

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE" I.S.S.S.T.E.

No. DE REGISTRO 400-2009

"IDENTIFICACION DE SUBPOBLACIONES  
LINFOCITARIAS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS  
MULTIPLE"

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**ESPECIALISTA EN ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

PRESENTA

**DRA. ONDINA MARLENE GARIBAY VARGAS**

ASESORES DE TESIS:

DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN

DRA. MARÍA EUGENIA VARGAS CAMAÑO

PROFESOR TITULAR:

DR. RICARDO LEOPOLDO GUIDO BAYARDO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios por darme la vida y por ponerme en este camino.

A mis padres por apoyarme incondicionalmente y enseñarme a luchar, por todo el amor que siempre me han brindado.

A Christian por ser mi cómplice, mi apoyo y mi amigo incondicional; esposo eres la fuerza que me mantiene, te amo inmensamente, gracias.

A Annie Marlene, aunque aún no estás a mi lado, eres mi inspiración y mi razón de ser.

A Kelly, César y Susette por su cariño y por siempre estar a mi lado.

A la Dra. Carmen Chima por su tiempo, entrega y paciencia para la realización de este proyecto.

Al Dr. Guido, Dra. Vargas, Dra. Castrejón, Dra. Martínez y Dr. Escárcega por el apoyo que nos han brindado para nuestra formación.

Al QFB Guillermo García por el apoyo y el tiempo brindados para la realización de este proyecto.

A Diego, Gaby, Enrique, Erika y Guillermo por ser grandes compañeros y amigos siempre estarán en mi mente.

## ÍNDICE

1. Resumen.....	5
2. Antecedentes.....	6
3. Planteamiento del problema.....	13
4. Justificación.....	13
5. Hipótesis.....	13
6. Objetivos.....	14
6.1 Objetivo general.....	14
6.2 Objetivos secundarios.....	14
7. Material y métodos.....	15
7.1 Diseño del estudio.....	15
7.2 Ubicación espacio-temporal.....	15
7.3 Procedimiento.....	15
7.4 Muestreo.....	16
7.4.1 Sujetos de estudio.....	16
7.4.2 Criterios de selección de la muestra.....	16
7.4.2.1 Criterios de inclusión.....	16
7.4.2.2 Criterios de exclusión.....	16
7.4.2.3 Criterios de eliminación.....	17
7.5 Tamaño de la muestra.....	17
7.6 Definición de las variables y escalas de medición.....	17
7.7 Análisis estadístico.....	19
7.8 Consideraciones éticas.....	19
7.9 Cronograma de actividades.....	20
7.10 Logística.....	21

7.10.1 Recursos humanos.....	21
7.10.2 Recursos materiales.....	21
7.10.3 Recursos financieros.....	21
8. Resultados.....	22
9. Discusión .....	26
10. Conclusiones.....	28
11. Anexos.....	29
11.1 Carta de consentimiento informado para pacientes con Esclerosis Múltiple.....	29
11.2 Carta de consentimiento informado para controles sanos.....	31
11.3 Cuadros y gráficas.....	33
12. Bibliografía.....	36

## 1. RESUMEN

**Antecedentes Científicos:** Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central, caracterizada por una respuesta inflamatoria en la sustancia blanca, en donde células T activadas entran al sistema nervioso central y desencadenan una importante respuesta autoinmune. No existen estudios donde se evalúen alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con enfermedades autoinmunes.

**Objetivo:** Identificar si hay alteraciones en los valores de la subpoblación de linfocitos que se encuentren asociadas en los pacientes mexicanos con EM.

**Material y Métodos:** Se tomaron muestras sanguíneas a pacientes con diagnóstico de EM y a controles sanos de nacionalidad mexicana que acudieron al Banco de Sangre del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE y se realizó la determinación de linfocitos CD3, CD4, CD8 y la relación CD4/CD8.

**Resultados:** Se incluyeron 76 sujetos, 38 en el grupo de EM y 38 en el grupo de controles sanos, en donde 15 (39.47%) fueron hombres y 23 (60.5%) mujeres para ambos grupos, obteniéndose los siguientes valores: CD3 1205, CD4 749, CD8 420 y relación CD4/CD8 2.32, así como, CD3 1572, CD4 959, CD8 616 y relación CD4/CD8 1.71 para el grupo de EM y controles sanos respectivamente. Se compararon ambos grupos mediante prueba de T obteniéndose un valor de  $p$  de 0.002 para CD3, 0.009 para CD4, 0.001 para CD8 y 0.032 para la relación 4/8, a favor del grupo de EM. En las diferencias por género se encontró que para las mujeres los resultados fueron estadísticamente significativos para CD3 ( $p$  de 0.02) y para CD8 ( $p$  de 0.02).

**Conclusiones:** Existe diferencia en la Subpoblación de Linfocitos en pacientes con EM comparada con controles sanos; así como una disminución en las cifras de linfocitos CD3 y linfocitos CD8 en pacientes con EM. Además existe un aumento en el cociente CD4/CD8 de los pacientes con EM, con mayor afectación en las cifras de CD3 y CD8 en el género femenino.

## 2. ANTECEDENTES CIENTIFICOS

Esclerosis Múltiple (EM) es la enfermedad neurológica que más frecuentemente causa invalidez en adultos jóvenes en los países con una población predominantemente caucásica. Con respecto a la latitud, el mayor riesgo de padecer la enfermedad se presenta entre personas que nacen y viven hasta la adolescencia entre 37° N a 52° N. El riesgo incrementa a mayor latitud norte; por ejemplo, en Columbia Británica, Canadá, la incidencia entre población de origen caucásico es de 64.7 por 100 000 habitantes y en Alberta, Canadá de 216.7 por 100 000 una de las más altas del mundo. El riesgo de la enfermedad en un familiar de primer grado es de 10 a 15 veces mayor que el riesgo de la población general y el índice de concordancia en gemelos idénticos es de 30%, lo que indica un fuerte componente genético. Sin embargo, se describió una epidemia localizada de esclerosis múltiple en las islas Faroe, donde el agrupamiento de casos sugiere una causa transmisible<sup>1</sup>. En Estados Unidos de Norteamérica, cada año 10 000 personas desarrollan esclerosis múltiple y existe una prevalencia de ataques del padecimiento en 250 000 personas.

En las áreas de menor riesgo como África y Japón el índice es menor de 5 por 100 000. Los individuos que emigran después de los 15 años, de un área de gran riesgo a una de menor o viceversa, llevan con ellos el riesgo nativo de adquirir la enfermedad.

En México no se conoce con exactitud la prevalencia ni la frecuencia de EM, sin embargo se presupone de baja incidencia, Se calcula una prevalencia de alrededor de 13 por 100 000 habitantes (Velázquez, comunicación personal). Tampoco se conocen las zonas de mayor riesgo para presentar la enfermedad, ni los costos sociales y económicos derivados de la invalidez que produce y ni la calidad de vida de los pacientes tratados en las diversas instituciones del Sector Salud.

EM es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central, caracterizada por una respuesta inflamatoria en la sustancia blanca, en donde

células T activadas entran al sistema nervioso central, y desencadenan una importante respuesta autoinmune<sup>2,3</sup>. Su etiología es multifactorial<sup>4</sup>, y se han invocado como factores causales-precipitantes a varios agentes infecciosos, principalmente a aquellos relacionados con infecciones virales: exantemáticas y respiratorias<sup>5</sup>, También se ha sugerido una infección de bajo grado por algunos miembros de la familia de los herpes virus asociada a la lesión en el cerebro con EM<sup>6</sup>.

Otros factores ambientales se han asociado a la enfermedad como: la latitud, la luz solar, los metales pesados (como el mercurio) y la dieta con alimentos que contienen gran cantidad de grasas saturadas de origen animal; la carne ahumada y la leche no pasteurizada se han relacionado como un factor adicional en la gravedad del proceso de desmielinización en países industrializados<sup>7</sup>, aún cuando un factor protector puede ser la alimentación con leche materna por períodos prolongados<sup>8</sup>. La modificación de la respuesta inmune por una amigdalectomía a edad temprana (menor de 5 años), constituye un factor de riesgo en EM.

Diversos estudios han demostrado una definitiva y significativa asociación a la respuesta inmune asociada a antígenos de histocompatibilidad de clase II, como son HLA-DR y HLA-DQw1<sup>9-12</sup>.

El 65% de las lesiones existentes en EM está constituido por placas de desmielinización, causadas por inflamación autoinmune, es decir, células T activadas que ingresan al sistema nervioso central y lesionan la sustancia blanca. El proceso de penetración de la barrera hematoencefálica por linfocitos activados tiene varias fases: hay células capilares endoteliales en el SNC que no son fenestradas y están conectadas a través de uniones gruesas. Estas células están inducidas a expresar VCAM y MHC II por IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que son liberados en la respuesta inflamatoria, y las moléculas de adhesión tales como la  $\alpha$ -4 integrina (VLA-4) que une a VCAM y miembros de superfamilias de inmunoglobulinas como CD4 que une MHC, facilitan el tránsito de los linfocitos a través de la barrera. Una vez activada cualquier célula T puede expresar VLA-4 y unirse a moléculas de adhesión. Las dos moléculas de adhesión



críticas involucradas en la entrada de células T activadas al SNC en EM son  $\alpha$ 4-integrina y su receptor VCAM<sup>13</sup>.

La liberación de citocinas por los linfocitos T CD4+ cerca de la vaina de mielina puede mediar el daño directamente y aumentar el ataque citolítico de los macrófagos y otras células inflamatorias<sup>14</sup>. En el infiltrado de una placa de EM pueden observarse estos linfocitos, macrófagos y las numerosas citocinas que estas células secretan, en las lesiones analizadas con inmunohistoquímica y se mostró que existe IFN- $\gamma$  en los márgenes de placas activas de EM pero no en la sustancia blanca indemne. El IFN- $\gamma$  es inductor de muerte celular programada (apoptosis) en los oligodendrocitos, y puede ser la causa del daño observado en un 35% de las lesiones patológicas de EM<sup>15</sup>.

La respuesta autoinmune está dirigida contra antígenos de mielina: proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP) y proteína mielínica de oligodendrocitos (MOG). Estas lesiones tienen una localización perivascular predominante. La inducción de autoinmunidad a través de MBP y virus depende de la homología de secuencias de péptidos cortos (<10 aminoácidos) en ciertos antígenos virales y regiones encefalitogénicas de MBP. HLA DR une con gran afinidad a secuencias 12-32, 84-103, 144-163<sup>16</sup>.

TNF- $\alpha$  es otra de las citocinas involucradas en la desmielinización: favorece la expresión de moléculas de adhesión, puede inhibir respuestas de células TH1 y TH2<sup>17</sup> y puede inhibir IL-12.

La citocina osteopontina, juega un papel fundamental en la EM, ya que puede aumentar las respuestas TH1, como mediador crítico de la progresión de la enfermedad desmielizante<sup>18</sup>.

Como lesiones residuales quedan parches de desmielinización en el sistema nervioso central y cada exacerbación se asocia con nuevas áreas de desmielinización, aunque no necesariamente se presentan síntomas. La recuperación completa después de una recaída frecuentemente ocurre aunque

muchos pacientes quedan con alguna secuela y si se acumulan las secuelas, se produce una incapacidad cada vez mayor<sup>19</sup>.

Hay evidencia de que la actividad autoinmune persiste en bajo grado durante las fases de remisión clínica, con la presencia continua de blastos en líquido cefalorraquídeo<sup>20</sup>.

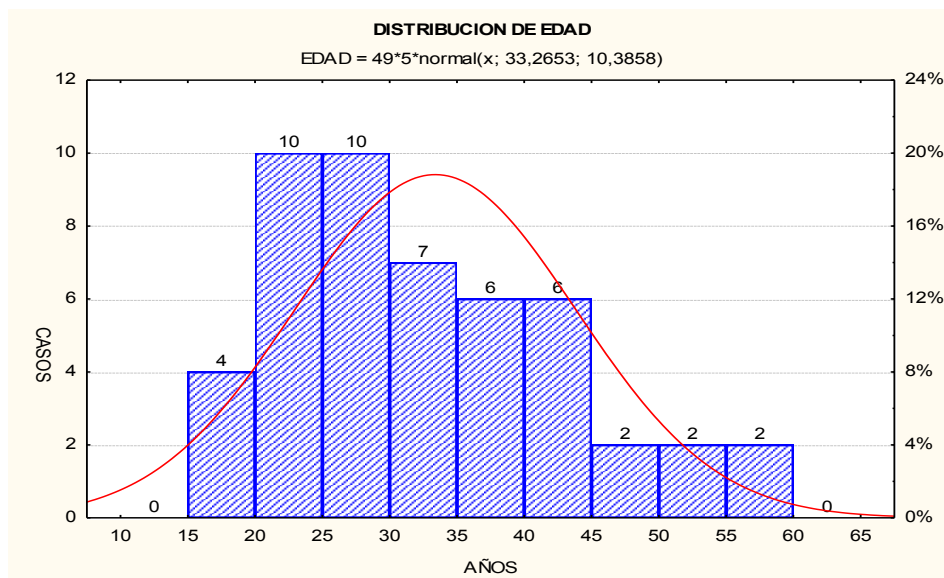
La cronicidad puede inducir a las células T CD8+ para inhibir la producción de IgG por medio de las células B, una disminución en las células CD4+CD45RA parece correlacionarse con daño en la supresión funcional en la esclerosis múltiple y en otras enfermedades autoinmunes<sup>46</sup>.

Las células CD4+CD45RA+ han sido designadas como inductoras de supresión. Las cifras relativas y absolutas de las células CD4+CD45RA+ están marcadamente disminuidas en los pacientes con esclerosis múltiple; la fluctuación de las células CD4+CD45R- y CD4+CD45R+ en sangre periférica puede hablar de exacerbaciones<sup>46</sup>.

Algunos investigadores sugieren que las cifras relativas de las células CD8+ está disminuida en sangre periférica al inicio de la recaída; muchos factores indican que la relación CD4+/CD8+ incrementa en líquido cefalorraquídeo durante una exacerbación<sup>46</sup>. Por otra parte se ha encontrado en diversos estudios realizados en sangre periférica de paciente con EM que existe un incremento en el cociente CD4/CD8, debido básicamente a una disminución en las células T CD8; se ha encontrado además una disminución significativa de los niveles del precursor supresor (CD28-) CD8+, pero presentan niveles normales de células T citotóxicas (CD28+) CD8+; por otro lado se ha encontrado un incremento significativo en el precursor de memoria (CD45RO+) de las células T CD4+<sup>47</sup>. Se encuentran disminuidos los linfocitos T CD8+, con un cociente CD4/CD8 elevado, habitualmente mayor de 2.5.<sup>20</sup> No está aún claro si esta alteración es resultado de la enfermedad o si se trata de inmunodeficiencia que predispone a esta enfermedad.<sup>26,27</sup>

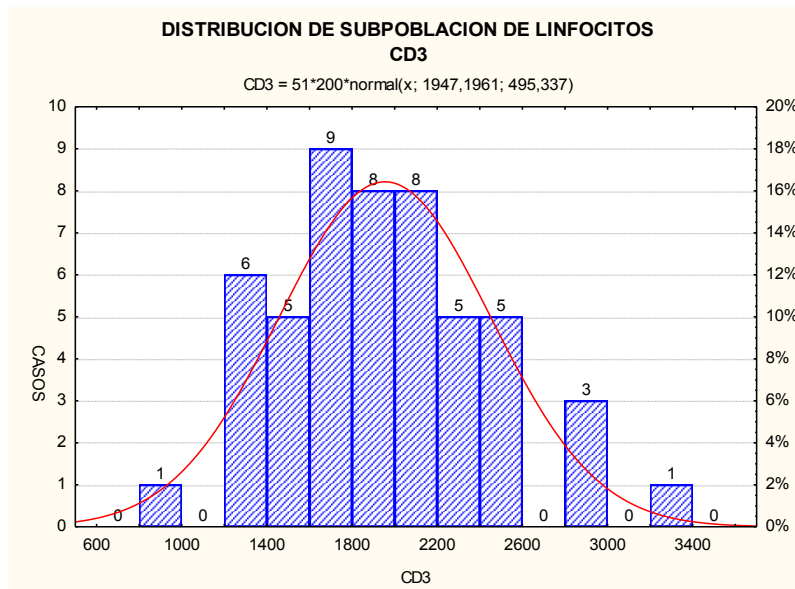
Los valores de linfocitos CD3, linfocitos CD4, linfocitos CD8 y la relación CD4/CD8 fueron tomados en base a la Tesis realizada en el CMN “20 de Noviembre” bajo el título “Determinación de niveles de subpoblación de linfocitos en donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre ISSSTE, los cuales se encuentran validados en esta institución y que se reportan en las gráficas 1, 2, 3 y 4 <sup>48</sup>.

**Gráfica 1.** Distribución por edad de la muestra de donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE

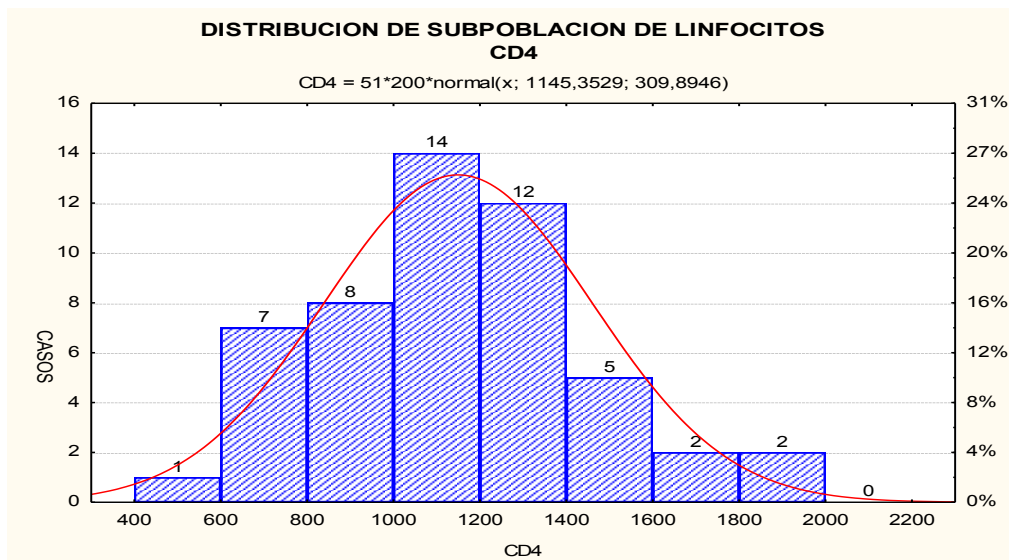


**Gráfica 2.** Valores de subpoblación CD3 en 51 donadores adultos

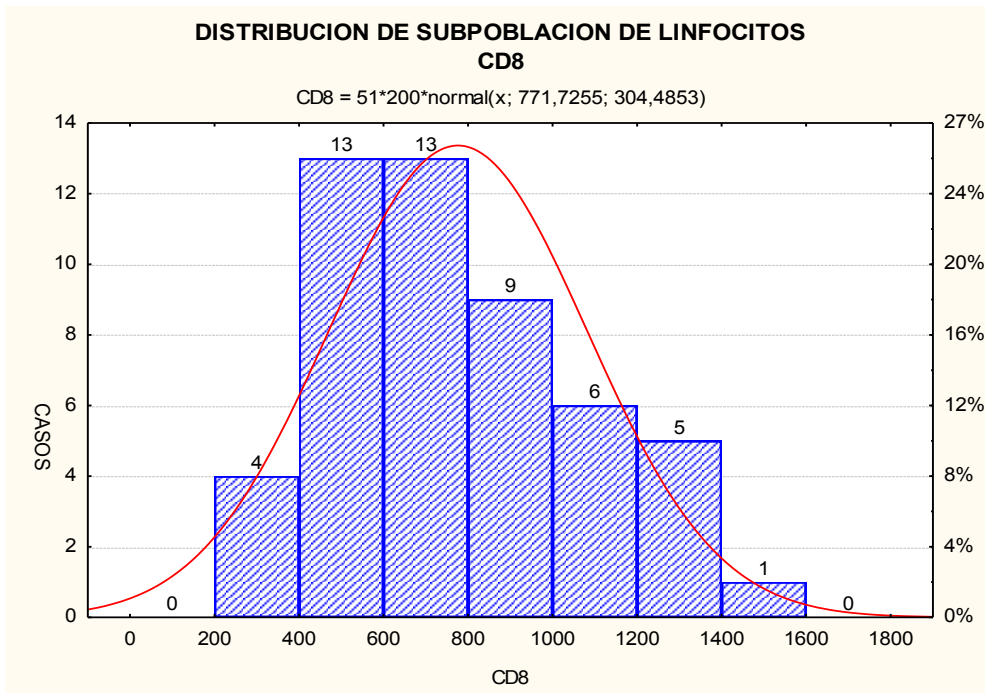
Sanos del CMN 20 de Noviembre



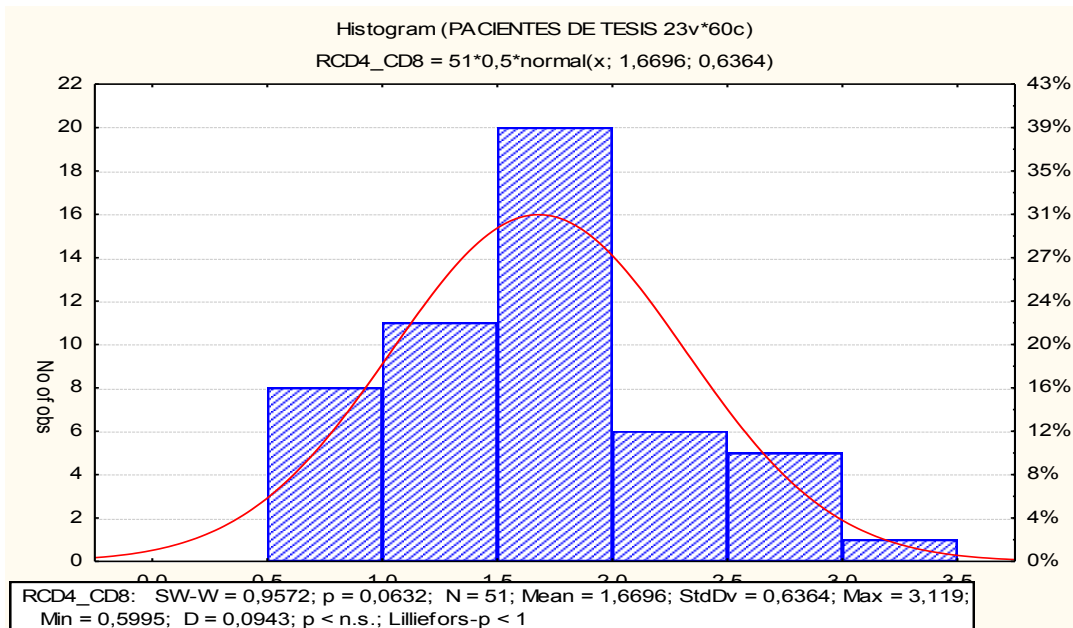
**Gráfica 3.** Valores de subpoblación CD4 en 51 donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre



**Gráfica 4.** Valores de subpoblación CD8 en 51 donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre



**Gráfica 5.** Relación de CD4/CD8 en donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre



### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Existen alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias asociadas a esclerosis múltiple en pacientes mexicanos?

## **4. JUSTIFICACIÓN**

La Esclerosis Múltiple (EM) es la alteración neurológica desmielinizante del sistema nervioso central que causa invalidez en los adultos jóvenes, en México sólo se conoce con cierta aproximación su prevalencia e incidencia, pero es evidente el daño a la salud y socio-económico que causa.

Es de fundamental importancia conocer las alteraciones en la subpoblación de linfocitos que se presentan ó se encuentran asociadas en los pacientes mexicanos con EM, entre ellas los niveles de CD3, CD4 y CD8, así como la relación 4/8. No hay publicaciones que refieran los cambios en las subpoblaciones linfocitarias que se producen con los tratamientos administrados en EM. La identificación de las alteraciones de estos valores nos permitirá un tratamiento adecuado, oportuno y racional para un mejor control de la enfermedad, así como, la estructuración y aplicación de nuevos tratamientos sobre blancos terapéuticos

## **5. HIPOTESIS**

### **1. Hipótesis General**

Las subpoblaciones de linfocitos T CD3, CD4, CD8 y la relación CD4/CD8 se encuentran alteradas en pacientes mexicanos que padecen Esclerosis Múltiple

### **2. Hipótesis alterna**

**HO:** No hay alteraciones en los valores de subpoblación de linfocitos asociadas a pacientes mexicanos con Esclerosis Múltiple

**H1:** Si hay alteraciones en los valores de subpoblación de linfocitos asociadas a pacientes mexicanos con Esclerosis Múltiple

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar si hay alteraciones en los valores de la subpoblación de linfocitos que se encuentren asociadas en los pacientes mexicanos con Esclerosis Múltiple (EM).

### **6.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. Determinar las subpoblaciones linfocitarias, CD4, CD8 y la relación CD4/CD8 en pacientes con esclerosis múltiple.
2. Correlacionar las subpoblaciones linfocitarias de pacientes con esclerosis múltiple con individuos control sanos.



## **7. MATERIAL Y METODOS**

### **7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

- Observacional
- Transversal
- Descriptivo
- Prospectivo
- Abierto

### **7.2 UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL**

El estudio se realizó en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del I.S.S.S.T.E., en el periodo comprendido entre marzo y junio del 2009. Las muestras se obtuvieron de los pacientes con diagnóstico de Esclerosis Múltiple y de las personas que acudieron como donadoras del Banco de Sangre y que aceptaron participar en el estudio; y el procesamiento de muestras se realizó en el Laboratorio de Histocompatibilidad de este hospital.

### **7.3 PROCEDIMIENTO**

Previo consentimiento informado (Anexo 1) y llenado de la cédula de recolección de datos (Anexo 2), a los pacientes con Esclerosis Múltiple y a los controles sanos, se les tomaron 4 ml de sangre periférica, para la determinación de la subpoblación de linfocitos por citometría de flujo, de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se colocaron 50 uL de sangre completa con 20 uL de anticuerpos monoclonales de la marca Beckton Dickinson en formato multitest que

incluyeron antiCD3, antiCD4, antiCD8 y antiCD45 usando tubos TrueCuont. Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó lisante de rojos de la misma marca y se incubó por 15 minutos. Se realizó lectura en el equipo FACSCalibur de 4 colores en el programa worklistManager. En cada corrida se montó una calibración de 4 colores de acuerdo a la técnica del equipo.

## 7.4 MUESTREO

### 7.4.1 SUJETOS DE ESTUDIO

Grupo de estudio: Pacientes con esclerosis múltiple, variedad de recaídas y remisiones, de 18 a 65 años de edad, atendidos por los servicios de Neurología e Inmunología del CMN “20 de Noviembre” ISSSTE.

Grupo control: Individuos sanos pareados por edad y sexo que acuden como voluntarios donadores en el Banco Central de Sangre y que cumplen con el criterio de selección del mismo.

### 7.4.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

#### 7.4.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Pacientes con EM definida de acuerdo a los criterios ya validados de McDonald<sup>35</sup>, variedad recurrente-remitente, con o sin progresión secundaria e independientemente del tratamiento que esté recibiendo, de 18 a 65 años de edad, además que tengan padres y abuelos mexicanos.

#### 7.4.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Pacientes que rechacen participar en el estudio

Falta de muestra sanguínea

#### 7.4.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

Muestras insuficientes para realizar el estudio inmunológico.

Paciente que carezcan de la evaluación neurológica especializada del CMN 20 de Noviembre ISSSTE.

#### 7.5 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se determinó como muestreo no probabilístico, ya que se seleccionaron los pacientes de acuerdo a criterios establecidos (muestra por criterios) de donde, aplicó también para los donadores ó pacientes con Esclerosis Múltiple.

Se estudiaron a 76 sujetos divididos en 2 grupos de 38 sujetos cada uno correspondiente al grupo de Esclerosis Múltiple y al grupo de controles sanos.

#### 7.6 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICION

Variable Independiente:

- Edad
- Género

Variable dependiente:

- Linfocitos CD3
- Linfocitos CD4
- Linfocitos CD8
- Relación de linfocitos CD4/CD8

## CUADRO DE VARIABLES

<b>NOMBRE</b>	<b>DEFINICION OPERATIVA</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>CLASIFICACIÓN</b>	<b>FUENTE DE DATOS</b>
<b>EDAD</b>	Años cumplidos.	Cuantitativa	18 a 65 años	Cédula de registro.
<b>GENERO</b>	Característica biológica que diferencia hombre-mujer	Cualitativa	Masculino Femenino	Cédula de registro.
<b>CD3</b>	Linfocito T3, Leu4, marcador de la línea celular T expresada en unidades/ $\mu$ l	Cuantitativa	852-3264 U/ $\mu$ l	Cédula de registro.
<b>CD4</b>	Linfocito T4, Leu3a, marcador para células T cooperadoras	Cuantitativa	580-1944 U/ $\mu$ l	Cédula de registro.
<b>CD8</b>	Linfocito T8, Leu2a, marcador para células T citotóxicas	Cuantitativa	264-1563 U/ $\mu$ l	Cédula de registro.
<b>RELACION CD4/CD8</b>	Es el cociente d la relación entre numero de linfocitos T4/T8	Cuantitativa	Cociente expresado en números absolutos 1.67	Cédula de registro.

## 7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la estadística descriptiva. Se determinó la distribución para cada una de las variables y se analizó con la prueba de T de Student y la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se consideró diferencia estadística cuando  $p < 0.05$ . El análisis se llevó a cabo con el paquete estadístico MINITAB 15.

## 7.8 CONSIDERACIONES ETICAS

Dado que se trató de una investigación en seres humanos se cumplió con los principios éticos necesarios para su realización, para lo cual se presentó una carta de Consentimiento Informado a los participantes del estudio, que garantizó los principios de autonomía, no maleficencia y confidencialidad de la información clínica y genética individual, con base en la Ley General de Salud (Artículos 22-27, 34-56 y 100), la Declaración Universal sobre el Genoma y Derechos Humanos, promulgada por la UNESCO en 2003, el informe Belmont de guías éticas para la protección de los sujetos humanos de investigación biomédica y la Declaración de Helsinki modificada en la 52<sup>a</sup> Asamblea General en Edimburgo Escocia, Octubre 2000, nota de Clarificación sobre el párrafo 29, añadida por la Asamblea General, Washington, 2002.

El protocolo fue sometido para su aprobación por el Comité de Investigación y de Ética del CMN “20 de Noviembre”, ISSSTE.  
(Anexo 1 Carta de Consentimiento Informado)

## 7.9 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Recolección de datos para protocolo de investigación	X	X				
Entrega a Enseñanza e investigación para revisión y aprobación de protocolo			X			
Captación de pacientes y grupo control			X			
Toma de muestras de pacientes y grupo control				X		
Captación de resultados de muestras tomadas				X		
Análisis de resultados finales					X	
Impresión y entrega de Tesis final						X

## 7.10 LOGÍSTICA

### 7.10.1 RECURSOS HUMANOS

La realización del presente protocolo de investigación, requirió de la participación de médicos profesionales en el diagnóstico y control de pacientes con Esclerosis Múltiple, así como de médicos, químicos y biólogos capacitados en las diferentes técnicas moleculares y sus aplicaciones, así como en el análisis de resultados. El tiempo fue variable en la participación de cada uno de los mencionados, con el plan de seguir el cronograma establecido.

### 7.10.2 RECURSOS MATERIALES

Equipo necesario para la determinación de subpoblación de linfocitos marca Beckton Dickinson formato multitest con tubos True count. Equipo de lectura para determinación de subpoblación de linfocitos marca FACSCalibur de 4 colores con el programa worklistmanager. Microcentrifuga Vortex Pipetas de presión positiva de diferentes rangos. Citómetro de flujo.

### 7.10.3 RECURSOS FINANCIEROS

Principalmente los asignados por el fondo FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE y los destinados a los servicios de Medicina Genómica, Neurología e Inmunología Clínica y Alergia.



## 8. RESULTADOS

El presente estudio fue realizado en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE, donde se incluyó un número total de 76 pacientes divididos en 2 grupos, uno correspondiente a 38 pacientes con diagnóstico establecido de Esclerosis Múltiple (Grupo 1) de acuerdo a los criterios de McDonald y un segundo grupo también de 38 sujetos sanos (Grupo 2) que acudieron de forma voluntaria a donación en el Banco de sangre de este CMN, en quienes se confirmó su origen Mexicano hasta en dos generaciones previas. Se excluyeron a los individuos sanos con antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes y neurológicas.

El grupo 1 estuvo formado por pacientes con edades comprendidas entre los 18 a los 62 años con una edad media de 44.28; de los cuales 23 (60.5%) fueron mujeres y 15 (39.47%) hombres. En cuanto al grupo 2, estuvo constituido por individuos con edades comprendidas entre los 18 y los 57 años y una edad media de 31.66; de los cuales 23 (60.5%) fueron mujeres y 15 (39.4%) hombres (Tabla 1).

El análisis estadístico inicial de la determinación de los CD3 en el grupo 1 mostró una media de 1207, una mediana de 1246, varianza de 321,307, con un rango de 2201, una desviación estándar de 566, un mínimo de 115 y un máximo de 2316, presentando un error estándar de 91; mientras que para el grupo 2 mostró una media de 1572, con una mediana de 1527, varianza de 375,780, un rango de 2639, una desviación estándar de 613, con un mínimo de 115 y un máximo de 2754, con error estándar de 98.

En cuanto a las determinaciones de los CD4 en este mismo grupo se encontró una media de 749, con una mediana de 814, varianza de 139,950, en un rango de 1535, con una desviación estándar de 374 con un mínimo de 39 y un máximo de 1574, con un error estándar de 60; mientras que en el grupo 2 se obtuvo una media de 959, con una mediana de 902, varianza de 126,108, en un rango de 1270, con una desviación estándar de 355, con un mínimo de 392 y un máximo de 1662, con un error estándar de 56.

Los valores obtenidos para CD8 en el grupo 1 mostraron una media de 420, una mediana de 391, varianza de 58,309, con un rango de 966, una desviación estándar de 241, con un mínimo de 13 y un máximo de 979, así como un error estándar de 39; en tanto que en el grupo 2 se obtuvo una media de 615, una mediana de 543, varianza de 126,108, con un rango de 860 y una desviación estándar de 273, con un mínimo de 223 y un máximo de 1083, así como un error estándar de 43.72 (Figura 1).

En cuanto a la relación de CD4/CD8 se obtuvieron los siguientes valores para el grupo 1: media de 2.32, mediana de 2.0, moda de 2, varianza de 2.39, rango de 8, desviación estándar de 1.54, con un mínimo de 0 y un máximo de 8, con un error estándar de 0.251; en cuanto al grupo 2 en este mismo rubro se encontraron los siguientes resultados: media de 1.71, mediana de 2, moda de 1, varianza de 0.46, rango de 2, desviación estándar de 0.68, con un mínimo de 1 y un máximo de 3, con un error estándar de 0.10 (Figura 2).

De acuerdo al género se obtuvieron las siguientes medidas de tendencia central para los CD3; en hombres del grupo 1 se obtuvo una media de 1352, mediana de 1520, varianza de 218,014, rango de 1469, con una desviación estándar de 466, con un mínimo de 438 y un máximo de 1907, con un error estándar de 120; mientras que en el grupo 2 se obtuvo una media de 1601, mediana de 1539, varianza de 331,584, un rango de 234, una desviación estándar de 575, con un mínimo de 720 y un máximo de 2754, con una error estándar de 112.

En cuanto a los CD4, los individuos del sexo masculino del grupo 1 mostraron: media de 775, mediana de 832, varianza de 110,453, para un rango de 1192, con una desviación estándar de 332, con un mínimo de 39 y un máximo de 1231, con un error estándar de 85. En el grupo 2, los hombres mostraron una media de 962, una mediana de 909, varianza de 123,029, con un rango de 1270 y una desviación estándar de 350, con un mínimo de 392 y un máximo de 1662, con un error estándar de 68.

Los valores obtenidos en los hombres del grupo 1 para CD8 registraron una media de 477 una mediana de 404, varianza de 79,860, con un rango de 814 y una desviación estándar de 282, con un mínimo de 165 y un máximo de 979, con un error estándar de 72. En los hombres del grupo 2 encontramos una media de 1002, una mediana de 556, una varianza de 4263,134, un rango de 10798, con una desviación estándar de 2064, con un mínimo de 253 y un máximo de 1152, con un error estándar de 404.

En el grupo 1 los hombres mostraron en la relación CD4/CD8 una media de 2.11, una mediana de 2, moda de 2, una varianza de 1.64, con un rango de 5 y una desviación estándar de 1.28, con un mínimo de 0 y un máximo de 5 con un error estándar de 0.33; los hombres del grupo 2 mostraron una media de 1.67, mediana de 1, moda de 1, varianza de 0.43, con un rango de 2 y una desviación estándar de 0.66, con un mínimo de 1 y un máximo de 3, con un error estándar de 0.13 (Tabla 2).

Con respecto a las mujeres del grupo 1 el análisis de CD3 se obtuvo una media de 1109, mediana de 1144, una varianza de 377,414, con un rango de 2201 y una desviación estándar de 614, con un mínimo de 115 y un máximo de 2316 con un error estándar de 128, en el grupo 2, los CD3 mostró una media de 1592, mediana de 1471, varianza de 337,371, con un rango de 1852, con una desviación estándar de 580, con un mínimo de 782 y un máximo de 2634, con error estándar de 161.

Las mujeres del grupo 1 presentaron para CD4 una media de 1109, una mediana de 1144, varianza de 377,414, para un rango de 2201, con una desviación estándar de 614, con un mínimo de 115 y un máximo de 2316 y un error estándar de 128; en tanto que en las mujeres del grupo 2 encontramos una media de 953, una mediana de 835, con una varianza de 142,973, para un rango de 1077, con una desviación estándar de 350, con un mínimo de 554 y un máximo de 1631 y un error estándar de 104.

Respecto a las mujeres del grupo 1 los CD8 mostraron una media de 383, una mediana de 379, varianza de 43,584, un rango de 877, con una

desviación estándar de 208, con un mínimo de 13 y un máximo de 890, con un error estándar de 42; en tanto que las mujeres del grupo 2 mostraron una media de 614, una mediana de 512, con una varianza de 88,811, un rango de 855, una desviación estándar de 298, con un mínimo de 223 y un máximo de 1078, con un error estándar de 82.

En esta misma relación de CD4/CD8 la mujeres del grupo 1 mostraron una media de 2.45, una mediana de 2, una moda de 2, con una varianza 2.97, un rango de 8, una desviación estándar de 1.72, un mínimo de 0 y un máximo de 8, con un error estándar de 0.35. Las mujeres del grupo 2 en cuanto a la relación CD4/CD8 arrojaron los siguientes resultados: una media de 1.78, mediana de 2, moda de 2, varianza de 0.52, con un rango de 2 y una desviación estándar de 0.72, con un mínimo de 1 y un máximo de 3, con un error estándar de 0.20 (Tabla 3).

Con el propósito de establecer si existen diferencias entre ambos grupos estudiados se realizó prueba de T obteniéndose un valor de  $p$  de 0.002 para CD3, 0.009 para CD4, 0.001 para CD8 y 0.032 para la relación 4/8; considerándose todas ellas estadísticamente significativas (Tabla 4).

Por otra parte se aplicó la misma prueba para valorar las diferencias por genero encontrándose que para los hombres no hubo significancia estadística, mientras que para las mujeres los resultados fueron estadísticamente significativos para CD3 ( $p$  de 0.02) y para CD8 ( $p$  de 0.02) (Tabla 5).

## 9. DISCUSION

La fenotipificación inmunológica de las subpoblaciones linfocitarias se ha empleado para valorar el estado inmunológico en una gran número de enfermedades, dentro de las cuales se incluyen los trastornos de tipo autoinmune como lo es la Esclerosis Múltiple, en donde se ha encontrado particularmente un incremento en la respuesta tipo TH1<sup>16</sup>, además es una enfermedad que tiende a la cronicidad, en donde se observa una inducción en las células TCD8 para inhibir la producción de IgG a través de las células B y además se acompaña de una disminución de la células CD4+CD45RA; esto repercute en el cociente CD4/CD8<sup>46</sup>.

Existen pocos estudios nacionales realizados para la determinación de subpoblaciones de linfocitos en población sana, sin embargo no existen estudios donde se evalúen alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con enfermedades autoinmunes y tampoco existen en pacientes mexicanos con Esclerosis Múltiple.

No han sido establecidas alteraciones a nivel de las cifras totales de la subpoblación de linfocitos, sin embargo, encontramos una discreta disminución en las cifras de CD3 de los pacientes con Esclerosis Múltiple comparados con los controles sanos; en donde la disminución más marcada se encontró en el grupo de mujeres en comparación con los hombres del grupo de EM.

Tal y como lo mencionan en publicaciones internacionales, existe una disminución en las cifras tanto de precursores de memoria de los linfocitos CD4, así como de las cifras relativas y absolutas de linfocitos CD4 a nivel de sangre periférica, en nuestro estudio encontramos que los pacientes con Esclerosis Múltiple presentaron esta disminución en las cifras de linfocitos CD4 comparado con los sujetos sanos; pero no encontramos variaciones en los niveles de CD4 relacionados con el género.

Estudios internacionales que sugieren que existe una disminución en las cifras de relativas de los linfocitos CD8 en sangre periférica, se han relacionado

con los períodos de recaída de la enfermedad <sup>46</sup>, que abarca desde una disminución de sus precursores CD8+(CD28-). En este estudio los pacientes efectivamente tuvieron una disminución de estas cifras en relación a las encontradas en el grupo de sujetos sanos, que incluso se encuentra por debajo del promedio obtenido en el estudio realizado en el CMN “20 de Noviembre” en sujetos sanos mexicanos <sup>48</sup>; esta disminución es más marcada en las mujeres con Esclerosis Múltiple, por lo que consideramos importante estudiar no sólo el estado funcional del paciente, sino su función hormonal que también puede influir en estos valores.

La relación entre los linfocitos CD4/CD8 es conocida como la relación Cooperador/Supresor, en personas sanas esta relación se encuentra entre 0.9 y 1.9 lo que significa que hay una ó más células CD4 por cada célula CD8; no sólo se han encontrado alteraciones en esta relación a nivel de líquido cefalorraquídeo, ya que además en diversos estudios realizados en sangre periférica de pacientes con Esclerosis Múltiple se ha encontrado un incremento en el cociente CD4/CD8, debido básicamente a una disminución en las células T CD8, detectando este valor elevado incluso hasta cifras mayores de 2.5 tal y como lo mencionan Roncarolo y col; nuestras determinaciones confirman estas alteraciones observando valores elevados en la relación CD4/CD8, sin encontrar diferencia significativa por género .

No está claro aún si estas alteraciones son el resultado directo de la presencia de enfermedad autoinmune, en este caso de Esclerosis Múltiple, de su cronicidad, del número de recaídas o bien si está implícito el tipo de tratamiento al que ha sido sometido el paciente; o si se trata de la presencia de una inmunodeficiencia que predispone a la presencia de esta o alguna otra enfermedad autoinmune.

Los resultados del estudio forman parte de los avances logrados a la fecha del proyecto: “IDENTIFICACION DE POLIMORFISMOS GENETICOS DE CD24 ASOCIADOS A LA DISFUNCION NEUROLOGICA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MULTIPLE”- C01-69809, apoyado por los fondos en salud 2007 del CONACYT.

## **10. CONCLUSIONES**

1.- Existe diferencia en la Subpoblación de Linfocitos en pacientes con Esclerosis Múltiple comparada con controles sanos.

2.- Existe una disminución en las cifras de linfocitos CD3 en pacientes con Esclerosis Múltiple.

3.- Existe una disminución en las cifras de linfocitos CD8 en pacientes con Esclerosis Múltiple.

4.- Existe un aumento en el cociente CD4/CD8 de los pacientes con Esclerosis Múltiple.

5.- Existe mayor afectación en las cifras de CD3 y CD8 en el género femenino.

## 11. ANEXOS

### 11.1 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON ESCLEROSIS MULTIPLE.



Subdirección General Médica  
Subdirección de Regulación y Atención Hospitalaria

*Departamento de Investigación*  
**GUIA PARA LA ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**



#### ANEXO 2 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO, PACIENTES CON ESCLEROSIS MULTIPLE

México D. F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2009

Yo \_\_\_\_\_ de manera libre y voluntaria DOY MI CONSENTIMIENTO, para ingresar al estudio titulado: "**Identificación subpoblaciones linfocitarias pacientes con esclerosis múltiple**", sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

Se me ha informado que el estudio ha sido aceptado y aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación Clínica del Hospital CMN "20 de Noviembre ISSSTE", donde se realizará el estudio, por un período aproximado de 12 meses. Se me ha explicado la importancia que tiene este estudio para la atención de los pacientes con esclerosis múltiple, así como los conocimientos generados de este tipo de estudios y también se me ha dado a conocer los riesgos implícitos del procedimiento.

Para la realización de esta investigación se tomarán 10 ml de mi sangre para la determinación de poblaciones celulares (linfocitos), en el laboratorio de histocompatibilidad de este Centro Médico.

El investigador se ha comprometido a darme la información oportuna de los resultados obtenidos y de las dudas que de ellos surjan, así como sobre cualquier manejo alternativo que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento; además me ha dado la seguridad de que la realización de este estudio no pondrá en riesgo mi integridad física ó mental, y que los datos obtenidos serán manejados de forma confidencial y anónima, pero que los resultados agrupados que se deriven del mismo, podrán ser presentados en publicaciones o foros científicos y médicos.

Nombre del paciente (o representante legal):

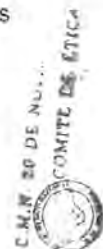
Firma:

Dirección:

Teléfono (casa):

Teléfono (trabajo)

Nombre del testigo:







ISSSTE

Subdirección General Médica  
Subdirección de Regulación y Atención Hospitalaria

*Departamento de Investigación*  
**GUIA PARA LA ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE  
INVESTIGACIÓN**



Firma:

Nombre del testigo:

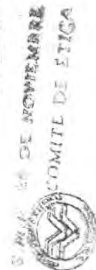
Firma:

Nombre del investigador:

Firma:

En caso de dudas o requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar a la Dra. Ondina Marlene Garibay Vargas (Servicio de Inmunología Clínica y Alergia) en el número telefónico: (55) 52-00-50-03 , extensión 14526 y 14523; o bien a la Dra. María del Carmen Chima Galán (Laboratorio de Medicina Genómica) al teléfono: (55) 52-00-50-03, extensión 14605 y 14507.

Y si usted quisiera discutir su participación con una persona que no esté directamente involucrado en el proyecto (delegado del comité de ética o persona autorizada) nosotros lo invitamos a contactar con el Dr. Abel Archundia García, Presidente del Comité de Ética al teléfono (55) 52-00-50-03, extensión 14629; o bien, a la Coordinación de Investigación del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE con la Dra. Silvia García, al teléfono: (55) 52-00-50-03, ext. 14609.



## 11.2 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CONTROLES SANOS.



Subdirección General Médica  
Subdirección de Regulación y Atención Hospitalaria

### Departamento de Investigación GUIA PARA LA ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN



#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CONTROLES SANOS

México D. F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2009

Yo \_\_\_\_\_ de manera libre y voluntaria DOY MI CONSENTIMIENTO, para ingresar al estudio titulado: **"Identificación subpoblaciones linfocitarias en pacientes con esclerosis múltiple"**, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

Se me ha informado que el estudio ha sido aceptado y aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación Clínica del Hospital CMN "20 de Noviembre ISSSTE", donde se realizará el estudio, por un período aproximado de 12 meses. Se me ha explicado la importancia que tiene este estudio para la atención de los pacientes con esclerosis múltiple, así como los conocimientos generados de este tipo de estudios y también se me ha dado a conocer los riesgos implícitos del procedimiento.

Para la realización de esta investigación se tomarán 10 ml de mi sangre para la determinación de poblaciones celulares (linfocitos), en el laboratorio de Histocompatibilidad de este Centro Médico.

El investigador se ha comprometido a darme la información oportuna de los resultados obtenidos y de las dudas que de ellos surjan, además me ha dado la seguridad de que la realización de este estudio no pondrá en riesgo mi integridad física ó mental, y que los datos obtenidos serán manejados de forma confidencial y anónima, pero que los resultados agrupados que se deriven del mismo, podrán ser presentados en publicaciones o foros científicos y médicos.

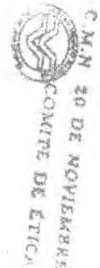
Nombre del participante: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Teléfono (casa): \_\_\_\_\_

Teléfono (trabajo) \_\_\_\_\_





ISSSTE

Subdirección General Médica  
Subdirección de Regulación y Atención Hospitalaria

*Departamento de Investigación*  
**GUIA PARA LA ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE  
INVESTIGACIÓN**



Nombre del testigo:

Firma:

Nombre del testigo:

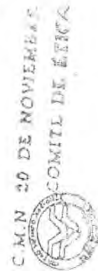
Firma:

Nombre del investigador: Dra. Ondina Marlene Garibay Vargas

Firma:

En caso de dudas o requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar a la Dra. Ondina Marlene Garibay Vargas (Servicio de Inmunología Clínica y Alergia) en el número telefónico: (55) 52-00-50-03, extensión 14526 y 14523; o bien a la Dra. María del Carmen Chima Galán (Laboratorio de Medicina Genómica) al teléfono: (55) 52-00-50-03, extensión 14605 y 14507.

Y si usted quisiera discutir su participación con una persona que no esté directamente involucrado en el proyecto (delegado del comité de ética o persona autorizada) nosotros lo invitamos a contactar con el Dr. Abel Archundia García, Presidente del Comité de Ética al teléfono (55) 52-00-50-03, extensión 14629; o bien, a la Coordinación de Investigación del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE con la Dra. Silvia García, al teléfono: (55) 52-00-50-03, ext. 14609.



### 11.3 TABLAS Y GRÁFICAS.

<b>TABLA 1. CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS</b>				
<b>GRUPO</b>	<b>n</b>	<b>EDAD (MEDIA)</b>	<b>HOMBRES (%)</b>	<b>MUJERES (%)</b>
<b>GRUPO 1 *</b>	38	18-62 (44.28)	15 (39.47)	23 (60.52)
<b>GRUPO 2 **</b>	38	18-57 (32.66)	15 (39.47)	23 (60.52)

\*Grupo 1 Pacientes con Esclerosis Múltiple \*\*Grupo 2 Controles sanos

<b>TABLA 2. COMPARACION DE SUBPOBLACION DE LINFOCITOS DE HOMBRES EN AMBOS GRUPOS</b>					
	<b>LINFOCITOS</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MINIMO</b>	<b>MAXIMO</b>
<b>GRUPO 1</b>	<b>CD3</b>	1352	466	438	1907
	<b>CD4</b>	775	332	39	1231
	<b>CD8</b>	477	282	165	979
	<b>REL 4/8</b>	2.11	1.28	0	5
<b>GRUPO 2</b>	<b>CD3</b>	1601	575	720	2754
	<b>CD4</b>	962	350	392	1662
	<b>CD8</b>	1002	2064	253	1151
	<b>REL 4/8</b>	1.67	0.66	1	3

Grupo 1 Pacientes con Esclerosis Múltiple

Grupo 2 Controles sanos

DE Desviación estándar

<b>TABLA 3. COMPARACION DE SUBPOBLACION DE LINFOCITOS DE MUJERES EN AMBOS GRUPOS</b>					
	<b>LINFOCITOS</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MINIMO</b>	<b>MAXIMO</b>
<b>GRUPO 1</b>	<b>CD3</b>	1109	614	115	2316
	<b>CD4</b>	732	405	62	1574
	<b>CD8</b>	383	208	13	890
	<b>REL 4/8</b>	2.45	1.72	0	8
<b>GRUPO 2</b>	<b>CD3</b>	1592	580	782	2634
	<b>CD4</b>	953	378	554	1631
	<b>CD8</b>	614	298	223	1078
	<b>REL 4/8</b>	1.78	0.72	1	3

Grupo 1 Pacientes con Esclerosis Múltiple

Grupo 2 Controles sanos

DE Desviación estándar

<b>TABLA 4. ANALISIS ESTADISTICO POR GRUPO</b>								
	<b>CD3 <math>\bar{x}</math></b>	<b><i>P</i></b>	<b>CD4 <math>\bar{x}</math></b>	<b><i>p</i></b>	<b>CD8 <math>\bar{x}</math></b>	<b><i>p</i></b>	<b>Rel 4/8 <math>\bar{x}</math></b>	<b><i>p</i></b>
<b>GRUPO 1</b>	1205	0.002	749	0.009	420	0.001	2.32	0.032
<b>GRUPO 2</b>	1572		959		616		1.71	

Grupo 1 Pacientes con Esclerosis Múltiple

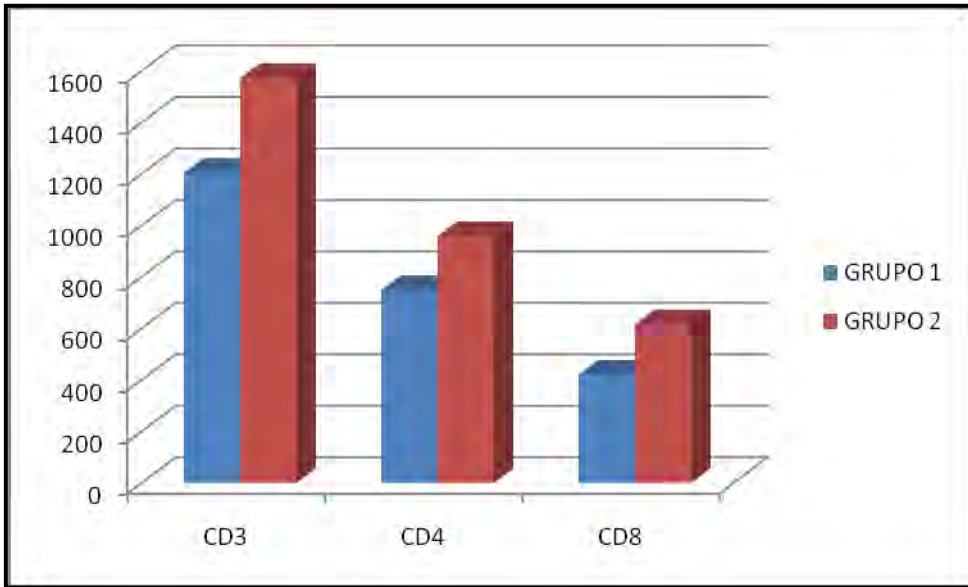
Grupo 2 Controles sanos

<b>TABLA 5. ANALISIS ESTADISTICO POR GENERO</b>								
	<b>CD3 <math>\bar{x}</math></b>	<b><i>p</i></b>	<b>CD4 <math>\bar{x}</math></b>	<b><i>p</i></b>	<b>CD8 <math>\bar{x}</math></b>	<b><i>p</i></b>	<b>Rel 4/8 <math>\bar{x}</math></b>	<b><i>p</i></b>
<b>Hombres Grupo 1</b>	1352	0.14	775	0.09	477	0.12	2.11	0.22
<b>Hombres Grupo 2</b>	1601		962		556		1.67	
<b>Mujeres Grupo 1</b>	1109	0.02	732	0.11	383	0.02	2.45	0.11
<b>Mujeres Grupo 2</b>	1592		953		614		1.78	

Grupo 1 Pacientes con Esclerosis Múltiple

Grupo 2 Controles sanos

**Figura 1 Subpoblación de linfocitos**



Grupo 1: Pacientes con Esclerosis Múltiple.  
Grupo 2: Controles sanos.

**Figura 2 Relación de linfocitos CD4/CD8**



Grupo 1: Pacientes con Esclerosis Múltiple.  
Grupo 2: Controles sanos.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Kurtzke JF: Epidemiology of multiple sclerosis. En: Demyelinating diseases, Ed. J.C. Koetsier 1985: 259.
2. Zweimann B; Levinson A. Immunological aspects of neurological and neuromuscular diseases. JAMA 1992; 286: 2918.
3. Kivisäkk P; Trebst C; Eckstein DJ; Kerza-Kiawatecki AP; Ransohoff R. Chemokine-based therapies for MS: how do we get from here? Trends in Immunol 2001; 22:591-593.
4. Bernard CC; Kerlero de Rosbo N. Múltiple sclerosis an autoimmunitary disease of multifactorial etiology. Curr Opin Immunol 1992; 4: 769.
5. Johnson RT. Viral aspects of multiple sclerosis. En: Demyelinating diseases. Ed. J: C: Koitser "1985: p. 319.
6. Martin C; Enbom M; Soderstrom M; Fredrikson S; Dahl H; Lycke J; Berstrom T; Linde A. Absence of seven human herpes viruses. Including HHV-6, by polymerase chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. Acta Neurol Scand 1997; 95: 280-3.
7. Panitch, HS; Fishman PS; Bever CT: Enfermedades neurológicas En: Inmunología básica y Clínica. Daniel P. Stites, Abba I. Terr, Tristan Parslow. Ed. Manual Moderno. México 9a. Ed. 1998. pp. 697-711.
8. Pisacane A, Impagliazzo N; Russo M, Valiani R; Mandarinini A; Florio C; Vivo P. Breast feeding and multiple sclerosis. BMJ 1994; 308: 1411.
9. Compston A. Genetic factors in the etiology of multiple sclerosis. En: Multiple Sclerosis. Ed. W.I. McDonald and D.H. Silberberg, Butterworths, London. 1986: p 56.
10. Godorezky C; Nájera R; Rangel BE; Castro LE, Flores J; Velasquez G; Granados J; Sotelo J. Immunogenetic profile of multiple sclerosis in mexicans. Human Immunology 1986; 16: 230-234.
11. Mc. Farlin DE: Immunogenetics in relation to neurologic disease. Immunol Allergy Clin North Am 1988; 201.

12. Kelly MA; Jacobs KH; Penny MA, Mijovic CH; Nigthingale S; Barnett AH; Francis DA. An investigation of HLA-encoded genetic susceptibility to multiple sclerosis in subjects of Asian Indian and Afro-Caribbean ethnic origin. *Tissue Antigens* 1995; 45: 197.
13. Steinman L: Multiple sclerosis: a two stage disease. *Nat. Immunol* 2001; 2: 762-764.
14. Zamvil SS; Steinmann L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Ann Rev Immunol* 1990; 8: 579-621.
15. Vartanian T; Li Y; Zhao M; Stefansson K. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1995; 1; 732-43.
16. Bielekova B; Goodwin B, Richert N; Cortese I; Kondo T; Afshar G; Gran B; Eaton J; Antel J; Frank JA: Encephalitogenic potential on the myelin protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 2000;6; 1167-1176.
17. Cope AP; Liblau R; Yang X; Congia M, Laudanna C; Shreiber R; Probert L; Kollias G; Mc Devitt H. Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T-cell receptor signaling. *J Exp Med* 1997; 185: 1573-1584.
18. O'Neill L. Microarray analysis reveals osteopontin as important player in MS. *Trends Immunol* 2002; 4: 178.
19. Constant C F. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Lancet* 1994; 343: 271-5)
20. Roncarolo MG, Levings, MK. The role of different subsets of T regulatory cells controlling autoimmunity *Curr Op Immunol* 2001: 12: 676-683.
21. Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, Gusella JF, Kim DJ, Terwedow H, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Haynes CS, Roses et al. (1996) *Nat. Genet.* 13, 469–471.
22. Bai XF, Liu JQ, Liu X, Guo Y, Cox K, Wen J, Zheng P, Liu Y. (2000) *J. Clin. Invest.* 105, 1227–1232.
23. Hubbe M, Altevogt P. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24, 731–737.



24. Zhou Q, Wu Y, Nielsen PJ, Liu Y. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27, 2524-2528.
25. Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS, Janeway CA. (1992) *J. Exp. Med.* 175, 437-445.
26. De Bruijn ML, Peterson PA, Jackson MR. (1996) *J. Immunol.* 156, 2686-2692.
27. Enk AH, Katz SI. (1994) *J. Immunol.* 152, 3264-3270.
28. Liu Y, Jones B, Brady W, Janeway CA, Linsley PS, Linley PS. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22, 2855-2859.
29. Liu Y, Wenger RH, Zhao M, Nielsen PJ. (1997) *J. Exp. Med.* 185, 251-262.
30. Wu Y, Zhou Q, Zheng P, Liu Y. (1998) *J. Exp. Med.* 187, 1151-1156.
31. Hahne M, Wenger RH, Vestweber D, Nielsen PJ. (1994) *J. Exp. Med.* 179, 1391-1395.
32. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA. (1993) *J. Exp. Med.* 177, 57-68.
33. Zhou Q, et al. CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis. *PNAS.* 2003. 25 (100): 15041-46.
34. Wang L, et al. A dinucleotide deletion in CD24 confers protection against autoimmune diseases. *PLOS Genetics.* 2007. 4 (3): 508-17.
35. McDonald WI, Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis. Guidelines from the international panel on the diagnosis on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001, 50:121-7.
36. Beckman Coulter, Análisis de secuencia. En: Sistema de análisis genético. CEQ8000.2002. p.8-22.
37. Kurtzke JF, Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS), *Neurology* 1983, 33, 1444-1452
38. Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

39. Zhou Qunmin, Rammohan K, Lin Shili, Robinson N, Li Ou, Liu X, Bai Xf, Yin L, CD24 is a genetic modifier for risk of multiple sclerosis, PNAS 2003, 100:25, 15041-15046.
40. Luque José y Ángel Herráez, Caracterización y separación de células por citofluorimetría en Biología Molecular e Ingeniería Genética, Edit. Harcourt, 126-129.
41. Ley General de Salud, 8ª.ed. Edit Porrúa, S.A., México 1994.
42. Declaración internacional sobre los datos genéticos humanos. Octubre 2003. [http:// www.unesco.org](http://www.unesco.org)
43. Yesley MS, Alexander D, Beauchamp T, et,al, Principios éticos y orientaciones para la protección de sujetos humanos en la experimentación. National Comitión fort the Protection of Human Subjets of Biomedical and Behavioral Research. DHEW Publication n. 78-0012, 1978.
44. Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects. World. Medical Association Declaration of Helsinki. Junio 1999; 42(6):635-697.
45. Códigos Internacionales de Ética. 52 Asamblea General, Edimburgo Escocia, Octubre 2000 y Nota de Clarificación sobre el parágrafo 29 añadida por la Asamblea General, Washington 2002.
46. O. Oksaranta, MD; S. Tarvonen, MD; J. Ilonen MD; K. Poikonen, MSx; M. Reunanen, MD; M. Panelius, and R. Salonen, MD. Neurology 1996:47: 1542-1545
47. Brian Crucian, Meter Dunne, Herman Friedman, Robyn Ragsdale, Susan Pross and Raymond Widen. Alterations in Levels of CD28-/CD8+ Suppressor Cell Precursor and CD45RO+/CD4+ Memory T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Multiple Sclerosis Patients.
48. Tesis realizada en el CMN “20 de Noviembre” bajo el título “Determinación de niveles de subpoblación de linfocitos en donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre ISSSTE.