
Neurología y Psiquiatría del INCMNSZ

A mis compañeros residentes del departamento de  
Neurología y Psiquiatría del INCMNSZ

## INDICE

|                                                                  |               |
|------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>INTRODUCCION .....</b>                                        | <b>1</b>      |
| Epidemiología.....                                               | 1             |
| El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) .....         | 2             |
| Factores genéticos asociados a la esclerosis múltiple .....      | 7             |
| Factores genéticos y etiológicos de la esclerosis múltiple ..... | 8             |
| <br><b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>                      | <br><b>18</b> |
| <br><b>JUSTIFICACION .....</b>                                   | <br><b>19</b> |
| <br><b>OBJETIVOS .....</b>                                       | <br><b>21</b> |
| <br><b>HIPOTESIS.....</b>                                        | <br><b>22</b> |
| <br><b>PACIENTES Y METODOS .....</b>                             | <br><b>23</b> |
| <br><b>RESULTADOS .....</b>                                      | <br><b>28</b> |
| <br><b>DISCUSION .....</b>                                       | <br><b>32</b> |
| <br><b>CONCLUSIONES .....</b>                                    | <br><b>33</b> |
| <br><b>BIBLIOGRAFIA .....</b>                                    | <br><b>34</b> |
| <br><b>ANEXOS.....</b>                                           | <br><b>37</b> |
| Criterios de resonancia magnética en Esclerosis Múltiple .....   | 38            |
| EQUIPO, MATERIAL Y TECNICAS .....                                | 39            |
| <br><b>GLOSARIO.....</b>                                         | <br><b>47</b> |

## INTRODUCCION

### **Epidemiología**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria autoinmune y desmielinizante del sistema nervioso central cuya etiología es desconocida. En general, la incidencia anual de la EM es alrededor de 7/100,000 habitantes con una prevalencia alrededor de 120/100,000 habitantes; la relación hombre-mujer es de 1:2 y el 80% de los enfermos presenta la variedad clínica de recaída-remisión.

Usualmente el inicio de la enfermedad es entre la tercera y la cuarta décadas de la vida, la expectativa global de vida es aproximadamente de 25 años y la mayoría de los enfermos fallecen por causas no relacionadas. (1)

En México, se ha reportado un incremento en la incidencia de la esclerosis múltiple atribuible a factores putativos tales como la migración, la alimentación, la globalización y a la mejoría en las técnicas diagnósticas. (1)

Estudios previos han mostrado un gradiente en la prevalencia de la enfermedad de 6 a 12/100,000 habitantes entre el centro y el norte del país, sin embargo existe la idea que en las comunidades indígenas la prevalencia es mucho menor. (1,2)

## El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)

La regulación del sistema inmune es factible gracias a la participación de moléculas codificadas por numerosos genes, algunos de ellos localizados dentro de un sistema genético denominado complejo principal de histocompatibilidad ó MHC (Major Histocompatibility Complex, siglas en inglés), el cual está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y ocupa una región de 4,000 Kb. (3)

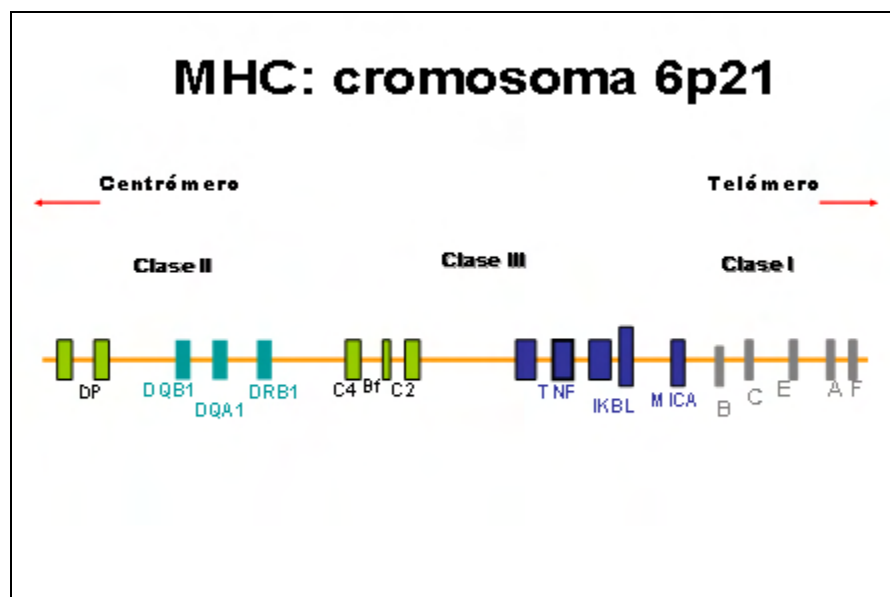


Figura 1: Diagrama del Complejo Principal de Histocompatibilidad en el cromosoma 6p21

El producto de los genes del MHC tiene como función participar en el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos-T; éste proceso es en cierta manera complejo y se lleva a cabo por medio del reconocimiento de determinantes antigénicos en asociación con un antígeno propio, el cual es expresado por los genes del MHC. Existen tres clases de genes del MHC: I, II y



III; los dos primeros codifican para antígenos leucocitarios humanos (HLA, siglas en inglés) y el último codifica para componentes del complemento. (4)

Estas moléculas funcionan como elementos de restricción, esenciales para el reconocimiento de antígenos (tumoraes ó virales) por linfocitos-T citotóxicos (clase I) que expresan el marcador CD8 (5) y por los linfocitos-T cooperadores (clase II).

Los genes clase II se localizan en el extremo centromérico del brazo corto del cromosoma 6, dicha región incluye a los *loci* HLA-DR, DP y DQ, cada uno de ellos está constituido por las cadenas A y B que codifican para una cadena alfa de 33 Kd y otra beta de 28 Kd que dan lugar a la expresión de una glicoproteína dimérica llamada antígeno clase II. Estos antígenos se expresan sólo en los macrófagos, linfocitos-T activados, linfocitos-T cooperadores, linfocitos-B, células dendríticas, epiteliales y endoteliales.

Las moléculas clase II presentan 2 cadenas alfa y 2 cadenas beta. La cadena beta es la más polimórfica, especialmente la beta 1, aunque en los DQ y los DP la cadena alfa sí es polimórfica. Ambas cadenas se hallan insertadas en la membrana celular mediante un dominio transmembranal y tienen también una región intracitoplásmica. Los *loci* HLA-DRA1 y DRB1 codifican para los polipéptidos alfa y beta respectivamente los cuáles forman una molécula madura de HLA-DR clase II. Los productos de los *loci* DQA1 y DQB1 forman la molécula DQ y los *loci* DPA1 y DPB1 codifican para la molécula DP.

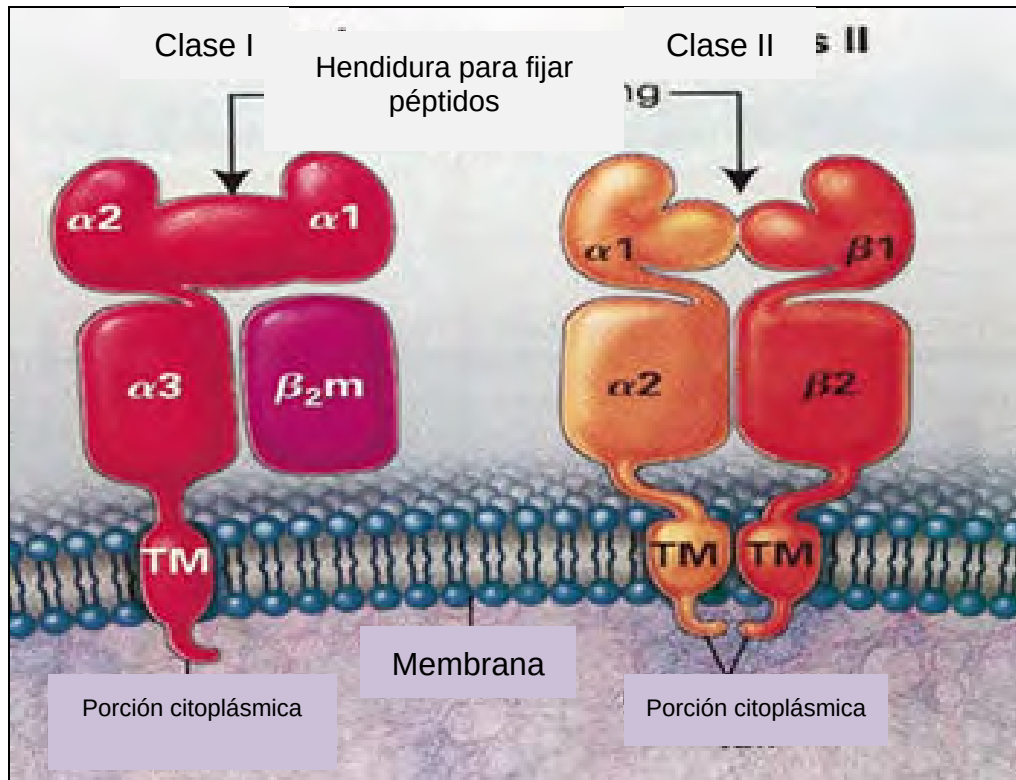


Figura 2: Diagrama de las moléculas HLA clase I y II

Los genes clase III se encuentran ubicados en una porción de 12 Kb entre los genes clase I y II dentro del MHC que se hereda como unidad genética conocido “complotipo ó haplotipo del complemento”. Cada complotipo codifica la síntesis de los factores del complemento C2, C4A y C4B de la vía clásica y el factor B de la vía alterna; intercalados entre los genes C4A y C4B se localizan dos genes que codifican para la expresión de la enzima 21 hidroxilasa, la cual hidroxila el carbono 21 en la biosíntesis del cortisol. (6)

El HLA es el sistema genético más polimórfico del ser humano, hasta la fecha se han identificado claramente 158 antígenos HLA a nivel de la proteína: 27 HLA-A;

59 HLA-B; 10 HLA-C; 21 HLA-DR; 9 HLA-DQ y 6 HLA-DP. A nivel del ADN éste polimorfismo es aún más elevado, por ejemplo, del gen HLA-A2 existen 17 variantes (A\*0201-A\*0217) y del HLA-B35 en México existen 16 variantes (B\*3501-B3516) a nivel de la secuencia de nucleótidos. (7,8)

En relación a la nomenclatura un antígeno se identifica por la letra del locus y un número (p. ej. A1, B51, Cw8, DR4, etc). Un alelo se identifica por la letra del locus, un asterisco y un número (p. ej. A\*0101, B\*0501, Cw\*0401, DRB1\*0401, etc). (9)

Los genes del HLA se heredan en forma co-dominante, de tal forma que cada haplotipo es transmitido por la madre y el padre. Se desconoce el mecanismo que dió lugar a éste extenso polimorfismo, por lo que se han propuesto dos hipótesis que tratan de explicarlo:

La primera es la “deriva aleatoria” la cual explica que el polimorfismo se debe a las variaciones al azar de una estructura genética básica y que dicha variación tiene una cierta frecuencia dentro de una población determinada.

La segunda es la “selección natural” la cual propone que existe selección de los genes polimórficos sobre los monomórficos.

Es probable que ambos mecanismos participen en el desarrollo del polimorfismo que caracteriza a los genes del MHC. La trascendencia del micropolimorfismo es, que le confiere a la especie un enorme repertorio de elementos de reconocimiento para la gran variedad de antígenos ambientales y por lo tanto, una gran diversidad en la capacidad para activar respuestas inmunitarias contra

los patógenos que podrían acabar con la especie, dando así una ventaja selectiva. (10)

El polimorfismo dentro de la molécula de clase I es determinado por variaciones de aminoácidos en pequeñas secciones de los dominios extracelulares  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Los polimorfismos en las moléculas clase II resultan de las alteraciones en la secuencia de aminoácidos en la cadena  $\beta$ . Los péptidos son presentados a las células-T-cooperadoras en asociación con moléculas de clase II y la interacción célula-célula es asistida por una variedad de moléculas de adhesión. (11)

### **Factores genéticos asociados a la esclerosis múltiple**

El gen identificado como candidato a contribuir en la etiología de la esclerosis múltiple se encuentra codificado en el cromosoma 6p21.1-21.3 con los alelos DR15 y/o DQ6 sin embargo, en ésta región pueden estar codificados uno ó más genes y en cada *loci* pueden presentarse heterogeneidad en los alelos.(11)

Un estudio ha sugerido que: aunque la presencia del alelo HLA-DRB1\*15 aumenta en forma dominante el riesgo de padecer esclerosis múltiple, el HLA-DRB1\*03 contribuye en menor medida al riesgo en forma recesiva, además el alelo HLA-DRB1\*14 disminuye el riesgo.

Existen otros potenciales *loci* en los cromosomas 5q33, 17q23 y 19p13 que han mostrado un vínculo débil con la susceptibilidad a la esclerosis múltiple. (12)

## Factores genéticos y etiológicos de la esclerosis múltiple

Uno de los modelos de inducción a la desmielinización primaria en la esclerosis múltiple es: el reconocimiento de antígenos expresados en la superficie de los oligodendrocitos por parte de las células inmunes en el entorno de los productos genéticos del MHC. (1)

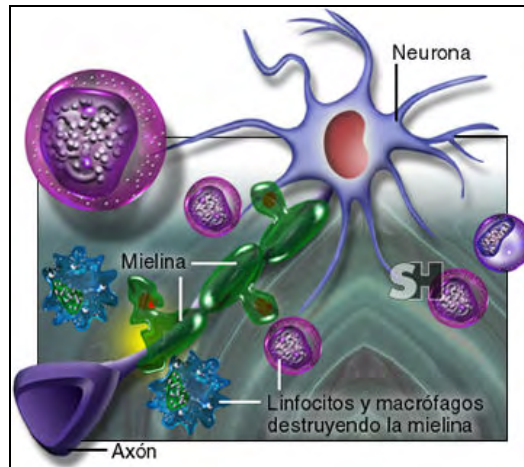


Figura 3: Destrucción de la mielina por linfocitos-T y macrófagos activados

Estudios genéticos han validado la asociación entre la EM y las variantes polimórficas dentro del MHC. (13)

Los genes del MHC codifican proteínas importantes en la activación de la respuesta inmune antígeno-específica con un papel fundamental en el reconocimiento inmunológico de lo propio y lo no propio. (14,15)

En enfermos mexicanos la EM se ha asociado a los haplotipos HLA-DR2, HLA-DR3 y HLA-DQ6 así como DRw6 además, se ha observado una distribución similar de los alelos clase II entre los pacientes mexicanos con EM esporádica y familiar. (2,16)

Los alelos encontrados en enfermos mexicanos se han asociado previamente con EM en enfermos de raza blanca, la frecuencia de éstos haplotipos en la población mexicana en general es consistentemente baja. (2,16)

Un análisis basado en los genes del MHC mostró una gran variabilidad en la estructura genética de mestizos mexicanos como resultado de una mezcla entre diferentes etnias, éste mecanismo se ha propuesto como el principal responsable de la gran diversidad observada en la poblaciones urbanas. (17)

Un estudio de la expresión clínica de la EM en mexicanos mestizos mostró características compartidas con enfermos europeos y asiáticos, lo que indica una participación de la estructura genética en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. (18)

Los genes en el MHC codifican proteínas que son importantes en la activación de las respuestas inmunes antígeno-específicas. Los alelos en los *loci* adyacentes al MHC a menudo se encuentran en fuerte desequilibrio genético; sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos responsables para éste desequilibrio genético. El haplotipo HLA-DR2 del MHC humano, el cuál predispone a EM, muestra un desequilibrio genético más extenso que otros haplotipos caucásicos HLA comunes en la región DR y así parece que probablemente se ha mantenido mediante selección positiva. La caracterización de dos alelos HLA-DR asociados a EM en *loci* separados mediante un ensayo funcional en ratones humanizados indican que el desequilibrio genético entre dos alelos puede ser debido a una interacción epistática funcional, en la cual un alelo modifica la respuesta de las células-T activada por el segundo alelo

mediante la inducción y/o activación de la muerte celular. Esta epistasis funcional se asocia con una forma moderada de enfermedad similar a EM. Dicha interacción epistática pudiera probar ser un mecanismo general importante para la modificación de respuestas inmunes exuberantes que son deletéreas al huésped y pudiera también ayudar a explicar el fuerte desequilibrio genético en éstos y quizás otros haplotipos.

En el MHC humano el haplotipo HLA-DR2 contiene los alelos DRB1\*1501 (DR2b) y DRB5\*0101 (DR2a) en los respectivos *loci* DRB1 y DRB5, localizados a 85kb de distancia. En todos los grupos étnicos estudiados en forma extensa, éstos alelos muestran casi por completo un desequilibrio genético con frecuencias de haplotipos que varían entre las poblaciones. Datos previos sugieren que éste haplotipo es excepcional en la extensión del desequilibrio genético. Utilizando extensos datos disponibles de polimorfismos de nucleótido único (SNP) para ésta region genómica, se ha analizado la extensión y el tamaño del desequilibrio genético en muestras caucásicas. Se ha encontrado que el haplotipo HLA-DR2 muestra la preservación más extensa en relación a todos los otros haplotipos HLA-DR comunes. Así, éstos datos sugieren que la fuerte selección positiva opera en éste haplotipo y que éstos *loci* DR pudieran conferir un beneficio selectivo particular.

En teoría, la inseparabilidad del DR2a del DR2b pudiera implicar la persistencia de un haplotipo fundador; sin embargo, su ubicuidad en grupos étnicos ampliamente variables es un argumento en contra que ésta fuera la única explicación. Otra posibilidad pudiera ser una interacción epistática benéfica entre



éstos alelos. Como en la definición original de Bateson, aquí utilizamos el término epistasis para referirnos al enmascaramiento de un efecto funcional de un alelo en un *loci* por otro alelo en un *loci* separado. Si la combinación DR2b-DR2a fuera muy benéfica, ésta favorecería un desequilibrio genético más fuerte entre esos alelos codificantes para el HLA-DR que entre los anónimos SNP inmersos ó vecinos. Estudios han resaltado tales diferencias entre SNP y los alelos HLA. Análisis de los datos disponibles de SNP en la región DR2 en el proyecto HapMap para muestras nigerianas (Yoruba) y asiáticas sugieren que hay diferencias poblacionales en los patrones de desequilibrio genético para SNP. Esta observación está en rígido contraste con el fuerte desequilibrio genético entre DR2b y DR2a, y sugiere fuertemente la co-selección de alelos epistáticos.

En apoyo a éstas observaciones genéticas, se ha obtenido evidencia biológica independiente de una interacción epistática entre el DR2b y el DR2a. Estudios funcionales en ratones humanizados han disecado los papeles de éstos alelos en la predisposición a EM. Estudios genéticos previos localizaron determinantes genéticos dominantes de susceptibilidad hacia la región alrededor de los *loci* DRB1 y DRB5 en el haplotipo HLA-DR2, pero la disección de la variante de ADN precisa que cuenta para ésta susceptibilidad ha sido reducida por el casi completo desequilibrio genético entre los alelos DR2b y DR2a. Transferir éstos genes dentro de ratones ha permitido analizar sus contribuciones, ya sea por separado ó en conjunto a la respuesta autoinmune de las céls-T y a la encefalitis experimental autoinmune similar a EM (EAE).

Dos receptores de antígenos de céls-T (TCRs) derivados de individuos afectados con EM: Hy.2E11 (Hy) y Ob.1A12 (Ob), reconocen el epítipo inmunodominante en el autoantígeno relevante de EM de la proteína básica de mielina (MBP), cuando éste es presentado por la molécula DR2b (codificada por DRB1\*1501 y la invariante del alelo DRA1\*0101). El TCR de Hy también reconoce varios diferentes epítopos presentados por la molécula DR2a (codificada por DRB7\*0101 y la invariante del alelo DRA1\*0101), una reacción cruzada que no se observa con el TCR Ob. Generando ratones humanizados transgénicos que expresan el TCR Hy y el TCR Ob y DR2b ó DR2a ó ambos de éstos alelos HLA clase II y debido a que han sido cruzados hacia ratones Rag2 -/-, los cuáles no expresan TCRs murinos endógenos, los TCRs expresados únicamente por los ratones fueron los TCR transgénicos-codificados humanos.

Los ratones Hy<sup>+</sup>-DR2b<sup>+</sup> desarrollaron espontáneamente EAE muy severa. La adición del transgen DR2a disminuyó significativamente su incidencia, redujo su severidad y retardó su inicio. También se han visto remisiones clínicas completas espontáneas en alrededor del 20% de los ratones Hy<sup>+</sup>-DR2b<sup>+</sup>-DR2a<sup>+</sup>, mientras que ninguno de los 38 ratones transgénicos Hy<sup>+</sup>-DR2b<sup>+</sup> se recuperaron ( $P < 0.014$ ) de la EAE. Además, La EAE progresiva primaria fué muy prevalente en los ratones transgénicos Ob<sup>+</sup>-DR2b<sup>+</sup> y no se vió afectada por la introducción del DR2a. Estos resultados indican que el efecto modificante del DR2a puede no ser simplemente secundario a un evento inespecífico, como el robo de la cadena DRA, sino secundario a una interacción epistática con el DR2b que depende de una reacción cruzada de los TCR. Esta conclusión fué

corroborada en experimentos por separado que mostraron que ni las frecuencias de céls T CD4+ ni la severidad de la EAE en los ratones transgénicos Hy+DR2b+ fueron afectados por la adición de otro alelo HLA-DR, DRB1\*0401. En conjunto éstos resultados implican que, al menos en éste escenario, los alelos DR2b median la EAE, mientras que el DR2a funciona como un modificador genético de la enfermedad resultante.

Una posible explicación de éstas observaciones es que las moléculas HLA DR2 induzcan deleción de las céls-T CD4+ y modulen con ello la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto se ha comparado la frecuencia de las céls T CD4+ tanto en los timos como en la sangre periférica de los individuos DR2+ transgénicos en el fondo genético deprivado de los genes Rag2<sup>-/-</sup>. No se apreciaron diferencias significativas en los timos y sí se encontró frecuencias considerablemente bajas de céls-T CD4 en la sangre periférica; en contraste no existieron tales diferencias en los transgénicos con distinto fondo genético. Estos resultados sugieren que las moléculas DR2 no inducen tolerancia central y sin embargo sí reducen las céls-T CD4+ autorreactivas en la sangre periférica.

Un mecanismo de tolerancia periférica es la deleción clonal de las céls-T que reaccionan contra lo propio mediante la inducción de muerte celular inducida por activación (AICD). Este tipo de activación precede a la expansión proliferativa de las céls-T que serán llevadas a apoptosis, en consecuencia interesa conocer si las moléculas DR2 inducen directamente la deleción en la periferia, los experimentos en modelos transgénicos demostraron que ésto ocurre aproximadamente 5 días después de que se inició la activación de las céls-T y

sólo los individuos DR2+ lo hacen. La tasa de apoptosis en las céls-T CD4+ puede ser transferida a otros individuos sólo si comparten el alelo de susceptibilidad confirmando con ello el papel directo que tienen las moléculas DR2 en la delección periférica de los linfocitos-T CD4+ mediante la AICD. Este mecanismo muestra además que el efecto de epistasis está presente cuando existen 2 alelos de susceptibilidad en el mismo individuo.

Otro fenómeno interesante característico de los genes del MHC en el humano es la propiedad en algunos de ellos (30%) de mostrar desequilibrio genético el cual existe en todo el genoma pero que es particularmente elevado en la región MHC. El mecanismo que lo genera y lo mantiene se desconoce aunque se han propuesto varias explicaciones, en cualquiera de los casos los haplotipos marcados por el HLA-DR2 lo tienen; la explicación más simple es que quién lo tenga es porque ha sido seleccionado positivamente como un mecanismo benéfico en contra de enfermedades infecciosas, no necesariamente debido a que todos los elementos que constituyen al haplotipo sean benéficos, sino que uno ó varios genes tengan dicha característica; en una etapa posterior el haplotipo expandirá su frecuencia en la historia evolutiva de las poblaciones generando lo que en genética se conoce como efecto fundador, el cual según conserve su ventaja ó no permanecerá en desequilibrio genético ó disminuirá su frecuencia a través del tiempo.

Estos argumentos aunque son relevantes para explicar la genética de población no explican de manera absoluta los efectos que genera la enfermedad autoinmune lo que sugiere la interacción con agentes detonadores contenidos

en el medio ambiente donde la prevalencia de la enfermedad es particularmente elevada y sugieren la existencia además de factores epigenéticos en la fisiopatogenia de la EM. Los 2 mecanismos señalados en los párrafos previos (genética y medio ambiente) sí explican las diferencias en prevalencia e incidencia de la EM en distintos grupos étnicos lo que ha llevado a estudiar además del HLA distintos polimorfismos de nucleótido único (SNP) en distintas poblaciones.

De cualquier manera, los datos presentes en las poblaciones estudiadas incluyendo la de México indican que existe la selección natural de haplotipos con efecto fundador y que la incidencia de la enfermedad aumentará en la medida que dichos haplotipos se incorporen a poblaciones, hasta antes de ese momento, vírgenes a la enfermedad.

La interacción epistática de los genes de susceptibilidad sugiere la existencia de modulación intensa en el TCR en los linfocitos-T autorreactivos y sugieren además la existencia de disociación entre tolerancia central y periférica y asienta las bases para estudiar los mecanismos genéticos que subyacen a las distintas formas de expresión clínica de la enfermedad, y particularmente a los distintos estados de gravedad; muy probablemente también influyen en los estados de remisión y exacerbación particularmente en la forma de recaída-remisión.

Lo anterior sugiere que para ésta forma clínica se hace necesario que las vías metabólicas de apoptosis estén intactas y en consecuencia pueda ocurrir espontáneamente remisión clínica; de ser así también sería factible disminuir la

gravedad mediante la manipulación de las vías metabólicas de apoptosis seleccionando los individuos genéticamente susceptibles como los HLA-DR2+.

Los datos expresados en los párrafos anteriores sugieren que una vez iniciado los mecanismos fisiopatogénicos primarios ocurre la interacción de otros elementos que inducirán una respuesta immune particularmente intensa que al final sera la responsable de buena parte del daño histopatológico característico de la EM donde el papel de algunas infecciones virales parece particularmente importante, dichos agentes infecciosos incluyen los virus de hepatitis, la esquistosomiasis, y en los modelos experimentales el virus de la coriomeningitis linfocítica.

El equilibrio de control de la infección por un lado y el mecanismo de daño histopatológico por otro se centra en un balance perfecto de la respuesta inmune, el cual puede derivar a enfermedad si el fenómeno de epistasis descrito líneas arriba está presente y en consecuencia hacer que la balanza se desvíe hacia la patogenicidad e incluso a la gravedad de la forma clínica. La caracterización de todos los genes que acompañan al haplotipo HLA-DR2 en desequilibrio genético permitirá abundar en el mecanismo fisiopatogénico de la EM, ésta tarea ha iniciado con la caracterización de los haplotipos HLA-DR2 y requiere que a corto plazo se vayan identificando *loci* adicionales de susceptibilidad los cuáles por el hecho de estar en desequilibrio genético con el DR2 sean accesibles a su caracterización.

Una vez caracterizada la estructura de los genes seguirá la correlación funcional de la interacción de cada uno de ellos y su eventual manipulación lo que aportará un mecanismo muy poderoso para la manipulación terapéutica de ésta enfermedad neurológica crónicamente degenerativa. (14)

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La EM se ha considerado como una enfermedad que en forma predominante afecta a la población del norte de Europa además de ser la resultante de una interacción recíproca entre los genes y el medio ambiente, siendo una enfermedad estrictamente poligénica en la cuál se codifican polimorfismos normales que pueden contribuir con varios efectos en alguna estructura ó función aún no determinadas.

La EM, con su curso crónico, es la enfermedad neurológica que con mayor frecuencia ocasiona discapacidad en el adulto joven. Un análisis epidemiológico descriptivo de una población del norte del país mostró que el 58% de los enfermos quedaron confinados en su hogar a una edad promedio de 38 años.

(19)



## JUSTIFICACION

La identificación de uno ó varios genes verdaderamente predisponentes a EM dentro del amplio haplotipo del MHC ha sido perjudicada por el fenómeno del desequilibrio genético.

Debido a que los patrones del desequilibrio genético difieren entre las diferentes poblaciones, un potente abordaje para romper éste complejo obstáculo genético es: el escrutinio y comparación de un gran número de haplotipos en bases de datos bien caracterizados de poblaciones con diferente historia ancestral.

En el caso de la EM ésto se puede realizar comparando grupos de alto riesgo provenientes del norte de Europa con grupos no caucásicos de bajo riesgo. (15)

Antes de la conquista por los españoles los habitantes nativos de México mostraban una gran variabilidad somática como resultado de los primeros habitantes indígenas en asentamientos tempranos durante el período paleolítico asiático. La ocurrencia de diferentes oleadas migratorias así como de cambios genéticos por las fuerzas evolutivas dieron lugar a la conocida diversidad de las poblaciones Mesoamericanas. México es considerado principalmente de afiliación asiática en contraste con los europeos y africanos que vinieron a América a partir de los viajes de Colón. (17)

La población mexicana se compone principalmente de mestizos (la mezcla entre españoles e indígenas) por lo tanto tiene un importante trasfondo genético Mongoloide. (16)

Los individuos mestizos mexicanos tienen una proporción de genes autóctonos del 56%, de genes caucásicos del 40% y de genes afro-americanos del 4%. (2)

## **OBJETIVOS**

Primario:

Determinar las frecuencias génicas de los alelos del locus HLA-DR en enfermos mexicanos mestizos con EM y compararlas con aquellas presentes en individuos sanos pareados por etnicidad.

Secundario:

Conocer si existe asociación entre algún alelo del locus HLA-DR con la EM y en consecuencia confiera susceptibilidad genética.

## **HIPOTESIS**

Hipótesis nula:

La frecuencia génica de los alelos HLA-DR en enfermos con EM es semejante a la de individuos sanos.

Hipótesis alternativa:

La frecuencia génica de alguno de los alelos del locus HLA-DR en enfermos con EM difiere de su contraparte en individuos sanos.

## **PACIENTES Y METODOS**

Tipo de estudio: Casos y controles.

Este estudio fué diseñado teniendo en consideración que la EM representa una baja prevalencia en mexicanos (6-12/100,000 habitantes) y para establecer fuerzas de asociación entre marcadores del HLA y el desarrollo de la enfermedad.

Población:

1. Casos:

- Se estudiaron 30 enfermos mexicanos mestizos con diagnóstico de EM que consecutivamente acudieron a la consulta externa de Neurología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

2. Criterios de inclusión:

- Enfermos adultos de ambos sexos
- Mayores de 18 años de edad
- Mexicanos mestizos: nacidos en México, con apellido proveniente de España y antecedentes familiares de ancestros mexicanos al igual que sus 2 últimas generaciones
- Criterios diagnósticos propuestos en la Revisión de los Criterios Diagnósticos de McDonald para Esclerosis Múltiple del 2005

3. Criterios de exclusión:

- Portadores de otro tipo de enfermedad desmielinizante inflamatoria idiopática del sistema nervioso central que no cumplan los criterios diagnósticos para EM
- Enfermos con EM que no aceptaron participar en el estudio

#### 4. Controles:

- Se estudiaron 99 individuos sanos mexicanos mestizos (nacidos en México al igual que sus 2 últimas generaciones), provenientes de población abierta, sin la presencia de antecedentes heredo-familiares de enfermedades autoinmunes.

Cálculo del tamaño de la muestra:

$$p1 = \frac{(RM)p2}{(RM)p2 + (1-p2)}$$

$$n = \frac{[Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p2(1-p2)} + Z_{1-\beta} \sqrt{p1(1-p1) + (1-p2)}]^2}{(p1-p2)^2}$$

Nivel de significancia estadística  $\alpha = 0.05$

$$Z_{1-\alpha/2} = 1.96 \quad p1 = 0.155$$

$$Z_{1-\beta/2} = 0.84 \quad p2 = .05$$

$$\text{Poder} = 0.80 \quad RM = 3.5$$

Al realizar el despeje se obtiene un tamaño de muestra de 65 pacientes para EM, pero sólo fué posible incluir 30 enfermos.

Variables:

A. Variable independiente: Genes del HLA clase II DR y DQ

B. Variable dependiente: Esclerosis Múltiple

C. Variables universales: Sexo, Edad, Origen, Antecedentes heredo-familiares

Definición conceptual y operativa de las variables:

- Genes del HLA clase II: Localizados en el brazo corto del cromosoma 6 hacia la posición centromérica. Se determinarán los *loci* DRB1. Se medirán como presente ó ausente para cada DR específico. Variable independiente dicotómica.
- Esclerosis múltiple: Destrucción de la mielina en múltiples áreas subependimarias de la sustancia blanca del sistema nervioso central en un contexto patológico autoinmune en el cual participan factores ambientales y genéticos, con una evolución en el tiempo de recaídas y remisiones clínicas.
- Sexo: Masculino vs femenino
- Origen: Distrito Federal, estado de México u otro estado de la república mexicana
- Edad: 18 años ó más
- Antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes: # de miembros de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> generaciones con enfermedades autoinmunes

Procedimiento:

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), en la consulta externa de la especialidad de Neurología se les invitó a participar a todos los enfermos con EM que cumplieran con los criterios de inclusión, y de quienes se consignó el género, la edad, la

fecha de inicio de los síntomas, el lugar de origen, el lugar de residencia actual y la historia familiar de la enfermedad.

No se utilizó muestreo alguno porque no se trata de un estudio de intervención. Posteriormente, previo consentimiento informado, se les extrajo a los enfermos participantes una muestra sanguínea (5cc) la cual se depositó en un tubo con anticoagulante EDTA. La selección de los pacientes y las tomas de muestra se efectuaron por el Dr. Humberto González Mercado (médico residente de Neurología), los tubos se conservaron a 4 grados Celsius y se trasladaron al departamento de Inmunogenética del INCMNSZ para realizar la extracción de ADN a la brevedad.

Técnicas de biología molecular:

- A. Extracción de ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo
- B. Cuantificación del ADN por medio de espectrofotometría
- C. Realización de reacción en cadena de la polimerasa utilizando secuencias específicas para cada alelo clase II
- D. Hibridación y marcaje con oligonucleótidos alelo-específicos
- E. Interpretación de los datos

Estas técnicas ya están estandarizadas y validadas en el INCMNSZ.

Análisis estadístico:

Se realizó el cálculo de frecuencias génicas (fg) a partir de la frecuencia de cada gen ó alelo respecto al total de 2N (uno del padre y otro de la madre).

El análisis de asociación de la frecuencia de cada alelo del HLA se realizó mediante tablas de contingencia de 2x2 y se aplicó la prueba de Xi cuadrada; en



casos con datos en celdillas menor a 5 se utilizó prueba exacta de Fisher. La fuerza de asociación en las tablas 2x2 se determinó con Razón de Momios (RM), en la cual una cifra mayor de 1 es asociación positiva ó de susceptibilidad y menos de 1 es negativa ó de protección.

## RESULTADOS

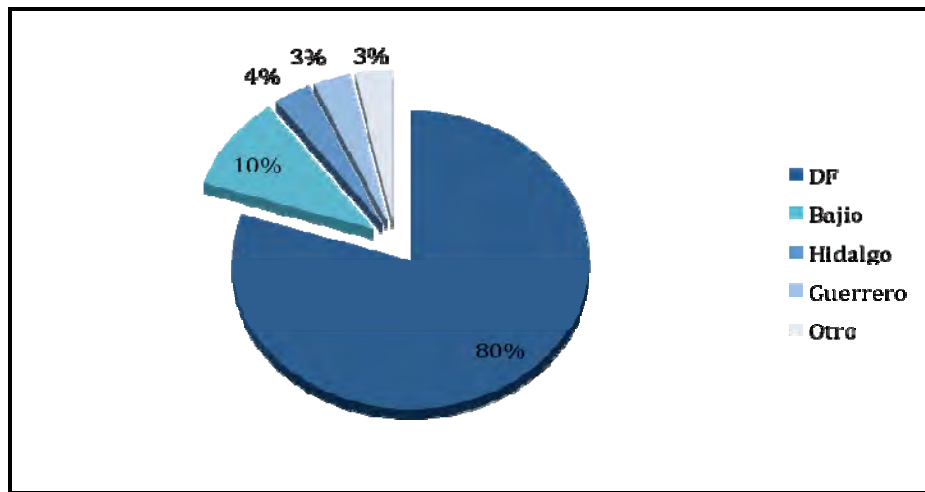
En el grupo de estudio se encontró un predominio de las mujeres sobre los hombres con una relación 2.75:1, el promedio de edad al inicio de la EM fué de 38.1 años y la mediana del tiempo de evolución de la enfermedad fué de 9.5 años con un rango entre 4.8 a 13.8 (Tabla 1), además la variedad clínica predominante en un 80% fué la de recaída-remisión (figura 6) luego entonces se aprecia que las características demográficas de los pacientes con EM no muestran diferencias a lo reportado en la literatura médico-científica con respecto al género, edad de inicio, ni tiempo de evolución de la enfermedad en tales individuos.

Tabla 1: Características clínicas de 30 pacientes con EM

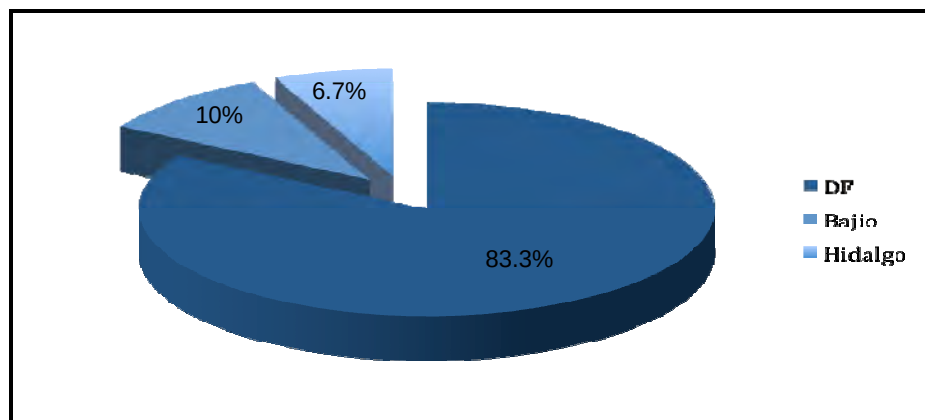
|                          | Total<br>(n) | Porcentaje | M    | DE   | Mediana | Pc25 | Pc75 |
|--------------------------|--------------|------------|------|------|---------|------|------|
| <b>Edad</b>              |              |            | 38.1 | 11.3 | 36.0    | 28.3 | 46.5 |
| <b>Sexo</b>              |              |            |      |      |         |      |      |
| <b>Hombre</b>            | 8            | 26.7%      |      |      |         |      |      |
| <b>Mujer</b>             | 22           | 73.3%      |      |      |         |      |      |
| <b>Raza Mestiza</b>      | 30           | 100.0%     |      |      |         |      |      |
| <b>Años de evolución</b> |              |            | 10.9 | 7.5  | 9.5     | 4.8  | 13.8 |
| <b>Neu.Opt.</b>          | 17           | 56.7%      |      |      |         |      |      |
| <b>Paraclínicos</b>      |              |            |      |      |         |      |      |
| <b>Bandas</b>            |              |            |      |      |         |      |      |
| <b>Oligoclonales</b>     | 15           | 50%        |      |      |         |      |      |
| <b>IRM (+)</b>           | 30           | 100%       |      |      |         |      |      |
| <b>PEV anormal</b>       | 16           | 53.30%     |      |      |         |      |      |
| <b>PESS anormal</b>      | 9            | 30.0%      |      |      |         |      |      |
| <b>PEA anormal</b>       | 4            | 13.3%      |      |      |         |      |      |

Las figuras 4 y 5 muestran los lugares de nacimiento y de residencia actual de los pacientes, destacando que tales sitios se mantienen entre los 23.4 grados de

latitud norte y los 16 grados de latitud sur en una region considerada como de baja incidencia para EM.



Figuras 4 y 5: Estados de origen y de residencia actual de los 30 enfermos con esclerosis múltiple



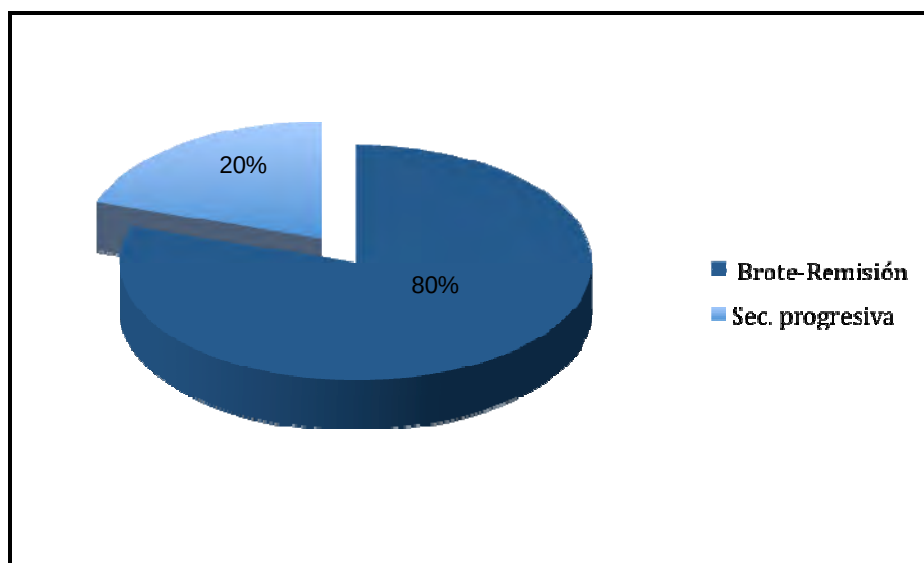


Figura 6: Variedad clínica en los 30 enfermos con esclerosis múltiple

La tabla 3, muestra las frecuencias génicas de los alelos del locus HLA-DR en los 30 pacientes con EM y su comparación con el grupo de 99 individuos sanos pareados por etnicidad y en quienes se excluyó enfermedad autoinmune en las últimas 2 generaciones.

Tabla 3. Frecuencias génicas de los alelos HLA-DR

| ALELO | EM<br>N=60 |       | Controles<br>N=198 |       | p    | RM  | IC95%    |
|-------|------------|-------|--------------------|-------|------|-----|----------|
|       | n          | fg    | n                  | fg    |      |     |          |
| DR4   | 16         | 0.266 | 47                 | 0.237 | NS   |     |          |
| DR2   | 14         | 0.233 | 13                 | 0.09  | 0.02 | 4.3 | 1.7-10.6 |
| DR8   | 7          | 0.116 | 33                 | 0.165 | NS   |     |          |
| DR7   | 5          | 0.083 | 22                 | 0.111 | NS   |     |          |
| DR14  | 5          | 0.083 | 21                 | 0.105 | NS   |     |          |
| DR11  | 5          | 0.083 | 20                 | 0.1   | NS   |     |          |
| DR3   | 4          | 0.063 | 11                 | 0.055 | NS   |     |          |
| DR1   | 3          | 0.05  | 10                 | 0.05  | NS   |     |          |
| DR9   | 1          | 0.016 | 3                  | 0.015 | NS   |     |          |

Como se observa, el alelo más frecuente es el HLA-DR4 en el grupo de pacientes con una fg de 0.266 mientras que en el grupo de controles el HLA-DR4 fué de 0.237 ésta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

El siguiente alelo en el grupo de pacientes fué el HLA-DR2 con una frecuencia de 0.233, mientras que en los controles fué de 0.090. Esta diferencia fué estadísticamente significativa con un valor de  $p$  corregida (Bonferroni) de 0.002.

La razón de momios (RM) fué de 4.3 con intervalo de confianza al 95% (IC 95%) de 1.7 a 10.6 .

El resto de los alelos tuvo una distribución semejante en el grupo de pacientes y controles.

## DISCUSION

Este trabajo mostró asociación del haplotipo HLA-DR2 con el grupo de enfermos mexicanos mestizos con EM que tienen tanto la variedad recaída-remisión así como secundariamente progresiva en la proporción descrita en la mayoría de las publicaciones especializadas, ésto corrobora que los enfermos mexicanos mestizos tienen mecanismos de la enfermedad similares a los enfermos caucásicos

Además se confirma lo reportado en la literatura con respecto a la susceptibilidad genética al desarrollo de EM con el HLA-DR2, dicho alelo es relativamente raro en las poblaciones autóctonas de México y Sudamérica por lo que en la población mestiza parece haber sido incorporado a través de la mezcla étnica con individuos de origen europeo.

Esta asociación con el HLA-DR2 y teniendo en cuenta los fenómenos de desequilibrio genético y epistasis, sugieren que los individuos con éste alelo generan una respuesta autoinmune detonada probablemente por una infección viral que afecta a individuos HLA-DR2+ como ha sido sugerido recientemente por Sotelo y cols. (24) particularmente en la variedad recaída-remisión. Este hecho es difícil de confirmar en México debido a que gran parte de la población pediátrica es vacunada en contra de la varicela, pero fácilmente explorable en aquellos países donde la vacuna es aplicada ocasionalmente.

## CONCLUSIONES

En conclusión, los mexicanos mestizos con EM tienen susceptibilidad genética asociada con el alelo HLA-DR2.

La alta prevalencia en años recientes parecer ser resultado del mestizaje con individuos de origen europeo.

El mecanismo parece ser detonado por una infección viral en individuos genéticamente susceptibles y abre la investigación a la confirmación tanto del virus como de las moléculas involucradas en la respuesta immune y deberan ser sustentadas por estudios de cohorte espidemiológico.

Finalmente, la tipificación de las moléculas del MHC de clase II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) en individuos afectados por EM y en sus familiares sanos de primer grado será particularmente útil en los proyectos de epidemiología genética.

La reciente elevación de la incidencia de EM en mestizos mexicanos parece resultar de mestizaje con poblaciones caucásicas y puede identificarse mediante la determinación de los genes HLA-D

## BIBLIOGRAFIA

1. Rodriguez-Violante M, Violante-Villanueva A, Corona T. Bases moleculares de la esclerosis múltiple. Arch Neurociencia 2001; 6: 126-134
2. Alvarado-de la Barrera et al. HLA class II genotypes in Mexican Mestizos with familial and nonfamilial multiple sclerosis. Neurology 2000, 55: 1897-900
3. Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD. Map of the human major histocompatibility complex (MHC). Immunology Today 1991; 12: 443-6
4. Heinriche H, Oss HT. HLA non-A, B, C class I genes: their structure and expression. Immunol Res 1990; 9: 265-74
5. Cloegh HL, Orr HT, Strominger JL. Major histocompatibility antigens: The human (HLA-A, B, C) and murine (H2-K, H2-D) class I molecules. Cell 1981; 42: 287-99
6. White P, New M, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. Proc Natl Acad Sci (USA) 1986; 83: 5111
7. Browning M, Krausa P. Genetic diversity of HLA-A2: evolutionary and functional significance. Immunology Today 1996; 17:1 65-70
8. Vargas-Alarcón G, Alvarez M, Martínez-Laso J, Granados J, Díaz-Campos N, Gomez-Casado E, Alcocer-Varela J, Arnaiz-Villena A. A new HLA-B35 (B\*3516) allele found in a Mexican Nahua (Aztec) descent. Immunogenetics 1996; 43:244-5



9. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA. Nomenclature for factor of HLA system. *Tissue Antigens* 1992; 39: 1-13
10. Klein J. Of HLA, types and selection: an assay on evolution of MHC and parasites. *Human Immunol* 1991; 30: 247-58
11. The genetics of multiple sclerosis in Mc Alpine Multiple Sclerosis
12. Kantarci OH. Genetics and Natural History of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 2008; 28:7-16
13. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *N Engl J Med* 2007; 357: 1-12
14. Gregersen JW et al. Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 2006; 443: 574-577
15. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nature Reviews Genetics* 2008; 9: 516-526
16. Gorodezky C et al. Immunogenetic profile of multiple sclerosis in Mexicans. *Hum Immunol* 1986, 16:364-74
17. Gorodezky C et al. The Genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol* 2001; 62: 979-991
18. Cordova J, Vargas S, Sotelo J. Western and Asian features of multiple sclerosis in Mexican Mestizos. *Clin Neurol Neurosurg* 2007; 109: 146-151

19. Velázquez M, López-Prieto, Márquez JC, Rivera-Castaño M, Vargas-Myrna L. Características epidemiológicas de la esclerosis múltiple en un estado fronterizo con los Estados Unidos de Norteamérica. Arch Neurociencia 2002; 7: 147-150
20. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria." Ann Neurol 2005; 58: 840-846
21. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. Comparison of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. Brain 1997; 120: 2059-2069
22. Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. Am J Neuroradiol 2000; 21: 702-706
23. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. Lancet 2002; 359: 1221-31.
24. Sotelo J, Martínez-Palomo A, Ordoñez G, Pineda B. Varicella-Zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis. Ann Neurol 2008; 63: 303-311

## ANEXOS

### Revisión a los Criterios de McDonald para Esclerosis Múltiple 2005

| Presentación clínica                                                                                                      | Datos adicionales necesarios para el Diagnóstico de Esclerosis Múltiple                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 ó más ataques; <sup>a</sup> evidencia clínica objetiva de 2 ó más lesiones                                              | Ninguno <sup>b</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 2 ó más ataques; <sup>a</sup> evidencia clínica de una lesión                                                             | Diseminación en espacio, demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• IRM<sup>c</sup> ó</li> <li>• 2 ó más lesiones compatibles con EM más LCR<sup>d</sup> positivo ó</li> <li>• Esperar un futuro ataque clínico<sup>a</sup> que involucre un sitio diferente</li> </ul>                                                                           |
| Un ataque, <sup>a</sup> evidencia clínica objetiva de 2 ó más lesiones                                                    | Diseminación en tiempo, demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• IRM<sup>e</sup> ó</li> <li>• Segundo ataque clínico<sup>a</sup></li> </ul>                                                                                                                                                                                                     |
| Un ataque, <sup>a</sup> evidencia clínica objetiva de una lesión (presentación monosintomática; síndrome clínico aislado) | Diseminación en espacio, demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• IRM<sup>c</sup> ó</li> <li>• 2 ó más lesiones en IRM compatibles con EM más LCR positivo<sup>d</sup> y</li> </ul> Diseminación en tiempo, demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• IRM<sup>e</sup> ó</li> <li>• Segundo ataque clínico<sup>a</sup></li> </ul> |

*Si se completan los criterios indicados y no hay una mejor explicación para la presentación clínica, el diagnóstico es EM, si hay sospecha, pero los criterios no se completan, el diagnóstico es "posible EM"; si aparece otro diagnóstico que explique mejor y de forma completa la presentación clínica durante la evaluación, entonces el diagnóstico "No es EM"*

<sup>a</sup>Un ataque se define como un episodio de déficit neurológico para el cual las lesiones causales son probablemente de naturaleza inflamatoria y desmielinizante. Debiera haber un reporte subjetivo (respaldado por hallazgos objetivos) ó una observación objetiva de que el evento duró al menos 24 horas.

<sup>b</sup>No se requieren pruebas adicionales; sin embargo, si se realizan (IRM, LCR) y son negativas, se debe ser extremadamente cuidadoso en realizar el diagnóstico de EM. Se deben considerar diagnósticos diferenciales. No debe haber una mejor explicación para el cuadro clínico y alguna evidencia objetiva para fundamentar el diagnóstico de EM.

<sup>c</sup>La demostración de diseminación en espacio por IRM debe cumplir los criterios de Barkhof y cols. (1997) y de Tintoré y cols. (2000)

<sup>d</sup>La determinación de LCR positivo es mediante la detección de bandas oligoclonales diferentes de cualquier banda en suero, ó por aumento del índice de inmunoglobulina G.

<sup>e</sup>La demostración por IRM de la diseminación en tiempo debe cumplir los criterios.

## Criterios de resonancia magnética en Esclerosis Múltiple

### - Diseminación en espacio

3 de los siguientes:

1. al menos una lesión que realce con gadolinio ó 9 lesiones hiperintensas en T2 si no hay lesiones que realcen con gadolinio
2. al menos una lesión infratentorial
3. al menos una lesión yuxtacortical
4. al menos 3 lesiones periventriculares

NOTA: una lesión medular se puede considerar equivalente a una lesión cerebral infratentorial: una lesión medular que realce se considera equivalente a una lesión cerebral con realce, y lesiones medulares individuales junto con lesiones cerebrales individuales pueden contribuir a cumplir el número de lesiones requeridas en T2.

### - Diseminación en tiempo

1. Detección de realce con gadolinio al menos 3 meses después del comienzo del evento clínico inicial, si no en el sitio correspondiente al evento inicial
2. Detección de una nueva lesión en T2 si aparece en cualquier tiempo comparada con una imagen de referencia hecha al menos 30 días después del comienzo del evento clínico inicial

## EQUIPO, MATERIAL Y TECNICAS

- EQUIPO:
  - o Campana de extracción
  - o Termociclador
  - o Lámpara de rayos ultravioleta
  - o Incubadora para hibridación, baño de agua.
  - o Fuente de vacío
  - o Cámara fotográfica
- MATERIAL:
  - o Tubos estériles Falcon de 50cc
  - o Pipetas Pasteur
  - o Micropipetas de 5, 20 y 100 $\mu$ l
  - o Tubos Ependorf de 2.5cc
  - o Bolsas de hibridación
  - o Película de rayos X
  - o Películas fotográficas
- REACTIVOS:
  - o Amortiguador salino de fosfatos
  - o Solución de lisis AKC ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  10mM + Tris-base 10mM + EDTA 25mM)
  - o Amortiguador Tris-EDTA
  - o Amortiguador de Tris-Base 0.5 M, pH= 8.0
  - o Solución de duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%
  - o Proteinasa K (10mg/ml)
  - o Fenol
  - o Cloroformo

- o Alcohol etílico absoluto
- o Iniciadores derecho e izquierdo
- o Cloruro de Magnesio
- o Deoxinucleótidos (ATP, CTP, GTP, TTP)
- o Taq polimerasa
- o Agarosa al 1%
- o Bromuro de etidio (10mg/ml)
- o Solución de naranja G (10 ml de Ficoll al 20%, 2 grs de Tris-base y suficiente naranja G para dar color)
- o Hidróxido de sodio NaOH 0.5 M
- o Cloruro de sodio Na Cl 1.5 M
- o Tris-base 0.5 M pH=7.4
- o Terminal transferasa
- o Cloruro de cobalto CoCl 25 mM
- o Oligonucleótidos (sondas) en concentración de 10 pmoles/ $\mu$ l
- o Digoxigenina (ddTUP-Dig) en concentración de 1 nmol/ $\mu$ l
- o EDTA 0.2 M pH=8.0
- o Glucógeno
- o Cloruro de Litio LiCl 4M
- o Etanol al 70%
- o Membranas de nylon
- o Solución de hibridación. SSPE 6X, solución Denhardt 5X, Lauril-sarconine de sodio 0.1%, SDS 0.02%
- o SSPE 30X: NaCl 4.5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.3 M, EDTA 30mM

- o Solución Denhardt: PVP y Ficoll 400 al 2%, 2gr de albúmina sérica bovina
- o Solución de cloruro de tetrametilamonio 5M (TMAC)
- o Solución de revelado 1: ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M
- o Solución de revelado 2: amortiguador 1 +0.3% de Tween 20
- o Solución de revelado 3: solución de bloqueo diluída 1:10 en amortiguador 1
- o Solución de revelado 4: Tris-base 0.1 M pH=9.5, NaCl 0.1 M y Mg Cl<sub>2</sub> 50mM
- o Solución de bloqueo: reactivo de bloqueo al 10% en amortiguador 1
- o Anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina
- o Amortiguador de revelado 4: Tris 0.1 M pH=9.5, NaCl 0.1M y Mg Cl<sub>2</sub> 50mM
- o Dioxetano
- TECNICAS
  - o Extracción de ADN
    1. Colocar 3-4cc de sangre (EDTA) en un tubo Falcon de 50cc
    2. Agregar 30cc de PBS y centrifugar a 2,000 rpm durante 10 minutos
    3. Desechar el sobrenadante y al paquete agregarle 50cc de solución de lisis (AKC), incubar por 30 minutos e inmediatamente centrifugar a 1,500 rpm durante 10 minutos
    4. Desechar el sobrenadante y agregar PBS, agitar y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos

5. Desechar el sobrenadante y agregar AKC, agitar y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos
6. Desechar el sobrenadante y agregar PBS, agitar y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos
7. Desechar el sobrenadante y agregar 3cc de amortiguador RCB, 30 $\mu$ l de SDS al 10% y 100 $\mu$ l de proteinasa K (10mg/ml). Incubar la mezcla durante la noche en baño María a 65-70°C
8. Al siguiente día, saturar el fenol utilizando Tris-base 0.5 M pH=8.0 volúmen a volúmen
9. Sacar los tubos del baño y agregar a cada uno 3cc de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos
10. Obtener la fase acuosa y a ésta, agregarle nuevamente 3cc de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos
11. Separar la fase acuosa y agregarle 2cc de amortiguador de Tris-EDTA y 5cc de cloroformo, agitar y centrifugar como en el paso anterior
12. Obtener la fase acuosa y agregarle otros 5cc de cloroformo, agitar y centrifugar. Este paso se repite hasta que la fase acuosa quede cristalina
13. Separar la fase acuosa y agregar NaCl 5 M (la décima parte del volúmen final, de manera que el NaCl quede a 0.5 M en la solución)
14. La mezcla anterior se agita y se agrega etanol absoluto en proporción 1:4 V/V



15. El ADN precipitado se separa en un tubo ependorf de 2.5cc  
éste ADN se déja secar ya sea con N<sub>2</sub> ó a temperatura ambiente
  16. Una vez seco, el ADN se hidrata ya sea con tris-EDTA ó con agua destilada y se guarda a -20°C hasta su uso
- Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
    1. Se prepara una mezcla que contiene todo lo necesario para realizar la amplificación con los siguiente:
      - a. Agua 1762.5 µl
      - b. Amortiguador de PCR 10X 250µl
      - c. Deoxinucleótido 2mM 250µl
      - d. Iniciador derecho 50µl
      - e. Iniciador izquierdo 50µl
      - f. Agitarla bien y ponerla en hielo
      - g. Taq polimerasa 12.5µl
    2. Antes de añadir la enzima a la mezcla, colocar 2µl (0.5µg) de los ADN en los tubos de PCR.por ultimo añadir 47.5µl de la mezcla anterior a cada tubo (mezclando ADN y solución) y agregar 2 gotas de aceite mineral.
    3. Posteriormente los tubos son colocados en el termociclador, el cual se programa con las siguientes condiciones que son estandarizadas en el laboratorio:
      - a. Desnaturalización 1 minuto a 94°C
      - b. Anillamiento 1 minuto a 60 °C
      - c. Extensión 1 minuto y 30 segundos a 72 °C

- d. Extensión final 7 minutos a 72 °C
  - e. El proceso se realiza durante 30 ciclos
4. Una vez finalizado el proceso de amplificación, éste es corroborado por medio de un gel de agarosa al 1%. Se mezclan 5µl de cada muestra con 7µl de colorante naranja G. Esta mezcla se corre en el minigel de agarosa a 50 volts durante 30 minutos. Las bandas son observadas en un transiluminador UV y se compara su corrimiento con un marcador de peso molecular conocido. Finalmente las muestras amplificadas son guardadas para realizar la hibridación. Los iniciadores que serán utilizados son aquellos para la region generica DRB1 sugeridos en el XI taller internacional de histocompatibilidad.
- Marcaje de las sondas
    - o Cada sonda en cantidad de 95 picomoles es mezclada con 4µl de amortiguador para la terminal transferasa, 4µl de solución de CoCl 25 mM, 1µl de ddUTP-Dig (1nmol/µl) y 1.5 unidades de terminal transferasa. La mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos y después se coloca en hielo. Por otra parte, se mezcla 1µl de glucógeno con 200µl de EDTA 0.2M pH=8.0 y a ésta solución se añaden 2µl a la mezcla inicial. El oligonucleótido marcado se precipita con 2.5µl de LiCl 4M y 85µl de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C, se mezcla bien y se mantiene a -70 °C durante 15 minutos y después a 20 °C durante 2 horas ó toda la noche. Centrifugar a 12,000 rpm

durante 20 minutos a 4°C, eliminar y lavar el paquete con 60µl de etanol. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, eliminar el sobrenadante y secar el tubo al vacío.

- Hibridación

- o Tratamiento de la membrana: la membrana de nylon es cortada en cuadros de 10 cm<sup>2</sup>. La membrana se humedece en agua destilada, posteriormente se coloca en una solución de SSPE 10X durante 15 minutos. Se seca en el horno a 60°C, en cada cuadro de 1 cm<sup>2</sup> se colocan 2µl del ADN amplificado. La membrana se seca a temperatura ambiente y luego a 80 °C (puede fijarse el ADN utilizando un transiluminador de luz ultravioleta). Una vez colocado el ADN en la membrana se procede a desnaturalizarlo, colocando la membrana en una solución de NaOH 0.5M/NaCl 1.5M durante 5 minutos. Después de la desnaturalización, la membrana es neutralizada colocándola en una solución de NaCl 1.5M/tris-base 0.5M pH=7.4 durante un minuto. Finalmente la membrana se hornea a 80 °C durante 10 minutos y se pone en un transiluminador de luz ultravioleta durante 3 minutos.
- o Hibridación: las membranas que contienen el ADN amplificado son pre-hibridadas en la solución correspondiente (0.1-0.2ml/cm<sup>2</sup>) durante al menos 42°C en baño María y utilizando bolsas de plástico. Posteriormente las membranas son hibridadas en la solución para éste efecto, la cual contiene el oligonucleótido marcado con digoxigenina (2 a 4 picomoles de

sonda por cada ml de solución de hibridación). Esta solución también se agrega de 0.1 a 0.2ml por cada  $\text{cm}^2$  de membrana; éste proceso se realiza a  $42^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Las membranas son posteriormente lavadas en 2 ocasiones (5 minutos cada una) con una solución de SSPE 2X y SDS 0.1% a temperatura ambiente con agitación utilizando para esto recipientes de plástico de tamaño apropiado a la membrana. Por lo general se utilizan de 50 a 100cc de solución de lavado por cada  $100 \text{ cm}^2$  de membrana. Posteriormente la membrana se lava con una solución TMAC 3M durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lava 2 veces con esta misma solución durante 15 minutos a  $59^\circ\text{C}$ .

## **GLOSARIO**

**ALELOS:** diferentes formas ó versiones de un gen que se localizan en los locus.

**CROMOSOMA:** Estructura que contiene una gran molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) organizada en genes sostenidos en proteínas denominadas cromatina.

**DESEQUILIBRIO GENETICO (linkage disequilibrium):** Asociación no-aleatoria entre los alelos de diferentes locus que tienden a heredarse juntos. Esto se debe a la cercanía física y/ó a la selección de una combinación particular de rasgos.

**EPISTASIS:** Expresión alterada de un gen debido a los efectos de otro gen localizado en un locus diferente. Así es como los diferentes genes interactúan en el desarrollo del comportamiento, la fisiología y la morfología.

**HAPLOTIPO:** La combinación de los alelos del complejo principal de histocompatibilidad dentro de uno de los cromosomas de un par homólogo.

**HLA:** Antígeno leucocitario humano, nombre que se le dá al complejo principal de histocompatibilidad.

**LOCUS:** Localización específica de un gen dentro del cromosoma.

**POLIMORFISMO:** Se refiere al alto grado de variación alélica dentro de un locus lo cual culmina en una extensa variabilidad entre diferentes individuos que expresan diferentes alelos.