

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**INMUNOGENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE:  
ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y LIGAMENTO EN LA  
POBLACIÓN ESPAÑOLA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Ana Rubio Jareño

Bajo la dirección del Doctor:

Emilio Gómez de la Concha

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-2041-2**

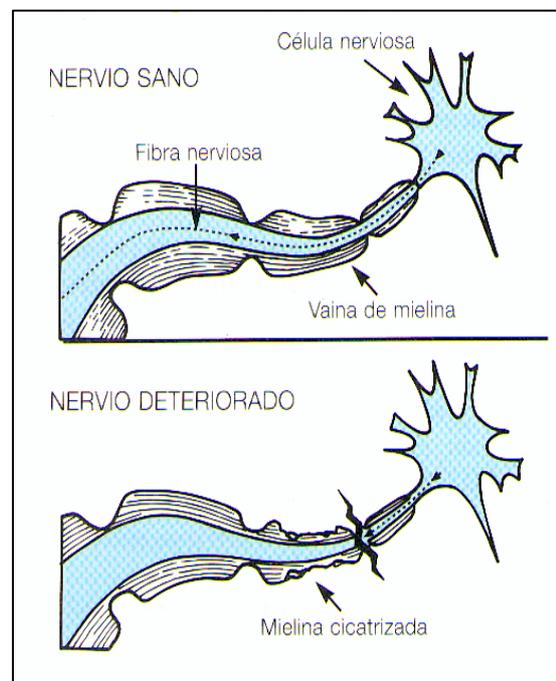
# I. INTRODUCCIÓN

## I.A. DEFINICIÓN DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad neurológica crónica más frecuente en los adultos jóvenes de Europa y Norteamérica.

Se conoce como entidad clínica desde hace más de 130 años. Las primeras descripciones anatomopatológicas fueron realizadas por Cruveilhier (1835) y Carswell (1838); pero fue Charcot, en 1868, quién detalló por primera vez los aspectos clínicos y evolutivos de la enfermedad.

La patología consiste en la aparición de lesiones focales en la sustancia blanca, denominadas **placas**, en las que lo más llamativo es la pérdida de mielina y oligodendrocitos (**desmielinización**) con preservación relativa de los axones, pues siempre está presente un grado variable de destrucción axonal. Estas lesiones suelen ser múltiples y están distribuidas por todo el sistema nervioso central (SNC). También pueden aparecer placas en la sustancia gris pero son más difíciles de identificar. El soma neuronal no se suele afectar.



Las dos características fundamentales de la esclerosis múltiple son la **diseminación temporal** y **espacial** de los **síntomas** y **signos neurológicos**. Los

síntomas dependen de las áreas del SNC lesionadas. Un individuo con esta enfermedad experimenta normalmente más de un síntoma pero no todos los individuos presentan todos los síntomas. Éstos incluyen debilidad, hormigueo, alteración de la coordinación, fatiga, problemas de equilibrio, alteraciones visuales, temblor, espasticidad, trastornos del habla, problemas intestinales y/o urinarios, andar inestable (ataxia), problemas en la función sexual, sensibilidad al calor, alteraciones en la memoria a corto plazo y, ocasionalmente, problemas de juicio o razonamiento (trastornos cognitivos).

Con el objetivo de poder **valorar la evolución clínica** de la enfermedad, se han desarrollado diferentes escalas cuantitativas de valoración neurológica. La más ampliamente usada hasta el momento es la **EDSS** (*Expanded Disability Status Scale*) desarrollada por Kurtzke en 1983<sup>1</sup>. Se basa en los resultados de, por un lado, la exploración de 7 sistemas funcionales (piramidal, cerebelo, tronco, sensibilidad, vesical e intestinal, visual y mental) y por otro, del índice de deambulación, basado en la discapacidad que presenta el paciente para caminar autónomo, con apoyo uni o bilateral o restringido a silla o cama.

El **diagnóstico** de la esclerosis múltiple se fundamenta en las manifestaciones clínicas producidas y en el resultado de pruebas complementarias. Se realiza por exclusión por lo que con una sola prueba no se puede diagnosticar. Se requieren todos o algunos de los procedimientos siguientes:

1. Un historial médico en el cual el especialista analiza los signos y los síntomas.
2. Un exhaustivo examen neurológico.
3. Los potenciales evocados que miden la respuesta del SNC frente a estímulos específicos (ruido, imágenes, estímulos sensitivos).
4. La resonancia magnética (RM), una técnica relativamente nueva para visualizar imágenes precisas y altamente detalladas del cerebro y de la médula espinal.
5. La punción lumbar para analizar la aparición de bandas oligoclonales producidas por la presencia de anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

En el diagnóstico de la esclerosis múltiple se utilizan los **criterios de Poser**. Fueron propuestos en el año **1983** como una actualización de los criterios de

Schumacher y se desarrollaron como consecuencia del reflejo de los avances en las técnicas de detección de lesiones neurológicas y otras evidencias paraclínicas. Estos criterios son<sup>2</sup>:

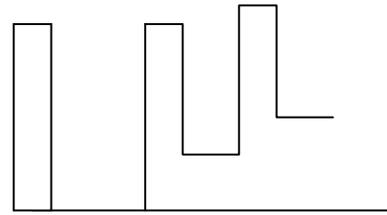
- **Esclerosis múltiple definida clínicamente:**
  - 2 ataques y evidencias clínicas de 2 lesiones separadas.
  - 2 ataques, evidencias clínicas de una lesión y paraclínicas de otra lesión separada.
- **Esclerosis múltiple definida apoyada por datos de laboratorio:**
  - 2 ataques, evidencias clínicas o paraclínicas de 1 lesión y anormalidades inmunológicas en el LCR.
  - 1 ataque, evidencias clínicas de 2 lesiones separadas y anormalidades en el LCR.
  - 1 ataque, evidencias clínicas de una lesión y paraclínicas de otra lesión separada, y anormalidades en el LCR.
- **Esclerosis múltiple probable clínicamente:**
  - 2 ataques y evidencias clínicas de 1 lesión.
  - 1 ataque y evidencias clínicas de 2 lesiones separadas.
  - 1 ataque, evidencias clínicas de 1 lesión y paraclínicas de otra lesión separada.
- **Esclerosis múltiple probable apoyada por datos de laboratorio:**
  - 2 ataques y anormalidades en el LCR.

## I.B. HETEROGENEIDAD CLÍNICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. CLASIFICACIONES

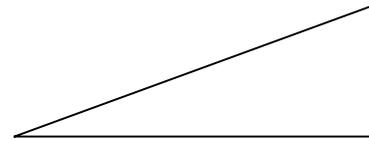
Se pueden establecer diferentes clasificaciones de la EM según el criterio de categorización que se utilice:

- 1- La **forma de evolución clínica**: esta patología es imprevisible y varía enormemente. Puede atravesar periodos agudos de exacerbación o brotes (aparecen nuevos síntomas o los ya existentes se agravan) o fases estables o remisión (los síntomas mejoran o desaparecen). Normalmente la EM sigue uno de los cuatro cursos siguientes:

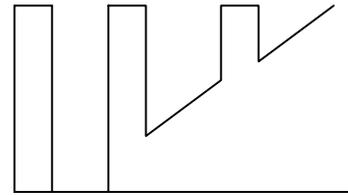
**Remitente-Recurrente (RR):** definida por la presencia de exacerbaciones claras (brote) con posterior recuperación completa o parcial. Los períodos entre los brotes se caracterizan por la ausencia de progresión de la enfermedad. Está presente en el 85% de los pacientes.



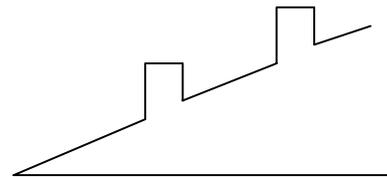
**Primaria-Progresiva (PP):** enfermedad progresiva desde su inicio con posibilidad de estacionarse en ocasiones e incluso presentar mejoría. Aparece en el 10% de los sujetos enfermos.



**Secundaria-Progresiva (SP):** inicialmente es una forma remitente-recurrente seguida de progresión con o sin recaídas. Se ha estimado que la proporción de pacientes con EM-RR que desarrollan una evolución SP es del 50% al cabo de 10 años desde el inicio de la enfermedad.



**Progresiva-Recurrente (PR):** es una enfermedad progresiva desde su inicio con claras recaídas con o sin recuperación completa; los períodos entre brote y brote se caracterizan por una continua progresión. Su frecuencia es del 5%.



- 2- El **pronóstico** a corto o a largo plazo: **Hiperaguda y Benigna**.
- 3- La predilección por una determinada **topografía lesional**: **Neuromielitis óptica de Devic y Esclerosis múltiple espinal**.
- 4- La **edad de comienzo** de los síntomas: **Infantil y Tardía o Adulta**.

Aunque **no** se tiene **conocimiento** acerca de si un individuo presentará una **evolución clínica determinada**, **sí** se sospecha el **mecanismo** por el cual la **enfermedad progresa**. La EM es la entidad en la que el mecanismo de ampliación de determinantes proteicos ha sido demostrado como el responsable del desarrollo patológico. Así, mientras que la actividad encefalitógena (inductora de células T autorreactivas restringidas por HLA-DR frente a ciertos determinantes antigénicos, los denominados dominantes) corresponde, según los individuos, a péptidos muy concretos (y bien caracterizados en modelos animales) en el curso de la enfermedad se van generando células CD4<sup>+</sup> reactivas frente a otros péptidos de la misma proteína. El resultado final es la amplificación de la respuesta y en consecuencia el progreso de la enfermedad<sup>3</sup>.

#### I.C. HISTORIA NATURAL DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El estudio de la **historia natural** de la esclerosis múltiple resulta complicado por las características de esta enfermedad. Dado que la duración de la EM es prolongada, desde su comienzo en la juventud hasta el fallecimiento, se dificulta el seguimiento de una cohorte a lo largo de toda su evolución. Además, no existe ningún marcador biológico preciso de la actividad patológica y la correlación entre la frecuencia de los brotes, la progresión de la discapacidad y la evolución de las lesiones es inconstante<sup>4</sup>.

El conocimiento de la historia natural de una enfermedad es la piedra angular donde se sustentan todos los estudios científicos sobre esa patología. En la esclerosis múltiple es la base de los cálculos para el diseño de los estudios de eficacia de nuevas terapias<sup>5</sup>, para identificar factores que permitan establecer un pronóstico individualizado de los pacientes<sup>6</sup> y para intentar definir subgrupos de enfermos en los que potencialmente pueda descartarse esta enfermedad<sup>5</sup>.

Los estudios realizados en la serie de pacientes con EM de Ontario<sup>5,6</sup> son en la actualidad la principal referencia en lo relativo a la historia natural de la esclerosis múltiple aunque se desconoce si estos resultados son extrapolables a poblaciones de diferente origen racial y geográfico.

#### I.D. PRONÓSTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El **pronóstico** de la EM es variable y está relacionado estrechamente con el curso clínico y la discapacidad. La evolución clínica de los primeros años puede predecir el comportamiento posterior de la enfermedad y el inicio de una fase progresiva.

En dos amplios estudios de seguimiento prolongado sobre la historia natural de la EM considerada de forma global<sup>7</sup> se ha encontrado el siguiente patrón evolutivo de la enfermedad en relación con la discapacidad:

- a) durante los 8 primeros años el 50% tiene limitada su ambulación;
- b) en los primeros 15 años el 50% de los pacientes necesita ayuda para caminar;
- c) y, al cabo de 30 años el 50% de los pacientes está restringido en su casa.

#### I.E. SUPERVIVENCIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La **supervivencia** media tras el diagnóstico de esclerosis múltiple es de 25-35 años y, como cabría pensar, se correlaciona con la discapacidad física. Las curvas de supervivencia indican que la expectativa de vida se ve reducida sólo en 6 o 7 años con respecto a la población sin EM. Las causas de muerte de los pacientes con esta enfermedad se pueden dividir en cuatro grupos:

- a) dependientes de la enfermedad (mielitis cervicales altas, formas hiperagudas, etc.).
- b) complicaciones de la EM (sepsis, tromboembolismo pulmonar, etc.).
- c) no relacionadas con la EM (infarto de miocardio, neoplasias, etc.), que suponen el 50-60% de las muertes.
- d) y por último, el suicidio. La tasa de suicidio se ha estimado que es de 2-7 veces mayor que en la población general ajustada por edad.

#### I.F. ETIOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y EPIDEMIOLOGÍA

A pesar de que la **causa exacta** de la esclerosis múltiple **se desconoce**, muchos investigadores piensan que la destrucción de la mielina es el resultado de una respuesta

anormal del sistema inmunológico hacia el propio organismo (autoinmunidad). Aún no se sabe lo que impulsa al sistema inmunitario a deteriorar la vaina que recubre los nervios pero la mayoría de los científicos coinciden en que son varios los factores que están involucrados.

A partir de los conocimientos adquiridos mediante los estudios genéticos y epidemiológicos se han generado **dos hipótesis** referentes a las **causas** de la **esclerosis múltiple** que no se excluyen mutuamente, sino que se complementan.

4 A favor de la **hipótesis genética** están los siguientes hallazgos:

- Los **estudios familiares** han permitido saber que la EM es de 10-50 veces más frecuente en los parientes de los afectados por la enfermedad que en la población general<sup>8</sup>, dependiendo del grado y el sexo. Además, la concordancia entre gemelos monozigotos es del 40% frente al 4% en gemelos dizigóticos<sup>9</sup>. También se ha podido comprobar que los hijos adoptados por sujetos con EM no tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad que el esperado en la totalidad de la población, así como que la patología no aumenta en los esposos de los individuos afectos.
- Los **estudios genéticos de ligamiento** realizados mediante **barridos genómicos** han identificado como principal determinante genético para la esclerosis múltiple al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), localizado en el brazo corto del cromosoma 6<sup>10-13</sup>. Aparte de esta región, algunos estudios han identificado otros genes, entre los que destacan la región de la cadena  $\beta$  del receptor de la célula T (TCR) en el cromosoma 7<sup>14-16</sup>, el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina en el cromosoma 19<sup>17</sup> y, en la población finesa, un gen ligado a la proteína básica de la mielina (MBP) en el cromosoma 18<sup>18</sup>.
- Los **estudios étnicos** han permitido establecer la existencia de una susceptibilidad racial, siendo la raza blanca o caucásica la más predispuesta a padecer esta enfermedad. Por otro lado, se ha comprobado que existen poblaciones aparentemente resistentes a la EM como los lapones, maories de Nueva Zelanda, indios de

Norteamérica, gitanos húngaros, etc<sup>19</sup>. Además, **Poser** en 1995, propuso una teoría según la cual la esclerosis múltiple se produciría en las poblaciones con **antecedentes escandinavos**, a través de las invasiones vikingas, que llegaron no sólo a países o regiones situados en el norte como Inglaterra, Irlanda, Islandia o Groenlandia, sino a países situados en el sur de Europa, como Francia y España. Existiría un segundo aporte de genes escandinavos, más importante que el primero de las invasiones vikingas, particularmente a los EE.UU. en épocas muy posteriores, propiciadas por las migraciones europeas debidas a la colonización, primero, y luego a las guerras y hambrunas padecidas en Europa<sup>20</sup>.

Por todo lo expuesto anteriormente, se considera que en la esclerosis múltiple existe un factor genético de susceptibilidad, compatible con una herencia poligénica.

4 A favor de la **hipótesis ambiental** podemos citar los siguientes aspectos:

- Los **estudios de prevalencia** han permitido apreciar una distribución irregular por todo el mundo, detectándose mayores frecuencias entre los 40 y 60 grados de latitud norte. Entre los años setenta y ochenta, Kurtzke definió **zonas de riesgo alto** (>30 casos/100.000 habitantes), **riesgo medio** (5-25 casos/100.000) y **bajo** (<5 casos/100.000). Posteriormente, al repetirse los estudios y al realizar otros más detallados, se han podido apreciar aumentos muy llamativos definiéndose estas zonas de riesgo en >100, 50-100 y <50. España se encuentra en una zona de riesgo medio-alto (53-65 casos/100.000 habitantes)<sup>19,21-23</sup>. Estudios poblacionales también han permitido saber que la EM es más frecuente en el **sexo femenino** y la proporción aproximada es **2:1**<sup>24,25</sup>.
- La **incidencia** de la esclerosis múltiple ha cambiado en periodos cortos de tiempo lo que se explicaría mejor por una alteración ambiental que por la genética. Se han apreciado **aumentos** de incidencia (condado de Olmsted en Minnesota, EE.UU.; Sassari en Cerdeña, etc.) y también **disminuciones** (Gotemburgo en Suecia; Islas Órcadas en Dinamarca, etc.)<sup>21</sup>. Además, se han descrito **focos** y **epidemias**. Éstas últimas tuvieron lugar en Islandia y en las islas Faroe después de la Segunda Guerra

Mundial y fueron investigadas por Kurtzke en 1995. Él postuló que este aumento de frecuencia era debido a la presencia de tropas británicas en la zona dos años antes y a un posible factor infeccioso transmitido por estos soldados. Ambos tipos de hallazgos, focos y epidemias, apoyan la existencia de un origen ambiental, aunque son muy cuestionados debido a las dificultades metodológicas, y no han conducido a ninguna conclusión respecto a la causa de la enfermedad<sup>21</sup>.

- **Estudios en emigrantes** han podido constatar la existencia de un periodo de susceptibilidad a “contraer” la enfermedad, entre los 10 y los 15 años de edad, siendo el periodo de latencia de 18-20 años. La susceptibilidad en la descendencia de los emigrantes difiere de la de sus progenitores<sup>19</sup>.
- ◆ **Origen viral:** las evidencias de una causa viral son indirectas, pues no se ha logrado aislar de forma reproducible ningún virus, ni partícula viral en tejidos de EM, y se basan en datos epidemiológicos de estudios caso-control y en datos serológicos. Los virus que en alguna ocasión han sido implicados en la etiología de la enfermedad son: el virus del moquillo canino, el virus del sarampión, el virus de varicela zóster, el virus de la encefalitis por garrapatas y, en especial, el virus del herpes HHV6<sup>26</sup> y el retrovirus HTLV-I<sup>19,21</sup>. Recientemente, se ha encontrado una asociación muy fuerte de la enfermedad con la bacteria *Chlamydia pneumoniae*<sup>27</sup>.
- Del estudio de los **factores geoclimáticos**, destaca la asociación entre la esclerosis múltiple y los climas fríos y, en relación probablemente con éstos, la humedad y la lluvia<sup>19</sup>.
- En cuanto a los **aspectos socioculturales** se ha hallado una asociación con la ingesta de grasa de origen animal, carne y productos de granja<sup>19</sup>.

Como conclusión de los estudios genéticos y epidemiológicos, podemos decir que la esclerosis múltiple se expresaría en sujetos genéticamente predispuestos sobre los que por azar incidiría un factor ambiental desconocido, que pondría en marcha un proceso

inmunitario anormal (autoinmunidad) que, a su vez, sería el causante de la inflamación y la desmielinización propias de la enfermedad.

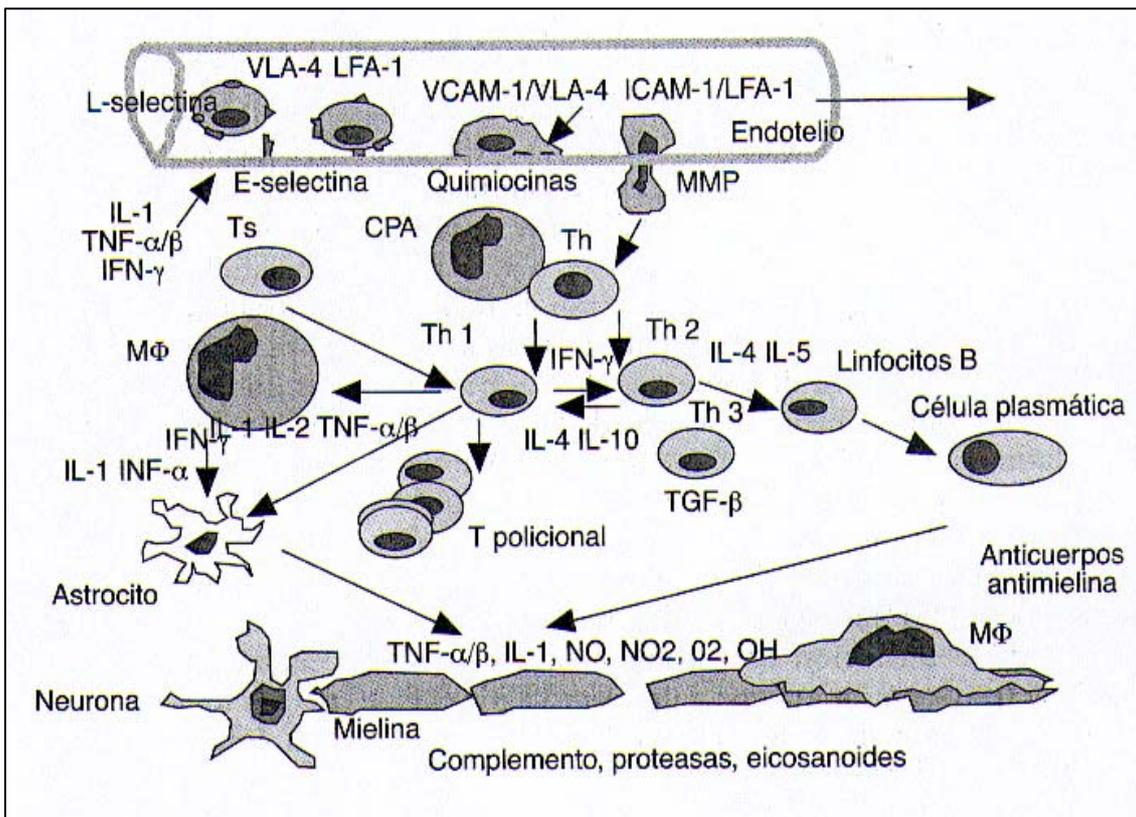
#### I.G. MECANISMO INMUNOLÓGICO

La autoinmunidad existente en los pacientes de esclerosis múltiple está respaldada por datos inmunológicos procedentes del estudio de las lesiones neurológicas agudas. En ellas se detectan células **T colaboradoras** (o *helper*) **CD4<sup>+</sup>** y la expresión de forma anómala de antígenos MHC de clase II por macrófagos y astrocitos. Existe además, una activación de **células B** demostrada por la presencia de inmunoglobulinas sintetizadas intratecalmente en el sistema nervioso central.

La predisposición hereditaria, combinada con el factor ambiental desconocido, establecen o mantienen **células T autorreactivas**, que tras un periodo de latencia de 10-20 años serán activadas por un factor sistémico o local (infección viral, puerperio, etc.) mediante un mecanismo de **mimetismo molecular** (epítomos compartidos por la mielina y los posibles agentes infecciosos) o por una **estimulación** a través de **superantígenos** virales o bacterianos. Una vez activadas, estas células T pasan selectivamente la barrera hematoencefálica (BHE) y al ser expuestas de nuevo a su autoantígeno, inician una reacción inflamatoria tipo Th1.

El **mecanismo** por el cual los **linfocitos T sistémicos penetran** en el **SNC no se conoce** en su totalidad, pero se sabe que se trata de un proceso desarrollado en varios pasos secuenciales<sup>28</sup>. Inicialmente, las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF- $\alpha$  inducen un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1. Las selectinas endoteliales establecen enlaces débiles con los ligandos leucocitarios que hacen a los leucocitos rodar sobre la pared vascular en la dirección de la corriente sanguínea. El deslizamiento permite a la célula recibir el estímulo de quimiocinas que, a su vez, conduce la activación y el cambio conformacional de las integrinas leucocitarias LFA-1 y VLA-4. Así, las integrinas se unen a sus respectivos ligandos (ICAM-1 y VCAM-1) mediante enlaces estables. Es entonces cuando las células se deforman y atraviesan el endotelio. Para la extravasación se requiere, por un lado, la interacción de

ICAM-1/LFA-1, así como la de otras moléculas de adhesión y, por otro, la producción linfocitaria de proteasas que degraden la matriz extracelular (metaloproteasas de la matriz o MMP: MMP-2 y MMP-9). En este momento ejercen un papel importante las quimiocinas, en especial las quimiocinas C-C (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, RANTES y la linfotactina), que son las encargadas del reclutamiento selectivo de los macrófagos y los linfocitos T<sup>29,30</sup>.



*Patogenia de la esclerosis múltiple. Elementos celulares y humorales participantes en la cascada patogénica*

Una vez en el SNC, el linfocito T activado encuentra a una célula presentadora de antígeno (macrófago o microglía) que expresa en su superficie el antígeno responsable de la esclerosis múltiple en el contexto de una molécula HLA de clase II y de las moléculas coestimuladoras. El antígeno es el factor más desconocido y, aún más, es preciso tener en cuenta que puede existir más de un autoantígeno capaz de desencadenar la respuesta autoinmune y que el o los antígenos que inician la enfermedad pueden no ser los mismos que la perpetúan. Las proteínas mielínicas del SNC implicadas en la autorreactividad de la

células T incluyen: MBP (proteína básica de la mielina), MOG (glucoproteína mielínica oligodendrocitaria), MAG (glicoproteína asociada a la mielina), PLP (proteína proteolípídica),  $\alpha$ B-cristalina, transaldolasa, fosfodiesterasas y otras proteínas no mielínicas, como las HSP (proteínas de choque térmico)<sup>31</sup>, los antígenos astrocitarios (proteína S100), algunos antígenos endoteliales y factores nucleares<sup>32</sup>.

Las moléculas coestimuladoras son tanto citocinas como moléculas de membrana. La interferencia sobre estos sistemas coestimuladores induce anergia, dando idea de su relevante papel en la regulación de la respuesta inmunitaria celular. Estas moléculas son reguladas, a su vez, en diversos niveles mediante citocinas como la IL-4 e IFN- $\gamma$  que aumentan su expresión, o como la IL-10 que la disminuye. Los sistemas coestimuladores más implicados en la patogenia de la esclerosis múltiple son la vía del CD28/CTLA4-CD80/CD86 y el sistema CD40-CD40L. En las lesiones agudas se ha encontrado aumento en la expresión de CD80, CD86 y CD40L<sup>33</sup>.

Una vez constituido el complejo trimolecular (receptor de la célula T o TCR, el antígeno y la molécula HLA de clase II), las células T, que son de fenotipo colaborador CD4 tipo 1 (Th1) producen citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) y quimiocinas, que inducen la proliferación clonal de células T y que atraen a los macrófagos y a la microglía, activándolos, con lo que se pone en marcha la inflamación. Los linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2) liberan citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) que tienden a regular a la baja el estado proinflamatorio del sistema inmunitario y, además, inducen la proliferación de células B y la consiguiente elaboración de anticuerpos. El equilibrio entre las distintas citocinas y de sus concentraciones determina en gran medida el sentido de la reacción inmunitaria de todo el proceso<sup>34</sup>.

La **desmielinización** puede producirse por **mecanismos celulares y humorales**:

$\pi$  Entre los **mecanismos celulares** destaca el ataque directo a los oligodendrocitos por los **linfocitos T  $\gamma\delta$** <sup>35</sup>, que no tienen restricción MHC y que están presentes en las lesiones neurológicas. Los oligodendrocitos también podrían

ser dañados como “espectadores inocentes” de la reacción inflamatoria debido a la producción por parte de las células T de, por un lado, **TNF- $\beta$**  que induce la apoptosis de estos oligodendrocitos y, por otro, de **perforinas** que dan lugar a un aumento del calcio intracelular y que originan poros en la membrana provocando su muerte. Además, los **macrófagos estimulados** también producen **sustancias** potencialmente **tóxicas** como proteasas, radicales libres, óxido nítrico y TNF- $\alpha$  que podrían desempeñar un importante papel en la desmielinización<sup>36</sup>.

$\pi$  Los **mecanismos humorales** están presentes en la esclerosis múltiple al producirse el paso de **células B** a través de la BHE dañada y sintetizar **anticuerpos** intratecalmente. En estos pacientes se encuentran **anti-MBP** y **anti-MOG**. En este sentido, la desmielinización la producirían los anticuerpos mediante la activación del complemento, que pondría en marcha el complejo de ataque a la membrana, y la atracción de los macrófagos que liberarían las sustancias tóxicas ya mencionadas anteriormente<sup>37</sup>.

En la esclerosis múltiple la **remielinización** es incompleta y existen varias posibles explicaciones, basadas en que los episodios repetidos de desmielinización producirían la depleción de las células progenitoras del oligodendrocito o la muerte de las mismas por la falta de los factores de crecimiento específicos<sup>38</sup>.

## I.H. MODELOS ANIMALES

El acceso restringido al tejido afectado cuando las lesiones están desarrollándose ha significado que la investigación de los mecanismos del daño mielínico haya dependido de los modelos animales. Existen dos modelos animales de EM:

***Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)***. La EAE es el modelo más relevante para la investigación de la EM<sup>39,40</sup>. La inmunización de pequeños animales con cerebro o médula homogeneizados, extractos encefalitógenos o proteína básica de mielina en adyuvante produce una encefalitis que se ha asemejado a la esclerosis múltiple. Las células T de estos animales inmunizados pueden desencadenar los efectos

clínicos y patológicos de la enfermedad, lo que sugiere que la EAE, y la EM por analogía, está mediada por células T sensibilizadas a la MBP. Sin embargo, esta conclusión no es satisfactoria a nivel clínico debido a que la EAE es una patología monofásica mientras que el curso de la EM es multifásico. Investigaciones posteriores han mostrado que es posible producir una variante de EAE con recaídas mediante la alteración del protocolo de inmunización con MBP y empleando animales jóvenes. Otro problema con esta conclusión es la observación de que, la inmunización con componentes menores de la membrana mielínica o, incluso, antígenos del endotelio cerebral, puede también conducir a una encefalomiелitis autoinmune experimental. Para complicar aún más el tema, la EAE no puede ser inducida por células T cuando se priva al animal de complemento y macrófagos. Esto muestra que la desmielinización experimental requiere tanto factores celulares como humorales.

Determinadas **infecciones víricas** pueden producir *lesiones* en el *SNC*<sup>41</sup> por el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria a neoantígenos víricos que está mediada por células T y que produce la inflamación del tejido nervioso. Los ejemplos más destacados son la encefalitis vírica de Theiler, el virus de la hepatitis en ratón y el virus del sarampión en ratas.

## I.I. TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

En la esclerosis múltiple no existe una terapia curativa porque no se conoce la causa de la enfermedad. El tratamiento actual está basado en dos pilares fundamentales:

- a) La infusión de dosis altas de **glucocorticoides** (la ACTH, que induce la síntesis de estas moléculas en las glándulas suprarrenales, metilprednisolona por vía intravenosa o prednisona por vía oral) constituyen los fármacos estándar en la **fase aguda** de los **brotes**. Aunque su modo de acción no se conoce exactamente, sí se sabe que inhibe la transcripción de ciertos genes implicados en la inflamación (ej: E-selectina) lo que explicaría sus potentes efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores. Son capaces de paliar el daño de la barrera hematoencefálica, disminuyen las moléculas de adhesión solubles y producen un aumento en la expresión del mRNA de la IL-10. Esta terapia

**disminuye** la **duración** del **ataque inmunológico** pero **no previene** de **futuros episodios ni modifica** el **curso** de la enfermedad<sup>42</sup>.

b) La administración de **interferón- $\beta$  (IFN- $\beta$ )** de modo **crónico** se emplea para **disminuir** la tasa de **brotos** y la **progresión** de la enfermedad. Su mecanismo de acción es complejo<sup>36,43</sup> e incluye los siguientes procesos:

- ◆ Disminución de la actividad de las citocinas proinflamatorias de tipo Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ )<sup>44</sup> y aumento de la respuesta linfocitaria de tipo Th2 mediante la inducción de las citocinas IL-4 e IL-10<sup>45</sup>. También se ha podido comprobar que esta molécula tiene efectos proinflamatorios, como la aparición del síndrome seudogripal, debidos a una producción de IL-6 que acompaña a una supresión del TNF.
- ◆ Inhibición de las células T autorreactivas<sup>46</sup>.
- ◆ Inhibición de la expresión de moléculas MHC de clase II con disminución de la presencia antigénica en el SNC<sup>47</sup>.
- ◆ Inhibición de las metaloproteasas<sup>48</sup> o alteración de la expresión de moléculas de adhesión<sup>49</sup> produciendo una reducción en la migración celular hacia el SNC.

Hoy en día disponemos de tres preparados comerciales de IFN- $\beta$ :

- IFN $\beta$ -1b (Betaferón®): recombinante del IFN- $\beta$  humano y no glucosilado (sustitución de una cisteína por una serina).
- IFN $\beta$ -1a (Avonex® y Rebif®): recombinante del IFN- $\beta$  humano, glucosilado y con una secuencia de aminoácidos idéntica al IFN- $\beta$  natural.

No se puede predecir antes de iniciar el tratamiento con IFN- $\beta$  qué pacientes van a responder al mismo y quiénes no. Esto implica que no hemos de hacer ninguna discriminación antes de iniciar el tratamiento si el paciente cumple los criterios establecidos. Por otro lado, actualmente no están establecidos criterios estrictos de falta de respuesta al tratamiento, y únicamente la experiencia clínica acumulada indica qué paciente no está respondiendo. Además, tampoco se dispone de marcadores que informen de la respuesta. Todo esto hace justificable la realización de estudios que nos

permitan identificar a aquellos pacientes con mala respuesta para intentar llevar a cabo otras alternativas terapéuticas. Entre éstas se incluyen:

### **Copaxone® o Copolimero-1**

Se trata de un oligopéptido sintético (glatirameracetato o GLAT) cuyos efectos fueron demostrados en estudios experimentales con el mejoramiento de la EAE. Este tratamiento se utiliza como terapia alternativa en los pacientes EM-RR sin importantes discapacidades funcionales en los que el IFN- $\beta$  no ha proporcionado ningún efecto positivo o su administración les ha producido serios efectos adversos<sup>50-53</sup>.

### **Inmunoglobulinas (clase IgG) por vía intravenosa**

Su eficacia terapéutica ha sido establecida en una gran variedad de enfermedades del sistema nervioso periférico<sup>54</sup>. Aunque distintos autores no recomiendan su utilización como primer fármaco de elección, se ha podido observar en la forma remitente-recurrente evidencias de su participación en el proceso de remielinización<sup>55-57</sup>.

### **Azatioprina**

Azatioprina es un análogo inmunosupresor de una purina que presenta una larga tradición en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Los ensayos clínicos realizados con este fármaco no han proporcionado datos fiables acerca de su eficacia por lo que los distintos consorcios no han aprobado su utilización como terapia preferente. Únicamente se recomienda a nivel profiláctico para aquellos enfermos que no han tolerado los fármacos de primer orden. Para una aplicación futura de azatioprina en la EM se deberán realizar estudios de comparación y/o combinación con el IFN- $\beta$ <sup>58,59</sup>.

### **Mitoxantrone (Novantrone®)**

Es un citostático que se utiliza frecuentemente en el tratamiento de neoplasias malignas. Entre sus efectos inmunosupresores en animales se encuentra su fuerte acción antiproliferativa sobre los linfocitos B<sup>60</sup>. De los ensayos clínicos se ha podido observar cómo se trata de una droga muy efectiva en la reducción del número de brotes y en la inhibición de la progresión de la EM, sin embargo, debido a sus severos efectos secundarios (ej: cardiomiopatía congestiva) y a su acumulación en el organismo por su

elevada vida media (6 días) se ha decidido que sólo se debe utilizar en los pacientes con un elevado ratio de brotes y una incompleta remisión o en aquellos en los que el IFN- $\beta$  no ha funcionado<sup>61,62</sup>.

### **Ciclofosfamida**

No existen muchos datos disponibles acerca de este fármaco en el tratamiento de la EM y los que hay son conflictivos<sup>63,64</sup>. Los distintos grupos de investigación han considerado esta droga válida en los pacientes que no han respondido a otras terapias.

### **Otros tratamientos inmunosupresores**

Los resultados obtenidos de ensayos clínicos con otros fármacos o tratamientos inmunosupresores como la ciclosporina A, linomida, sulfasalazin, mielina oral, plasmaféresis, trasplante de células madre, proteasas o inhibidores de fosfodiesterasas no han sido suficientemente concluyentes para justificar su uso en la población general. Además, muchos de los ensayos han tenido que suspenderse por su elevada toxicidad (ej: linomida).

### **Vacunas**

La vacunación de ratones SJL/J con un péptido sintético de 18 aminácidos procedente de la tercera región hipervariable de la cadena  $\beta$  de la molécula de clase II murina IAs produjo la síntesis de anticuerpos anti-IAs que trataron la EAE<sup>65,66</sup>. En pacientes EM con la forma secundaria-progresiva se probó una vacuna que consistía en un complejo solubilizado formado por el antígeno DR2 y un fragmento de la proteína básica de la mielina denominado 84-102 (AG284). Aunque el estudio fue seguro y bien tolerado se necesitarán futuros ensayos para determinar la actividad biológica y la eficacia clínica de este potente tratamiento<sup>67</sup>.

Los **mecanismos exactos** a través de los cuales estos **medicamentos** son **eficaces no se conocen**. **Establecer** estos **mecanismos** supondría, por un lado, un **mejor entendimiento** de la **patogenia** de la enfermedad **y**, por otro, un posible **conocimiento** de los **marcadores de actividad** del proceso patológico.

## I.J. GENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Como hemos mencionado anteriormente, los estudios de prevalencia en esclerosis múltiple han dejado claro que la distribución irregular de la enfermedad depende no sólo de factores ambientales sino, además, de otro componente muy importante, el riesgo genético. Los datos de que se dispone **no** son compatibles con la existencia de un **gen único** responsable de la susceptibilidad, sino más bien con la **interacción** de **varios genes independientes**<sup>68</sup>.

Los genes candidatos son los genes que por su función se supone que desempeñan un papel decisivo en el desencadenamiento de una enfermedad. En patologías como la EM, en la que se ignoran detalles esenciales de la etiología, la tarea de adjudicar funciones patogénicas es realmente difícil. Hay que recordar que con el estudio de la encefalomiелitis autoinmune experimental, se admite que la EM es una enfermedad mediada por el sistema inmunitario a través de una reacción denominada hipersensibilidad de tipo retardado en la que linfocitos T, macrófagos y anticuerpos reaccionan de manera desfavorable dentro de la sustancia blanca del SNC, produciendo áreas desmielinizadas con proliferación astrocitaria y, en ocasiones, daño axonal. Con este esquema patogénico no es de extrañar que los genes más estudiados en esta enfermedad sean, por un lado, los que controlan la respuesta inmunitaria y, por otro, los relacionados con proteínas estructurales de la sustancia blanca. En esta tesis nos vamos a centrar en los primeros, localizados principalmente en el complejo mayor de histocompatibilidad o antígeno leucocitario humano.

En el año 1996, tres equipos de investigación diferentes procedentes de Canadá<sup>10</sup>, Inglaterra<sup>12</sup> y Estados Unidos<sup>11</sup>, realizaron **tres barridos genómicos** en familias multiplex utilizando una gran variedad de marcadores polimórficos. Aunque los resultados obtenidos no concordaron totalmente, sí coincidieron en asignar al **MHC** el **principal y más importante determinante genético** presente en los enfermos de esclerosis múltiple. Existe, además, un **cuarto** barrido genómico realizado por un equipo finlandés<sup>13</sup> que se diferencia de los anteriores por el estudio de tres regiones homólogas a tres regiones del ratón asociadas a la EAE. En este caso, el *screening* se efectuó en familias

multiplex en las que el ligamiento del MHC y la proteína básica de la mielina ya se conocía. En esta investigación se determinó que el cromosoma ligado a la enfermedad era el 5. A pesar de que estos cuatro grupos de científicos han observado que la contribución de este sistema HLA no es tan fuerte como en otras enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide o la diabetes mellitus tipo I, consideramos de gran interés su estudio.

La investigación realizada en esta tesis ha sido dividida en dos partes:

### I.J.1. ESTUDIO GENÉTICO **DENTRO** DEL MHC

Antes de explicar detalladamente cada uno de los genes estudiados, quisiéramos introducir brevemente la importante función que desempeña el sistema MHC en nuestro organismo.

#### **COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)**

El estudio de la base genética de las enfermedades inmunológicas hunde sus raíces en los análisis del rechazo de aloinjertos entre cepas de ratones. Benacerraf<sup>69</sup> y otros pioneros acuñaron el término de genes **Ir** (*immune response*) para referirse al locus que determinaba el patrón de rechazo o tolerancia al tejido transplantado. Una gran variedad de técnicas celulares y serológicas fueron ampliando aquel concepto primitivo y revelaron la existencia de un conjunto de genes, el MHC, que parecía controlar diversos aspectos de la respuesta inmunitaria. Con la percepción de que estos genes MHC (en humanos se denomina HLA) se caracterizaban por su elevado polimorfismo, parecía natural buscar entre los diversos alelos aquéllos que confirieran susceptibilidad a padecer enfermedades de sospechada base inmunológica.

Los genes del MHC se caracterizan por ser los más polimórficos de los que se encuentran en el genoma de todas las especies analizadas. Se han identificado más de

150 alelos para algunos de los loci del HLA mediante análisis serológicos y, más recientemente, mediante secuenciación molecular.

Los genes del MHC se expresan de manera codominante en cada individuo. En otras palabras, cada persona expresa los alelos del HLA en los dos cromosomas heredados de los padres. Para el individuo esto aumenta al máximo el número de moléculas de MHC disponibles para ligar péptidos y presentarlos a las células T.

El descubrimiento de la capacidad de respuesta inmunitaria ligada al MHC condujo a la conclusión de que los genes de este sistema controlan no sólo el rechazo al injerto, como ya hemos mencionado antes, sino también las reacciones inmunológicas a todos los antígenos proteicos. Todos estos avances llevaron al estudio de este complejo al primer plano de la investigación inmunológica.

### Localización y estructura del MHC

El locus MHC está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, concretamente en la región 6p21, y contiene cerca de 4 millones de pares de bases secuenciados ya desde 1999<sup>70</sup>. Los genes incluidos en este sistema son, con mucho, los más y mejor estudiados de todo el genoma en la EM, y además siguen siendo, según reiterados estudios, los más relacionados con la susceptibilidad genética a padecer esta enfermedad. Por orden centrómero^telómero, el HLA se subdivide en tres clases o regiones (véase esquema del HLA en la página 36):

- a) **clase II**: constituida por genes que codifican para las moléculas de clase II, encargadas de presentar péptidos a los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Entre éstos destacan los loci HLA-DR y DQ.
- b) **clase III**: alberga genes cuyas proteínas intervienen en distintas reacciones del sistema inmunitario. Entre otros, se encuentran algunos genes del complemento (C2, C4, Bf), el gen del factor de necrosis tumoral, la linfoxina, el gen IKBL y el gen HSP70.

- c) **clase I**: formada por genes que codifican para moléculas de clase I, HLA-A, HLA-B, HLA-C, etc., cuyas formas clásicas son las responsables de la presentación peptídica a los linfocitos CD8<sup>+</sup>.

El conjunto de alelos del MHC, que en la especie humana reciben una designación numérica (ej: HLA-DR2, HLA-B5, etc.), forman **haplotipos** diferentes: uno materno y otro paterno. El fenómeno mediante el cual algunos alelos del HLA que se encuentran en distintos loci se heredan juntos con mayor frecuencia de la que cabría esperar por azar se denomina **desequilibrio de ligamiento**.

#### I.J.1.a. MOLÉCULA DE CLASE II HLA-DR

El estudio de la estructura y complejidad del MHC<sup>71</sup>, junto con el hallazgo de la capacidad presentadora de péptidos de las moléculas de clase I y clase II, han llevado a diferentes hipótesis para explicar las asociaciones encontradas entre ciertos alelos del HLA y determinadas enfermedades autoinmunes. En 1973 un descubrimiento clave estableció la asociación entre el alelo de clase I HLA-B27 y la espondilitis anquilosante. A esta determinación siguieron numerosas comunicaciones estableciendo asociaciones entre el DR4 y la artritis reumatoide, el DR3 y el lupus eritematoso, DR2 y narcolepsia, etc.

Si bien en algunos casos el alelo asociado podría estar simplemente en desequilibrio de ligamiento con el gen 'responsable' y heredarse junto con él, en otros se postula que es el propio alelo asociado el que directamente juega un papel patogénico clave. Se sabe que diferentes alelos del gen DRB1, que codifica la cadena β de la molécula de clase II DR, otorgan a dicha molécula la capacidad de unirse a diferentes péptidos. Bien podría pensarse que la unión de un péptido derivado de un autoantígeno fuera un factor desencadenante de la respuesta inmune. En este sentido, diversos autores han destacado la fuerte asociación que existe entre la **esclerosis múltiple** y el alelo **HLA-DR2** y su correspondiente haplotipo **DRB1\*1501/DQA1\*0102/DQB1\*0602**<sup>72</sup>.

Estudios recientes en **ratones transgénicos** para la molécula **DR2**<sup>73,74</sup> indicaron que tras la inmunización con proteínas mielínicas los animales desarrollaban

encefalomielitis autoinmune experimental. En éstos, el daño neurológico se producía por la generación de células T autorreactivas productoras de citocinas Th1. Los datos obtenidos en ambas investigaciones proporcionaron resultados convincentes, válidos y aplicables a la esclerosis múltiple.

Abundando en esta idea de la presentación antigénica como origen de la enfermedad, existen estudios que demuestran la importancia adquirida de diferentes alelos de los genes  $V\alpha$  del TCR y de los genes de inmunoglobulinas en la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple<sup>75</sup>.

Aparte de las moléculas de clase II, los genes estudiados en el MHC fueron:

#### I.J.1.b. GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

Una de las citocinas estrella en el panorama actual de la inmunología es el **TNF** o **Factor de Necrosis Tumoral**. Identificada originariamente en 1965 como la sustancia que confería capacidades citotóxicas a los sobrenadantes de cultivos linfocitarios, se pueden rastrear sus efectos en algunos resultados obtenidos ya en el siglo XIX<sup>76</sup>.

El TNF- $\alpha$  humano se sintetiza inicialmente como un precursor de 26 kDa que permanece anclado en la membrana citoplasmática. De su liberación se encarga una enzima denominada TACE (*TNF- $\alpha$  converting enzyme*), que produce un fragmento soluble de 17 kDa que circula como un trímero. Esta molécula trimérica, de la cual se conoce su estructura, capacita al TNF para agregar a sus receptores, paso necesario en la transducción de señales<sup>77-79</sup>.

Esta citocina proinflamatoria pleiotrópica está **producida** por **macrófagos activados** y por **células T**, y **regula casi** todos los procesos implicados en la **respuesta inmunitaria**: activación de los monocitos y células dendríticas, adhesión de células endoteliales, organización de los tejidos linfoides, colabora en la inducción de proteínas de fase aguda, etc.

Existen tres genes homólogos en la **familia del TNF**: **TNF- $\alpha$** , **LT- $\alpha$**  (linfotoxina- $\alpha$  o también llamada TNF- $\beta$ ) y **LT- $\beta$** . Estos tres genes se encuentran estrechamente ligados en el seno de la región de clase III del HLA (véase esquema del HLA en la página 36) y los tres son homólogos de CD154 (CD40L) y FasL.

Los **receptores** de alta afinidad del **TNF** se expresan en una gran variedad de células del organismo. Existen dos receptores llamados **p55 (TNFRI)** y **p75 (TNFRII)**, atendiendo a su masa molecular. Sus principales características son las siguientes:

- El **TNFRI** posee un dominio mortal (*death domain*) al igual que Fas<sup>78</sup> mediante el cual interacciona con otras moléculas que inducen apoptosis, en un proceso que ha sido recientemente dilucidado. El dominio citoplasmático del TNFRI capta a una proteína denominada TRADD, que además de un dominio mortal mediante el cual intercede con p55, tiene un dominio efector de muerte que interacciona con un dominio similar existente en FLICE. FLICE es una proteasa que activa a otras proteasas que desencadenan la muerte celular programada (lo que se conoce como la cascada de las caspasas).
- El **TNFRII** carece de dominio mortal, pero tiene homología de secuencia con la región citoplásmica de CD40, lo que se conoce como dominio TRAF, por lo que no está claro el mecanismo mediante el cual induce apoptosis; quizás sea vía activación de la quinasa del extremo amino de c-Jun, JNK. Sí se sabe que p75 provoca la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B (*nuclear factor*  $\kappa$ B) mediada por TRAF2, y que esta activación de NF $\kappa$ B antagoniza la apoptosis mediada por TNF<sup>80</sup>.

Varios estudios recientes en ratones deficientes en TNF o linfotoxinas así como en sus receptores han demostrado que estas citocinas no solamente median funciones efectoras citotóxicas, como sugieren sus nombres, sino que también están implicadas en la organogénesis linfoide<sup>81</sup>.

En cuanto a los efectos del **TNF** en el proceso de la **desmielinización**, esta citocina presenta dos acciones independientes. Por un lado, inhibe la inducción de la

autoinmunidad al mediar la muerte celular producida por la activación de los linfocitos T y, por otro, regula los mecanismos efectores en el daño tisular<sup>82,83</sup>.

Ya sabemos que la lesión existente en el sistema nervioso central está producida por células que atraviesan la barrera hematoencefálica por mecanismos activos. Sin embargo, esta barrera no está tan dañada como para permitir el paso libre de proteínas plasmáticas al líquido cefalorraquídeo. En el **campo farmacológico**, esto es aplicable a la molécula del **infiximab** (anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ ) o del **etanercept** (receptor de TNF solubilizado tipo II), tratamientos que no consiguen inhibir el mecanismo efector causante de la destrucción de la vaina de mielina y, por tanto, no mejoran la condición desmielinizante. En cambio, la administración sistémica de **anticuerpos anti-TNF** disminuye la eliminación de células T autorreactivas, que éstas sí pueden atravesar la BHE. De esta manera, se generan mayor número de células potencialmente reactivas que al alcanzar el tejido neurológico dañan sus estructuras<sup>84</sup>.

## **POLIMORFISMOS EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN TNFA**

En el **promotor** del **gen TNFA** hemos estudiado **tres mutaciones puntuales** que podrían intervenir en la regulación de la transcripción. Son las posiciones polimórficas: **-238**, **-308** y **-376** caracterizadas porque en la mayoría de la población están ocupadas por una **guanina** aunque también existen alelos con **adenina**<sup>85,86</sup> (véase el esquema del HLA en la página 36). Estudios funcionales han demostrado la importancia de estas sustituciones en la actividad del promotor medida en ensayos con genes *reporter*<sup>87</sup>. Dado que existen investigaciones que demuestran la susceptibilidad que alguna de estas variantes proporciona a padecer enfermedades de base inmunológica (sirva como ejemplo la frecuencia incrementada del alelo -308A entre los afectados de malaria cerebral<sup>88</sup>), hemos considerado importante profundizar en su estudio en EM.

### **I.J.1.c. GEN MIC-A**

Dentro de los genes no clásicos de clase I, ha recibido especial atención el denominado **MIC-A** (*MHC class I chain-related gene A*)<sup>89</sup>. Fue clonado en el año

1996 y se observó homología de secuencia con los genes humanos de clase I. Codifica para proteínas de la membrana celular y presenta en su estructura tres dominios extracelulares. Los dos primeros guardan homología con los dominios de unión a péptidos de las moléculas de clase I, y el tercero se asemeja estructuralmente a un dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Sigue a estos tres dominios un segmento de transmembrana de unos 20 aminoácidos aproximadamente y una corta secuencia intracitoplasmática.

El gen MIC-A se encuentra en la región centromérica de **clase I** (concretamente a 47 kb *upstream* del locus HLA-B), **fronteriza** con la región telomérica de **clase III** (véase el esquema del HLA de la página 36) y contiene 5 exones. Tras un primer exón que codifica para el péptido líder, los tres exones siguientes codifican los tres dominios proteicos. Un quinto exón codifica el segmento de transmembrana y el sexto y último codifica la porción intracitoplasmática de la molécula.

La **proteína MICA** es un **ligando** para el **receptor** de células *natural Killer*, **NKG2d**, que se encuentra en las células NK, células T  $\gamma/\delta$  y células T  $\alpha/\beta$  CD8<sup>+</sup>. A diferencia de las moléculas clásicas del HLA de clase I, MICA no se une en la superficie de la célula a la  $\beta$ 2 microglobulina y, además, no parece que presente péptidos. Tampoco, la expresión de esta molécula es ubicua como las formas clásicas, sino que se sintetiza en células sometidas a estrés (ej: las células tumorales).

El receptor NKG2d forma un heterodímero en la membrana de la célula con la molécula DAP10, que sirve como correceptor transductor de señales. La cascada señalizadora parece comenzar con la activación de la PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa) por la porción intracitoplasmática de la molécula adaptadora DAP10. Es importante destacar que al no ser esta activación mediada por un motivo ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activating motif*), no es inhibible por receptores portadores de motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) presentes en la misma célula. De ahí que la señal activadora proporcionada por la unión del ligando MICA sea dominante sobre otras señales inhibitorias emanantes de la misma célula, como las generadas por las propias moléculas de clase I. La respuesta de la célula estimulada por este receptor

(NKG2d/DAP10) consiste en un disparo de la actividad citotóxica y en un incremento de la síntesis de citocinas entre las que destaca el interferón- $\gamma$ <sup>90</sup>. El estudio de **MICA** en la **esclerosis múltiple** resulta muy interesante porque este ligando activa a las células  $\gamma/\delta$  presentes en la forma crónica de la enfermedad<sup>91</sup>.

### **POLIMORFISMO EN EL GEN MIC-A**

El gen MIC-A comparte un alto grado de polimorfismo con sus homólogos clásicos de clase I. Sin embargo, a diferencia de éstos, los aminoácidos polimórficos no se limitan a la región que correspondería al dominio de unión al péptido, sino que se encuentran repartidos por toda la molécula y no se conoce su significado funcional. Además de en la parte extracelular, aparece otro **polimorfismo exónico** en el **segmento** que **cruza la membrana**. Se trata de un triplete **GCT repetido**, que codifica un residuo de **alanina** y que puede aparecer 4, 5, 6, 9<sup>92</sup>, o 10 veces<sup>93</sup>. Adicionalmente existe un alelo, denominado 5.1, que se caracteriza por la inserción de un nucleótido que cambia la pauta de lectura del mensajero. La proteína codificada por alelos en los cuales el segmento de transmembrana presenta esta inserción no se expresa en la superficie de la célula. Aunque se especuló en un primer momento con la posible liberación al medio de esta proteína, estudios más recientes parecen indicar que esta forma no llega a alcanzar la membrana citoplasmática desde su sitio de síntesis, el retículo endoplasmático rugoso<sup>94</sup>.

#### I.J.1.d. GEN IKBL

Dada la homología existente entre el inhibidor **I $\kappa$ BL** (*inhibitor of NF $\kappa$ B like*) y otros miembros de la familia I $\kappa$ B, esta molécula puede interactuar con el factor de transcripción NF $\kappa$ B<sup>95</sup> y regular la síntesis de muchas citocinas como el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ .

### **POLIMORFISMO EN EL GEN IKBL**

El gen IKBL se encuentra en la parte central del MHC, **telomérico** al locus del **Factor de Necrosis Tumoral** (véase esquema del HLA en la página 36). Presenta un

polimorfismo en la posición **+738** que se caracteriza por la transición de una timina a una citosina<sup>95</sup>. El consiguiente cambio de aminoácido (**cisteína a arginina**) en una zona de la proteína donde se encuentra una diana de fosforilación de la proteinkinasa C (PKC), podría tener importancia funcional. El polimorfismo +738C se ha descrito como un factor de gravedad en la colitis ulcerosa<sup>96</sup> y se ha detectado que está presente **casi exclusivamente** en el **haplotipo ancestral 7.1** (y sus formas recombinantes relacionadas)<sup>95</sup>.

Los **haplotipos ancestrales** son fragmentos de DNA que se extienden a lo largo de todo el HLA y que se transmiten íntegramente de generación a generación. La asignación de los alelos existentes en estos haplotipos deriva del **panel celular 4AOHW** (*Fourth Asia-Oceania Histocompatibility Workshop*) y *workshops* (reuniones) anteriores<sup>97</sup>.

Como la recombinación es más frecuente en dirección centromérica respecto del locus DQ, los haplotipos en esta región están más fragmentados que entre el HLA-B y el HLA-DQ. Estos haplotipos ancestrales “se rompen” en lugares específicos que marcan los límites de bloques conservados y la recombinación dentro de estos bloques es muy rara o no existe<sup>98</sup>.

#### I.J.1.e. RASTREO GENÓMICO: LOCALIZACIÓN DE MICROSATÉLITES

La alternativa al estudio de los genes candidatos causantes de enfermedad es el rastreo de todo el genoma utilizando marcadores anónimos. Son regiones polimórficas denominadas **microsatélites**, generalmente exentas de función codificante, en las que una secuencia corta de bases se repite un número variable de veces causando un diferente genotipo en cada individuo. Parece claro que los datos de los que hasta ahora se disponen no manifiestan la existencia de genes que tengan un papel decisivo en la determinación de la susceptibilidad a la esclerosis múltiple, aunque esta suposición puede deberse a razones metodológicas o a la heterogeneidad de la enfermedad. Con el fin de localizar posibles genes implicados en esta patología analizamos los siguientes microsatélites (véase el esquema del HLA en la página 36):

- En clase III: **DS6273**, **BAT2** y **TNFabcde**
- En clase I: **D6S2223**

En la siguiente tabla vamos a indicar todos los marcadores genéticos estudiados en el complejo mayor de histocompatibilidad incluidos los presentes en los genes anteriormente descritos. Por orden centrómero^telómero encontramos:

MARCADORES GENÉTICOS	LOCALIZACIÓN	REPETICIÓN	NÚMERO DE ALELOS	REFERENCIA
<b>D6S273</b>	Gen G6D	CA	7	99
<b>BAT2</b>	Gen G1	CA	13	100
<b>TNFd</b>	Gen LST-1	CT	6	101
<b>TNFe</b>	Gen LST-1	CT	3	101
<b>PROMOTOR TNFA</b> (véase pág. 24)	Gen TNFA		6 alelos:	
			-238G/A	85
			-308G/A	86
			-376G/A	102
<b>TNFc</b>	Gen LTA	CT	2	103
<b>TNFb</b>	Telomérico al gen LTA	CT	6	103
<b>TNFa</b>	Telomérico al gen LTA	CA	14	103
<b>IκBL</b> (véase pág. 26)	Gen IKBL		2 alelos: +738C/T	95
<b>MICA</b> (véase pág. 26)	Gen MIC-A	GTC (Alanina)	5	94
<b>D6S2223</b>	Telomérico al gen HLA-F	AT o GT	3	104

## I.J.2. ESTUDIO GENÉTICO FUERA DEL MHC

Los genes objeto de estudio fuera de la región del complejo mayor de histocompatibilidad han sido dos: el **gen de la interleucina-10** (IL-10) y el **gen del antagonista del receptor de la IL-1** (IL-1Ra). La elección se realizó en base a la

importancia que presentan estas dos proteínas en la reacción inmunológica y, más concretamente, en la patogenia de la esclerosis múltiple.

#### I.J.2.a. GEN DE LA INTERLEUCINA-10

La **interleucina-10** fue descrita como un factor inhibitorio de la síntesis de citocinas (CSIF)<sup>105</sup>. Su estructura es un homodímero de 34-40 kDa que está constituido por subunidades de 18 kDa<sup>106</sup>.

La IL-10 está producida principalmente por **macrófagos activados** y, debido a que **inhibe** las **respuestas inmunitarias** en las que intervienen estas células, es un excelente ejemplo de regulador de retroalimentación negativa. No está claro si estímulos diferentes inducen la producción de una citocina reguladora como la IL-10 o de citocinas efectoras como el TNF y la IL-12, o si los mismos estímulos inducen la producción de todas estas citocinas, pero con cinéticas distintas. Los linfocitos T también secretan IL-10, citocina que es producida también por algunos tipos celulares no linfoides (ej: queratinocitos). En este sentido, la IL-10 adquiere un papel inmunológico muy importante ya que interviene en el control homeostático de las reacciones de la inmunidad innata y adaptativa<sup>106</sup>.

Los **efectos biológicos** más importantes de la IL-10 son los siguientes<sup>106,107</sup>:

- Inhibe la producción de las citocinas IL-12 y TNF por los macrófagos activados.
- Inhibe también en los macrófagos la expresión de coestimuladores y moléculas de clase II del MHC inactivando así a las células T y terminando las reacciones de la inmunidad celular.
- Estimula la proliferación de células B humanas en cultivos, aunque se desconoce su importancia fisiológica.

El receptor de la IL-10 es un **receptor de citocinas tipo II** que pertenece a la familia del receptor del interferón (IFNR) y que se compone de dos subunidades. Una tiene la capacidad de unir el ligando y la otra es la responsable de transmitir las señales al

interior de la célula. La vía de transducción utilizada es la Jak/Stat y, concretamente, se realiza mediante la Jak1/Stat3<sup>107</sup>.

En ratones **knock-out** para la **IL-10** se desarrolla una enfermedad inflamatoria intestinal, presumiblemente debido a una activación incontrolada de macrófagos que reaccionan frente a microorganismos entéricos. Estos ratones también presentan una lesión tisular y una inflamación excesiva en respuesta a irritantes químicos<sup>108</sup>.

El virus de Epstein-Barr contiene un gen homólogo al de la IL-10 humana (hIL-10), y la IL-10 viral tiene *in vitro* las mismas acciones que la citocina natural. Esto plantea la intrigante posibilidad de que la adquisición del gen de la IL-10 durante la evolución del virus le haya concedido a éste la capacidad de inhibir la inmunidad del huésped y, por tanto, una ventaja de supervivencia en el individuo infectado.

Estudios iniciales del papel de la **IL-10** en la **encefalomielitis autoinmune experimental** mostraron la importante función que desempeña esta citocina en la enfermedad. Por un lado, se pudo observar como en ratas y ratones con EAE existía una recuperación espontánea por la expansión de células Th2 productoras de IL-4 y/o IL-10<sup>109</sup> y, por otro, se detectó una disminución en la producción de esta citocina en aquellos animales con la forma crónica de la EAE. Así surgió la idea de que la IL-10 endógena podía regular patologías del SNC<sup>110</sup>.

El **IFN- $\beta$** , que se utiliza en el tratamiento de la **esclerosis múltiple**, puede inducir la **expresión** de **IL-10** en células mononucleares de sangre periférica. Esta síntesis revelaría que un mecanismo de protección frente al daño neuronal podría ser la producción de esta citocina<sup>107</sup>.

La **interleucina-10** ha sido considerada como un candidato muy atractivo en el **campo farmacológico** por sus potentes **acciones inmunomodulatorias**. Su administración por vía intravenosa o subcutánea en modelos animales con enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, ciertas autoinmidades, cáncer y enfermedades infecciosas ha permitido obtener efectos muy beneficiosos sin ocasionar serios

acontecimientos adversos<sup>111</sup>. Además, en ninguno de estos estudios se observó la producción de anticuerpos neutralizantes. Dos años más tarde, el mismo equipo de investigación<sup>112</sup>, utilizó el recombinante humano de la IL-10 y observó una disminución de la expresión de moléculas HLA-DR en monocitos pero no en células B. Este resultado se correlacionó con los obtenidos en experimentos *in vitro* y determinó la asociación existente entre esta citocina y la inhibición de la presentación antigénica. Por último, la IL-10 ha sido testada en grupos de pacientes con enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis y hepatitis C crónica, y los resultados han sido muy satisfactorios<sup>113</sup>.

### **POLIMORFISMO EN EL GEN HUMANO DE LA IL-10 (hIL-10)**

El **gen** de la **IL-10 humana (hIL-10)** está codificado por **cinco exones** situados en la región 5´-flanqueante y está situado en el **cromosoma 1**<sup>114</sup>.

En esta tesis hemos estudiado las siguientes **regiones variables** o **polimórficas** en el gen de la IL-10 (véase el esquema de la página 36):

- Dos microsatélites **IL-10G** e **IL-10R** caracterizados por la repetición del dinucleótido CA y localizados a 1.2 kb y 4 kb, respectivamente, del origen de transcripción.
- Tres mutaciones puntuales en el promotor de dicho gen: **-1082 (G/A)**, **-819 (C/T)**, y **-592 (C/A)**<sup>107</sup>. Determinados alelos de estas posiciones polimórficas se han visto relacionados con ciertas enfermedades autoinmunes. Concretamente el polimorfismo -1082G, que incrementa la síntesis de esta citocina, está asociado fuertemente al lupus eritematoso sistémico y a la enfermedad meningocócica<sup>107</sup>.

#### **I.J.2.b. ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA INTERLEUCINA-1**

La **interleucina-1** tiene como principal función mediar la respuesta inflamatoria del huésped a las infecciones y a otros estímulos inflamatorios<sup>115</sup>. Esta citocina actúa en la inmunidad innata y en la inflamación, y su principal **fuentes celular** es el **fagocito mononuclear activado**. Su producción puede desencadenarse por productos bacterianos como el LPS y por otras citocinas como el TNF. Hay dos formas de IL-1, **IL-**

**1 $\alpha$**  e **IL-1 $\beta$** , que muestran una homología entre sí inferior al 30%, pero que se unen a los mismos receptores de superficie y median las mismas actividades biológicas.

Se han caracterizado dos receptores de membrana diferentes para la IL-1, ambos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El receptor tipo I (**IL-1RI**) se expresa en casi todos los tipos celulares y es el receptor principal de las respuestas mediadas por esta citocina. Se asocia a otra proteína, la proteína accesoria del IL-1R (IL-1R AcP), homóloga al IL-1R y necesaria para las respuestas biológicas. El receptor tipo II (**IL-1RII**) se expresa en las células B, pero puede ser inducido en otros tipos celulares. No se estimula en respuesta a la IL-1 y su principal función es actuar como "señuelo" que inhibe competitivamente la unión de la IL-1 al receptor de señalización tipo I. Tanto la forma IL-1 $\alpha$  como IL-1 $\beta$  se unen al IL-1R tipo I y tipo II aunque este último receptor no es capaz de generar ninguna señal a la célula y, por tanto, previene de la acción de agonistas. Los receptores IL-1RI e IL-1RII también existen en forma soluble, sin embargo, la unión natural de éstos ocurre de forma diferente a los receptores situados en las membranas celulares. El IL-1RI soluble sólo se une al antagonista del receptor de la IL-1 y el IL-1RII sólo a la IL-1 $\beta$ . Ninguno de los dos receptores solubles se une a la IL-1 $\alpha$ .

La unión de la IL-1 al receptor de tipo I da lugar al reclutamiento de una proteína adaptadora, denominada MyD88, y a una kinasa asociada al receptor de la IL-1 (IRAK). Ambas desencadenan la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 a través de una vía de señalización en la que parece estar implicado un miembro de la familia TRAF. La IL-18 también transmite señales por un mecanismo similar, debido a que las regiones citoplasmáticas de los receptores de la IL-1 e IL-18 son homólogas entre sí<sup>116</sup>. La porción citoplasmática del receptor de IL-1 tipo I también es homóloga a la de un receptor de superficie de *Drosophila* denominado receptor de tipo Toll, que está implicado en la defensa frente a las infecciones<sup>117</sup>. Hasta ahora se han identificado diez homólogos del receptor Toll en mamíferos, y todos ellos parecen actuar en la defensa frente a diferentes tipos de infecciones microbianas. En el ratón, el receptor del LPS bacteriano es un miembro de la familia Toll.

A **comienzos** de los **80**, se describió un **inhibidor natural** de la **IL-1** que era estructuralmente homólogo a la citocina y que se unía a los mismos receptores, pero que era biológicamente inactivo, por lo que actuaba como inhibidor competitivo de la IL-1. Se denominó, por tanto, **antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1Ra)**<sup>118</sup> y se consideró como un regulador endógeno de la acción de la IL-1. Se conocen diferentes variantes estructurales o isoformas del IL-1Ra:

- **sIL-1Ra**: isoforma de peso molecular 17 kDa, secretada por monocitos, macrófagos, neutrófilos, y otras células y localizada en sangre periférica, bazo, pulmón e hígado.
- **icIL-1Ra**: isoforma de 18 kDa, que permanece en el citoplasma de queratinocitos y otras células epiteliales, monocitos y fibroblastos y se localiza, principalmente, en intestino y piel.
- y, recientemente, se ha descrito una tercera forma intracelular, de peso molecular 16 kDa, que reside en neutrófilos, monocitos, y hepatocitos.

Las variantes sIL-1Ra e icIL-1Ra se crean por *splicing* alternativo del gen del IL-1Ra y su identificación ha sugerido el complejo papel que puede presentar dicho antagonista en los distintos procesos biológicos<sup>118</sup>.

La producción del IL-1Ra está estimulada *in vitro* por sustancias, tales como la IgG adherente o LPS, diversas citocinas, y diferentes componentes virales y bacterianos. El IL-1Ra también se comporta como una proteína de fase aguda (APP).

Con el fin de conocer el papel fisiológico de IL-1Ra, se realizaron estudios con **ratones transgénicos y knockout** para este gen<sup>119</sup>. En los primeros, la resistencia al LPS se observó en función de la cantidad de IL-1Ra mRNA y de proteína producida que era proporcional al número de copias del gen de IL-1Ra existentes en el genoma, y los segundos, se caracterizaron porque:

- a nivel fenotípico, tenían un tamaño más pequeño que los ratones *wild type*.
- cuando se les administró intraperitonealmente LPS, en estos ratones knockout la dosis fue más letal que en los ratones control y en los transgénicos. Así se conoció el efecto beneficioso del antagonista en el choque séptico en modelos animales.

- en infecciones producidas por *Listeria monocytogenes*, dichos ratones eran menos susceptibles a la infección que los ratones sanos y los transgénicos, de ahí la importancia de la IL-1 en la resistencia a la infección por organismos intracelulares. Estos estudios establecieron que el balance *in vivo* entre la IL-1 endógena y el IL-1Ra endógeno era importante en la respuesta del individuo a una infección<sup>118</sup>.

El IL-1Ra endógeno está producido en numerosos modelos de enfermedad en animales de experimentación y, en humanos, en enfermedades autoinmunes y patologías inflamatorias crónicas<sup>118</sup>.

La utilización de anticuerpos anti-IL-1Ra neutralizantes ha demostrado que el IL-1Ra endógeno es una importante proteína anti-inflamatoria natural que interviene en enfermedades como artritis, colitis y granulomatosis pulmonar<sup>118</sup>.

En humanos, el **tratamiento** de enfermedades con el **recombinante humano IL-1Ra** no es beneficioso en el síndrome séptico. Sin embargo, se ha visto que los pacientes con artritis reumatoide si reciben durante seis meses este recombinante muestran mejoras tanto en los parámetros clínicos como en los radiológicos<sup>118</sup>.

## **POLIMORFISMO EN EL GEN HUMANO DEL ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA IL-1 (IL1RN)**

El **gen IL1RN** está situado en el brazo largo del **cromosoma 2** (véase esquema de la página 36)<sup>120</sup>. Los genes IL-1 $\alpha$  (IL1A), IL-1 $\beta$  (IL1B) e IL-1Ra, están situados en un fragmento de restricción de 430 kb en dicho cromosoma y los genes de los receptores de la IL-1 tipo I y II también se sitúan en el brazo largo de este cromosoma pero están más lejos de los genes que codifican para los tres ligandos anteriormente mencionados.

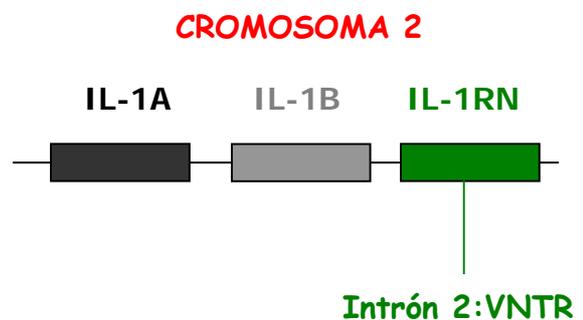
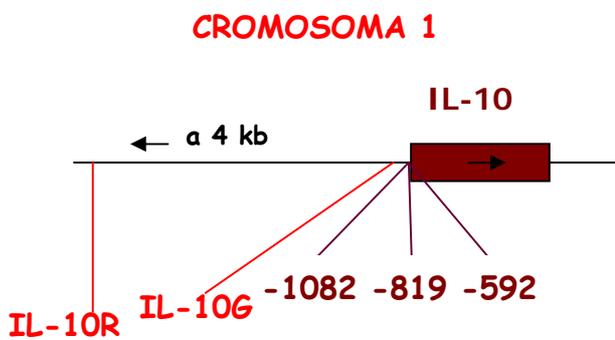
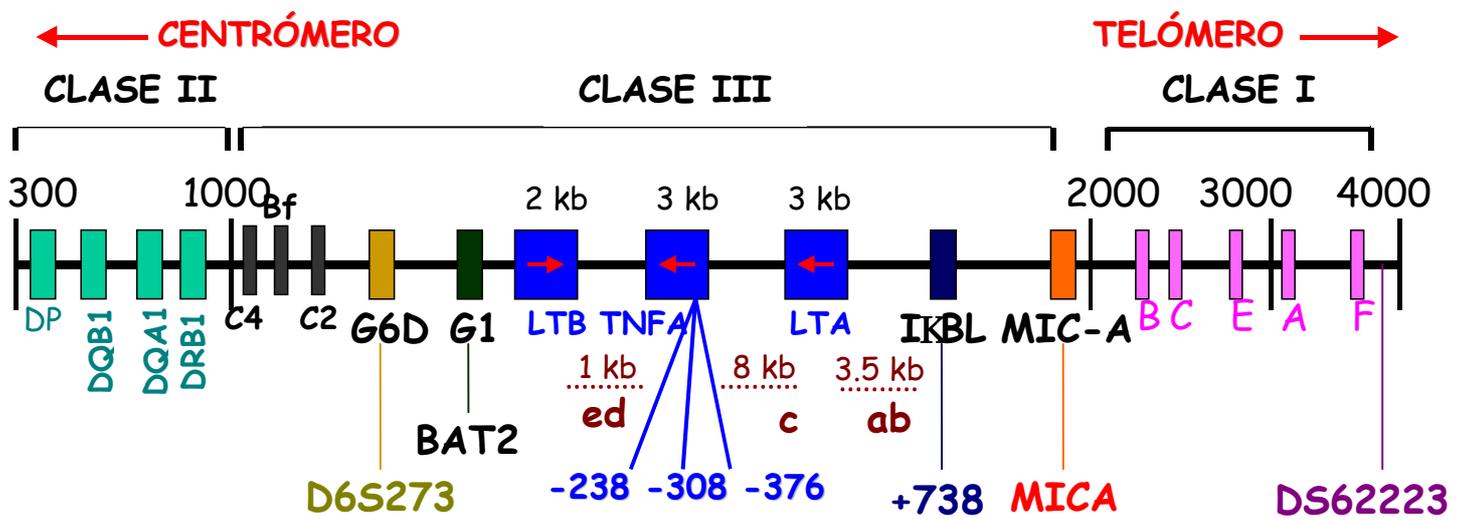
El **intrón 2** del gen IL1NR es polimórfico ya que presenta un número variable de repeticiones en tándem (**VNTR**) de una secuencia de 86 pares de bases<sup>121</sup>. Se conocen cinco alelos que van del 1 al 5 y que corresponden a 4, 2, 5, 3 y 6 copias de la secuencia repetitiva, respectivamente. Los tamaños oscilan entre 240 pb (alelo 2) y 595 pb (alelo 5)

y se ha descrito que en esta región se encuentran tres sitios potenciales de unión a proteínas por lo que dependiendo de las copias existentes en un individuo podría existir una significación funcional<sup>122</sup>.

El alelo 2 de dicho gen (**IL1RN\*2**) se ha visto asociado a un gran número de enfermedades humanas entre las que destacan, la colitis ulcerosa, psoriasis, lesiones epidérmicas del lupus eritematoso sistémico y nefropatía diabética. El mecanismo de asociación del alelo 2 a estas patologías permanece desconocido. Los niveles de mRNA icIL-1Ra no se ven alterados en queratinocitos de individuos portadores de este alelo del antagonista aunque en dicho estudio no se midió la producción de proteína. Fue entonces cuando se pensó que el IL1N\*2 podría ser un marcador de un locus ligado/asociado a una enfermedad y, por tanto, no ser el causante directo de la enfermedad<sup>118</sup>.

I.J.3. ESQUEMA DEL HLA, GEN DE LA INTERLEUCINA-10 Y GEN DEL ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA INTERLEUCINA-1

## ESQUEMA DEL HLA CROMOSOMA 6p21



## II. OBJETIVOS

- 1- **Encontrar**, tanto **dentro** del complejo mayor de histocompatibilidad como **fuera** de él, **genes asociados primariamente** a la **susceptibilidad** a padecer **esclerosis múltiple**. Este estudio se realizará mediante un análisis caso-control que podrá determinar **loci adicionales** de **riesgo** aparte del ya conocido alelo de susceptibilidad de clase II, **HLA-DRB1\*1501**.
- 2- **Evaluar** si las **asociaciones positivas** o **negativas** encontradas se deben a la existencia de **ligamiento**, determinado por un **test** de **desequilibrio** de **transmisión** en 63 familias de esclerosis múltiple.
- 3- **Localizar** mediante la **técnica** del **mapeo** de **microsatélites** la **ubicación** más probable en el MHC de los **genes** de **susceptibilidad** y **resistencia** implicados en el proceso patológico.
- 4- **Medir** la **contribución** de los **marcadores genéticos** estudiados y asociados a la esclerosis múltiple **al efecto** conferido por el alelo **HLA-DRB1\*1501**.
- 5- **Valorar** el papel de los **polimorfismos** de las **citocinas anti-inflamatorias**, **interleucina-10** y **antagonista del receptor de la interleucina-1**, en la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple.
- 6- **Determinar** si existen **similitudes** o **diferencias genéticas** en los loci estudiados (MHC, IL-10 e IL-1Ra) entre la forma clínica **Primaria-Progresiva** y la forma mayoritaria de la enfermedad **Remitente-Recurrente**.

### III. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En el amplio abanico de las enfermedades inmunológicas existe un grupo de ellas para las cuales ya se conoce el gen cuyo fallo es el origen de la enfermedad:

- Síndrome hiper-IgM: provocado por una mutación en el gen del ligando de CD40, CD154.
- Ataxia telangiectasia: causada por diferentes mutaciones en el gen ATM implicado en los procesos de reparación del DNA.
- Agammaglobulinemia de Bruton: déficit de Btk, tirosín kinasa imprescindible en la transmisión de señales mediada por el BCR y en la maduración de los linfocitos B.
- Varias formas de inmunodeficiencia combinada severa: déficit de Jak-3, RAG1,  $\gamma_c$ .
- Síndrome de Wiskott-Aldrich, en el cual se ha encontrado defectuosa la proteína WASP responsable de la organización del citoesqueleto... por citar sólo algunas<sup>123</sup>.

Sin embargo, también destacan otro grupo de enfermedades, en general todas las de naturaleza autoinmune, más heterogéneas y presumiblemente poligénicas en las cuales aún prosigue la búsqueda del gen o genes responsables<sup>124,125</sup>.

Aunque el **origen** de la esclerosis múltiple sigue siendo una incógnita, desde hace más de cien años diversas observaciones y estudios epidemiológicos han permitido abordar desde dos perspectivas etiológicas distintas, aunque no excluyentes, la causa de la enfermedad: la **teoría ambiental**, sustentada por la distinta prevalencia de la patología según zonas geográficas<sup>68,126,127</sup> y la **teoría genética**, basada en que la enfermedad es más frecuente en un determinado grupo étnico (caucásico)<sup>128</sup> y en la mayor incidencia entre familiares de personas afectadas<sup>129,130</sup>.

Durante décadas los defensores de la teoría ambiental han intentado hallar algún agente infeccioso en el sistema nervioso de los enfermos como desencadenante de la

respuesta inmunitaria<sup>131-133</sup>; en cambio, aquéllos que sostienen la causa genética han intentado investigar sobre los genes relacionados con la aparición de la enfermedad<sup>134-136</sup>.

Existen pocas patologías de origen desconocido con tantos datos acerca de la incidencia y prevalencia mundial como la esclerosis múltiple. Numerosos equipos de investigación han coincidido en considerar que la **incidencia, prevalencia y tasa de mortalidad** de la EM **varían** con la **latitud**: la enfermedad es muy rara en las zonas tropicales y subtropicales, y en las zonas templadas de ambos hemisferios existe una mayor incidencia cuanto mayor es la latitud. Este fenómeno ha sido estudiado detalladamente en Europa, Estados Unidos, Japón, Australia y Nueva Zelanda<sup>127</sup>. Por otro lado, estos investigadores también han observado que el **sexo femenino** es el más afectado por esta enfermedad y la proporción es **2:1**<sup>137,138</sup>. Sin embargo, en este sentido, algunos grupos se han desmarcado: un equipo **japonés** determinó que el ratio mujer:hombre era **4:1**<sup>139</sup> y otro grupo de **Nairobi** observó una relación de **7:2**<sup>140</sup>.

Dado que tres **barridos genómicos** diferentes han considerado al **MHC o HLA**, situado en el brazo corto del cromosoma 6, el **principal locus de susceptibilidad** en la esclerosis múltiple<sup>10-12</sup>, hemos dividido el análisis de los antecedentes bibliográficos en dos bloques: ESTUDIO GENÉTICO **DENTRO Y FUERA** DEL MHC.

### III.A. ESTUDIO GENÉTICO **DENTRO** DEL MHC

Con la percepción de que los genes MHC se caracterizan por su elevado polimorfismo, parece natural buscar entre los diversos alelos aquéllos que confieren susceptibilidad a padecer enfermedades de sospechada base inmunológica, como la esclerosis múltiple.

#### III.A.1. MOLÉCULA DE CLASE II HLA-DR

En 1975, Jersild describió en la población del norte de Europa la asociación existente entre la **esclerosis múltiple** y el complejo mayor de histocompatibilidad, en

particular con los alelos de clase I **HLA-A3** y **HLA-B7**<sup>141</sup>. Aproximadamente diez años después se publicó que la **asociación** era aún **más fuerte** cuando en la molécula de clase II **HLA-DR** estaba presente el **alelo 2**<sup>142</sup> (también en España<sup>143</sup>).

Diferentes estudios epidemiológicos han indicado el papel crítico que desempeñan algunos patógenos ambientales en el comienzo y desarrollo de la esclerosis múltiple. Se postula que uno de los **mecanismos desencadenantes** de la **autoinmunidad** característica de esta enfermedad es el denominado **mimetismo molecular**. Se ha apuntado la posibilidad de que los anticuerpos o células T generadas frente al agente infeccioso, puedan dar reacciones cruzadas con antígenos propios (mielina). En este caso, los anticuerpos o linfocitos T reconocen, además de los antígenos del patógeno, otros propios del organismo de similar estructura. Puesto que la respuesta inmune (y autoinmune) implica la participación de células T que reconocen péptidos presentados por moléculas del MHC, se ha postulado que un antígeno microbiano presentado por **HLA-DR2** puede desencadenar la activación del sistema inmunitario contra un péptido similar presente en la mielina<sup>133,144,145</sup>.

Al igual que en otras patologías autoinmunes todavía no se conoce exactamente el proceso mediante el cual la presencia de un determinado alelo en las moléculas HLA-DR o -DQ influye en la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple. Estudios realizados en líneas celulares han mostrado como la activación de linfocitos T por péptidos presentados por **HLA-DR2** produce un **aumento** en la **síntesis** de ciertas citocinas (como el **TNF- $\alpha/\beta$** ), responsables, en parte, del daño neuronal<sup>145,146</sup>. Además, en un grupo de pacientes de EM se analizaron los sitios polimórficos de unión a péptidos en las cadenas DR $\beta$ 1, DQ $\alpha$ 1 y DQ $\beta$ 1 y se determinó una **asociación** entre la enfermedad y la presencia de determinados **residuos aminoacídicos** (prolina en la posición 11, arginina en la 13 y alanina en la 71 de la cadena DR $\beta$ 1) que eran, de hecho, específicos de la molécula HLA-DR2 y no de alguno de sus subtipos en particular (DRB1\*1501, \*1502, \*1601 y \*1602). Esta idea sugirió que la secuencia de aminoácidos no estaría directamente relacionada con la patogénesis puesto que sólo el alelo DRB1\*1501 es el que se ha visto asociado a la esclerosis múltiple<sup>146,147</sup>.

Poco a poco el estudio acerca de la causa y desarrollo de la esclerosis múltiple fue intensificándose aún más. En torno a 1990, se observó que la **asociación más fuerte** con la enfermedad no era la existente con el HLA-DR2 sino más concretamente con su haplotipo de clase II **DRB1\*1501/DQA1\*0102/DOB1\*0602**<sup>72,148-150</sup>. A partir de este hallazgo, comenzaron a realizarse numerosos estudios de asociación en los que se intentaba determinar si el aumento de esta combinación haplotípica y en concreto del alelo HLA-DRB1\*1501 se distribuía diferentemente en los distintos grupos de pacientes:

- **Formas clínicas** de la **EM**: Primaria-Progresiva y Remitente-Recurrente<sup>4,137,138,151,152</sup>.
- **Sexo**<sup>137,138,153</sup>.
- **Edad de comienzo** de la **enfermedad**<sup>138,154</sup>.
- **Pronóstico**<sup>138,151,155</sup>.
- **Respuesta a tratamientos**<sup>36,45,156-159</sup>.

Abundando más en la idea de la influencia de clase II en la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple, un estudio finlandés encontró, además del esperado aumento del **HLA-DRB1\*1501**, la existencia en estos mismos pacientes de una **protección** otorgada por la combinación del alelo **HLA-DR1** y **HLA-DR53** (HLA-DR4, -7, -9)<sup>160</sup>.

Algunas de las investigaciones en las que **no** se ha encontrado **asociación** entre el alelo **HLA-DRB1\*1501** y la **esclerosis múltiple** son las siguientes:

- a) En **Cerdeña** (Italia), distintos autores han observado que la EM se asocia con el alelo **3** de la molécula **HLA-DR**<sup>161-163</sup>.
- b) En un estudio familiar de EM publicado por el Instituto Karolinska (**Suecia**), se observó que incluso en 58 familias de enfermos (de un total de 542) cuyos **progenitores no** presentaban el **DRB1\*1501** existía ligamiento con el HLA. Este hallazgo podía ser debido a la existencia de un segundo gen de susceptibilidad presente en el MHC o bien al desequilibrio de ligamiento del **DRB1\*1501** con el verdadero gen causante de la enfermedad<sup>164</sup>.
- c) En **Israel**, el alelo asociado con la esclerosis múltiple es el **DRB1\*1303** y, en cambio, el **DRB1\*1501** se encuentra disminuido aunque no significativamente<sup>165</sup>.

- d) En **China**, el haplotipo DRB1\*1501/DQB1\*0602 se asocia positivamente a la enfermedad pero también existen otros haplotipos cuya frecuencia está incrementada en los pacientes EM. En este estudio se sugiere que el alelo de susceptibilidad es el DQB1\*0602<sup>166</sup>.

### III.A.2. GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

En vista de los efectos biológicos que ya hemos comentado en la Introducción de esta tesis y de la localización del gen del **TNF- $\alpha$**  en el seno del MHC se ha especulado con qué **polimorfismos** situados en este locus podrían contribuir en las **asociaciones** encontradas entre alelos del complejo **HLA** y **enfermedades autoinmunes** e **infecciosas**<sup>167,168</sup>. Esto es especialmente relevante en aquellas patologías en las cuales se ha comprobado que el TNF- $\alpha$  está implicado en el inicio o sostenimiento de la respuesta inflamatoria, como es el caso de la artritis<sup>169,170</sup>, o donde niveles elevados de esta citocina en circulación son predictivos de un peor pronóstico, como en la malaria<sup>171</sup>. En la esclerosis múltiple estudios de expresión de esta molécula no han ofrecido resultados concluyentes<sup>172,173</sup>.

Desde que se conoce que los genes polimórficos del MHC presentan un elevado grado de desequilibrio de ligamiento, las enfermedades asociadas a los alelos de clase I y II podrían ser consecuencia del ligamiento existente con el gen del TNF causante de la enfermedad. Sin embargo, respecto al papel que presentan los polimorfismos del TNF como factores causantes de patologías, no se conoce con certeza su relevancia funcional. Así, se ha observado como diferentes haplotipos del MHC están asociados con diferentes fenotipos productores de TNF. Por ejemplo, los haplotipos HLA-DR3 y -DR4 producen niveles superiores de TNF, mientras que el haplotipo -DR2 es un pobre productor<sup>174</sup>.

### $\pi$ POSICIONES POLIMÓRFICAS EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN TNFA

La estricta regulación de la expresión del gen del TNF es un requisito fundamental para tener una adecuada y efectiva respuesta inmunitaria e inflamatoria. Recientemente

se ha comprobado cómo una mutación en la región promotora del gen podría tener importancia funcional en la regulación de la transcripción<sup>175,176</sup>.

4 El **polimorfismo más estudiado** por los distintos equipos de investigación es la transición **guanina^adenina** en la posición **-308**.

Respecto a esta posición existen datos conflictivos. El **estudio funcional** del alelo **-308A** (o también llamado **TNF2**) fue realizado por diferentes autores mediante ensayos con genes *reporter*. La transfección de células B humanas con plásmidos que portaban la versión salvaje o la mutada del promotor del TNF unido al gen de la cloranfenicolacetiltransferasa (**CAT**) determinó cómo dicha mutación **incrementaba** significativamente la **actividad transcripcional**<sup>87,177-179</sup>. Este hecho se corroboró con el estudio en tres líneas celulares, Jurkat (células T), Raji (células B) y U937 (monocitos), que mostraron cómo se unían los factores de transcripción sólo al alelo **TNF2**<sup>180</sup>. Los resultados indicaron que este polimorfismo podía tener un efecto directo sobre la transcripción del gen y podía ser la causa de que el haplotipo HLA-A1/-B8/-DR3, que contiene esta mutación<sup>181-183</sup>, se asociara con una elevada producción de TNF y fuera directamente el responsable del peor pronóstico que presentan los pacientes con malaria cerebral<sup>171</sup>.

Por otro lado, existen una serie de grupos que **no** han observado **diferencia** alguna en la **transcripción** del gen con ninguno de los dos alelos **-308A** y **-308G**; es más, se ha demostrado en células mononucleares de individuos heterocigotos que ambos alelos contribuyen de forma similar en la actividad transcripcional del gen TNFA<sup>184-186</sup>.

Los **estudios de asociación** realizados entre estos polimorfismos y enfermedades de base inmunológica también han sido conflictivos:

a) Entre las **enfermedades** que se asocian **positivamente**:

- a la presencia del polimorfismo **-308A** son: el asma<sup>187</sup>, la enfermedad de Crohn<sup>188</sup>, la colitis ulcerosa<sup>189</sup> y el lupus eritematoso sistémico<sup>190</sup>.

- a la presencia del polimorfismo **-308G** destacan: la espondilitis anquilosante<sup>191</sup> y la úlcera duodenal asociada a *Helicobacter pylori*<sup>192</sup>.
- b) Entre las **patologías** que se asocian **negativamente**:
- a la presencia del alelo **-308A** se encuentran: la enfermedad de Kawasaki<sup>193</sup>, el cáncer pancreático<sup>194</sup> y la enfermedad de Hodgking<sup>195</sup>.
  - a la presencia del alelo **-308G** destaca la periodontitis adulta<sup>196</sup>.

En la mayoría de las enfermedades, las asociaciones positivas encontradas fueron debidas al desequilibrio de ligamiento existente con los alelos de clase I y II del HLA, verdaderos responsables de la susceptibilidad. Sin embargo, existen estudios en los que se ha demostrado que un polimorfismo dado puede jugar un papel determinante en la patogenia. Este es el caso, del alelo -308A y los pacientes chinos con lupus eritematoso. En la población china también existe desequilibrio de ligamiento entre el TNF2 y el HLA-DR3, pero como en los enfermos de lupus estaba más aumentado el TNF2 que el -DR3, cabía pensar que era el polimorfismo en el promotor del TNF uno de los responsables de dicha patología<sup>197</sup>.

Dado que el **TNF- $\alpha$**  es una citocina proinflamatoria que interviene en la **patogénesis**<sup>198-201</sup> y **progresión**<sup>199,201</sup> de la **esclerosis múltiple**, distintos autores han tratado de determinar si estos polimorfismos presentes en la región promotora se asociaban a la enfermedad.

Ya desde el año 1995 se vienen realizando estudios en los que **no** se ha podido hallar **asociación** alguna entre la **susceptibilidad** a padecer **esclerosis múltiple** y el polimorfismo **-308**<sup>202,203</sup>. Aún así, los avances científicos, como la secuenciación automática, y un mayor conocimiento acerca del papel de esta citocina en la EM ha hecho posible que los distintos grupos de investigación no hayan abandonado su estudio.

Con el fin de determinar la posible implicación de esta posición polimórfica en el desarrollo de alguna **forma clínica** de la enfermedad, en 1996 se realizó un estudio con 27 pacientes EM-RR, 21 EM-PP y 22 controles que no presentaban en su historia familiar

ningún caso de esclerosis múltiple. Los resultados revelaron que sólo 3 individuos de los 21 enfermos con Primaria-Progresiva, del total de pacientes EM-RR y de los controles, eran homocigotos -308AA. Además, realizaron ensayos CAT y únicamente detectaron una producción espontánea de TNF- $\alpha$  en los sujetos con el genotipo -308AA<sup>204</sup>.

De entre los estudios que **no** hallaron asociación entre esta **mutación puntual** y algún **curso clínico** de la enfermedad<sup>179,205</sup> destaca el realizado en dos poblaciones europeas distintas, Alemania y Chipre, con origen genético diferente. Aunque el alelo -308A era más frecuente en el primer país comparado con el segundo, en ninguno de los dos este polimorfismo se asoció con la EM en general o con una determinada progresión de la misma<sup>179</sup>.

4 Otro polimorfismo que también se encuentra en la **región promotora** del **gen TNFA** es nuevamente una transición **G→A** en la posición **-238**. En un estudio acerca de la posible importancia de esta mutación en la regulación de la transcripción se comprobó cómo los monocitos de individuos heterocigotos -238AG estimulados por LPS no producían un nivel significativamente diferente de los monocitos con el genotipo -238GG<sup>85,180</sup>. En este estudio no se dispuso de homocigotos -238AA y en este sentido fue interesante observar como en otro análisis de 199 controles y 123 pacientes con lupus eritematoso sistémico del norte de Italia sólo se encontraron tres sujetos -238AA y los tres eran enfermos<sup>206</sup>.

Este dimorfismo se ha relacionado con ciertas enfermedades autoinmunes **independientemente** de la **asociación** con algún haplotipo del **HLA**. En la artritis reumatoide, por ejemplo, el polimorfismo -238GG se ha visto asociado con la forma más agresiva de la enfermedad y con el comienzo temprano de la misma<sup>207,208</sup>. En el lupus eritematoso sistémico, el genotipo -238AA se considera un marcador de un subtipo clínico particular<sup>206</sup>. Y en la psoriasis y la artritis psoriática existe una fuerte asociación con el alelo -238A<sup>209</sup>. Entre los estudios de asociación negativa se encuentran enfermedades como la hepatitis autoinmune tipo I<sup>210,211</sup> y la enfermedad de Kawasaki (tipo de vasculitis)<sup>193</sup>.

Los estudios que relacionan esta posición **-238** con la **esclerosis múltiple** no son muy abundantes en la literatura inmunológica. Entre éstos destaca el de Huizinga y sus colaboradores, donde se encontró el genotipo **-238AA** asociado a las **formas menos severas** de la enfermedad<sup>212</sup>.

4 La **forma juvenil** de **esclerosis múltiple** (desarrollada antes de los 16 años) presenta diferencias clínicas con la forma adulta. Para determinar si en este tipo de EM existían peculiaridades genéticas en el locus TNF, se estudió la distribución alélica de las posiciones **-238** y **-308** en estos pacientes (n=24) y en controles (n=92). No observaron diferencias significativas en las frecuencias fenotípicas y genotípicas por lo que sugirieron, a pesar de contar con un tamaño muestral pequeño, que estos polimorfismos **no** jugaban un papel importante en la **susceptibilidad** a padecer este tipo de **forma juvenil**<sup>213</sup>. Otro equipo que **combinó** también el **estudio** de las dos posiciones **-238** y **-308** ofreció resultados negativos al no asociarse ninguna de estas dos mutaciones con la EM<sup>214</sup>.

4 La posición **-376** es la **menos presente** en la literatura inmunológica actual. Al igual que los dos polimorfismos anteriores, este marcador se caracteriza por la transición de una **guanina** a una **adenina** y ha sido objeto de estudio por su posible influencia en la regulación de la transcripción del gen TNFA. Así, el factor de transcripción **OCT-1**, que se une al promotor cuando en esta posición existe una adenina, produce un aumento de la expresión del gen<sup>215</sup>. Sin embargo, diversos autores han trabajado en ella y en **ningún caso** han observado **asociación** entre:

- este **polimorfismo** y una **mayor o menor producción** del TNF- $\alpha$ <sup>180,212</sup>.
- y, este **polimorfismo** y la **susceptibilidad** a padecer enfermedades de marcada base inmunológica<sup>102,216</sup>. En este sentido, un trabajo realizado en nuestro laboratorio determinó una posible implicación de esta posición polimórfica en la susceptibilidad a padecer **esclerosis múltiple**. Realizamos un estudio caso-control con 238 pacientes y 324 controles y detectamos un **aumento significativo** del alelo **-376A** en EM que, además, era **independiente** de la asociación ya conocida del **DRB1\*1501**<sup>217</sup>. Dos años más tarde se publicó una réplica a este estudio<sup>218</sup> que comentaremos más detalladamente en el apartado de Discusión (página 125).

4 Dado que los alelos **-238A** y **-376A** se encuentran en desequilibrio de ligamiento, un equipo holandés realizó en pacientes de artritis reumatoide ensayos funcionales con genes *reporter* que presentaban este haplotipo en líneas celulares de linfocitos y monocitos. Los resultados obtenidos indicaron la **no** participación de ambas mutaciones en la **actividad transcripcional**<sup>186</sup>.

#### $\pi$ OTROS POLIMORFISMOS PRESENTES EN EL PROMOTOR DEL GEN TNFA

Numerosos autores también han abordado el estudio de otras posiciones polimórficas presentes en el promotor del TNF que pudieran estar implicadas en distintas patologías de naturaleza inmune. Estos polimorfismos y sus asociaciones son<sup>168</sup>:

- Posición **-163** (G $\wedge$ A), analizada en individuos seropositivos portadores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y no asociada con la evolución clínica de la infección<sup>102</sup>.
- Posición **-244**, investigada en artritis reumatoide<sup>219</sup> y en espondilitis anquilosante<sup>220</sup> y no asociada a ninguna de las dos patologías.
- Posición **-850** (C $\wedge$ T), estudiada en narcolepsia y no asociada a ella<sup>221</sup>.
- Posición **-857** (C $\wedge$ T). El alelo con **timina** se ha visto **asociado** con la enfermedad de Crohn<sup>222</sup>, narcolepsia<sup>223</sup>, artritis reumatoide<sup>224</sup> y artritis reumatoide juvenil<sup>225</sup>, y **no** con la diabetes mellitus insulino-dependiente<sup>226</sup> ni con la enfermedad de Kawasaki<sup>193</sup>.
- Posición **-863** (C $\wedge$ A). El alelo con **adenina** sí se ha **asociado** a la enfermedad de Crohn<sup>222</sup> y a la artritis reumatoide juvenil<sup>225</sup> y, en cambio, **no** a la enfermedad de Kawasaki<sup>193</sup>.
- Posición **-1063** (T $\wedge$ C), investigada también en la enfermedad de Kawasaki pero no asociada a ella<sup>193</sup>.

**Estudios funcionales** con las posiciones **-857** y **-863** han demostrado la influencia que presentan ambos SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) en la expresión del gen cuando el factor de transcripción OCT-1 se une a sus alelos raros<sup>227</sup>.

### $\pi$ POLIMORFISMOS PRESENTES EN LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN TNFA

- La posición **+489** (G $\wedge$ A), presente en el primer intrón de la región codificante del gen TNFA, se estudió en periodontitis y se obtuvieron resultados negativos<sup>196</sup>.
- La posición **+70**, caracterizada por la inserción de una **C**, se ha visto que no modifica la actividad transcripcional<sup>228</sup>.

#### III.A.3. GEN MIC-A

Como ya hemos indicado en la Introducción de la tesis (página 24), el gen MIC-A presenta un elevado grado de polimorfismo como sus homólogos clásicos de clase I. De entre las diferentes regiones polimórficas existentes en su estructura, nosotros hemos analizado un microsatélite exónico situado en el segmento que cruza la membrana celular. Se trata de un **triplete GCT** que codifica para un residuo de alanina y que se repite **4, 5, 6, 9**<sup>92</sup> o **10** veces<sup>93</sup>. Además, existe otro alelo, denominado **5.1**, caracterizado por la inserción de un nucleótido que cambia la pauta de lectura del mensajero. La proteína resultante de esta inserción no se expresa en la superficie de la célula<sup>94</sup>.

Dada su proximidad a clase I y a su homología con las moléculas codificadas por los genes de esta región, los primeros estudios realizados se relacionaron con enfermedades asociadas a clase I. Entre éstas se incluyen la **enfermedad de Behcet**, cuya asociación con el alelo **MICA 6** no era independiente de la ya bien conocida asociación del alelo de clase I **HLA-B51**<sup>92,229,230</sup> y la **espondilitis anquilosante**, asociada también con el **MICA 4** pero por el desequilibrio de ligamiento existente con el **HLA-B27**<sup>231</sup>.

Existen pocos estudios en los que se encuentran asociación de algún **alelo** del gen MIC-A **independientemente** de **clase II**. Uno de ellos se realizó en nuestro laboratorio y los resultados indicaron una **disminución significativa** del alelo **6** en los pacientes con artritis reumatoide. Además, esta reducción fue confirmada con un estudio TDT

(*Transmission Disequilibrium Test*) en 54 familias españolas que detectó la **no** transmisión de los haplotipos portadores de este alelo a los hijos enfermos<sup>232</sup>. Conclusiones similares se obtuvieron con el estudio de Singal y sus colaboradores<sup>233</sup>.

Aunque en la literatura científica no existen publicaciones que relacionan el gen MIC-A con la esclerosis múltiple, hemos considerado interesante su estudio por la acción que ejerce este ligando en las células  $\gamma/\delta$  presentes en la enfermedad<sup>234-236</sup>.

#### III.A.4. GEN IKBL

Diversos autores han indicado que la susceptibilidad a padecer determinadas patologías inmunológicas como la diabetes insulino-dependiente o la esclerosis múltiple se asocia con diversos alelos de genes de clase II y con el locus TNF. Dado que la recombinación en esta región es muy rara o prácticamente inexistente<sup>95,237</sup>, resulta muy difícil identificar el gen o genes causantes de estos procesos patológicos. Para facilitar su determinación se han utilizado los denominados **polimorfismos funcionales**.

En 1999, se describió la existencia de un marcador polimórfico situado en la posición **+738** del **gen IKBL** caracterizado por la transición de una **timina** a una **citocina**. El cambio consiguiente de aminoácido (cisteína a arginina) en una zona de la proteína donde se encuentra una diana de fosforilación para la proteinkinasa C, podría tener una implicación funcional. Aunque se ha observado que la secuencia de este gen se mantiene en la mayoría de los haplotipos ancestrales, el alelo **+738C** se encuentra casi exclusivamente en el **HA 7.1** (HLA-A3/B7/DR2-DRB1\*1501)<sup>95</sup>. El posible significado patológico de este polimorfismo también fue estudiado por De la Concha en pacientes con **colitis ulcerosa** en los que se consideró la presencia de este alelo **+738C** como un **factor de gravedad** de la enfermedad<sup>96</sup>.

Esta mutación puntual también fue investigada en los enfermos de **esclerosis múltiple**. El análisis realizado por Allcock en colaboración con nuestro laboratorio detectó que dentro de los individuos que presentaban el alelo de susceptibilidad **DRB1\*1501**, la combinación de los microsatélites **TNFa11b4** junto con el alelo **+738C** era **menos**

**frecuente** en los pacientes que en los controles. Con estos resultados se postuló que este polimorfismo podía marcar un **gen de resistencia** situado en el haplotipo del DRB1\*1501<sup>238</sup>.

### III.A.5. RASTREO GENÓMICO: LOCALIZACIÓN MEDIANTE MICROSATÉLITES

Cuando se desconoce el posible gen implicado en alguna enfermedad genética se utilizan procedimientos basados en el rastreo genómico que localizan los denominados **microsatélites**. Son secuencias cortas de bases que se repiten un número variable de veces causando un diferente genotipo en cada individuo. Estos polimorfismos nos van a servir de marcadores de susceptibilidad porque se van a heredar conjuntamente con la hipotética mutación funcionalmente responsable de la enfermedad.

Como ya se ha mencionado en la página 28 de Introducción, hemos estudiado tres microsatélites en la región de clase III y uno en la región de clase I. Por orden centrómero^telómero encontramos:

#### III.A.5.a. EN LA REGIÓN DE CLASE III

La región de **clase III** se extiende a lo largo de 760 kb y se caracteriza por la presencia elevada de un gran número de genes polimórficos (59, uno cada 12.9 kb)<sup>239</sup> que intervienen en distintas reacciones del sistema inmunológico. Recientemente, se ha sugerido que el locus de susceptibilidad asociado a muchas patologías autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, etc.) se encuentra en esta región, y concretamente en el locus del TNF y alrededores<sup>239</sup>. Sin embargo, resulta muy difícil localizar precisamente el posible locus causante de enfermedad debido a la escasez de marcadores polimórficos existentes en esta región HLA. Para facilitar esta labor, en el año 2001, se publicó un trabajo en el que se analizaron gran cantidad de microsatélites y entre ellos se encontraron los que nosotros vamos a estudiar<sup>239</sup>:

- **DS6273**
- **BAT2**
- **TNFabcde**

### III.A.5.a.i. MICROSATÉLITE D6S273

El microsatélite **D6S273** está situado en el gen **G6D**, centromérico al locus del Factor de Necrosis Tumoral y fue descrito en el año 1995. La secuencia nucleotídica repetida es CA y el número de alelos descritos es 7<sup>99</sup>.

En 1999, se secuenció un fragmento de 30 kb que abarcaba desde el gen HSP70 hasta los genes del locus TNF como parte de un programa de identificación de loci que pudieran estar implicados en la susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes. La secuenciación detectó siete nuevos genes de los cuales tres de ellos (G6C, **G6D** y G6E) codificaban proteínas supuestamente implicadas en la maduración leucocitaria. En este mismo estudio analizaron también el **microsatélite** en cuestión y lo encontraron **fuertemente asociado** a la **espondilitis anquilosante**<sup>240</sup>.

Desde que las asociaciones existentes entre los alelos del gen de clase II DRB1 y la susceptibilidad a la **artritis reumatoide** son incompletas, Singal y sus colaboradores estudiaron el polimorfismo **D6S273** como marcador de un posible locus causante de enfermedad. Dos alelos, el de 132 pb y 138 pb, presentaron sus frecuencias incrementadas en pacientes con respecto a controles. Mientras que el aumento del primer alelo fue debido al desequilibrio de ligamiento con clase II, el segundo se asoció a la enfermedad independientemente del gen DRB1<sup>241</sup>.

Otras patologías autoinmunes en las que también se ha estudiado este microsatélite como un marcador de un posible gen causante de enfermedad son: el **lupus** eritematoso sistémico<sup>242</sup>, diabetes mellitus insulino-dependiente<sup>243</sup> y algunos tipos de cáncer<sup>244</sup>.

### III.A.5.a.ii. MICROSATÉLITE BAT2

El microsatélite **BAT2** está situado en el gen **G1**, centromérico al locus TNF y se caracteriza por la repetición del dinucleótido CA. El número de alelos descritos en la

literatura es 13<sup>100</sup> y los estudios más relevantes que asocian este marcador a enfermedades autoinmunes son los siguientes:

En 1999, se analizó la distribución alélica del BAT2 en individuos con **diabetes mellitus insulino-dependiente** y se buscó posibles asociaciones con el microsatélite TNFa, situado también en clase III. El estudio caso-control detectó un **aumento** y una **disminución** significativa de los alelos **9** y **12**, respectivamente, que se debía, en el primer caso, al desequilibrio de ligamiento existente entre el BAT2-9 y el TNFa9 y en el segundo caso a la fuerte asociación del BAT2-12 con el alelo TNFa13 y con el alelo DRB1\*1502. Esta investigación, por tanto, determinó una asociación del BAT2 a la enfermedad dependiente del TNFa<sup>245</sup>.

Otra patología en la que también se ha estudiado el microsatélite BAT2 es en la **artritis reumatoide**. En ella un grupo de investigación canadiense identificó el haplotipo D6S273 alelo 138/BAT2 alelo 138/TNFa2 como la combinación asociada a la enfermedad<sup>246,247</sup>.

#### III.A.5.a.iii. MICROSATÉLITES TNFa, b, c, d, e

Un campo que también hemos abordado es el estudio de microsatélites en el **locus TNF**. Los cinco microsatélites analizados fueron: **TNFa**, **TNFb**, **TNFc**, **TNFd** y **TNFe**, y el número de alelos observados para cada uno de ellos fue 13, 7, 2, 5 y 3, respectivamente. En 1991, los marcadores TNFa, TNFb y TNFc fueron descritos por Nedospasov<sup>103</sup> y dos años más tarde, Udalova definió TNFd y TNFe<sup>101</sup>.

Aunque se piensa que el polimorfismo de los microsatélites en el locus TNF por sí mismo no afecta la regulación o la estructura de esta citocina<sup>248,249</sup> se utilizan como un punto de partida conveniente y confiable en el estudio de marcadores genéticos de implicación de esta proteína en patologías asociadas con el complejo mayor de histocompatibilidad.

Alguno pero no todos los alelos de estos microsatélites muestran un fuerte desequilibrio de ligamiento con otros genes de la región. El haplotipo **TNFd1a2b3** se asocia con el haplotipo HLA-DQB\*0201/DQA1\*0501/DRB1\*0301/C4A\*Q0 y con peculiaridades clínicas del **lupus** como la fotosensibilidad y el fenómeno de Raynaud<sup>250</sup>. Una asociación negativa existe entre el alelo **TNFc2** y una rápida progresión del **SIDA**<sup>251</sup>.

En conexión con estos haplotipos extendidos, Gallagher estudió la distribución de algunos de ellos en la población del oeste de Escocia. Su equipo encontró que el haplotipo **HLA-A1/B8/DR3** contenía los alelos **TNFa2**, **TNFb3** y **-308A** siendo éste uno de los haplotipos ancestrales presentes en la población europea. Otra combinación haplotípica importante a mencionar es el **HLA-A3/B7/DR2** que se asociaba con los alelos **TNFa11**, **TNFb4** y **-308G**<sup>252</sup>.

Aunque el haplotipo **d3a11b4** se encuentra asociado con la **esclerosis múltiple**, los distintos autores han detallado que el aumento observado en estos enfermos es debido al **desequilibrio de ligamiento** existente con el alelo de susceptibilidad **DRB1\*1501**<sup>238,253,254</sup>. Entre los estudios que han tratado de determinar el **efecto independiente** de estos microsatélites en la EM, se encuentra el realizado por Kirk y sus colaboradores en Irlanda. Cuando se tiparon los 19 individuos homocigotos TNFd3a11b4 se halló que esta asociación podría ocurrir independientemente de la presencia o no de DR2. Así se sugirió que en esta población el TNF era uno de los factores genéticos que influiría en la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple<sup>255</sup>.

En el estudio de la **forma juvenil** de **EM** se observó un **aumento** de los alelos **DRB1\*1501** y **TNFa11**, al igual que en la forma adulta<sup>256</sup>.

#### III.A.5.b. EN LA REGIÓN DE CLASE I: MICROSATÉLITE D6S2223

Entre los estudios más recientes acerca de enfermedades autoinmunes y microsatélites de clase I, destaca el realizado por un equipo noruego en el año 1999. Con el fin de detectar el gen causante de la **diabetes insulino-dependiente**, se describió la asociación, **independiente** de la molécula **HLA-DR** y **-DQ**, entre el microsatélite

**D6S2223** y el riesgo a padecer esta enfermedad<sup>257</sup>. Este marcador genético, cuyo polimorfismo se basa en la repetición dinucleotídica AT o GT, está situado a 2.5 Mb telomérico al gen HLA-F<sup>104</sup>. Dado que la **enfermedad celiaca** comparte ciertos haplotipos de susceptibilidad (en clase II) con la diabetes tipo I, una segunda parte del estudio noruego fue determinar si algún alelo de este microsatélite D6S2223 podía estar también asociado a esta patología intestinal. Los resultados obtenidos indicaron que el alelo **D6S2223-3** en los **haplotipos HLA-DR3 disminuía** la **susceptibilidad** en las **dos** enfermedades autoinmunes<sup>257</sup>.

### III.B. ESTUDIO GENÉTICO **FUERA** DEL MHC

Dado que la esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune heterogénea, otros loci presentes fuera del complejo mayor de histocompatibilidad, pueden contribuir de forma importante en el comienzo y desarrollo de la enfermedad<sup>258,259</sup>. Hemos estudiado dos genes polimórficos **IL-10** e **IL-1Ra**, situados en los **cromosomas 1** y **2**, respectivamente.

#### III.B.1. GEN DE LA INTERLEUCINA-10

La IL-10 ha sido considerada objeto de estudio en numerosas enfermedades de base inmunológica debido al importante papel que desempeña como inhibidor de los macrófagos activados y como regulador homeostático de las reacciones inmunitarias innata y adquirida<sup>106,107</sup>. Por un lado, presenta la capacidad de inhibir la producción de las citocinas IL-12 y TNF y, por otro, disminuye la expresión de coestimuladores y moléculas de clase II del MHC en las células presentadoras de antígeno<sup>106</sup>.

Desde que se observó una asociación entre la expresión del mRNA de la IL-10 con la forma estable (o sin brotes) de la esclerosis múltiple<sup>260</sup>, los polimorfismos presentes en el gen de esta citocina han sido investigados detalladamente. Por un lado, destacan en el promotor tres mutaciones puntuales situadas en las posiciones **-1082 (G/A)**, **-819 (C/T)** y **-519 (C/A)**<sup>261</sup>, de las que se piensa que pueden intervenir de forma decisiva en

la transcripción de este gen y, por otro, dos microsatélites denominados **IL-10R** e **IL-10G**, localizados a 4 kb y 1.2 kb, respectivamente, del origen de transcripción<sup>262,263</sup>.

**Ensayos *in vitro* de expresión** de **IL-10** con estos tres polimorfismos demostraron la asociación de los **haplotipos** -1082**A**, -819**T**, -592**A** y -1082**G**, -819**C**, -592**C** con una **disminución** y **aumento** transcripcional respectivamente<sup>264,265</sup>.

Cuando se realizó un estudio con pacientes **EM no** se observó asociación de ningún alelo en particular ni de ningún haplotipo específico del promotor con la enfermedad o el curso de la misma<sup>266,267</sup>. Sin embargo, en estudios con **lupus eritematoso sistémico**, enfermedad Th2 por excelencia, **sí** se asociaron los polimorfismos de este gen con la susceptibilidad<sup>268</sup>.

### III.B.2. GEN DEL ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA IL-1 (IL-1RN)

El **intrón 2** del gen IL1NR es polimórfico ya que presenta un número variable de repeticiones en tándem (**VNTR**) de una secuencia de 86 pares de bases<sup>121</sup>. Se ha descrito que en esta región se encuentran tres sitios potenciales de unión a proteínas por lo que dependiendo de las copias existentes en un individuo podría existir una significación funcional. El **alelo 2** de dicho gen (IL1RN\*2) se ha visto asociado a un gran número de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple<sup>152</sup>, colitis ulcerosa<sup>269</sup>, alopecia areata<sup>270</sup>, psoriasis<sup>271</sup>, lesiones epidérmicas del lupus eritematoso sistémico<sup>272</sup>, enfermedad de Graves<sup>273</sup> y nefropatía diabética<sup>274</sup>. El mecanismo de asociación del alelo 2 a estas patologías permanece desconocido. Los niveles de mRNA icIL-1Ra no se ven alterados en queratinocitos de individuos portadores de este alelo del antagonista aunque en este estudio no se midió la producción de proteína. Fue entonces cuando se pensó que el IL1N\*2 podría ser un marcador de un locus ligado/asociado a una enfermedad y, por tanto, no ser el causante directo de la misma<sup>118</sup>.

Entre los hallazgos que asocian **IL-1Ra** con la **EM** destacan los siguientes. Un equipo finlandés<sup>259</sup> encontró que las mujeres con esclerosis múltiple presentaban el alelo

2 del gen IL-1Ra asociado a la enfermedad y Kantarci, investigador americano, observó que el alelo 3 existía en los pacientes con menor tasa de supervivencia<sup>275</sup>.

Diversos estudios han demostrado que tras la administración del **IFN-β** los niveles séricos de IL-1Ra aumentaban<sup>276</sup> y se inhibían citocinas proinflamatorias tales como la IL-1 y el TNF-α<sup>277</sup>. Estas acciones podrían contribuir al efecto anti-inflamatorio del fármaco y, parcialmente, podrían explicar la reducción del grado de exacerbación de la enfermedad que muestran los pacientes tratados con este compuesto<sup>276</sup>. Teniendo en cuenta las características clínicas de la enfermedad tales como la **edad de comienzo**, el **curso** y la **severidad** de la patología, grupos como el de Luomala<sup>259</sup> y el de Perini<sup>277</sup>, han determinado que el IFN-β disminuía el número de brotes en los individuos con la forma Remitente-Recurrente y que los niveles séricos del IL-1Ra eran mayores en la EM-PP que en la EM-RR, aunque este aumento no era estadísticamente significativo.

## IV. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### IV.A. PACIENTES Y MUESTRAS ANALIZADAS

Esta investigación se ha realizado en el Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos. Todos los individuos que han participado en el estudio son caucásicos y provienen de las Comunidades Autónomas de Madrid y Cataluña.

#### 4 PACIENTES

Se ha incluido un total de 318 enfermos de esclerosis múltiple diagnosticados según los criterios de Poser en las Unidades de Esclerosis Múltiple de los Servicios de Neurología del Hospital Clínico San Carlos y de Neuroinmunología del Hospital Vall d'Hebron. La distribución de las muestras fue la siguiente:

- **Sexo:** el 68% de las muestras provenían de mujeres y el 32% de hombres.
- **Formas Clínicas:** el 14% fueron formas Primaria-Progresiva y el 86% formas Remitente-Recurrente. Adicionalmente, contamos con 100 pacientes EM-PP provenientes de Barcelona.
- **Edad:** los percentiles de edad 25, 50 y 75 eran 22.3, 26.8 y 34.1 años, respectivamente. La mediana de edad era 26.6 años para el sexo femenino y 28.2 para el sexo masculino.

#### 4 CONTROLES

Como grupo control dispusimos de 382 sujetos sanos caucásicos, no relacionados entre sí y obtenidos principalmente de donantes de sangre y personal de nuestro laboratorio. También hemos contado con 101 controles de Barcelona a los enfermos EM-PP del Hospital Vall d'Hebron.

#### 4 FAMILIAS DE ENFERMOS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Hemos analizado las muestras de 63 pacientes y sus progenitores para realizar un estudio de ligamiento y construir los haplotipos existentes en estas familias.

## IV.B. MATERIAL

### IV.B.1. MEDIOS INSTRUMENTALES

#### Agitadores

- Magnético (Selecta Agimatic-S)
- Vortex-2 Genie

#### Aparatos de esterilización

- Autoclave Selecta Clino-Matic

#### Balanzas

- De precisión, modelo Precisa 600 C (Zurich)

#### Baños

- Selecta Unitronic 320 OR
- Innova 3000

#### Bomba de vacío

- Laboport, KNF

#### Caja de exposición y películas para autorradiografía

- Caja de exposición: Pantalla intensificadora X-OMATIC REGULAR de Kodak
- Películas AGFA

#### Centrífuga

- Microfuga Sigma 201 M
- Microfuga Hettich Mikroliter
- Centrífuga Kubota 5800

#### Equipos de electroforesis

- Cubetas horizontales: Mupid-2, Cosmo BIO CO., LTD

- Fuente de alimentación de Bio-Rad Power-Pac 300

#### Equipo fotográfico

- Gelprinter TDI

#### Espectrofotómetro

- Pharmacia GeneQuant, LKB Biochrom (England)

#### Fungibles

- Tubos de 200  $\mu$ l de MicroAmp, Applied Biosystem y de Abgene House
- Tubos de 500  $\mu$ l Perkin Elmer, modelo GeneAmp
- Puntas de D10 y D200 de Gilson
- Microtube Rack system de Greiner, etc.

#### Horno de Hibridación

- Modelo Ecogen

#### Pipetas automáticas

- Modelos p-2, p-10, p-20, p-200, p-1000 y p-5000 de Gilson (Francia)

#### Revelador de autorradiografía

- RPX-OMAT PROCESSOR MODEL M6B, de Kodak

#### Robot de PCR

- ABI 877 Applied Biosystem, Foster City, CA, USA.

#### Secuenciador Automático

- ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER de Perkin Elmer

#### Sistemas Informáticos

- Vectra Pentium Hewlett Packard
- Power Macintosh 7200/200
- Scanner Hewlett Packard ScanJet 4p

- Programas informáticos:
  1. Análisis estadístico: Epi Info, versión 5.01 de:
    - C.D.C. (Centers for Diseases Control and Prevention), U.S.A.
    - World Health Organization, Suiza
  2. Base de Datos: D BASE IV, Borland International INC. y ACCESS (OFFICE 97) de MICROSOFT.
  3. Software de análisis de fragmentos: ABI PRISM 310 Collection y 310 GENESCAN 3.1

#### Soporte de membranas

- Modelo Bio-Rad

#### Termocicladores

- Modelo PTC-100, MJ RESEARCH, INC.
- Modelo GENEAMP PCR System 2400, Perkin Elmer

#### Termociclador para PCR cuantitativa

- Corbett, modelo ROTORGENE

#### Transiluminador

- *Cross-linker* modelo FLUO-LINK

### IV.B.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Agarosa al 1.5 %: 3 g de agarosa llevados hasta 200 ml de TBE 1× con bromuro de etidio (1µg/ml).

#### Agua:

- botellas→ agua inyectable de Fresenius (1000 ml)
- ampollas→ Grifols 10 ml
- Método de destilación→ Autostills 4000×

Anticuerpo: fragmentos Fab específicos para la digoxigenina unidos covalentemente a la fosfatasa alcalina (de Boehringer Mannheim).

Buffer B (500 ml): 12.5 ml de 0.075 M NaCl (3 M) y 25 ml de 0.024 M de EDTA (pH=8) (0.5M).

Buffer O 2× (1 litro): 200 ml ácido maleico 1 M, 600 ml H<sub>2</sub>O. Se ajusta el pH a 7.4 y se añaden 100 ml NaCl 3 M. Llevar a 1 litro.

Buffer 1 (1 litro): 1 litro de *buffer* O 2× y 3 ml de Tween.

Buffer 3 (1 litro): 100 ml Tris-HCl 1 M a pH=9.5, 33 ml NaCl 3 M y 50 ml MgCl<sub>2</sub> 1M.

Los productos químicos de uso cotidiano provienen de la casa Merk y Sigma.

Los oligonucleótidos han sido sintetizados automáticamente en la casa Perkin Elmer.

Las sondas se marcan en 3' con digoxigenina, mediante un kit de Boehringer Mannheim.

Reactivo de Denhardt 50× (para 100 ml): 1 g de Ficoll 400, 1 g de PVP, 1 g de BSA y el resto agua.

Reactivo de Prehibridación: 4 ml de SSPE 15×, 2 ml del reactivo de Denhardt's 50×, 200 µl N-lauril, 20 µl SDS 20× y agua hasta 20 ml.

Solución Blocking (reactivo proporcionado por la casa Roche): se prepara disolviendo 25 g del blocking en 250 ml de *buffer* O 2×

SSC 20× (1 litro): 175 g de NaCl, 88 g de citrato sódico y ajustar a pH=7 con NaOH 0.2 N.

SSPE 30× (500 ml): 130 g NaCl, 23 g de fosfato sódico y 1 g EDTA puro.

STMT (1 litro): 320 ml de Sacarosa 0.32 M (1 M), 1 ml de Tris-HCl 1 M (pH=7.5), 1 ml de MgCl<sub>2</sub> 5 mM (1 M) y 10 ml de Triton X-100 1%.

Sustrato: proporcionado por la casa Boehringer Mannheim y se trata del CSPD<sup>®</sup>. Se prepara disolviendo 100 µl de dicho compuesto en 10 ml de *buffer* 3.

TBE 10× (1 litro): 108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico, 20 ml EDTA 0.5 M a pH=8 y el resto agua.

TMAC (1 litro): 50 ml de Tris-HCl 1 M a pH=7.5, 4 ml EDTA 0.5 M a pH=7.5 y 5 ml SDS 20×.

Tris-HCl 0.5M y NaCl 3M (pH=7.4): para preparar 1000 ml se utilizan 61 g de Tris-base, 175 g de NaCl y 35 ml de HCl 37%.

## IV.C. MÉTODOS

### IV.C.1. OBTENCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

El DNA puede obtenerse a partir de cualquier célula nucleada del organismo, puesto que cualquiera de ellas posee toda la información genética del individuo.

El **aislamiento** de DNA consta de las siguientes **etapas**:

- 1- Partimos de 15 ml de sangre extraída con el anticoagulante EDTA que inhibe la agregación plaquetaria al quelar el Ca<sup>+2</sup> de la sangre.
- 2- Para lisar los eritrocitos, añadimos 15 ml de STMT (proporción 1:1) y lo dejamos reposar 5 min en la nevera a 4°C. A continuación, llevamos la sangre a centrifugar a 3500 r.p.m. durante 30 min y a 4°C.

- 3- Decantamos el sobrenadante, lo resuspendemos en otros 15 ml de STMT, y lo volvemos a centrifugar 30 min a 3500 r.p.m. y a 4°C.
- 4- Eliminamos el sobrenadante y, si es necesario, repetimos esta operación 1 ó 2 veces hasta que el *pellet* quede limpio.
- 5- Resuspendemos el *pellet* en 4,5 ml de *buffer* B.
- 6- Para romper las proteínas asociadas al DNA y que queden los péptidos libres, añadimos 325 µl de H<sub>2</sub>O, 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 125 µl de SDS (20%).
- 7- Se deja incubar toda la noche en un baño con agitación constante a 37°C y si al día siguiente quedan partículas en suspensión añadimos de nuevo proteinasa K y se vuelve a incubar 1 ó 2 horas a 55°C.
- 8- Para que precipiten los péptidos, añadimos 2 ml de NaCl 6 M y mezclamos en el vórtex durante 15 s.
- 9- Tras recoger el sobrenadante, precipitamos el DNA con un volumen de isopropanol (proporción 1:1) y mezclamos por inversión hasta que se forme una 'medusa' compacta.
- 10- Sellamos con fuego la punta de una pipeta Pasteur y recogemos con ella el DNA pasándolo a un eppendorf con 1 ml de etanol al 70%.
- 11- Secamos el DNA y lo resuspendemos en 600 µl de *buffer* Tris-EDTA (TE).

#### IV.C.2. CUANTIFICACIÓN DE DNA Y ESTIMACIÓN DE SU PUREZA

Una alícuota de la disolución de DNA (realizada en el paso anterior) se valora por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm. Su pureza se estima hallando el cociente entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm.

La cuantificación del DNA se realiza teniendo en cuenta que una unidad de D.O. se corresponde con 50 ng/µl de DNA.

Con los datos obtenidos por espectrofotometría y con el fin de tener una concentración de DNA de 50 ng/µl hacemos la dilución de la muestra en agua destilada de acuerdo a cada caso.

## IV.C.3. TIPAJE DE LOS GENES DE CLASE II DRB1, DQA1 Y DQB1

Para estudiar los loci de clase II **DRB1**, **DQA1** y **DQB1** empleamos el método **PCR-SSOP** (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probe*) que consta de las siguientes etapas:

IV.C.3.a. Amplificamos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el segundo exón de cada uno de estos genes por ser en ellos donde se concentran los polimorfismos que distinguen uno de otro alelo<sup>278</sup>.

IV.C.3.b. Transferimos el producto amplificado a una membrana de nylon mediante la técnica del DOT-BLOT.

IV.C.3.c. Hibridamos con sondas oligonucleotídicas específicas el alelo presente en la muestra.

## IV.C.3.a. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES DRB1, DQA1 Y DQB1, Y COMPROBACIÓN DE LA MISMA

## IV.C.3.a.i. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES DRB1, DQA1 Y DQB1

Para realizar las tres reacciones de PCR (una para cada gen), utilizamos los siguientes **primers** o **cebadores**:

<i>Primers</i>	<i>Secuencia de nucleótidos</i>
<b>DRBAMP-A*</b>	5´-CCCCACAGCACGTTTCTTG-3´
<b>DRBAMP-B*</b>	5´-CCGCTGCACTGTGAAGCTCT-3´
<b>DQAAMP-A</b>	5´-ATGGTGTAACCTGTACCAGT-3´
<b>DQAAMP-B</b>	5´-TTGGTAGCAGCGGTAGAGTTG-3´
<b>DQBAMP-A</b>	5´-CATGTGCTACTTCACCAACGG-3´
<b>DQBAMP-B</b>	5´-CTGGTAGTTGTGCTGCACAC-3´

\*Además de DRB1, se amplifican los genes DRB4 y DRB5

Las **condiciones** de **PCR** fueron para un volumen final de 65 µl las siguientes:

Buffer 10× (de Perkin Elmer) ----- 6.5 µl  
MgCl<sub>2</sub> ----- 1.5 mM  
dNTPs ----- 100 µM

Cebadores o *primers* ----- 0.2  $\mu$ M cada uno  
Ampli Taq Gold ----- 1.5 Unidades  
DNA ----- 300ng

Las **características** del **programa** de **PCR** fueron las siguientes:

- 1) Una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min
- 2) 40 ciclos con tres etapas cada ciclo de:
  - 20 s a 95°C (desnaturalización)
  - 20 s a **55°C** (hibridación)
  - 30 s a 72°C (elongación)
- 3) Una elongación final de 7 min a 72°C
- 4) Tiempo indefinido a 4°C

#### IV.C.3.a.ii. COMPROBACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS EN GELES DE AGAROSA

El DNA es un polímero polianiónico cargado negativamente de forma uniforme debido a la presencia de grupos fosfato que migran cuando son sometidos a un campo eléctrico.

Los geles de agarosa se utilizan para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA pequeños. Éstos pasan fácilmente a través de los poros y se desplazan rápidamente, mientras que los fragmentos mayores avanzan con más lentitud.

La movilidad de los fragmentos depende del tamaño del DNA (número de bases) y de la concentración de agarosa del gel.

Las características del gel se escogen según la longitud media de los fragmentos de DNA que se deseen separar. Generalmente, cuanto mayor sea ésta, la concentración del gel debe ser menor.

Las bandas de DNA obtenidas después del desplazamiento son invisibles, a menos que el DNA esté marcado o teñido. Para ello se usa el colorante bromuro de etidio, añadido previamente al gel. Al intercalarse entre las bases del DNA, este colorante presenta fluorescencia de color naranja por medio de iluminación con luz ultravioleta corta ( $\lambda=300$  nm).

Se toman 5  $\mu$ l del producto amplificado y se somete a electroforesis horizontal en el gel de agarosa<sup>279</sup>.

Estos geles han sido preparados al 1.5% con tampón TBE 1 $\times$  y bromuro de etidio (0.2 mg/ml). Para comprobar si el tamaño del fragmento es el esperado, en el gel también se carga un marcador que contiene bandas de DNA de tamaños conocidos (Marcador V de Boehringer-Mannheim).

La electroforesis se desarrolla durante 10 minutos a 100 voltios; una vez transcurrido este tiempo, se utiliza el transiluminador para observar si la amplificación ha sido correcta y no se ha producido contaminación alguna, que detectaríamos mediante la presencia de una banda en el blanco (sin DNA muestra).

#### IV.C.3.b. TÉCNICA DEL DOT-BLOT

Esta técnica consiste en transferir el producto amplificado de DNA a una membrana de nylon<sup>280</sup>. El proceso consta de las siguientes etapas:

- 1- Ponemos 55  $\mu$ l del DNA amplificado en un tubo de dilución y añadimos 220  $\mu$ l de NaOH 0.5 M. Esperamos 10 min, tiempo en el cual el hidróxido sódico actúa como agente desnaturizante del DNA. A continuación, llevamos la gradilla con las muestras a una cubeta de hielo.
- 2- Añadimos a cada tubo 330  $\mu$ l de acetato amónico ( $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) 2 M para neutralizar el medio básico. Una vez realizado esto, las muestras ya están preparadas para ser transferidas a la membrana de nylon (Boehringer Mannheim).

- 3- Humedecemos el papel Whatman 3M en acetato amónico 1 M y lo colocamos sobre la carcasa de transferencia sin formar burbujas.
- 4- A continuación, humedecemos también la membrana de nylon en el acetato amónico y la situamos sobre el papel.
- 5- Montamos el aparato de DOT-BLOT y conectamos la bomba que hace el vacío.
- 6- Añadimos a cada pocillo del aparato 150  $\mu$ l de acetato amónico 1 M y a continuación, cargamos las muestras en sus pocillos correspondientes. Dejamos que el volumen impregne bien la membrana y después volvemos a añadir otros 150  $\mu$ l de acetato para arrastrar el DNA que pueda haber quedado en las paredes de los pocillos del aparato.
- 7- Esperamos unos minutos para que se realice correctamente la transferencia y posteriormente desmontamos el aparato sin desconectar la bomba.
- 8- Despegamos la membrana del papel y la llevamos al transiluminador para que, con la luz ultravioleta ( $1.5 \text{ J/cm}^2$ ), las hebras de DNA se fijen perfectamente al nylon, al establecerse enlaces covalentes entre el DNA y los grupos -OH de la membrana.

#### IV.C.3.c. HIBRIDACIÓN CON SONDAS OLIGONUCLEOTÍDICAS ESPECÍFICAS

Las sondas son fragmentos de DNA cuya longitud puede abarcar desde unos pocos nucleótidos hasta alguna kilobase, y cuya secuencia de bases es complementaria a la secuencia del DNA que se desea detectar. El fenómeno de la hibridación es extraordinariamente específico por lo que sólo puede aparearse con la secuencia correspondiente.

Para el estudio de una enfermedad genética se necesita una sonda que reconozca específicamente el gen implicado o parte de él (sonda directa) o a marcadores genotípicos que se encuentren próximos a dicho gen (sondas indirectas).

#### IV.C.3.c.i. MARCAJE Y PREPARACIÓN DE LAS SONDAS

El marcaje se realiza con digoxigenina-ddUTP en el extremo 3'-OH. La mezcla de reacción consta de:

Buffer de reacción 5x -----	4 µl (vial 1)
CoCl <sub>2</sub> -----	4 µl (vial 2)
Sonda -----	200 pmol
Digoxigenina-ddUTP -----	1 µl
Transferasa terminal -----	1µl (50 U)
Agua estéril -----	c.p.s. 20 µl

Y el proceso es el siguiente:

- 1- Incubamos la mezcla anterior durante 30 min a 37°C.
- 2- Paralizamos la reacción:
  - a) colocando en hielo el tubo de reacción.
  - b) añadiendo 2 µl del combinado: 200 µl EDTA-Na<sub>2</sub> 0.2 M pH=8 + 1 µl de glucógeno (vial 8).
- 3- Precipitamos el DNA añadiendo:
  - a) LiCl 4 M ----- 2.5 µl
  - b) Etanol absoluto ----- 80 µl (-70°C durante 30 min)
- 4- Centrifugamos durante 20 min a temperatura ambiente y a 12000 r.p.m. (microfuga). Después decantamos el sobrenadante.
- 5- Resuspendemos en 200 µl de Tris-EDTA a pH=8 (el EDTA quela iones divalentes inhibiendo la acción de la DNasa) o agua destilada a 4°C.
- 6- Añadimos a un Falcon 50 µl de la solución de la sonda y 20 ml de líquido de prehibridación. De esta forma la sonda ya está preparada para ser lanzada.

#### IV.C.3.c.ii. HIBRIDACIÓN CON SONDAS ESPECÍFICAS DE ALELO, Y REVELADO

- 1- Cortamos en seis tiras la membrana de nylon que contiene el DNA transferido y fijado, e introducimos estas tiras en seis tubos de lavado.
- 2- Añadimos a cada tubo líquido de prehibridación, introducimos los seis tubos en un rulo de hibridación y lo llevamos al horno de hibridación aproximadamente una hora a 37°C.
- 3- Transcurrido este tiempo eliminamos el líquido de prehibridación y añadimos la sonda que habíamos marcado previamente. Las secuencias de dichas sondas se presentan en tablas al final de este apartado.

- 4- Introducimos de nuevo los seis tubos en el rulo y lo llevamos al horno a 37°C hasta el día siguiente.
- 5- Devolvemos la sonda a su Falcon correspondiente, ya que se puede utilizar hasta en 20 ocasiones, y añadimos a cada tubo SSPE 2× de 5 a 10 min para lavar el exceso de sonda. A partir de este momento el proceso debe continuar en agitación.
- 6- Retiramos el SSPE, añadimos el TMAC y sumergimos los tubos en el baño a la temperatura específica de cada sonda (véase en las tablas **1**, **2** y **3**) durante 9 min.
- 7- Retiramos el TMAC y volvemos a repetir el paso 7-.
- 8- Añadimos *buffer* 1 y esperamos 5 min a temperatura ambiente.
- 9- Retiramos el *buffer* y añadimos la solución de *blocking* durante media hora a temperatura ambiente (se ha preparado *blocking* 0.5× en c.s.p.).
- 10- Eliminamos esta solución y añadimos la misma cantidad de solución de *blocking* con anticuerpo (fragmentos Fab específicos para la digoxigenina, de Boehringer Mannheim) durante media hora a temperatura ambiente.
- 11- Retiramos el *blocking* con el anticuerpo y añadimos de nuevo *buffer* 1 durante 15 min.
- 12- Eliminamos el *buffer* 1 y añadimos *buffer* 3 durante 10 min a temperatura ambiente.
- 13- Añadimos 2 ml de sustrato durante 5 min exactos a temperatura ambiente.
- 14- Recuperamos el sustrato (se puede utilizar hasta en tres ocasiones).
- 15- Introducimos las membranas en bolsas de plástico y las llevamos a secar al horno de hibridación durante 15 min aprox. a 37°C.
- 16- Las membranas con su bolsa se introducen junto con una placa de fotografía en una carcasa de exposición.
- 17- Se revelan las placas tras una exposición de diez minutos.

**Tabla 1:** Secuencia de nucleótidos de las sondas empleadas para el **tipaje DR** de **baja resolución**.

Sonda DRB	Secuencia de nucleótidos	Tw (°C)	Alelos
<b>1001</b>	5´-TAAGTTTGAATGTCATTT-3´	37	1
<b>1003</b>	5´-GTACTCTACGTCTGAGTG-3´	45	3, 6, 11 <sup>1</sup>
<b>1004</b>	5´-GAGCAGGTTAAACATGAG-3´	45	4
<b>1005</b>	5´-AGAAATAACACTCACCCG-3´	48	8, 12 <sup>2</sup>
<b>1006</b>	5´-TGGCAGGGTAAGTATAAG-3´	37	7
<b>1007</b>	5´-GAAGCAGGATAAGTTTGA-3´	45	9
<b>1008</b>	5´-GAGGAGGTTAAGTTTGAG-3´	37	10

<b>1009<sup>a</sup></b>	5´-CAGCAGGATAAGTATGAG-3´	37	51
<b>2802</b>	5´-GGTACTGGAGAAGACACT-3´	48	12
<b>2810<sup>b</sup></b>	5´-GCGAGTGTGGAACCTGAT-3´	45	53
<b>5703</b>	5´-GCCTGATGAGGAGTACTG-3´	45	11

<sup>1</sup> No reconoce al alelo DRB1\*1404

<sup>2</sup> Además reconoce al alelo DRB1\*1404

<sup>a</sup> La sonda 1009 reconoce al gen DRB5 presente en los haplotipos cuyo alelo DRB1 es DR2

<sup>b</sup> La sonda 2810 reconoce al gen DRB4 presente en los haplotipos cuyos alelos DRB1 son DR4, -7, -9

**Tabla 2:** Secuencia de nucleótidos de las sondas empleadas para el tipaje **DQA1**

Sonda DQA	Secuencia de nucleótidos	Tw (°C)	Alelos
<b>2503</b>	5´-TGGGCAGTACAGCCATGA-3´	45	0301
<b>3401</b>	5´-GAGATGAGGAGTTCTACG-3´	45	0101
<b>3402</b>	5´-GAGATGAGCAGTTCTACG-3´	45	0102, 0103, 0501
<b>3403</b>	5´-GAGACGAGCAGTTCTACG-3´	45	0401, 0601
<b>4102</b>	5´-ACCTGGAGAAGAAGGAGA-3´	37	0103
<b>5501</b>	5´-TCAGCAAATTTGGAGGTT-3´	37	0101, 0102, 0103
<b>5502</b>	5´-TCCACAGACTTAGATTTG-3´	37	0201
<b>5504</b>	5´-TCAGACAATTTAGATTTG-3´	37	0401, 0501, 0601
<b>6903</b>	5´-ATCGCTGTCCTAAAACAT-3´	37	0501
<b>7502</b>	5´-CTTGAACATCCTGATTAA-3´	37	0201, 0401, 0601

**Tabla 3:** Secuencia de nucleótidos de las sondas empleadas para el tipaje **DQB1**

Sonda DQB	Secuencia de nucleótidos	Tw (°C)	Alelos
<b>2604</b>	5´-CGTCTTGTAACCAGACAC-3´	45	0603, 0604
<b>3701</b>	5´-AGGAGTACGTGCGCTTCG-3´	57	0501, 0502, 0503
<b>4501</b>	5´-GACGTGGAGGTGTACCGG-3´	52	0301
<b>4901</b>	5´-GGTGTACCGGCAGTGAC-3´	52	0501
<b>5702</b>	5´-GCGGCCTAGCGCCGAGTA-3´	57	0502, 0504
<b>5705</b>	5´-GGCTGCCTGCCGCCGAGT-3´	57	0201
<b>5706</b>	5´-GGCCGCCTGACGCCGAGT-3´	57	0301, 0303
<b>5707</b>	5´-GGCCGCCTGCCGCCGAGT-3´	57	0302
<b>7002</b>	5´-GACCCGAGCGGAGTTGGA-3´	57	0601
<b>7003</b>	5´-GAGGGGACCCGGCGGAG-3´	57	0602, 0603
<b>7005</b>	5´-GAAACGGGCGGCGGTGGA-3´	52	0201

## IV.C.4. TIPAJE DE LOS SUBTIPOS DEL GEN DE CLASE II DRB1

Alguno de los alelos del gen **DRB1** determinados en el paso anterior incluyen un conjunto de **subtipos**. Para averiguar cuál de ellos presenta una muestra dada se procede a un análisis más detallado o **tipaje de alta resolución**.

Las **condiciones** de la **reacción en cadena** de la **polimerasa**, **comprobación** de la misma, **transferencia** del producto amplificado a la membrana de nylon (o DOT BLOT), **hibridación** con sondas específicas de alelo y revelado, son similares a las descritas en los apartados anteriores (IV.C.3.a., IV.C.3.b. y IV.C.3.c.). Las diferencias existentes se basan únicamente en los *primers* y sondas utilizadas.

- Las secuencias de los **cebadores** utilizados para amplificar los subtipos de **DR1**, **DR2**, **DR4**, **DR6**, **DR11** son:

NOTA: Para realizar estas amplificaciones se usa además el *primer* DRBAMP-B, empleado en la PCR de baja resolución.

Alelos	Primers	Secuencia de nucleótidos
DR1	DRBAMP-1	5´-TTCTTGTGGCAGCTTAAGTT-3´
DR2	DRBAMP-2	5´-TTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG-3´
DR4	DRBAMP-4	5´-GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC-3´
DR6 DR11	DRBAMP-3	5´-CACGTTTCTTGGAGTACTCTAC-3´

- Las secuencias de las **sondas** utilizadas para la detección de los **subtipos** de estos alelos son las siguientes:

Alelos	Sonda DRB1	Secuencia de nucleótidos	Tw (°C)	Subtipos
DR1	8602	5´-AACTACGGGGCTGTGGAG-3´	45	0102
	3701	5´-CCAAGAGGAGTCCGTGCG-3´	41	0101, 0102, 0103
	7007	5´-ACATCCTGGAAGACGAGC-3´	41	0103
DR2	8601	5´-AACTACGGGGTTGGTGAG-3´	41	0101, 0103
	3702	5´-AACCAGGAGGAGTCCGTG-3´	41	15, 16
	8603	5´-AACTACGGGGTTGTGGAG-3´	41	1501

	<b>7002</b>	5´-GACTTCCTGGAAGACAGG-3´	41	1601
	<b>7003</b>	5´-GACCTCCTGGAAGACAGG-3´	41	1602
	<b>8601</b>	5´-AACTACGGGGTTGGTGAG-3´	41	1502, 1601, 1602
<b>DR4</b>	<b>3701</b>	5´-CCAAGAGGAGTCCGTGCG-3´	45	0406
	<b>5702</b>	5´-GCCTAGCGCCGAGTACTG-3´	45	0405, 0409, 0410, 0411
	<b>7007</b>	5´-ACATCCTGGAAGACGAGC-3´	41	0402
	<b>8601</b>	5´-AACTACGGGGTTGGTGAG-3´	41	0401, 0405, 0407, 0408, 0409
	<b>8603</b>	5´-AACTACGGGGTTGTGGAG-3´	41	0402, 0403, 0404, 0406, 0410, 0411
	<b>7005</b>	5´-ACCGCGGCCCGCTTCTGC-3´	63	0401, 0409
	<b>7006</b>	5´-CGAGAGCGGGGCCGAGGT-3´	63	0403, 0406, 0407, 0411
<b>DR6</b>	<b>8601</b>	5´-AACTACGGGGTTGGTGAG-3´	41	1302, 1303
	<b>8603</b>	5´-AACTACGGGGTTGTGGAG-3´	41	1301, 1304, 1401, 1404
	<b>7007</b>	5´-ACATCCTGGAAGACGAGC-3´	41	1301, 1302, 1304
	<b>5702</b>	5´-GCCTAGCGCCGAGTACTG-3´	45	1303, 1304
	<b>1005</b>	5´-AGAAATAACACTCACCCG-3´	35	1404
	<b>7001</b>	5´-TCCTGGAGCAGAGGCGGG-3´	45	1402
<b>DR11</b>	<b>8601</b>	5´-AACTACGGGGTTGGTGAG-3´	41	1101
	<b>8603</b>	5´-AACTACGGGGTTGTGGAG-3´	41	1102, 1103, 1104
	<b>7007</b>	5´-ACATCCTGGAAGACGAGC-3´	41	1102
	<b>7002</b>	5´-GACTTCCTGGAAGACAGG-3´	41	1101, 1104
	<b>7008</b>	5´-ACTTCCTGGAAGACGAGC-3´	45	1103

#### 4 DETECCIÓN DEL ALELO **DRB1\*1501** (DR2) POR **PCR CUANTITATIVA**

Para el análisis de los subtipos de DR2, y en concreto, la determinación de HLA-**DRB1\*1501**, hemos empleado el ensayo **TaqMan**<sup>281</sup>. Este método se basa en la adición, al cóctel de PCR, de una sonda que hibrida con el fragmento que se amplifica. Dicha sonda lleva en su extremo 5´ un marcador fluorescente (FAM) y en su extremo 3´ una molécula "secuestradora", como TAMRA. La presencia en la misma molécula de oligonucleótido de ambas sustancias da lugar al fenómeno de transferencia de energía por resonancia, y la molécula "secuestradora" acaba emitiendo luz de baja longitud de onda, fácilmente distinguible de la que emitiría la molécula fluorescente de 5´ si se encontrara libre en el medio.

Los *primers* que se añaden a la mezcla son específicos de alelo. Cuando la amplificación ocurre, la TaqPolimerasa (Ampli Taq Gold), en su elongación, llega a la zona donde se está hibridando la sonda. Por medio de su actividad exonucleasa 5´-3´, la

enzima separa la sonda en sus nucleótidos componentes. La consiguiente liberación del fluorocromo 5' de la actividad secuestradora de la molécula en 3', se detecta como emisión de luz. En una muestra negativa para el alelo considerado, la sonda mantendrá su integridad, y no se detectará la fluorescencia característica.

- Como hemos mencionado, la especificidad en la reacción la proporcionan los *primers*. Éstos son:

- **sense: 02**: 5'-TCCTGTGGCAGCCTAAGAG-3'

- **antisense: 1501**: 5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCCA-3'

**15021**: 5'-CTGCCACTGTGAAGCTCTCAC-3'

- La **sonda** empleada es: FAM 5'-TCCGTGCGCTTCGACAGCGAC3' TAMRA PO<sub>4</sub>. La adición final de un grupo fosfato impide que dicha sonda funcione como *primer*.

El cóctel de la **PCR** incluía los componentes a una dilución standard (apartado IV.C.3.a.i.) con las siguientes concentraciones de *primers* y sonda:

Primers ----- 300 nM

Sonda ----- 150 nM

Las **características** del **programa** de **PCR** fueron las siguientes:

- 1) Una desnaturalización inicial a 95°C durante 12 min
- 2) 10 ciclos con las siguientes particularidades:
  - 20 s a 95°C (desnaturalización)
  - 20 s a **65°C** (hibridación)
- 3) 20 ciclos con las siguientes condiciones:
  - 20 s a 95°C (desnaturalización)
  - 20 s a **60°C** (hibridación)

Las muestras **HLA-DR2<sup>+</sup>** se sometieron a **dos PCRs**, variando el *primer* antisense. La PCR con el antisense 1501 daba positivo para el alelo HLA-DRB1\*1501, y la PCR con el *primer* antisense 15021 daba positivo para las muestras HLA-DRB1\*1502, HLA-DRB1\*1601 y HLA-DRB1\*1602. Al ser nuestro objetivo la detección del alelo HLA-DRB1\*1501, con estas dos reacciones conseguimos los resultados necesarios, sirviendo

cada una de ella asimismo como control de la otra (porque todas las muestras HLA-DR2<sup>+</sup> han de necesariamente dar positivo en alguna de estas dos reacciones).

#### IV.C.5. DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS PUNTUALES EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN TNFA

Los polimorfismos que vamos a estudiar se sitúan en las posiciones **-238**, **-308** y **-376** de la región del promotor del gen TNFA y se pueden detectar amplificando un fragmento de DNA que vaya desde la posición -675 hasta la posición -143<sup>207</sup>.

Las **condiciones** de la **PCR**, **comprobación** de la misma, **transferencia** del producto amplificado a la membrana de nylon (o DOT BLOT), **hibridación** con sondas específicas de alelo y revelado, son similares a las descritas en los apartados anteriores (IV.C.3.a., IV.C.3.b. y IV.C.3.c.). Las diferencias se basan únicamente en los *primers* y sondas empleadas.

- Los **cebadores** utilizados se emplearon a una concentración de 0.2 μM cada uno de ellos y son los que se indican en la siguiente tabla:

Cebadores	Secuencia de nucleótidos
<b>primer C (antisense)</b>	<sup>-143</sup> 5'-TCTCGGTTTCTTCCATCG-3' <sup>-162</sup>
<b>primer D (sense)</b>	<sup>-675</sup> 5'-GAGTCTCCGGTCAGAATGA-3' <sup>-656</sup>

- Las **sondas** utilizadas fueron:

Sonda TNF	Secuencia de nucleótidos	Tw (°C)
<b>-238A</b>	5'-CCTCGGAATCAGAGCAGGG-3'	49
<b>-238G</b>	5'-CCCTGCTCCGATTCCGAG-3'	49
<b>-308A</b>	5'-AGGGGCATGAGGACGGGG-3'	52
<b>-308G</b>	5'-CCCGTCCCATGCCCT-3'	49
<b>-376A</b>	5'-TGTCTGGAATTAGAAGG-3'	35
<b>-376G</b>	5'-CCTTCTAACTCCAGACA-3'	37

## IV.C.6. DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO +738 EN EL GEN IKBL

El polimorfismo +738 situado en la región codificante del gen IKBL se caracteriza por la transición de una timina a una citosina. Para determinar esta mutación nos valemos de una **PCR específica de alelo**<sup>95</sup>. Además de un *primer* común, disponemos de dos cebadores que en su secuencia varían en el penúltimo nucleótido, y de los cuales uno hibrida con el alelo +738C y otro con el alelo +738T.

Para averiguar cuál o cuáles de estos dos alelos porta el individuo<sup>238</sup>, realizamos en cada muestra dos PCRs diferentes. La distinción entre un resultado negativo y un tubo en el que la reacción no ha funcionado, se realiza añadiendo en cada reacción una pareja de *primers* que amplifican el gen de la hormona del crecimiento (control interno). Como este gen lo poseen todos los individuos, si no se observa banda correspondiente a este amplificado, sabremos que la muestra no está en condiciones óptimas, y se descarta para el análisis.

Los **cebadores** utilizados para este estudio fueron:

<i>Primers</i>	Secuencia de nucleótidos
<b>MIDR1</b> ( <i>primer común para IKBL</i> )	5´-TCTCACGCAGCTCTTCCT-3´
<b>IKBL738CF</b>	5´-AGAAGCAGAGGGATCCCG-3´
<b>IKBL738TF</b>	5´-AGAAGCAGAGGGATCCTG-3´
<b>HGHU</b>	5´-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3´
<b>HGHD</b>	5´-ATCCA CT CACGGATTTCTGTTGTGT-3´

Las **condiciones** de **PCR** fueron **ligeramente diferentes** a las anteriores. Para un volumen final de 15 µl, añadimos:

Buffer 10× (de Perkin Elmer) ----- 1.5 µl  
MgCl<sub>2</sub> ----- 1.25 mM  
dNTPs ----- 60 µM  
*primers* IKBL ----- 0.2 µM cada uno  
*primers* Hormona de crecimiento ----- 0.05 µM cada uno  
Ampli Taq Gold ----- 0.35 Unidades

DNA ----- 50 ng

Las **características** del **programa** de **PCR** fueron las siguientes:

- 1) Una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min
- 2) 35 ciclos con tres etapas cada ciclo de:
  - 30 s a 95°C (desnaturalización)
  - 30 s a **58°C** (hibridación)
  - 40 s a 72°C (elongación)
- 3) Una elongación final de 7 min a 72°C
- 4) Tiempo indefinido a 4°C

Para observar los resultados, sometimos a los productos de PCR a una electroforesis horizontal en gel de agarosa del 2,2% durante 20 minutos a 125V, y se realizó la lectura por visualización directa con tinción de bromuro de etidio y luz ultravioleta ( $\lambda=300$  nm).

#### IV.C.7. DETECCIÓN DE LOS MICROSATÉLITES LOCALIZADOS EN EL MHC

Los microsatélites son secuencias cortas de DNA que se repiten un número variable de veces en el genoma provocando un diferente genotipo en cada individuo. Los alelos se caracterizan por presentar una diferente longitud en pares de bases y, por tanto, una diferente movilidad electroforética. Esta diferente movilidad se aprecia con facilidad mediante el secuenciador automático. Los **microsatélites** estudiados, los **primers** utilizados marcados con distintos **fluorocromos** y los **tamaños** de los **alelos** (menor y mayor) en pares de bases se indican a continuación en la siguiente tabla:

Marcador	Primers	Alelos: pb	Fluorocromo	Ref.
<b>TNFa</b>	IR1: 5´-GCACTCCAGCCTAGGCCACAGA-3´	TNFa1: 97	FAM	103
	IR5: 5´-GTGTGTGTTGCAGGGGAGAGAG-3´	TNFa14: 123		
<b>TNFb</b>	IR2: 5´-GCCTCTAGATTTTCATCCAGCGCACAG-3´	TNFb1: 124	HEX	103
	IR4: 5´-CCTCTCTCCCCTGCAACACACA-3´	TNFb7: 130		
<b>TNFc</b>	IR6: 5´-GGTTTCTCTGACTGCATCTTGTCC-3´	TNFc1: 156	FAM	103
	IR7: 5´-TCATGGGGAGAACCTGCAGAGAA-3´	TNFc2: 158		

<b>TNFd</b>	IR11: 5´-AGATCCTTCCCTGTGAGTTCTGCT-3´	TNFd1: 123	HEX	101
	IR12: 5´-CATAGTGGGACTCGTTCTCCAAAG-3´	TNFd6: 133		
<b>TNFe</b>	IR13: 5´-GTGCCTGGTTCTGGAGCCTCTC-3´	TNFe1:93	FAM	101
	IR14: 5´-TGAGACAGAGGATAGGAGAGACAG-3´	TNFe3: 97		
<b>MICA</b>	MICA 5F: 5´-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3´	MICA 4,0: 176	FAM	94
	MICA 5R: 5´-CCTTACCATCTCCAGAAACTGC-3´	MICA 9,0: 191		
<b>D6S273</b>	142_3: 5´-ACCAAACCTCAAATTTTCGG-3´	D6S273-1: 136	TET	99
	142_5: 5´-GAGTATTTCTGCAACTTTTC-3´	D6S273-7: 148		
<b>D6S2223</b>	4072F: 5´-AATAATGTTAAGTAACAAACTAGAGTAC-3´	D6S2223-0: 166	TET	104
	4072R: 5´-ACTCCAGCCTGGGCAATAGAGC-3´	D6S2223-3: 172		
<b>BAT2</b>	BAT2-1: 5´-GAGGTCAAAGCTGCAGTA-3´	BAT2-1: 210	TET	100
	BAT2-2: 5´-TAACAAAAGCTCCCTTCACT-3´	BAT2-12: 232		

Las **condiciones** de **PCR** generales para **todos** los **microsatélites** fueron (volumen final=15 µl):

Buffer 10× (de Perkin Elmer) ----- 1.5 µl  
MgCl<sub>2</sub> -----1.25 mM  
dNTPs ----- 200 µM  
*primers* -----0.05 µM cada uno  
Ampli Taq Gold ----- 0.35 Unidades  
DNA ----- 50 ng

Las **características** del **programa** de **PCR** comunes para **todos** los **microsatélites** fueron las siguientes:

- 1) Una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min
- 2) 35 ciclos con tres etapas cada ciclo:
  - 20 s a 95°C (desnaturalización)
  - 20 s a **55°C** (hibridación)
  - 40 s a 72°C (elongación)
- 3) Una elongación final de 7 min a 72°C
- 4) Tiempo indefinido a 4°C

Tras **comprobar** la reacción de **PCR** en geles de **agarosa** según lo explicado en el apartado IV.C.3.a.ii., **analizamos** los fragmentos de **DNA** amplificados con el **secuenciador automático**.

#### 4 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR CON EL SECUENCIADOR AUTOMÁTICO

Para determinar los tamaños de los fragmentos de DNA amplificados previamente mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, primero hay que preparar las muestras para poder introducir las en el secuenciador automático. Este proceso se realiza de la siguiente forma:

- 1- Se prepara una mezcla que contenga:
  - 12  $\mu$ l de formamida que actúa como agente desnaturizante de DNA (proporcionada por Sigma).
  - 0.5  $\mu$ l de marcador GeneScan 350 (Applied Biosystem, Washington, UK), patrón interno de cada muestra.
  - 1  $\mu$ l de DNA de cada una de las muestras amplificadas por PCR, previa dilución 1/5.
- 2- Se desnaturalizan las muestras en el termociclador durante 3 min a 95°C.

Una vez realizado este procedimiento las muestras ya están listas para ser introducidas en el secuenciador automático. Para que este aparato comience a leer los tamaños de los fragmentos de DNA, es necesario que previamente se cree una hoja de inyección en la que se detallan las características que debe tener la carrera electroforética.

La electroforesis va a ocurrir en el interior de un capilar lleno de un polímero (POP-4) proporcionado por la casa Perkin Elmer. Para capturar las moléculas de DNA de nuestra muestra se introduce el propio capilar más un electrodo en el interior del tubo (que contiene dicha muestra). El electrodo genera una diferencia de potencial que atrae al interior del capilar las moléculas de DNA. La separación de estos fragmentos se realiza durante 22 minutos a 60°C, 15000 V y 8 microamperios.

En su trayecto a través del capilar el DNA pasará por la cámara del láser que intermitentemente va lanzando destellos con una frecuencia elevada; es en este momento cuando el fluorocromo responde emitiendo su fluorescencia característica y esta señal es recogida por el aparato como dato bruto ("raw data") que será posteriormente elaborada mediante un proceso matemático que elimina la señal captada indebidamente por los filtros. Ésto se debe a que parte de la señal que emite el compuesto es captada por otros filtros que supuestamente están preparados para recoger la señal de los otros compuestos. De ello se deduce que cada filtro detecta no sólo la señal de un único compuesto sino también parte de la de los otros. Este exceso se elimina mediante una operación matemática que hace uso de unas matrices de compensación establecidas por el personal de Perkin Elmer.

#### IV.C.8. DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS PRESENTES EN EL GEN DE LA IL-10

En el gen de la IL-10, cuya localización es el cromosoma 1, hemos analizado las siguientes **regiones polimórficas**:

4 Los **microsatélites IL-10R** e **IL-10G** situados a 4 y 1.2 kb, respectivamente del origen de transcripción se amplificaron utilizando los siguientes *primers*:

Marcador	Primers	Alelos: pb	Fluorocromo	Ref.
<b>IL-10R</b>	IL-10.3: 5´-CCCTCCAAAATCTATTTGCATAAG-3´	IL-10R1: 111	TET	265
	IL-10.4: 5´-CTCCGCCAGTAAGTTTCATCAC-3´	IL-10R4: 117		
<b>IL-10G</b>	IL-10.A: 5´-GCAACTCCTCGTCGCAAC-3´	IL-10G1: 107	FAM	265
	IL-10.B: 5´-CCTCCAAAGAAGCCTTAGTA-3´	IL-10G18: 141		

Las **condiciones** de **PCR** fueron las generales para **todos** los **microsatélites** y tras **comprobar** la reacción en geles de **agarosa** (según lo explicado en el apartado IV.C.3.a.ii.), **analizamos** los fragmentos de **DNA** amplificados y marcados con fluorocromos en el **secuenciador automático** (véase página 78).

4 Los **polimorfismos** del **promotor -1082 (G/A)**, **-819 (C/T)** y **-592 (C/A)** se analizaron por **PCR específica** de **alelo**<sup>282</sup>. Este método está basado en la detección

simultánea de dos mutaciones situados en la región promotora y al igual que en la amplificación del gen IKBL (+738), se utilizó un control interno para cada muestra con el fin de vigilar que la reacción estaba funcionando correctamente. Las tres reacciones de PCR realizadas fueron:

- a) -1082A/-592C: detecta el promotor **ACC**
- b) -1082A/-819T: detecta el promotor **ATA**
- c) -1082G/-819C: detecta el promotor **GCC**

Dado que está descrito en la literatura, se ha supuesto que siempre que existe una "C" en la posición **-819**, también existe una "C" en **-592**; lo mismo sucede con la pareja -819T/-592A: cuando un individuo presenta una **timina** en **-819**, también presenta una **adenina** en **-592**. Gracias a esta técnica podemos determinar qué polimorfismos se encuentran físicamente en el mismo cromosoma y, por tanto, qué haplotipos son los que forman.

Los **cebadores** utilizados se indican a continuación:

<i>Primers</i>	<b>Secuencia de nucleótidos</b>
<b>1082G</b>	5´-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3´
<b>1082A</b>	5´-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAA-3´
<b>819T</b>	5´-GCAAAGTGGGACAGAGATA-3´
<b>819C</b>	5´-CAAAGTGGGACAGAGATG-3´
<b>592C</b>	5´-CCAGAGACTGGCTTCTTACAGG-3´
<b>HGHU</b>	5´-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3´
<b>HGHD</b>	5´-ATCCAATCACGGATTTCTGTTGTGT-3´

Para un volumen final de 15 µl, las **condiciones** de la **reacción** en **cadena** de la **polimerasa** fueron:

Buffer 10× (de Perkin Elmer) ----- 1.5 µl  
MgCl<sub>2</sub> -----2 mM  
dNTPs ----- 200 µM  
*primers* promotor IL-10 ----- 0.7 µM cada uno  
*primers* Hormona de crecimiento ----- 0.2 µM cada uno  
Ampli Taq Gold -----0.5 Unidades

DNA ----- 50 ng

Las **características** del **programa** de **PCR** se indican a continuación:

- 1) Una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min
- 2) 35 ciclos con tres etapas cada ciclo de:
  - 20 s a 95°C (desnaturalización)
  - 20 s a **62°C** (hibridación)
  - 40 s a 72°C (elongación)
- 3) Una elongación final de 7 min a 72°C
- 4) Tiempo indefinido a 4°C

Las amplificaciones se **comprobaron** en geles de **agarosa** al 1.5% y el tiempo empleado para la visualización de bandas de amplificado fue de 20 minutos.

4 Para determinar los **haplotipos** formados por el **microsatélite IL-10G** y la **primera posición** del **promotor** de la **IL-10 (-1082)** empleamos el método de Cavet<sup>283</sup>. Cada primer específico de alelo de estos dos polimorfismos estaba marcado con un fluorocromo diferente. Además, nosotros también incluimos en esta reacción los *primers* IL-10C1 e IL-10C2 para **tipar simultáneamente** la mutación de la región promotora en **-819**.

Los *primers* utilizados fueron:

Marcador	Primers	Haplotipo: pb	Fluorocr.	Ref.
	IL-10JWF: 5´-AGCAACACTCCTCGTCGCAAC-3´ (primer común)			
<b>IL-10G/-1082</b>	IL-10B1: 5´-CCTATCCCTACTTCCCCC-3´	IL-10G1/-1082G: 115 IL-10G18/-1082G: 149	FAM	265
	IL-10B2: 5´-CCTATCCCTACTTCCCCT-3´	IL-10G1/-1082A: 115 IL-10G18/-1082A: 149	HEX	
<b>IL-10G/-819</b>	IL-10C1: 5´-GCAAAGTGGAGGACAGAGATA-3´	IL-10G1/-819T: 378 IL-10G18/-819T: 412	TET	265
	IL-10C2: 5´-CAAAGTGGAGGACAGAGATG-3´	IL-10G1/-819C: 378 IL-10G18/-819C: 412	FAM	

Las **condiciones** de **PCR** eran las siguientes (volumen final=15 µl)

Buffer 10× (de Perkin Elmer) -----	1.5 µl
MgCl <sub>2</sub> -----	1.2 mM
dNTPs -----	100 µM
<i>primers</i> -----	0.2 µM cada uno
Ampli Taq Gold -----	0.3 Unidades
DNA -----	50 ng

Las **características** del **programa** de **PCR** fueron:

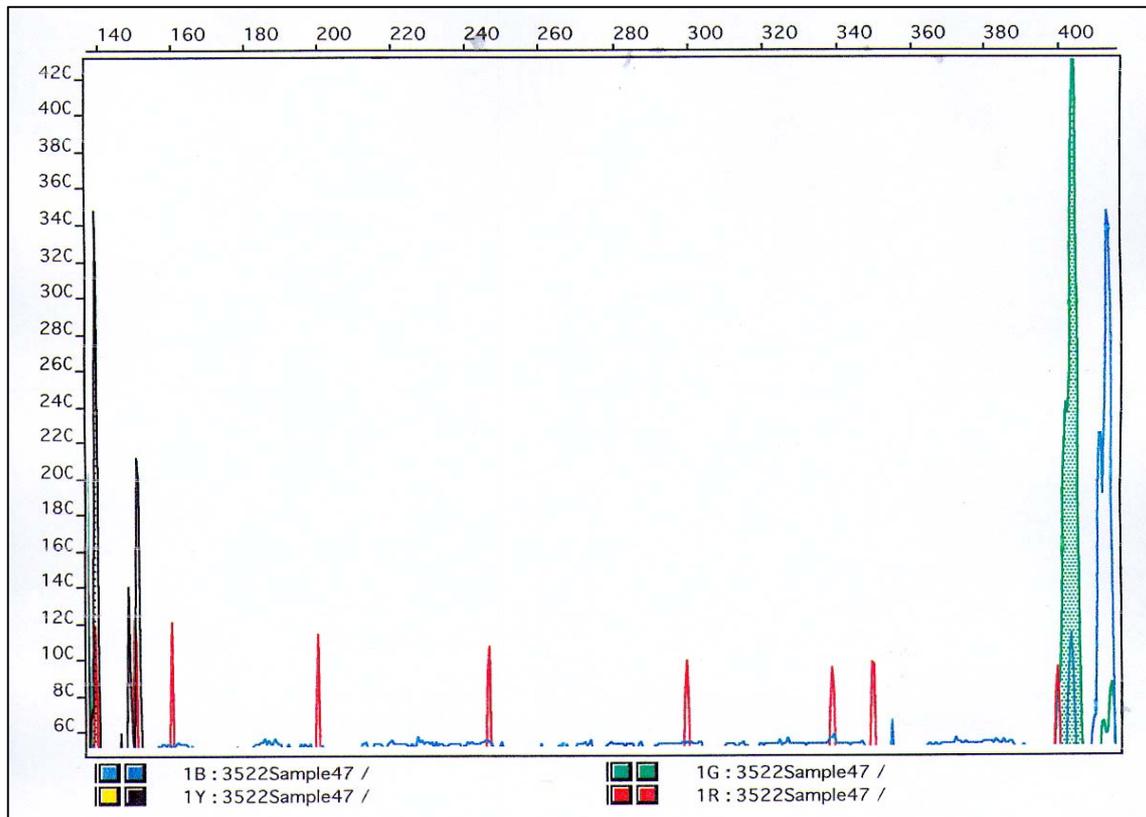
- 1) Una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min
- 2) 35 ciclos con tres etapas cada ciclo:
  - 20 s a 95°C (desnaturalización)
  - 20 s a **62°C** (hibridación)
  - 40 s a 72°C (elongación)
- 3) Una elongación final de 7 min a 72°C
- 4) Tiempo indefinido a 4°C

**Tras** realizar la **reacción** en **cadena** de la **polimerasa**, **comprobación** de la misma y **análisis** de los **fragmentos** IL-10G/-1082/-819 amplificados en el **secuenciador automático**, obtenemos los siguientes datos. En una muestra heterocigota se observaría:

- un máximo de dos pares de picos
  - el tamaño en pares de bases indica el alelo del microsatélite IL-10G
  - y el color del pico indica la base nucleotídica presente en cada polimorfismo.
- El SNP deducido del pico más pequeño de un par forma haplotipo con el SNP deducido del pico más pequeño del otro par.

Para comprender mejor esta determinación haplotípica IL-10G/-1082/-819 utilizamos un **ejemplo** representado en la siguiente gráfica. Los haplotipos que aquí se observan son:

- IL-10G**9**/-1082**A**/-819**T**
- IL-10G**14**/-1082**A**/-819**C**



Esta muestra presenta:

- en la parte de la izquierda dos picos negros. El color negro indica que en la posición del promotor -1082 existe una adenina (el azul hubiera indicado una guanina). Además, los tamaños representan los alelos del microsatélite IL-10G: IL-10G9 (pico de 139 pb) e IL-10G14 (pico de 149 pb).
- por otro lado, en la parte de la derecha se observan dos picos: uno verde y otro azul. La presencia de dos colores señala que este individuo es heterocigoto en la posición -819. El verde denota timina y el azul citosina.
- los picos rojos representan el marcador de peso molecular sin el cual no se podría conocer el tamaño en pares de bases de los fragmentos de cada muestra.
- dada las características de la reacción de PCR sabemos que el pico negro pequeño forma haplotipo con el pico más pequeño de los dos de la derecha (que en este caso es el verde). Asimismo, el otro pico negro (el más grande) forma pareja haplotípica con el pico más grande de la posición -819 (color azul). De esta manera, averiguamos que los dos haplotipos presentes en este individuo son IL-10G9/-1082A/-819T y IL-10G14/-1082A/-819C.

- estos datos junto con los obtenidos de las PCRs específicas de alelo nos llevaron a concluir finalmente que los haplotipos existentes en esta muestra eran: IL-10G**9**/-1082**A**/-819**T**/-592**A** y IL-10G**14**/-1082**A**/-819**C**/-592**C**.

#### IV.C.9. DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO PRESENTE EN EL GEN IL-1RN

El polimorfismo del gen humano del antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RN, cromosoma 2) se sitúa en el **intrón 2** y se caracteriza por la presencia de un número variable de repeticiones en tándem (**VNTR**) de una secuencia de 86 pares de bases (pb)<sup>121</sup>.

En este caso la identificación de alelos es, como en el caso de los microsatélites, por diferencias de tamaño, que se traducen en diferencias de movilidad electroforética. Sin embargo, al ser la diferencia entre un alelo y el siguiente de 86 pares de bases, no se hace necesario disponer del secuenciador automático, y la asignación de alelos se realiza por visualización en gel de agarosa comparando la migración con los marcadores de tamaño conocido previamente<sup>269</sup>. Existen cinco alelos que van del 1 al 5 y que corresponden a 4, 2, 5, 3 y 6 copias de la secuencia repetitiva, respectivamente. Los tamaños oscilan entre 240 pb (alelo 2) y 595 pb (alelo 5)

Los **cebadores** utilizados para el estudio del antagonista del receptor de la IL-1:

<i>Primers</i>	<b>Secuencia de nucleótidos</b>
<b>IL1-RAa</b>	5´- CTCAGCAACACTCCTAT- 3´
<b>IL1-RAb</b>	5´- TCCTGGTCTGCAGGTAA -3´

Las **condiciones** de **PCR** para un volumen final de 15 µl fueron:

Buffer 10× (de Perkin Elmer) ----- 1.5 µl  
 MgCl<sub>2</sub> -----2 mM  
 dNTPs ----- 200 µM  
*primers* ----- 0.2 µM cada uno  
 Ampli Taq Gold -----0.5 Unidades  
 DNA ----- 100 ng

Las **características** del **programa** de **PCR** eran:

- 1) Una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min
- 2) 35 ciclos con tres etapas cada ciclo de:
  - 20 s a 95°C (desnaturalización)
  - 20 s a **57°C** (hibridación)
  - 40 s a 72°C (elongación)
- 3) Una elongación final de 7 min a 72°C
- 4) Tiempo indefinido a 4°C

Finalizada la PCR, comprobamos el producto amplificado realizando una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%. La separación de las bandas se realizó a 100 V durante 30 minutos. En cada carrera electroforética se utilizaron muestras de tipaje ya conocido para asegurar la correcta identificación de los alelos, especialmente de los menos frecuentes (alelos 3, 4 y 5)

#### IV.C.10. MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recogidos en una base de datos dBase IV (Borland) se transfirieron en abril de 1998 a Microsoft® Access 97. Los contajes se establecieron mediante consultas en dicho programa, y los resultados obtenidos de los estudios genéticos se analizaron con los siguientes métodos:

##### $\pi$ ESTUDIO CASO-CONTROL

Con el estudio caso-control, de gran sensibilidad, podemos detectar pequeñas asociaciones. Sin embargo, un resultado positivo en este tipo de análisis no implica necesariamente la existencia de ligamiento entre el marcador dado y la enfermedad. La no plena concordancia étnica de casos y controles, que ocurre cuando la población está estructurada, puede dar lugar a falsos positivos.

Las frecuencias fenotípicas y genotípicas en comparaciones caso-control se llevaron a cabo mediante tablas de contingencia 2x2 o en su caso 2xn. La probabilidad de la distribución fue estimada mediante el estadístico **Chi-cuadrado** y cuando uno de los

valores esperados era menor de 5, se aplicó el test de Fischer. Se escogió el valor de la **p** de una cola o dos dependiendo de nuestras hipótesis *a priori*:

- **Test de una cola:** se aplica cuando la hipótesis de partida es que o bien existe un aumento solo o una disminución sola de un alelo dado.
- **Test de dos colas:** se aplica cuando la hipótesis de partida es que existe una diferencia entre enfermos y controles sin presuponer un aumento o una disminución de un alelo dado.

Los intervalos de confianza de las **odds ratios** al 95% se estimaron con el método de Cornfield, o en caso necesario, se determinaron sus límites exactos.

Todos estos cálculos los realizó el paquete informático Epi Info v6.02 (CDC, Estados Unidos/ WHO, Suiza).

#### $\pi$ ESTUDIO FAMILIAR

Con los estudios basados en familias se intenta evitar los problemas derivados de la estructura de la población. En estos análisis se comparan los haplotipos presentes en el individuo enfermo con los existentes en sus familiares sanos. Así, un resultado positivo sólo puede aparecer si existe ligamiento entre el marcador considerado y el gen responsable de la enfermedad. De entre los diversos métodos propuestos, hemos utilizado la técnica TDT (**T**ransmission **D**isequilibrium **T**est)<sup>284-286</sup>. En este método se compara el alelo transmitido desde un progenitor heterocigoto a su hijo enfermo con el alelo no transmitido. Este test, de gran especificidad, es sin embargo poco sensible y sólo ofrece resultados positivos si la asociación investigada no es muy débil.

Para el cálculo de las probabilidades en esta prueba de desequilibrio de transmisión de alelos a los hijos enfermos se aplicó una simulación informática con un programa de elaboración propia basado en el método de Montercarlo. Este método se aplica de forma general para facilitar cálculos complejos mediante un proceso aleatorio repetido un número elevado de veces. Este programa queda esquematizado de la siguiente manera:

```
INPUT Número De Iteraciones
INPUT Transmitidos; No Transmitidos
Total=Transmitidos + No Transmitidos

FOR I =1 TO Número De Iteraciones

    FOR J=1 TO Total
        IF RANDOM>0.5 THEN T=T+1
    NEXT J

    IF T>=Transmitido THEN P=P+1
    T=0
NEXT I

PRINT P/ Número De Iteraciones.
```

La probabilidad obtenida tras emplear el programa se multiplica por dos si se quiere obtener el valor correspondiente a un test con dos colas, por ser la distribución binomial en la cual se basa, perfectamente simétrica respecto de la media. La corrección del método se comprobó introduciendo en el programa valores procedentes de la literatura y la concordancia fue siempre total con los valores publicados de la  $p$ .

Las probabilidades obtenidas con ambos estudios caso-control y familiar fueron corregidas multiplicando por el número de comparaciones realizadas. Esta corrección (método de Bonferroni) se considera conservadora, en el sentido de sobre corregir las probabilidades. Una corrección menos exigente sería aplicar la fórmula  $p_c = 1 - (1-p)^n$ . Se consideró significativa una asociación cuando la  $p$  corregida fue menor de 0.05.

En cada uno de los cálculos estadísticos efectuados en esta tesis los totales considerados han sido los de las muestras de DNA para las cuales se han podido determinar los alelos presentes en el marcador estudiado. Esto explica que en cada uno de los análisis no siempre coincidiera el número total de casos.

## V. RESULTADOS

Como se menciona en los objetivos de esta tesis, vamos a tratar de determinar asociaciones genéticas entre la esclerosis múltiple y localizaciones cromosómicas, **dentro y fuera del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)**, mediante la utilización de marcadores polimórficos presentes en el genoma.

Con cada uno de los marcadores genéticos estudiados hemos realizado, por un lado, un **estudio caso-control** que detecta la asociación existente entre el polimorfismo dado y la susceptibilidad a padecer la enfermedad y, por otro, un **estudio familiar** que compara, gracias al **TDI (Transmission Disequilibrium Test)**, los alelos transmitidos desde los progenitores a sus hijos enfermos de EM con los no transmitidos. Así determinamos si existe desviación significativa en la transmisión de alguno de estos marcadores investigados con respecto a la distribución teórica esperada (que sería del 50%). Cuando se produce esta desviación podemos afirmar que existe ligamiento.

### V.A. ESTUDIO GENÉTICO **DENTRO** DEL MHC.

Aunque múltiples genes que no pertenecen al MHC contribuyen a la autoinmunidad, el complejo mayor de histocompatibilidad es el locus más importante ya que su aportación equivale casi a la de los demás loci combinados.

#### V.A.1. ESTUDIO DE LA MOLÉCULA DE CLASE II HLA-DR

Como en otras muchas enfermedades autoinmunes, los genes de clase II del MHC presentan una fuerte asociación con la enfermedad y la esclerosis múltiple es el prototipo de autoinmunidad mediada por células CD4<sup>+</sup>. Con este motivo, nuestra investigación se

inició con el estudio de la molécula de clase II, HLA-DR, como molécula presentadora de péptidos a estos linfocitos T.

#### V.A.1.a. ESTUDIO CASO-CONTROL

Para realizar este análisis contamos con un total de 318 pacientes de esclerosis múltiple, definida y establecida por el criterio estándar de Poser, procedentes de la Comunidad de Madrid y no emparentados. Como grupo control utilizamos 382 sujetos sanos, no relacionados y también obtenidos de la región de Madrid.

La distribución alélica de la molécula HLA-DR en afectados de EM y sanos se representa en la siguiente tabla:

Alelos HLA-DR		EM (n=318)	CON (n=382)
DR1		56 (18%)	81 (21%)
DR2		122 (38%) <sup>a</sup>	101 (26%)
DR3		89 (28%)	94 (25%)
DR4		87 (27%)	81 (21%)
DR5	DR11	57 (18%)	87 (23%)
	DR12	8 (2.5%)	5 (1%)
DR6		74 (23%)	111 (29%)
DR7		67 (21%) <sup>b</sup>	108 (28%)
DR8		23 (7%)	30 (8%)
DR9		6 (2%)	6 (1.5%)
DR10		8 (2.5 %)	7 (2%)

Los resultados obtenidos indicaron que:

- <sup>a</sup>: el alelo **HLA-DR2** estaba **incrementado** significativamente en enfermos con respecto a controles: 38% frente a 26%,  $p=0.0007 \wedge p_c=0.008$ ; OR=1.73.
- <sup>b</sup>: el alelo **HLA-DR7** se encontraba **disminuido** de manera significativa en EM aunque el valor de la  $p$  **no** admitía **corrección** por el número de comparaciones efectuadas o corrección de Bonferroni: 21% vs 28%,  $p=0.03 \wedge p_c=ns$ ; OR=0.68.

Dado que el alelo **HLA-DR2** fue la **única asociación clara** detectada en nuestros enfermos de EM, decidimos centrar toda nuestra atención en su estudio. El HLA-DR2 presenta diferentes subtipos: **HLA-DRB1\*1501**, **\*1502**, **\*1601** y **\*1602**, que tras ser analizados estadísticamente obtuvimos los siguientes resultados:

	EM (n=313)	CON (n=363)
<b>HLA-DR2-DRB1*1501</b>	107 (35%) <sup>a</sup>	69 (19%)
<b>HLA-DR2-DRB1 no *1501</b>	10 (3%)	27 (7%)

Con en este estudio se determinó que:

- <sup>a</sup>: el alelo **DRB1\*1501** estaba significativamente **aumentado** (35% en EM versus 19% en sanos,  $p=0.000003$   $\wedge$   $p_c=0.00001$ ; OR=2.3).
- considerando al conjunto de enfermos **DRB1\*1501**, en aquellos individuos **homocigotos** para este alelo **no se incrementaba** significativamente el **riesgo** de padecer esclerosis múltiple (6.5% en afectados frente a 4% en sanos).
- los alelos **DQA1\*0102** y **DQB1\*0602**, al estar en **desequilibrio de ligamiento** con el **DRB1\*1501**, presentaban también sus frecuencias **aumentadas** de forma significativa:
  - DQA1\*0102: 42% en EM vs 32% en controles,  $p=0.004$ ; OR=1.57
  - DQB1\*0602: 40% vs 21%,  $p=0.00006$ ; OR=1.99
- teniendo en cuenta que la fuerza de asociación de un alelo con una enfermedad viene determinada por el valor de la **Odds Ratio (OR)**, cuando observamos este dato en cada uno de los tres alelos de susceptibilidad (OR\*1501=2.3 > OR\*0602=1.99 > OR\*0102=1.57) detectamos que el **DRB1\*1501** podía ser un **más claro marcador genético** de la enfermedad.

Una vez determinado y comprobado, dado que ya estaba descrito en la literatura, que el subtipo de HLA-DR2, HLA-DRB1\*1501, era el alelo asociado a la susceptibilidad a padecer esta esclerosis múltiple, tratamos de conocer si dicho alelo se encontraba distribuido por igual en todos los enfermos o, por el contrario, estaba especialmente representado en algún subgrupo. Con este objeto, dividimos a nuestra población enferma en función del *Sexo* y la *Forma Clínica*.

$\pi$  *Sexo*

Estudios epidemiológicos ya han descrito que las **mujeres** se ven afectadas más frecuentemente que los hombres y la proporción es **2:1**. Los resultados obtenidos tras el estudio del alelo HLA-DRB1\*1501 en ambos sexos fueron los siguientes:

	MUJERES EM (n=203)	HOMBRES EM (n=103)	CON (n=363)
<b>HLA-DRB1*1501</b>	77 (38%) <sup>a, b</sup>	27 (26%)	69 (19%)

Esta tabla indica que:

- <sup>a</sup>: la frecuencia del **DRB1\*1501** estaba **umentada** significativamente en las **mujeres** enfermas con respecto a los individuos sanos (38% frente a 19%,  $p=0.0000008$ ;  $OR=2.60$ ).
- <sup>b</sup>: cuando comparamos las mujeres y los hombres con EM, la frecuencia del **DRB1\*1501** estaba incrementada significativamente en las primeras (38% en **mujeres** enfermas frente a 26% en **hombres** enfermos,  $p=0.04$ ;  $OR=1.72$ )
- **no** encontramos **diferencias** significativas en la distribución de este alelo de susceptibilidad entre los **hombres** enfermos con respecto a los controles (26% en hombres con EM vs 19% en sanos).

 $\pi$  *Forma Clínica*

En función de la evolución clínica de la enfermedad hemos estudiado dos formas o cursos en los pacientes con esclerosis múltiple: **Primaria-Progresiva** (EM-PP) y **Remitente Recurrente** (EM-RR).

Nuestro grupo enfermo estaba formado por 39 individuos con la forma Primaria-Progresiva y 266 con la forma Remitente-Recurrente y la distribución alélica del HLA-DRB1\*1501 en los dos estadios fue la siguiente:

	EM-PP (n=39)	EM-RR (n=266)	CON (n=363)
<b>HLA-DRB1*1501</b>	13 (33%) <sup>a</sup>	94 (35%) <sup>b</sup>	69 (19%)

En **ambas formas clínicas** el **HLA-DRB1\*1501** estaba **umentado** de manera significativa con respecto a las personas sanas:

- <sup>a</sup>: 33% en las EM-PP versus 19% en los controles,  $p=0.03$ ;  $OR=2.13$ .
- <sup>b</sup>: 35% en las EM-RR versus 19% en los controles,  $p=0.000004$ ;  $OR=2.33$ .

Dado que, en la Primaria-Progresiva, la  $p$  obtenida estaba en el límite de la significación estadística y, además, en la literatura existen discrepancias en cuanto a su asociación con el DRB1\*1501, quisimos profundizar más en el estudio de esta variante clínica. Para ello, colaboramos con un grupo del Hospital Vall d'Hebron, dirigido por el Dr. Xavier Montalbán, que nos ofreció la posibilidad de trabajar con 100 enfermos de EM-PP y sus correspondientes controles sanos de Barcelona ( $n=101$ ). Con el análisis de estos sujetos determinamos si la asociación del HLA-DRB1\*1501 a dicha forma era consistente. Los datos obtenidos fueron los siguientes:

	EM-PP (n=100)	CON (n=101)
<b>HLA-DR2</b>	39 (39%) <sup>a</sup>	18 (18%)
<b>HLA-DRB1*1501</b>	36 (36%) <sup>b</sup>	13 (13%)

Comprobamos que:

- **también** se observaba la **asociación** del **HLA-DR2** (<sup>a</sup>:  $p=0.0009$ ;  $OR=2.95$ ) y, en concreto, de su subtipo **HLA-DRB1\*1501** (<sup>b</sup>:  $p=0.0001$ ;  $OR=3.81$ ) con la susceptibilidad a padecer **Primaria-Progresiva**.
- el **aumento** del **tamaño muestral** ( $39 \text{ EM-PP} \wedge 100 \text{ EM-PP}$ ) permitió ver **más fuerte y claramente** dicha asociación.
- estos resultados **concordaron** con los obtenidos en el estudio de los enfermos **EM-RR**.

#### V.A.1.b. ESTUDIO FAMILIAR

Para determinar si el **HLA-DRB1\*1501** se transmitía preferentemente a los hijos enfermos realizamos un estudio **TDT** con 63 familias de esclerosis múltiple. Este test detectó que dicho alelo se transmitía **17** veces a los hijos con EM mientras que **6** veces no se transmitía. El valor de la  $p$  fue **significativo** ( $p=0.017$ ) y, al ser ésta nuestra hipótesis de partida, no fue necesario corregirlo por Bonferroni.

## V.A.2. ESTUDIO DE CLASE III

Como se observa en la página 90 de Resultados, sólo un 35% de los pacientes de esclerosis múltiple presentaban el alelo HLA-DRB1\*1501. Con el fin de conocer otros marcadores polimórficos que otorgasen susceptibilidad a padecer esta patología, hemos estudiado en la región de clase III del MHC los siguientes loci.

### V.A.2.a. GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

Dado que se ha detectado la presencia de la citocina TNF- $\alpha$  en las lesiones del sistema nervioso central y en la encefalomiелitis autoinmune experimental (modelo murino de la EM), diversos equipos de investigación han sugerido su posible papel patogénico y han estudiado determinados polimorfismos presentes en este locus que pudieran estar asociados a la enfermedad.

#### V.A.2.a.i. POLIMORFISMOS EN EL PROMOTOR DEL GEN TNFA

En el promotor del gen TNFA hemos estudiado **tres** posiciones polimórficas que pudieran intervenir en la regulación de la transcripción. Son las siguientes: **-238**, **-308** y **-376**, y todas ellas se caracterizan por presentar en la mayoría de la población una guanina (**G**) aunque también existen alelos con adenina (**A**).

##### V.A.2.a.i.1. ESTUDIO CASO-CONTROL

La distribución fenotípica de las tres mutaciones puntuales en el promotor del gen TNFA se analizó en 238 pacientes de esclerosis múltiple y en 324 controles. Las frecuencias halladas se indican a continuación en la siguiente tabla:

Frecuencias Fenotípicas	EM (n=238)	CON (n=324)
<b>-238A</b>	46 (19%)	51 (16%)
<b>-308A</b>	56 (23%)	79 (24%)
<b>-376A</b>	40 (17%) <sup>a</sup>	29 (9%)

Cuando comparamos estos dos grupos poblacionales:

- **no** encontramos **diferencias significativas** en la distribución fenotípica de las posiciones **-238** y **-308**.
- <sup>a</sup>: se observó un **aumento** significativo de la **Adenina** en la posición **-376** (17% en afectados frente a 9% en controles,  $p=0.0034 \wedge p_c=0.01$ ; OR=2.12).

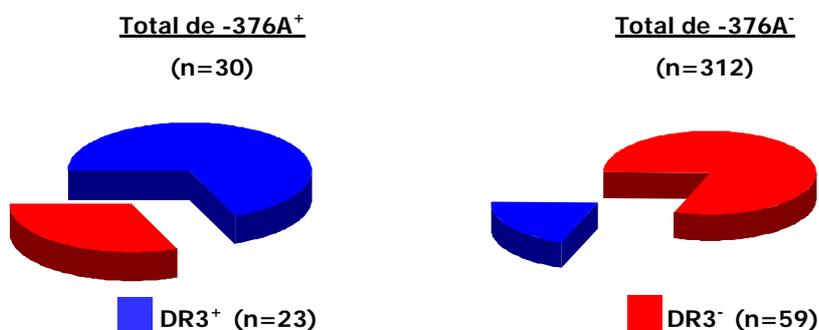
Dado que el alelo **-376A** estaba más representado en los pacientes de esclerosis múltiple que en la población sana quisimos determinar si este aumento era debido a una o a varias de las siguientes causas:

- Desequilibrios de ligamiento** entre **-376A** y algún **alelo** de la molécula de la clase II HLA-DR.
- Efecto independiente** de **-376A** con respecto a **clase II**.
- Efecto aditivo** de **-376A** al efecto ya conocido y establecido del alelo **HLA-DRB1\*1501**.

#### a) DESEQUILIBRIOS DE LIGAMIENTO ENTRE EL -376A Y ALGÚN ALELO DE LA MOLÉCULA DE CLASE II HLA-DR

El desequilibrio de ligamiento existente entre dos alelos de genes diferentes se determina en individuos sanos. Cuando estudiamos estos sujetos observamos que:

$\pi$  Dentro de los controles que presentaban la **adenina** en la posición **-376** del promotor (n=30), **sólo** la proporción del alelo de clase II **HLA-DR3** era **mucho mayor** (n=23) que dentro de los individuos que no tenían esta adenina (n=312), en los que el HLA-DR3 se encontraba únicamente en 59 individuos. Este análisis se representaría así:



$\pi$  Dicho de otra forma, en los controles HLA-DR3<sup>+</sup> (n=82) existía mucho más alelo -376A (n=23) que en los controles HLA-DR3<sup>-</sup> (n=260), en los que la "A" era menor (n=7).

Una vez establecido el **fuerte y único desequilibrio de ligamiento** existente entre el alelo **-376A** del promotor del gen TNFA con el alelo de clase II **HLA-DR3** y su correspondiente haplotipo también de clase II HLA-DRB1\*0301/HLA-DQA1\*0501/HLA-DQB1\*0201 ( $p < 10^{-11} \wedge p_c < 10^{-10}$ ; RR=4.05), quisimos conocer si el aumento encontrado de este -376A en los enfermos de EM era debido a que el HLA-DR3 también estaba asociado en estos individuos.

Como se observa en la tabla de la página 89 de Resultados y que aquí también indico, **no** se encontró **diferencia** en la distribución del **HLA-DR3** cuando comparamos **enfermos y sanos**:

- de los 318 pacientes de EM, 89 eran HLA-DR3 (28%)
- de los 382 controles, 94 eran HLA-DR3 (25%)

Dado que estos porcentajes eran muy similares pudimos afirmar que el **HLA-DR3** **no** estaba **asociado** a la esclerosis múltiple.

#### b) EFECTO INDEPENDIENTE DEL -376A CON RESPECTO AL ALELO DE CLASE II HLA-DR3

Para confirmar que el **-376A** tiene **efecto independiente** de la molécula de clase II **HLA-DR3**, estratificamos tanto a los enfermos como a los controles en dos grupos o estratos: **-DR3<sup>+</sup>** y **-DR3<sup>-</sup>**, y estudiamos cómo se distribuía la adenina en cada uno de ellos.

	EM DR3 <sup>+</sup> (n=78)	CON DR3 <sup>+</sup> (n=82)	EM DR3 <sup>-</sup> (n=210)	CON DR3 <sup>-</sup> (n=260)
<b>-376A</b>	35 (45%)	23 (24%)	15 (7%)	7 (3%)

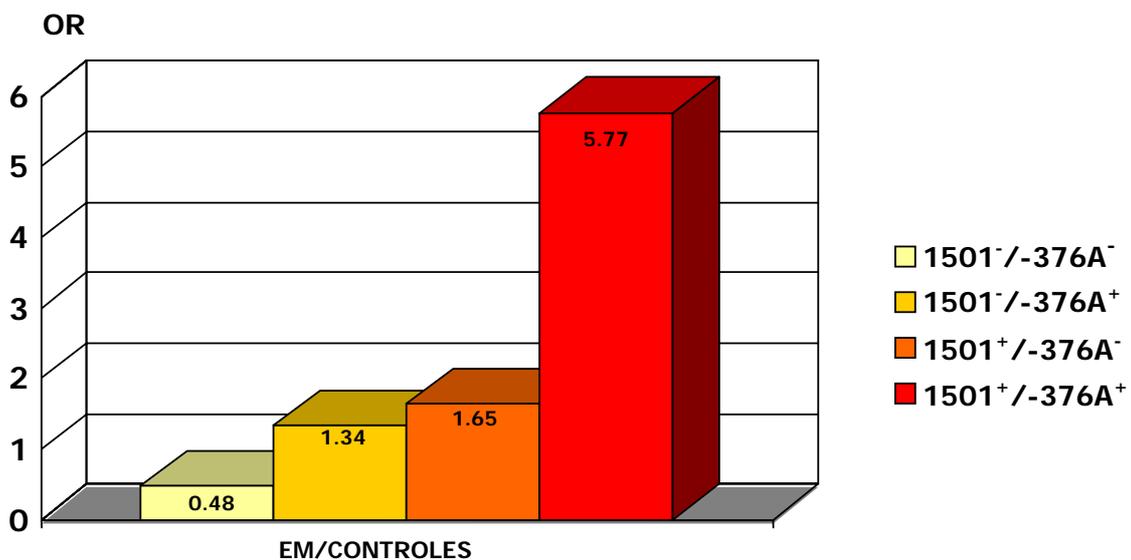
Este análisis nos permitió conocer que en cualquiera de los subgrupos estudiados, la proporción del **-376A** era **siempre mayor** en los **enfermos** que en los individuos sanos. Es decir, este alelo del promotor se **asociaba** a la patología **independientemente** de la presencia del **alelo 3** del **HLA-DR**.

## c) EFECTO ADITIVO DEL -376A AL EFECTO DEL HLA-DRB1\*1501

Conocida ya la asociación existente entre el alelo HLA-DRB1\*1501 y la esclerosis múltiple y establecida, también, la asociación entre el polimorfismo de la posición -376 del promotor del gen TNFA con dicha patología, quisimos conocer si la susceptibilidad otorgada por el **-376A** presentaba un **efecto aditivo** a la **susceptibilidad concedida** por el **DRB1\*1501**.

Para detectar este efecto utilizamos el valor de la **Odds Ratio (OR)** ya que, como hemos mencionado en esta tesis, mide la fuerza de asociación de un alelo con una enfermedad. En la siguiente gráfica se representan las distintas OR obtenidas tras las comparaciones efectuadas entre enfermos y controles en función de la presencia o no de los dos alelos de susceptibilidad:

- Individuos 1501<sup>+</sup> y -376A<sup>+</sup> 7% en EM vs 1% en CON, p=0.0005; OR=**5.77**
- Individuos 1501<sup>+</sup> y -376A<sup>-</sup> 25% en EM vs 17% en CON, p=0.01; OR=**1.65**
- Individuos 1501<sup>-</sup> y -376A<sup>+</sup> 10% en EM vs 8% en CON, p=0.32; OR=**1.34**
- Individuos 1501<sup>-</sup> y -376A<sup>-</sup> 58% en EM vs 74% en CON, p=0.00005; OR=**0.48**



Como se aprecia en la columna **roja**, los sujetos que presentaban los dos alelos asociados a la enfermedad: **DRB1\*1501** y **-376A** tenían **mucha más susceptibilidad** (OR=5.77) a padecer EM que los sujetos con sólo un alelo, el otro, o ninguno de los dos.

#### 4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -376A Y LA FORMA PRIMARIA-PROGRESIVA

Por otra parte, pensamos que podíamos utilizar el elevado número de muestras de pacientes con Primaria-Progresiva procedentes de Barcelona (n=100) para averiguar si este alelo del promotor del gen TNFA se asociaba también a la forma minoritaria de la enfermedad. La distribución de la adenina en los enfermos EM-PP y sus controles fue:

	EM-PP (n=100)	CON (n=101)
<b>-376A</b>	16 (16%) <sup>a</sup>	6 (6%)

Como se aprecia en esta tabla:

<sup>a</sup>: el alelo -376A también estaba **umentado** significativamente en estos pacientes con **Primaria-Progresiva** (16% frente a 6%, p=0.024; OR=2.98).

Además, observamos que este incremento obtenido fue más relevante cuando estudiamos la distribución de la "A" entre afectos y controles que **no** tuvieran el DRB1\*1501:

	EM-PP 1501 <sup>-</sup> (n=62)	CON 1501 <sup>-</sup> (n=89)
<b>-376A</b>	14 (23%) <sup>a</sup>	6 (7%)

<sup>a</sup>: la **significación estadística** encontrada **umentó** considerablemente al comparar el 23% de los enfermos EM-PP DRB1\*1501 negativos con el 7% de controles DRB1\*1501 negativos (p=0.003; OR=4.61).

#### V.A.2.a.i.2. ESTUDIO FAMILIAR

El estudio **TDT** de las 63 familias de esclerosis múltiple permitió obtener las siguientes conclusiones:

- los alelos con adenina o guanina de las tres posiciones polimórficas del promotor del gen TNFA: -238, -308 y -376 aparecían **solamente** formando **cuatro** combinaciones o **haplotipos** de los ocho posibles. Este hecho también se comprobó cuando estudiamos otras familias de otras enfermedades como el déficit de inmunoglobulina A y la enfermedad celíaca. Los haplotipos existentes en nuestra población eran los siguientes:

<b>-238</b>	<b>-308</b>	<b>-376</b>
G	G	G
A	G	G
A	G	A
G	A	G

- además, observamos que **siempre** que un individuo presentaba una **adenina** en la posición **-376 también** tenía una **adenina** en la posición **-238**. Sin embargo, esto **no** sucedía **al contrario**, podían existir haplotipos con adenina en -238 y no en -376.
- comprobamos que el fuerte desequilibrio de ligamiento existente entre el -376A y el HLA-DR3, determinado en la página 94 de Resultados, se corroboraba aquí también; del total de haplotipos TNF-376A (n=15), 11 llevaban también HLA-DR3.
- como en el total de los enfermos de EM, el DRB1\*1501 es más frecuente (35%) que la -376A del promotor (17%), el **análisis** de transmisión de este último alelo fue realizado **eliminando** el **posible efecto distorsionador** que producía el **DRB1\*1501**. Para ello, sólo aplicamos este **test** a los padres heterocigotos que presentaban en un **haplotipo** el alelo **-376A** y que en el otro, no llevaban el DRB1\*1501. Bajo estas condiciones, este estudio TDT determinó que sólo **12** progenitores llevaban el **-376A sin** el **DRB1\*1501** en el otro haplotipo y, de estos 12, en **7** ocasiones se **transmitía** la **"A"** y **5 no**. A pesar de que la estadística no fue significativa (7 vs 5), observamos que este resultado era compatible con nuestra hipótesis de partida.

#### V.A.2.a.ii. MICROSATÉLITES EN LA REGIÓN DEL TNF

En esta tesis hemos estudiado 5 microsatélites cercanos al locus del TNF. El número de alelos observados para cada uno de ellos fue el siguiente: **TNFa** (13 alelos),

**TNFb** (7 alelos), **TNFc** (2 alelos), **TNFd** (5 alelos) y **TNFe** (3 alelos). Las hipotéticas combinaciones que forman estos marcadores son múltiples, sin embargo, sólo un número determinado de haplotipos están, de hecho, presentes en nuestra población. De todos los hallados, aquéllos cuya frecuencia, tanto en el grupo enfermo como en el control, era inferior al 3% no fueron estudiados.

#### V.A.2.a.ii.1. ESTUDIO CASO-CONTROL

La distribución fenotípica de los haplotipos TNFabcde en el total de los pacientes de esclerosis múltiple (n=288) y de los sujetos sanos (n=354) se indica en la siguiente tabla:

Haplotipos TNFabcde	EM (n=288)	CON (n=354)	
<b>a1b5c2d4e3</b>	50 (17%) <sup>a</sup>	30 (8%)	
<b>a2b1c2d4e1</b>	58 (20%)	65 (18%)	
<b>a2b3c1d1e3</b>	36 (13%)	43 (12%)	
<b>a2b5c2d4e3</b>	8 (3%)	23 (6%)	
<b>a4b5c1d3e3</b>	24 (8%)	23 (6.5%)	
<b>a6b5c1d3e3</b>	46 (16%)	64 (18%)	
<b>a7b4c1d3e3</b>	36 (13%) <sup>b</sup>	68 (19%)	
<b>a10b4</b>	<b>c1d3e3</b>	45 (16%)	73 (21%)
	<b>c1d4e3</b>	20 (7%)	30 (8%)
<b>a11b4c1d3e3</b>	82 (28%) <sup>c</sup>	76 (21%)	
<b>a13b4c1d5e3</b>	18 (6%)	25 (7%)	

Estos datos reflejaron que:

- <sup>a</sup>: el **incremento** del **a1b5c2d4e3** era estadísticamente significativo en los pacientes de EM con respecto a los controles (17% frente a 8%,  $p=0.0007 \wedge p_c=0.008$ ; OR=2.27).
- <sup>b</sup>: el haplotipo **a7b4c1d3e3** estaba **disminuido** significativamente en los **enfermos** aunque esta significación estadística no admitía la corrección de Bonferroni (13% en afectados de EM versus 19% en sujetos sanos,  $p=0.02 \wedge p_c=ns$ ; OR=0.60).

- °: el **aumento** significativo del **a11b4c1d3e3** tampoco se mantenía tras multiplicar por el número de comparaciones efectuadas (28% en los pacientes de esclerosis múltiple frente a 21% en los individuos control,  $p=0.04 \wedge p_c=ns$ ;  $OR=1.46$ ).

Una vez halladas las **asociaciones genéticas** de estos tres haplotipos con la esclerosis múltiple tratamos de averiguar si éstas eran **primarias** (efecto por sí mismo, independiente de otros marcadores estudiados) o **secundarias** (debido a desequilibrios de ligamiento con otros genes) a la enfermedad:

#### 4 a1b5c2d4e3

El estudio de este haplotipo en la población control determinó que existía un **fuerte desequilibrio** de **ligamiento** entre el alelo **-376A** del promotor del gen TNFA y el **TNFA1b5c2d4e3**. En el conjunto de individuos que presentaban la **adenina** ( $n=29$ ), la proporción de este TNFA1b5c2d4e3 era **mucho mayor** ( $n=26$ ) que dentro de los individuos que carecían de ella ( $n=303$ ), en los que el a1b5c2d4e3 se encontraba únicamente en 1 sano ( $p < 10^{-62} \wedge p_c < 10^{-61}$ ;  $RR=97.7$ ). Este enorme desequilibrio permitió explicar que el aumento de dicho haplotipo en los enfermos era debido al aumento del -376A en la enfermedad y, como ambos aparecían casi siempre juntos formando parte del mismo haplotipo, consideramos estos marcadores como **marcadores equivalentes**. En este sentido, el estudio detallado y minucioso de la combinación alélica a1b5c2d4e3 no fue necesario realizarlo.

#### 4 a7b4c1d3e3

Como en el caso anterior, para determinar el tipo de asociación que existía entre este TNFAbcde y la enfermedad, estudiamos a los controles y observamos que también en ellos el **TNFA7b4c1d3e3** se encontraba en **desequilibrio** de **ligamiento** con un alelo de la molécula HLA-DR de clase II, **HLA-DR7**. De los 64 sujetos con a7b4c1d3e3, 45 llevaban el HLA-DR7; en cambio, de los 278 individuos sin a7b4c1d3e3, sólo 47 presentaban el HLA-DR7 ( $p < 10^{-17} \wedge p_c < 10^{-16}$ ;  $RR=6.4$ ). Es decir, la ligera disminución de esta combinación haplotípica en los individuos con esclerosis múltiple era probablemente secundaria a la pequeña reducción del HLA-DR7 existente también en esta enfermedad.

#### 4 a11b4c1d3e3

El haplotipo TNFa11b4c1d3e3, como en los dos casos anteriores, se encontraba en **desequilibrio de ligamiento** con el alelo de clase II **HLA-DRB1\*1501**. De los 64 controles DRB1\*1501 positivos, 42 llevaban el TNFa11b4c1d3e3; mientras que, de los 280 individuos DRB1\*1501 negativos, únicamente 32 personas presentaban a11b4c1d3e3 ( $p < 10^{-20} \wedge p_c < 10^{-19}$ ; RR=5.7).

Dado que el HLA-DRB1\*1501 y el a11b4c1d3e3 estaban asociados a la enfermedad y, como acabamos de ver, los dos alelos están en **desequilibrio de ligamiento**, pudimos deducir que ambos formaban parte del mismo haplotipo. De hecho, existe un **haplotipo ancestral**, llamado **HA 7.1**, que los contiene. Para determinar si la contribución de uno era independiente o aditiva a la contribución del otro en la patología, realizamos el siguiente análisis:

- **EFEECTO INDEPENDIENTE:**

- a) del **HLA-DRB1\*1501** con respecto al **a11b4c1d3e3** ( $n_{total} = \text{sujetos a11b4c1d3e3}^-$ ):  
47 de 205 (23%) **enfermos DRB1\*1501 sin a11b4c1d3e3** versus 22 de 266 (8%) **controles DRB1\*1501 sin a11b4c1d3e3**,  $p=0.000008$ ; OR=3.30.
- b) del **a11b4c1d3e3** con respecto al **HLA-DRB1\*1501** ( $n_{total} = \text{sujetos DRB1*1501}^-$ ):  
35 de 193 (18%) de **enfermos a11b4c1d3e3 sin DRB1\*1501** versus 32 de 276 (11%) de **controles a11b4c1d3e3 sin DRB1\*1501**,  $p=0.04$ ; OR=1.69.

Como indican los valores significativos de ambas  $p$ , los dos marcadores, **independientemente** el uno del otro, se asociaban a la EM.

- **EFEECTO ADITIVO:**

- a) del **HLA-DRB1\*1501** sobre el **a11b4c1d3e3** ( $n_{total} = \text{sujetos a11b4c1d3e3}^+$ ):  
46 de 81 (57%) de **enfermos DRB1\*1501 con a11b4c1d3e3** frente a 42 de 74 (57%) de **controles DRB1\*1501 con a11b4c1d3e3**,  $p=0.9$ ; OR=1.

Esta **no** significación estadística reveló que el **DRB1\*1501** **no** otorgaba **más susceptibilidad** a los individuos **a11b4c1d3e3<sup>+</sup>**.

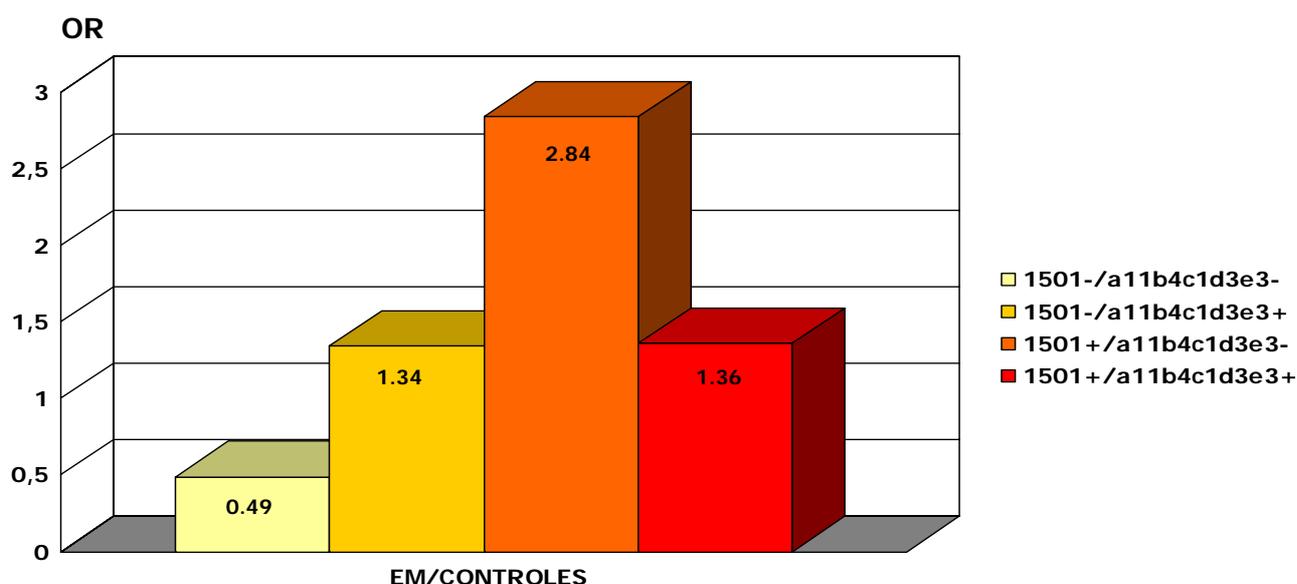
b) del **a11b4c1d3e3** sobre el **HLA-DRB1\*1501** ( $n_{\text{total}} = \text{sujetos DRB1*1501}^+$ ):

46 de 93 (49%) de **enfermos a11b4c1d3e3 con DRB1\*1501** versus 42 de 64 (66%) de **controles a11b4c1d3e3 con DRB1\*1501**,  $p=0.04$ ;  $OR=0.51$ .

Este resultado significativo indicó que el **a11b4c1d3e3 disminuía** la susceptibilidad ( $OR < 1$ ) conferida por el **DRB1\*1501**.

Para observar más claramente los efectos de estas dos asociaciones, HLA-DRB1\*1501 y a11b4c1d3e3, a continuación, representamos gráficamente los valores de las odds ratios obtenidas tras las comparaciones realizadas en enfermos y controles en función de la presencia o no de los mismos:

- Individuos 1501<sup>+</sup> y a11b4c1d3e3<sup>+</sup> <sup>TM</sup> 16% en EM vs 12% en CON,  $p=0.18$ ;  $OR=1.36$
- Individuos 1501<sup>+</sup> y a11b4c1d3e3<sup>-</sup> <sup>TM</sup> 16% en EM vs 6% en CON,  $p=0.00007$ ;  $OR=2.84$
- Individuos 1501<sup>-</sup> y a11b4c1d3e3<sup>+</sup> <sup>TM</sup> 12% en EM vs 9% en CON,  $p=0.25$ ;  $OR=1.34$
- Individuos 1501<sup>-</sup> y a11b4c1d3e3<sup>-</sup> <sup>TM</sup> 55% en EM vs 71% en CON,  $p=0.00001$ ;  $OR=0.49$



Como representa la columna **roja**, los individuos con **DRB1\*1501** y **TNFA11b4c1d3e3** presentaban **mucha menos susceptibilidad** (OR=1.36) a padecer la enfermedad que aquellos sujetos que sólo tenían el DRB1\*1501 (OR=2.84) e igual susceptibilidad que aquéllos que sólo tenían el haplotipo TNFA11b4c1d3e3 (OR=1.34).

#### 4 ESTUDIO DEL HAPLOTIPO HLA-DRB1\*1501/TNFA11b4c1d3e3 Y LA FORMA PRIMARIA-PROGRESIVA

Dado el pequeño número de pacientes EM-PP (n=39) con el que contábamos, resultó difícil determinar si la disminución de susceptibilidad existente en los individuos con el haplotipo HLA-DRB1\*1501/TNFA11b4c1d3e3 ocurría también en dicha forma clínica. Con este propósito, analizamos las 100 Primarias Progresivas procedentes de Barcelona y sus correspondientes controles (n=101). Los resultados obtenidos mostraron que:

- 1- **también** en estos individuos **EM-PP DRB1\*1501**, la proporción del haplotipo **TNFA11b4c1d3e3** era **menor** que en los controles DRB1\*1501: 46% en enfermos versus 75% en controles, p=0.08; OR=0.28.
- 2- en los **sujetos** que no presentaban este TNFAbcde (**\*1501<sup>+</sup>a11b4c1d3e3<sup>-</sup>**) la susceptibilidad conferida por el DRB1\*1501 **umentaba** considerablemente (19% en pacientes frente a 3% en sanos, p=0.0003; OR=7.66) con respecto a las personas \*1501<sup>+</sup>a11b4c1d3e3<sup>+</sup> (16% vs 9%, p=0.92; OR=1.95).

#### V.A.2.a.ii.2. ESTUDIO FAMILIAR

El análisis **TDI** realizado en las 63 familias de esclerosis múltiple se representa en la siguiente tabla:

Haplotipos	Individuos Homocigotos	T	NT	p
<b>DRB1*1501 (n=33)</b>	5	17	6	0.017
<b>DRB1*1501</b> a11b4c1d3e3 <sup>+</sup> (n=18)	0	10	8	ns
a11b4c1d3e3 <sup>-</sup> (n=15)	1	11	2	0.01

Estos datos indicaron que:

- existía una diferencia significativa en la transmisión de los haplotipos DRB1\*1501 a los hijos enfermos: **17T** versus **6NT** ( $p=0.017$ ), estudio ya realizado en la página 92 de Resultados.
- el **DRB1\*1501** se **transmitía menos** a los hijos enfermos (10T vs 8NT) cuando iba **acompañado** de los microsatélites **TNFA11b4c1d3e3** ( $p=ns$ ) y **más** cuando el **DRB1\*1501 no** llevaba dicho **TNFAbcde** ( $p=0.01$ ).

Para reforzar esta idea, quisimos estudiar en los 5 individuos homocigotos para el DRB1\*1501 y excluidos del TDT, qué se transmitía preferentemente a los hijos con esclerosis múltiple cuando se enfrentaba un haplotipo DRB1\*1501/TNFA11b4c1d3e3 con otro haplotipo DRB1\*1501 pero con un TNFAbcde diferente. De los 5:

| 1 no presentaba el a11b4c1d3e3 en ninguno de sus haplotipos, materno o paterno, por lo que no fue considerado en el estudio.

| y en los otros 4 sujetos, que sí cumplían este requisito observamos que:

- ningún haplotipo \*1501/a11b4c1d3e3 se transmitía y, en cambio,
- 4 eran los haplotipos transmitidos cuando el DRB1\*1501 se encontraba junto con otra combinación TNFAbcde diferente ( $p=0.07$ ).

Sabiendo que el **HLA-DRB1\*1501** y el **TNFA11b4c1d3e3** forman parte del haplotipo ancestral **7.1**, quisimos determinar **qué** hipotético **gen** o **genes** de **resistencia** existían en este cromosoma que disminuía la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple.

#### V.A.2.b. GEN IKBL

Nuestra búsqueda comenzó por el gen del inhibidor  $\kappa$  B-like (**IKBL**) ya que recientemente un equipo australiano describió que en este **HA 7.1** y, concretamente dentro de este locus, existía un **marcador haploespecífico**. Se trataba de un

polimorfismo situado en la posición +738 y caracterizado por la sustitución de una Timina (T) por una Citosina (C).

#### 4 ESTUDIO CASO-CONTROL Y FAMILIAR

Como cabía esperar, el alelo **HLA-DRB1\*1501**, los microsatélites **TNFa11b4c1d3e3** y la **citocina** se encontraban en **desequilibrio de ligamiento** formando parte del mismo haplotipo (el HA **7.1**). De 40 controles con DRB1\*1501 y con dicho TNFa11b4c1d3e3, 13 presentaban la "C"; en cambio, de 255 controles sin \*1501 o sin este TNFabcde, 7 individuos llevaban la mutación ( $p < 10^{-7} \wedge p_c < 10^{-6}$ ; RR=11.84).

Con el fin de determinar si este polimorfismo en cuestión contribuía en la disminución de la susceptibilidad a padecer la enfermedad, estudiamos dentro de los individuos enfermos y sanos DRB1\*1501 la distribución del haplotipo 7.1 con la timina y la citosina:

		EM (n=93)	CON (n=55)	p	OR
<b>DRB1*1501/a11b4c1d3e3/</b>	<b>T</b>	34 (36%)	27 (50%)	0.13	0.60
	<b>C</b>	12 (13%)	13 (24%)	0.10	0.48

Los resultados no significativos obtenidos tras este análisis indicaron que la **menor susceptibilidad otorgada** por el haplotipo ancestral **7.1** (con respecto a la conferida por el DRB1\*1501) era la **misma independientemente** de la presencia de la **Timina** (OR=0.60) o la **Citosina** (OR=0.48).

Por otro lado, si realmente la mutación en +738 proporcionara resistencia, cabría esperar que en ausencia del alelo de susceptibilidad, DRB1\*1501, la citosina tuviera también un papel protector. Para estudiar este efecto, comparamos los pacientes y los controles DRB1\*1501 negativos con la "C", y observamos que no había diferencia significativa entre ambos grupos: 4% individuos EM DRB1\*1501<sup>-</sup>+738C frente a 3% controles DRB1\*1501<sup>-</sup>+738C,  $p=0.48$ ; OR=1.45. Es decir, no sólo la "C" era poco frecuente en enfermos sino que además se encontraba ligeramente aumentada (OR>1).

Cuando realizamos el estudio **TDT** con las 63 familias de esclerosis múltiple, **no** obtuvimos **resultados concluyentes** porque el número de haplotipos **DRB1\*1501/a11b4c1d3e3/+738(C/T)** procedentes de padres heterocigotos era pequeño y no representativo. Con la "C": 2 transmitidos vs 4 no transmitidos, y con la "T": 8 versus 4.

#### 4 ESTUDIO DEL HAPLOTIPO HLA-DRB1\*1501/TNFA11b4c1d3e3/+738C Y LA FORMA PRIMARIA-PROGRESIVA

A pesar de que no obtuvimos resultados significativos en el análisis del alelo **+738C**, quisimos comprobar si su presencia en el haplotipo 7.1 proporcionaba menos susceptibilidad en los afectados con **Primaria-Progresiva**. Para estudiar la distribución de esta combinación haplotípica utilizamos la muestra adicional de pacientes EM-PP (n=100) y sus correspondientes controles (n=101) procedentes de Barcelona. *NOTA:* Los porcentajes están referidos al total de DRB1\*1501.

- DRB1\*1501/TNFA11b4c1d3e3/+738**T**: 28% en EM-PP vs 50% en sanos, p=0.15; OR=0.40.
- DRB1\*1501/TNFA11b4c1d3e3/+738**C**: 17% en EM-PP vs 25% en sanos, p=0.4; OR=0.62

A pesar de que los valores de la p no fueron significativos, las odds ratios <1 indicaron que la **pequeña susceptibilidad** proporcionada por el haplotipo DRB1\*1501/TNFA11b4c1d3e3 **no** dependía de la existencia de la "T" o la "C".

#### V.A.3. OTROS MICROSATÉLITES EN CLASE I Y III PRESENTES EN EL HAPLOTIPO ANCESTRAL 7.1

Siguiendo con la hipótesis de que en el haplotipo 7.1 existía un supuesto gen o genes de protección y visto que no era el locus IKBL, nuestro estudio continuó en su búsqueda utilizando la técnica del mapeo de microsatélites.

Por orden centrómero^telómero, los microsatélites investigados en el complejo mayor de histocompatibilidad (además del TNFabcde, ya explicado en la página 98 de Resultados) y el número de alelos observados para cada uno de ellos fue el siguiente:

- En clase III: **D6S273** (7 alelos), **BAT2** (13 alelos).
- En la frontera de clase III con clase I: **MICA** (5 alelos).
- En clase I: **D6S2223** (4 alelos).

El HA 7.1 está constituido por los siguientes alelos:

	DRB1	D6S273	BAT2	TNFabcde	IKBL	MICA	D6S2223
<b>7.1</b>	*1501	5	3	a11b4c1d3e3	C/T	5.1	2

#### $\pi$ ESTUDIO CASO-CONTROL Y FAMILIAR

Con respecto al conjunto de los individuos que presentaban el alelo de susceptibilidad DRB1\*1501, esta combinación haplotípica apareció en el 22% (24 de 107) de los enfermos de esclerosis múltiple y en el 33 % (23 de 69) de los sujetos sanos. A pesar de que el análisis estadístico no ofreció resultados significativos ( $p=0.11$ ;  $OR=0.58$ ) observamos que:

- efectivamente existía una **disminución** de la frecuencia del **HA 7.1** (33%  $CON^{\wedge}22\%$  EM).
- y que la **odds ratio**, al ser **menor** que **1** ( $OR=0.58$ ), indicaba menor susceptibilidad.

Por otro lado, cuando comparamos esta odds ratio con la obtenida en el análisis del DRB1\*1501/a11b4c1d3e3 ( $OR=0.51$ , página 102 de Resultados), observamos que ambas eran muy similares. En este sentido, se detectó que existía la **misma** poca **susceptibilidad** en los **individuos** que presentaban **todos** los **marcadores** del **haplotipo 7.1** que en **aquellos** que **sólo** tenían **DRB1\*1501/TNFA11b4c1d3e3**.

Para finalizar, los **datos** con los que contaba en este estudio caso-control y que aquí presentamos **no nos permitieron descartar** si la **disminución** de **susceptibilidad** otorgada por el **DRB1\*1501** junto con el **a11b4c1d3e3** ocurría

también en **trans**, esto es, cuando ambos marcadores no formaban parte del mismo haplotipo. Para comprobar este fenómeno utilizamos las familias de los enfermos. El estudio TDT consistió en detectar si, este TNFabcde solo, se transmitía menos a los hijos que presentaban por parte del otro progenitor el alelo de susceptibilidad, DRB1\*1501. Los resultados obtenidos mostraron que esta situación solamente ocurría una vez y que en dicha ocasión el TNFa11b4c1d3e3 era transmitido por la madre al hijo DRB1\*1501. Aunque este dato indicó que no se disminuía la susceptibilidad cuando ambos marcadores estaban en trans, el análisis tendrá que ser corroborado con un mayor número de familias de EM.

## V.B. ESTUDIO GENÉTICO **FUERA** DEL MHC

### V.B.1. GEN DE LA INTERLEUCINA-10

En esta tesis hemos estudiado las siguientes **regiones variables** o **polimórficas** en el **gen** de la **IL-10**:

- Dos zonas de DNA altamente repetitivo (microsatélites): **IL-10R** e **IL-10G**.
- Tres mutaciones puntuales en el promotor de dicho gen: **-1082**, **-819**, y **-592**.

El **objetivo** de esta investigación fue determinar la **asociación** existente entre alguno (o algunos) de estos **polimorfismos** y la **susceptibilidad** a padecer **esclerosis múltiple**. Como en los estudios anteriores, esta medición se realizó, por un lado, con el análisis caso-control y, por otro, con el estudio familiar.

#### V.B.1.a. MICROSATÉLITES IL-10R E IL-10G

##### V.B.1.a.i. ESTUDIO CASO-CONTROL

En una primera fase del estudio, comparamos la distribución fenotípica de los alelos de cada uno de estos dos microsatélites en nuestra población enferma (n=300) con

respecto a la población control (n=357). Los resultados obtenidos se indican a continuación en la siguiente tabla:

Frecuencia fenotípica	EM (n=300)	CON (n=357)
<b>IL-10R</b>		
<b>2</b>	283 (94%)	342 (96%)
<b>3</b>	112 (33%)	121 (34%)
<b>4</b>	6 (2%)	13 (4%)
<b>IL-10G</b>		
<b>7</b>	16 (5%)	10 (3%)
<b>8</b>	24 (8%)	19 (5%)
<b>9</b>	174 (58%)	190 (53%)
<b>10</b>	38 (13%)	51 (14%)
<b>11</b>	51 (16%) <sup>a</sup>	87 (24%)
<b>12</b>	50 (16%) <sup>b</sup>	33 (9%)
<b>13</b>	119 (40%)	167 (47%)
<b>14</b>	62 (21%)	54 (15%)
<b>15</b>	6 (2%)	10 (3%)

Estos datos demostraron que:

- los alelos **IL-10R2**, **IL-10G9** e **IL-10G13** eran los **más frecuentes** en nuestra población. En cambio, el **IL-10R1** y los alelos **IL-10G1-G6** eran extremadamente **raros**.
- **ninguno** de los alelos del microsatélite **IL-10R** presentaba una frecuencia estadísticamente **diferente** cuando comparamos los **pacientes** con los **sanos**.
- <sup>a</sup>: el alelo **IL-10G11** estaba **disminuido** significativamente en enfermos, aunque el valor de la p no soportaba la corrección de Bonferroni (16% frente a 24%,  $p=0.02 \wedge p_c=ns$ ; OR=0.64).
- <sup>b</sup>: el **incremento** del **IL-10G12** era significativo en los sujetos con esta patología (16% en EM versus 9% en sanos,  $p=0.0043 \wedge p_c=0.038$ ; OR=1.96).

En una segunda fase del estudio, establecimos la hipótesis de que los loci (HLA e IL-10), pertenecientes a cromosomas diferentes, pudieran actuar conjuntamente en la

susceptibilidad a padecer la enfermedad. Dado que la mayor asociación encontrada con los polimorfismos del microsatélite IL-10G fue con el alelo G12, decidimos examinar si éste presentaba una distribución diferente en los distintos grupos de enfermos. Las frecuencias de dicho alelo en función de la presencia o no del HLA-DRB1\*1501, del sexo y de la forma clínica de la enfermedad son:

	<b>1501<sup>+</sup></b> <b>(n=102)</b>	<b>1501<sup>-</sup></b> <b>(n=192)</b>	<b>Varones</b> <b>(n=95)</b>	<b>Mujeres</b> <b>(n=194)</b>	<b>EM-PP</b> <b>(n=39)</b>	<b>EM-RR</b> <b>(n=261)</b>
<b>Alelo IL-10G12</b>	19 (19%)	30 (16%)	18 (19%)	32 (16%)	7 (18%)	44 (17%)

Como se observa en esta tabla, el **alelo 12** del microsatélite **IL-10G** se asociaba **por igual** a las **dos formas clínicas**, el **sexo** y el **HLA**.

Aprovechando la disponibilidad de las 100 EM-PP de Barcelona, realizamos un estudio caso-control con sus respectivos controles para analizar la distribución de estos dos microsatélites y tratar de confirmar así las asociaciones encontradas anteriormente:

<b>Frecuencia fenotípica</b>	<b>EM-PP (n=100)</b>	<b>CON (n=101)</b>
<b>IL-10R</b>		
<b>2</b>	93 (93%)	94 (94%)
<b>3</b>	41 (41%)	33 (33%)
<b>4</b>	2 (2%)	3 (3%)
<b>IL-10G</b>		
<b>7</b>	4 (4%)	4 (4%)
<b>8</b>	5 (5%)	5 (5%)
<b>9</b>	59 (59%)	62 (62%)
<b>10</b>	18 (18%)	12 (12%)
<b>11</b>	21 (21%)	27 (27%)
<b>12</b>	14 (14%)	11 (11%)
<b>13</b>	40 (40%)	45 (45%)
<b>14</b>	19 (19%)	17 (17%)
<b>15</b>	3 (3%)	1 (1%)

Aunque los datos no fueron significativos, también observamos en estos pacientes **EM-PP** una **ligera disminución** del alelo **IL-10G11** (21% vs 27%) y un **pequeño aumento** del **IL-10G12** (14% vs 11%).

#### V.B.1.a.ii. ESTUDIO FAMILIAR

El análisis de transmisión de los alelos de los dos microsatélites fue el siguiente:

Alelos	Transmitido	No Transmitido
<b>IL-10R</b>		
<b>2</b>	18	17
<b>3</b>	16	16
<b>4</b>	1	2
<b>IL-10G</b>		
<b>7</b>	3	5
<b>8</b>	5	3
<b>9</b>	35 <sup>a</sup>	21
<b>10</b>	5	5
<b>11</b>	5	11
<b>12</b>	14	11
<b>13</b>	12	15
<b>14</b>	6 <sup>b</sup>	15
<b>15</b>	1	2

La interpretación de estos datos fue la siguiente:

- **no se transmitían** preferentemente ninguno de los **alelos** del microsatélite **IL-10R**.
- mientras que, en el **estudio caso-control** obtuvimos resultados significativos en las distribuciones del **IL-10G11** ( $p_c=ns$ ) e **IL-10G12**, en el **estudio familiar no** observamos sus **transmisiones distintas** a las esperables según las leyes de Mendel.
- por otro lado, los alelos **IL-10G9** e **IL-10G14**, que no se distribuían diferentemente en enfermos con respecto a controles, con el estudio familiar sí apreciamos un ligero **aumento** de **transmisión** del primero (<sup>a</sup>:

$p=0.04 \wedge p_c=ns$ ) y una **disminución** del segundo ( $^b$ :  $p=0.039 \wedge p_c=ns$ ). Una vez más, los valores de la  $p$  se perdían tras la corrección de Bonferroni.

#### V.B.1.b. POLIMORFISMOS EN EL PROMOTOR DEL GEN DE LA IL-10: -1082 -819, -592

Cada una de estas tres posiciones polimórficas se caracterizan por presentar los siguientes nucleótidos:

- 4 **-1082**: una Guanina o una Adenina.
- 4 **-819**: una Citosina o una Timina.
- 4 **-592**: una Citosina o una Adenina.

#### V.B.1.b.i. ESTUDIO CASO-CONTROL

En la siguiente tabla se muestran los datos desglosados por las distintas variantes alélicas de cada una de las posiciones del promotor. *NOTA*: En base a que está descrito en la literatura, se ha supuesto que todos los individuos que presentan una C en la posición -819 tienen también una C en -592; lo mismo ocurre con la pareja -819T/-592A (ver detalles de la técnica en Materiales y Métodos, página 79).

Alelos	EM (n=272)	CON (n=333)
<b>-1082A</b>	222 (82%)	271 (81%)
<b>-1082G</b>	174 (64%)	211 (63%)
<b>-819C/-592C</b>	255 (94%)	308 (92%)
<b>-819T/-592A</b>	136 (50%)	143 (43%)

El análisis estadístico **no** detectó **diferencias significativas** en la distribución de cada uno de los alelos de los tres polimorfismos cuando comparamos enfermos de esclerosis múltiple con individuos sanos.

Además, el estudio comparativo efectuado en una muestra adicional de pacientes con Primaria-Progresiva procedentes de Barcelona y sus controles sanos, permitió corroborar lo obtenido anteriormente:

Alelos	EM-PP (n=100)	CON (n=101)
<b>-1082A</b>	83 (83%)	82 (82%)
<b>-1082G</b>	68 (68%)	61 (61%)
<b>-819C/-592C</b>	93 (93%)	93 (93%)
<b>-819T/-592A</b>	47 (47%)	46 (46%)

Como se observa, **tampoco** obtuvimos **resultados significativos** con el análisis de las variantes alélicas del promotor del gen de la IL-10 en estos pacientes **EM-PP**.

Gracias a la técnica de la PCR específica de alelo (explicada en la página 80 de Materiales y Métodos), determinamos qué polimorfismos se encontraban físicamente en el mismo cromosoma y por tanto qué haplotipos eran los que formaban. A continuación, representamos las combinaciones y sus frecuencias en nuestra población:

Haplotipo -1082 -819 -592	EM (n=272)	CON (n=333)
<b>ACC</b>	142 (52%)	185 (56%)
<b>ATA</b>	136 (50%)	143 (43%)
<b>GCC</b>	174 (64%)	211 (63%)

Esta investigación reveló que **no difería** la distribución de los **haplotipos** en **enfermos y controles**.

Una vez más, contamos con las 100 muestras de **EM-PP** (Barcelona) para confirmar si la no asociación encontrada de ninguno de los haplotipos del promotor en la enfermedad se mantenía también en esta forma clínica.

Haplotipo -1082 -819 -592	EM-PP (n=100)	CON (n=101)
<b>ACC</b>	56 (56%)	57 (57%)
<b>ATA</b>	47 (47%)	46 (46%)
<b>GCC</b>	68 (68%)	61 (61%)

Efectivamente, como antes, **no** hallamos **diferencias** estadísticamente significativas en los **enfermos EM-PP** con respecto a los controles.

#### V.B.1.b.ii. ESTUDIO FAMILIAR

En el análisis **TDT** de las 63 familias de esclerosis múltiple encontramos los mismos tres haplotipos que en el estudio caso-control. Su distribución en transmitidos y no transmitidos se indica a continuación:

Haplotipo -1082 -819 -592	Transmitido	No Transmitido
<b>GCC</b>	22	20
<b>ATA</b>	32 <sup>a</sup>	19
<b>ACC</b>	18 <sup>b</sup>	33

Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

- la segregación Mendeliana permitió comprobar que **no** existía ningún **alelo nulo** y, por tanto, que los **haplotipos hallados** en nuestra población española eran los tres **descritos** en la literatura.
- apreciamos un pequeño **exceso** de **transmisión** de la combinación **ATA** (<sup>a</sup>:  $p=0.047 \wedge p_c=ns$ ) y una **disminución** de la **transmisión** del haplotipo **ACC** (<sup>b</sup>:  $p=0.025 \wedge p_c=ns$ ). Ambos valores de la p perdían su significación estadística cuando se corregían por el número de comparaciones efectuadas o corrección de Bonferroni.

#### V.B.1.c. MICROSATÉLITES Y PROMOTOR DE LA IL-10

El estudio de las familias de esclerosis múltiple y nuestro método de tipaje mediante la técnica de la **PCR específica de alelo** nos permitió asimismo establecer **haplotipos extendidos** que incluían tanto al microsatélite **IL-10G** como a las **posiciones polimórficas** del **promotor**. Las asociaciones encontradas tras el haplotipaje de 240 pacientes y 357 controles fueron las siguientes:

$\pi$  ESTUDIO CASO-CONTROL Y FAMILIAR

## 4 COMBINACIÓN IL-10R O IL-10G CON EL PROMOTOR:

**1- IL-G12 y ACC o GCC**

El IL-10G12, que en el **estudio caso-control** fue el único alelo asociado a la enfermedad, se encontraba mayoritariamente formando haplotipo con los promotores ACC y GCC. Sólo en dos individuos sanos hallamos este microsatélite con la combinación ATA. Cuando estudiamos la distribución de estos haplotipos en la población enferma y sana obtuvimos los siguientes resultados:

**IL-10G12/ACC:** 12% en EM frente a 5.6% en controles,  $p=0.008$ ; OR=2.23.

**IL-10G12/GCC:** 5% en EM frente a 3% en controles,  $p=0.23$ ; OR=1.66.

El **análisis familiar** permitió corroborar lo obtenido en el estudio caso-control. La combinación **IL-10G12/ACC** se **transmitió preferentemente** a los hijos enfermos (12 vs 9) mientras que con el haplotipo IL-10G12/GCC ocurrió lo contrario (1 transmitido frente a 3 no transmitidos).

**2- IL-10R3 y GCC**

El alelo **IL-10R3** se encontraba en un fuerte **desequilibrio** de **ligamiento** con el promotor **GCC** ya que el 85% de los haplotipos IL-10R3<sup>+</sup> y el 31% de los haplotipos IL-10R3<sup>-</sup> presentaban esta combinación nucleotídica ( $p < 10^{-7}$ ; RR=1.9). Este resultado también se confirmó en los controles de Barcelona.

3- Los microsatélites **IL-10G7<sup>^</sup>10** se **asociaban** tanto a **GCC** como a **ATA**, y sólo **raramente** a **ACC**.

4- Los microsatélites **IL-10G11<sup>^</sup>15** se **asociaban** tanto a **GCC** como a **ACC**, y sólo **raramente** a **ATA**.

5- Tanto en los pacientes **EM-PP** de **Barcelona** como en sus sujetos sanos corroboramos los puntos 2-, 3- y 4- pero no confirmamos el 1-.

#### 4 COMBINACIÓN IL-10R Y IL-10G CON EL PROMOTOR:

- 1- El estudio del **haplotipo extendido** formado por los microsatélites **IL-10R** e **IL-10G** y las **tres posiciones** del **promotor** sólo se pudo realizar mediante el análisis de segregación Mendeliana en las **familias** de esclerosis múltiple. Las combinaciones más frecuentes fueron:

Haplotipo IL-10R/IL-10G/PROM	Frecuencia Haplotípica (%)	Transmitido	No Transmitido	p
IL-10R2/IL-10G9/ATA	21%	27	14	0.03
IL-10R2/IL-10G13/ACC	11%	8	11	ns
IL-10R3/IL-10G9/GCC	11%	11	8	ns

Considerando estos datos, el haplotipo más abundante y que presentaba una diferencia significativa en su transmisión fue el formado por: **IL-10R2/IL-10G9/ATA** ( $p=0.03 \wedge p_c=ns$ ).

- 2- Es de destacar que, de los **haplotipos extendidos** que presentaban el promotor **ACC**, precisamente el único que incluía al alelo **IL-10G12** (IL-10R2/IL-10G12/ACC) se transmitía preferentemente a los hijos enfermos (12T vs 9NT).

#### V.B.2. GEN IL1RN

En 1993, un equipo de investigación inglés descubrió que el **intrón 2** del gen del **IL-1Ra** era polimórfico por presentar un número variable de repeticiones en tándem (**VNTR**) de una secuencia de 86 pares de bases (pb). Se conocen cinco alelos y se ha descrito que en esta región se encuentran tres sitios de unión a proteínas que podrían presentar un significado funcional dependiendo de las copias presentes en un individuo.

#### V.B.2.a. ESTUDIO CASO-CONTROL

Dado que existen investigaciones preliminares que indican una asociación entre el IL-1Ra (concretamente el alelo 2) y la forma clínica Remitente-Recurrente, el sexo o el

HLA, consideramos importante estratificar nuestro estudio de acuerdo con estos grupos. En este sentido, realizamos el siguiente análisis fenotípico y genotípico de los cinco alelos del IL-1Ra:

a) FRECUENCIAS FENOTÍPICAS:

Frecuencia Fenotípica IL-1Ra	EM (n=315)	EM-RR (n=251)	EM-PP (n=42)	MUJERES EM (n=201)	HOMBRES EM (n=102)	CON (n=371)
1	290 (92%)	227 (90%)	42 (100%)	183 (91%)	96 (94%)	340 (92%)
2	146 (46%)	124 (49%)	17 (40%)	96 (48%)	47 (46%)	162 (44%)
3	6 (2%)	5 (2%)	0 (0%)	3 (1%)	3 (3%)	11 (3%)
4	6 (2%)	4 (2%)	0 (0%)	2 (1%)	3 (3%)	5 (1%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0.5%)

Realizada la estadística pertinente, **no** encontramos **diferencias significativas** en la distribución alélica del antagonista del receptor de la interleucina-1 cuando comparamos:

- el total de enfermos de esclerosis múltiple con controles.
- cada forma clínica, RR y PP, con controles.
- y cada sexo con controles.

b) FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

Dado que el alelo 1 del IL-1Ra estaba presente en prácticamente la totalidad de la población, consideramos conveniente estudiar las combinaciones genotípicas formadas por estos cinco alelos:

Frecuencia Genotípica IL-1Ra	EM (n=315)	EM RR (n=251)	EM PP (n=42)	MUJERES EM (n=201)	HOMBRES EM (n=102)	CON (n=371)
1,1	159 (50%)	120 (48%)	25 (60%)	101 (50%)	50 (49%)	193 (52%)
1,2	121 (38%)	100 (40%)	17 (40%)	78 (39%)	41 (40%)	131 (35%)
1,3	4 (1%)	3 (1%)	0 (0%)	2 (1%)	2 (2%)	10 (3%)
1,4	6 (2%)	4 (1.5%)	0 (0%)	2 (1%)	3 (3%)	4 (1%)
1,5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0%)
2,2	23 (7%)	22 (9%)	0 (0%)	17 (8%)	5 (5%)	29 (8%)

Como se observa en esta tabla **tampoco** encontramos **diferencias** estadísticamente **significativas** cuando comparamos las frecuencias genotípicas de:

- el total de enfermos de esclerosis múltiple con controles.
- cada forma clínica, RR y PP, con controles.
- y cada sexo con controles.

A continuación, planteamos la **hipótesis**, al igual que hicimos en la investigación del gen de la IL-10, de que **ambos loci, HLA e IL-1RN**, situados en distintas cromosomas, pudieran contribuir conjuntamente en la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Para determinar si tal asociación existía, estratificamos nuestra población enferma y sana por el alelo de susceptibilidad HLA-DRB1\*1501:

Frecuencia Fenotípica IL-1Ra	EM *1501 <sup>+</sup> (n=105)	CON *1501 <sup>+</sup> (n=65)
1	97 (92%)	58 (89%)
2	55 (52%)	29 (45%)
3	3 (3%)	3 (5%)
4	1 (1%)	0 (0%)
5	0 (0%)	1 (1%)

Los datos de esta tabla muestran que **ningún alelo del IL-1Ra se asociaba al HLA-DRB1\*1501**.

Por último, para confirmar si los resultados obtenidos en el estudio de la forma clínica **Primaria-Progresiva** eran concluyentes contamos con la muestra adicional de 100 pacientes EM-PP de Barcelona que presentaban esta variante clínica y sus correspondientes 101 individuos control. Con el aumento del tamaño muestral quisimos detectar asociaciones que, quizás, con tan sólo 42 EM-PP no veríamos. La distribución de los alelos del antagonista fue:

Frecuencia Fenotípica IL-1Ra	EM-PP (n=100)	CON (n=101)
1	90 (90%)	94 (94%)

<b>2</b>	43 (43%)	46 (46%)
<b>3</b>	2 (2%)	3 (3%)
<b>4</b>	0 (0%)	0 (0%)
<b>5</b>	0 (0%)	0 (0%)

A pesar de que contamos con más muestras (42 $\wedge$ 100), **no** encontramos ninguna **asociación** entre los alelos del **IL-1Ra** y la forma clínica **Primaria-Progresiva**.

#### V.B.2.b. ESTUDIO FAMILIAR

En este estudio contamos con 63 familias de EM de las que utilizamos 46 progenitores. La distribución de los alelos transmitidos y no transmitidos fue:

<b>Alelos IL-1Ra</b>	<b>Transmitido</b>	<b>No Transmitido</b>
<b>1</b>	23	21
<b>2</b>	21	22
<b>3</b>	0	3
<b>4</b>	2	0
<b>5</b>	0	0

Como se observa en esta tabla, **ningún alelo** del polimorfismo del antagonista del receptor de la IL-1 se **transmitió** preferentemente a los hijos enfermos.

## VI. DISCUSIÓN

En esta tesis se ha planteado un **estudio inmunogenético** de la esclerosis múltiple tanto **dentro** como **fuera** del **complejo mayor de histocompatibilidad**. Para ello, hemos contado con una amplia muestra de pacientes con esclerosis múltiple de la Comunidad Autónoma de Madrid (n=318) y 382 sujetos sanos. También hemos dispuesto de 63 trios TDT (enfermo acompañado de sus dos padres) con el objeto de realizar un análisis de ligamiento. Adicionalmente, hemos dispuesto de 100 individuos con la forma clínica Primaria-Progresiva provenientes de Barcelona y sus correspondientes controles.

### VI.A. ESTUDIO GENÉTICO **DENTRO** DEL MHC

La investigación realizada **dentro** del MHC ha determinado al menos **dos asociaciones positivas** con la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple: la ya bien conocida asociación del alelo de clase II **HLA-DRB1\*1501** y la existente con el polimorfismo de clase III **TNF-376A**, decrita aquí por vez primera.

#### VI.A.1. ASOCIACIÓN DE LA MOLÉCULA DE CLASE II HLA-DR A LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Clásicamente, en las enfermedades autoinmunes ha existido un gran interés en los loci HLA-DR y -DQ<sup>72,287</sup>, principalmente debido a que las moléculas de clase II del MHC están relacionadas con la selección y la activación de las respuestas inmunitarias humorales y celulares frente a los antígenos proteicos. La función de estas moléculas es presentar péptidos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La **esclerosis múltiple** parece ser una **autoinmunidad** mediada por dichas células CD4<sup>+</sup> en la que tras el reconocimiento de proteínas asociadas a la mielina se inicia una cascada de procesos que conducen finalmente a la parálisis muscular.

En los estudios de asociación con esclerosis múltiple se ha encontrado **incrementada** la frecuencia del alelo de clase II **HLA-DRB1\*1501** (como ocurre en el presente estudio) prácticamente en la **totalidad** de las **poblaciones** analizadas. Sin embargo, existen **excepciones** en la literatura: los **sardos**, en los que la EM se asocia al **HLA-DR3** (como discutiremos posteriormente) y los **israelíes**, en los que el alelo **DRB1\*1303** es más frecuente en los enfermos que en sus controles étnicamente equivalentes. Si bien en ninguno de estos grupos se asocia la EM al DRB1\*1501, es posible argumentar que dada su escasa frecuencia en ambas poblaciones resulta difícil poder observar un aumento estadísticamente significativo de este alelo.

Cuando estudiamos la distribución del **DRB1\*1501** en los distintos subgrupos de pacientes, nuestros datos indicaron una **asociación** dependiente del **sexo** siendo ésta más destacada entre las **mujeres**. Como dicha asociación era más fuerte en la población femenina y, además, éstas son más abundantes que los hombres (el doble) en el grupo enfermo, se explica cómo el incremento del HLA-DRB1\*1501 era fácilmente observable tomando a la población como un todo. De forma análoga, si algún alelo se asociara a EM en los hombres (que no ha sido éste el caso) podría ocurrir que al considerar esta patología globalmente el aumento pudiera quedar diluido.

La fuerte asociación encontrada de este alelo de susceptibilidad en las mujeres ya ha sido previamente descrita<sup>137,288</sup>. En la especie humana es un hecho que, salvo en la diabetes tipo 1<sup>3</sup>, las enfermedades autoinmunes órgano-específicas, como es el caso de la esclerosis múltiple, son **más frecuentes** en las **mujeres**. Según estudios epidemiológicos, la EM presenta un cociente mujer/hombre aproximado de **2:1**<sup>137,138</sup>. Nuestra proporción 203 mujeres/103 hombres se haya pues cercana a lo descrito. La razón de este predominio del sexo femenino **no** ha encontrado **justificación fisiopatológica clara**<sup>24,289</sup>; únicamente se ha demostrado que el tratamiento hormonal o la castración modifica en los animales la incidencia de este tipo de enfermedades autoinmunes<sup>3</sup>.

También se ha postulado y nosotros sí hemos podido corroborar que la mediana de la **edad de inicio** de la **enfermedad** es de **uno o dos años mayor** en los **varones**.

Adicionalmente, hemos comprobado como en las formas progresivas desde el comienzo **no** existe este desequilibrio.

La **asociación** del HLA-DRB1\***1501** en las formas clínicas **Primaria-Progresiva** y **Remitente-Recurrente** es de **similar** intensidad en **ambas**. Ello queda patentemente confirmado en el estudio de un grupo adicional de EM-PP provenientes de Barcelona. Esta asociación sugiere que el DRB1 es un gen que influye más en el comienzo que en la progresión de la enfermedad, lo cual lleva a pensar que el papel que juega este locus está relacionado con la presentación antigénica, primer paso necesario para el desencadenamiento de la respuesta inmune.

No obstante, los resultados referentes a la clínica **EM-PP**, no se confirman en Escandinavia, donde se ha observado la **asociación** entre esta forma de la enfermedad y el haplotipo de clase II HLA-**DR4/DOA1\*0301/DOB1\*0302**<sup>290,291</sup>. Además, un estudio previo realizado en nuestro laboratorio pareció revelar diferencias genéticas entre las dos evoluciones de la patología<sup>152</sup>. Mientras que EM-RR se asociaba al DRB1\*1501, en los pacientes con EM-PP estaba incrementado significativamente el alelo HLA-DR4 y, en especial, los subtipos que presentaban valina en la posición 86 (HLA-DRB1\*0402, \*0403, \*0404 y \*0406). En aquel momento, contábamos con 22 enfermos EM-PP. Actualmente, el laboratorio dispone de 39 muestras de Primaria-Progresiva y, como hemos mencionado anteriormente, la asociación encontrada con el DRB1\*1501 fue corroborada con un amplio grupo EM-PP adicional procedente de Barcelona (n=100). Por último, es importante resaltar que otros autores también han encontrado asociado negativamente el HLA-DR4 con la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple<sup>292,293</sup>.

La **asociación** del **HLA-DRB1\*1501** a la **EM** puede ser debida a un **efecto primario** de este alelo **o** bien al **desequilibrio de ligamiento** con el gen auténticamente responsable de la enfermedad. Ya sólo el hecho de que la asociación del **DRB1\*1501** existiera en una gran disparidad de poblaciones apoya la idea de que sea un **agente primario**, puesto que los desequilibrios de ligamiento variarían dependiendo del sustrato étnico. En general, se piensa que el mecanismo inmunológico desencadenante de la enfermedad es el mismo en cualquier parte del mundo y, por tanto,

un alelo funcionalmente implicado en la susceptibilidad a padecer la patología se verá asociado con ésta en cualquier grupo poblacional estudiado. Por otro lado, podría también ocurrir en ciertos casos que el medio que rodea al individuo sumado al origen genético de cada población pueda hacer que observemos en países diferentes alelos diferentes asociados a la enfermedad.

Sí es interesante observar, apoyando la hipótesis del DRB1\*1501 como agente primario de la enfermedad, cómo los lugares con alta prevalencia de este alelo existe una alta incidencia de EM, como ocurre claramente en Escandinavia<sup>294</sup>.

A pesar de que los haplotipos del HLA extendidos son muy diferentes dependiendo de los grupos étnicos considerados, sí es cierto que el haplotipo de clase II HLA-DQA1\*0102/DQB1\*0602 se encuentra **muy conservado** en distintas poblaciones. Por esta razón ha resultado muy difícil establecer **cuál** de los **tres alelos** de **susceptibilidad** (DRB1\*1501, DQA1\*0102 o DQB1\*0602) pudiera ser, si alguno de ellos es, el responsable primario de la esclerosis múltiple. Nuestros datos apuntaron a que el DRB1\*1501 era el más claro marcador de susceptibilidad simplemente porque su Odds Ratio era mayor. Para confirmar definitivamente este hecho, sería idóneo disponer de una población en la que el DRB1\*1501 por una parte, y los alelos DQA1\*0102 y DQB1\*0602 por otra, se encontraron separados en haplotipos diferentes.

Con **ratones** sí es posible mediante técnicas de genética molecular construir **poblaciones exclusivamente DRB1\*1501**. En estos animales, la susceptibilidad a la EAE estaba incrementada, en especial, en aquéllos que eran simultáneamente transgénicos para un TCR humano y para péptidos derivados de la proteína básica de la mielina<sup>73</sup>. Estos hallazgos nuevamente mostraron que el papel crucial del DRB1\*1501 ocurría a la hora de presentar el péptido antigénico a las células T CD4<sup>+</sup>. Tanto los genes del TCR como la MBP y otras proteínas de la mielina se han estudiado en enfermos de esclerosis múltiple como posibles factores de susceptibilidad.

El receptor de los linfocitos T reconoce el antígeno en el contexto de la molécula HLA que expresan las células presentadoras de antígeno. Aunque los polimorfismos

presentes en los genes codificantes de la región variable (V) de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (situados en los cromosomas 14 y 7, respectivamente) han sido estudiados con gran detalle en EM, los resultados obtenidos no han sido concluyentes<sup>14-16,295</sup>.

Por constituir autoantígenos encefalitógenos muy bien estudiados en EAE, se ha supuesto que variaciones en los genes codificantes de las proteínas de la mielina podrían explicar parte de la susceptibilidad a padecer EM. La contribución de **MBP**, **PLP**, **MAG** y **MOG** se ha valorado mediante análisis de asociación y de ligamiento. La MBP es la más abundante de todas ellas. Su gen contiene un microsatélite situado en 5' con respecto al primer exón y aunque en los primeros estudios este marcador se asoció con la enfermedad, esto no se ha podido confirmar después<sup>18,296-299</sup>.

Aún no se conoce si esa hipotética presentación antigénica responsable de la enfermedad ocurre en la periferia o en el timo y, en este último caso, actuaría durante la selección del repertorio de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Existe otra hipótesis que explicaría la asociación del HLA-DRB1\*1501 con la patología: esta molécula pudiera servir de receptor en la superficie celular para un supuesto virus causante de la enfermedad. Ya es sabido, por ejemplo, como variaciones alélicas en el gen CCR5 afectan la capacidad de unión al virus HIV y, por tanto, modulan la susceptibilidad a padecer SIDA<sup>300</sup>. Nosotros pensamos que en la EM este hecho es improbable porque no se ha comprobado que existan diferencias genéticas de los portadores y no portadores de los posibles virus causantes de la enfermedad.

#### VI.A.2. ASOCIACIÓN DEL GEN TNFA A LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La **segunda asociación** encontrada en el **HLA** fue con el alelo **TNF-376A** del que hemos podido, además, demostrar que es **independiente** de **clase II**. Nuestro grupo ha sido el primero en establecer dicha asociación. La mayoría de los trabajos previos no la han hallado, principalmente porque su atención estaba centrada en las posiciones -238 y -308 del promotor, que también nosotros hemos visto que **no** están asociadas a la enfermedad. En un estudio previo al nuestro, realizado por Huizinga, se observó que la frecuencia del polimorfismo -376A era sólo del 3% en la población

holandesa<sup>212</sup>. Esta **diferencia de frecuencia** entre el **norte y sur de Europa** es debida a que este alelo forma parte del **haplotipo HLA-A30/B18/DR3**. La alta prevalencia de -376A en la región del Mediterráneo, nos ha facilitado la obtención en nuestro trabajo de una diferencia estadísticamente significativa entre enfermos y controles.

Dos años más tarde (en 2001), el departamento de Neurología de la Clínica Mayo (Rochester, USA) publicó una evaluación **crítica** al estudio realizado en nuestro departamento<sup>218</sup>. Previa a esta crítica, el equipo norteamericano había rastreado el promotor del gen TNFA desde la posición -353 y no habían encontrado asociación entre ninguna variante de las posiciones estudiadas (concretamente -238 y -308) y la esclerosis múltiple<sup>203,205</sup>. Ya en 2001, a la luz de nuestra investigación, estudiaron por vez primera la distribución del -376A en su población enferma y control. No sólo afirmaron la no asociación de este alelo a la enfermedad, sino que además existía una disminución marginal de la frecuencia de la "A" en sus pacientes. En la siguiente tabla presentamos el estudio comparativo de sus resultados con los nuestros publicados en 1999:

	MADRID		ROCHESTER	
	EM (n=238)	CON (n=324)	EM (n=121)	CON (n=243)
<b>-376A</b>	40 (17%)*	29 (9%)	2 (2%)	6 (2.5%)

\* $p_c < 0.05$

Dado al **escaso número de pacientes -376A** con el que contaban, este grupo **no pudo confirmar**:

- la **asociación primaria** del polimorfismo **-376A** independiente de clase II.
- el **desequilibrio de ligamiento** existente entre el alelo **-376A** y el haplotipo **HLA-A30/B18/DR3**.
- el **aumento de susceptibilidad** en los sujetos EM que presentaban los **dos alelos asociados** a la enfermedad: DRB1\*1501 y TNF-376A.

Aun presentando pocos casos de individuos EM con -376A y teniendo una muestra de pacientes formada principalmente por individuos de ascendencia alemana, escandinava y británica (regiones en las que, como hemos mencionado anteriormente, la frecuencia de este alelo era menor), afirmaron que nuestros resultados podían ser

debidos a una asociación específicamente existente en la población española o bien a un falso positivo. Sin embargo, nosotros creemos que el pequeño poder estadístico de su estudio les ha imposibilitado la observación de esta asociación.

Además, nuestros resultados se vieron refrendados en un segundo estudio con los datos obtenidos en el análisis de las muestras EM-PP. De esta manera, pudimos afirmar con mayor seguridad que esta asociación existe y está presente en ambas formas clínicas (Primaria-Progresiva y Remitente-Recurrente).

**Siempre** que se describe una **nueva asociación**, cabe preguntarse si ésta es **causa primaria** o es debida a **desequilibrio de ligamiento** con el verdadero gen responsable de la enfermedad. Como se ha mencionado en los Resultados de la Tesis (página 94), de entre los alelos de clase II, el polimorfismo **-376A** está en **desequilibrio de ligamiento sólo** con el **HLA-DR3**. Aunque nosotros **no** observamos un **incremento** del alelo **DR3** en los pacientes de **EM**, es interesante apuntar que en la población sarda su frecuencia sí se encuentra aumentada.

En los individuos caucásicos el alelo HLA-DRB1\*03 forma principalmente parte de dos haplotipos ancestrales: **HA 8.1** (DRB1\*0301/TNFa2b3/A1/B8) y el **HA 18.2** (DRB1\*0301/TNFa1b5/A30/B18). El **primero** de ellos presenta la mutación **-308A** mientras que el **segundo** se caracteriza por la mutación **-376A**, que aquí nos incumbe. En tanto que el HA 8.1 es el predominante en la mayoría de las poblaciones europeas, el HA 18.2 es extraordinariamente abundante en Cerdeña. Así, creemos, por tanto, que el **aumento** observado y antes mencionado del alelo **DR3** en esta población sería **secundario** a la **presencia** de un **gen** de **susceptibilidad**, **distinto** de **DRB1**, **marcado** por el polimorfismo **TNF-376A**. Es interesante mencionar, cómo en Cerdeña, dado que la prevalencia de esta patología es significativamente superior con respecto a los países mediterráneos colindantes, distintos autores<sup>161-163</sup> han postulado que el crecimiento aislado de este grupo poblacional ha podido concentrar un gran número de factores genéticos responsables del aumento considerable de la cifra de casos. Así, la singularidad genética de estos individuos enfermos se pone de manifiesto en que la

principal susceptibilidad en el HLA de clase II no está marcada por el DRB1\*1501 sino por HLA-DR3.

Con nuestro estudio también pudimos comprobar que los sujetos que presentaban los dos alelos **HLA-DRB1\*1501** y **-376A** simultáneamente tenían **mucha más susceptibilidad** a padecer esclerosis múltiple que los individuos que sólo tenían uno de dichos alelos, el otro, o bien ninguno de los dos<sup>217</sup>. Esto apuntaría a la existencia de una **colaboración sinérgica** de **ambos genes** mediante su participación en una vía molecular común. En otras muchas enfermedades, como el síndrome de Sjögren, enfermedad de Alzheimer y artritis reumatoide, se ha descrito también la influencia sinérgica de dos loci diferentes<sup>301-303</sup>.

Habiendo establecido que el **-376A** es **independiente** de **HLA-DR3**, queda por determinar si la transición G $\wedge$ A es la mecanísticamente responsable de la incrementada susceptibilidad presente en los individuos portadores de la misma. Sí se sabe que el factor de transcripción **OCT-1** se une con mayor afinidad cuando en el promotor del TNF existe la variante con "A"<sup>215</sup>. En este sentido, se podría pensar que este alelo pudiera afectar a la tasa de transcripción del gen e influir, por consiguiente, en los procesos patológicos de la enfermedad.

Aun **desconociendo** el **mecanismo molecular** a través del cual los alelos **HLA-DRB1\*1501** y **TNF-376A** influyen en la patogenia, es interesante especular que la futura determinación de este proceso molecular podría servir como fundamento de una nueva generación de fármacos. Ya se han publicado estudios que relacionan la presencia del alelo DRB1\*1501 en los enfermos EM-RR y la respuesta al fármaco inmunosupresor Copolímero-1 (glatirameracetato). Se postula que el mecanismo de acción a través del cual esta molécula podría ejercer su efecto sería mediante su unión a las moléculas de clase II. Cuando este estudio se realizó en otro grupo de pacientes EM-RR tratados con IFN- $\beta$ , no se detectó correlación alguna con ninguno de los alelos de clase II del HLA<sup>159</sup>.

Una vez concretada la **existencia** de **dos genes distintos** en el **MHC** influyentes en la susceptibilidad a padecer esta enfermedad, es de justicia mencionar que

no somos los únicos en apuntar esta posibilidad. Un estudio con familias EM suecas reveló que, incluso en las 58 familias de enfermos (de un total de 542) cuyos **progenitores no** presentaban el **DRB1\*1501**, existía ligamiento de la enfermedad al HLA. Los autores interpretaron este hallazgo como una posible existencia de un **segundo gen de susceptibilidad** presente en el **MHC**<sup>164</sup>.

Por otro lado, la **asociación de más de un gen en el MHC** a la **susceptibilidad** a padecer **diversas enfermedades autoinmunes** no es extraña y ha sido descrita por diferentes investigadores. En artritis reumatoide, se ha indicado la presencia de un segundo gen telomérico al DRB1<sup>246,304</sup>. También, Moghaddam y sus colaboradores<sup>305</sup> observaron en la diabetes mellitus insulino-dependiente la influencia de dos regiones diferentes en el MHC (un locus en clase II, HLA-DR y otro entre el microsatélite D6S273 y el gen TNFA), independientes entre sí. Asimismo, en la enfermedad celiaca se ha observado como un gen presente en el haplotipo ancestral 8.1 incrementa la susceptibilidad conferida por el ya conocido heterodímero DQA1\*0501/DQB1\*0201<sup>306,307</sup>.

En **esclerosis múltiple** también existen numerosos estudios que intentan **localizar un segundo gen** en el  **cromosoma 6** aparte del ya conocido locus DRB1 y el alelo de susceptibilidad DRB1\*1501:

- **Factor de Necrosis Tumoral y Linfotoxina.** Estas dos citocinas parecen estar íntimamente implicadas en distintos aspectos de la patogenia de la EM. Sus genes se hallan situados muy cerca entre sí, dentro de la clase III del MHC, y comparten homología de secuencia. La existencia de varios microsatélites cercanos o en el gen de la linfotoxina ha permitido analizar la contribución de los distintos alelos a la susceptibilidad de la EM<sup>87,167,172,205,212,255,308-310</sup>. Parte de estos resultados ya han sido comentados en relación con la asociación del -376A.
- **Genes de transporte peptídico.** Los genes polimórficos **TAP-1** y **TAP-2** están implicados en el transporte intracelular de péptidos provenientes de la degradación enzimática de proteínas hacia el retículo endoplásmico, posibilitando así su unión a moléculas HLA de clase I<sup>311,312</sup>. No se ha encontrado asociación de estos genes con EM<sup>313</sup>.

- **Otros genes del MHC.** Diversos polimorfismos existentes en los **genes del complemento** situados en clase III han permitido estudios de asociación que no han demostrado un efecto independiente del de los genes de clase II<sup>314,315</sup>.
- **Otros genes del cromosoma 6.** La proteína **MOG** tiene un alto interés patogénico por su elevado poder inductor de inflamación en el SNC y por facilitar la producción de anticuerpos desmielinizantes; sin embargo, el estudio de los polimorfismos de su gen, situado teloméricamente con respecto al MHC, no ha revelado asociación con esta enfermedad<sup>316,317</sup>.

La existencia de **varios genes de susceptibilidad** en una **región del genoma** tan relativamente **pequeña** como la **banda 6p21**, donde se ubica el **MHC**, explica por qué en los **barridos genómicos** el sistema **HLA** es la **única región** que insistentemente muestra una **fuerte señal de ligamiento**. Este mismo fenómeno se ha observado también en el cromosoma X y la retinitis pigmentosa<sup>318</sup>

#### VI.A.3. EN BUSCA DE UN GEN DE RESISTENCIA

Además de la presencia de dos genes que incrementan la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple, hemos descrito en esta tesis la existencia de un **marcador de resistencia** en el MHC. Nuestros datos han demostrado que la combinación de los alelos DRB1\*1501 y TNFa11b4c1d3e3 proporciona una susceptibilidad menor que la otorgada por el alelo \*1501 en ausencia del TNFa11b4c1d3e3. Estos datos fueron corroborados con un estudio TDT realizado en 63 familias de EM. Los haplotipos con DRB1\*1501 se transmitían menos a los hijos enfermos cuando dicho alelo iba acompañado de los microsatélites a11b4c1c3e3 que cuando el \*1501 no estaba ligado a dicha combinación TNFabcde. La interpretación más sencilla de estos resultados fue considerar que **ambos marcadores** DRB1\*1501 y a11b4c1d3e3 forman parte de un **haplotipo** que incluye un **gen de protección** a la enfermedad. A semejanza de lo manifestado por Kirk<sup>255</sup> en pacientes irlandeses con EM, hemos detectado un pequeño **efecto independiente** del TNFa11b4c1c3e3 con respecto al efecto conferido por el DRB1\*1501. Sin embargo, un análisis más detallado de sus datos indica la cuestionable solidez de sus conclusiones, por lo que consideramos que la cuestión sigue aún abierta.

Dado que el **haplotipo ancestral 7.1** se caracteriza precisamente por tener la **combinación** de **DRB1\*1501** y **TNFa11b4c1c3e3**, es, por tanto, nuestro primer **haplotipo candidato** portador del **gen de resistencia**, previamente mencionado. Disponemos además de un marcador haploespecífico situado en este HA 7.1 localizado en el gen **IKBL** y consistente en la **transición** T $\wedge$ C<sup>95</sup>. Aunque esta mutación se describió como característica de este HA, hoy en día se sabe que no siempre está presente: la frecuencia del polimorfismo **+738C**, dentro de los portadores de este haplotipo es variable de unas zonas geográficas a otras<sup>238</sup>.

Recientemente, también se ha descrito la existencia de esta transición en formas recombinantes del haplotipo 7.1. Nosotros quisimos comprobar si este alelo **IKBL+738C**, ocasionalmente presente en los individuos que eran DRB1\*1501<sup>+</sup> y a11b4c1d3e3<sup>+</sup> (y por tanto hipotéticos portadores del HA 7.1), era el responsable de la protección existente. Los datos parecieron indicar que **no**, puesto que la disminución de la susceptibilidad era similar en los individuos DRB1\*1501<sup>+</sup>, a11b4c1d3e3<sup>+</sup>, **C<sup>+</sup>** que en los sujetos \*1501<sup>+</sup>, a11b4c1d3e3<sup>+</sup>, **C<sup>-</sup>**. Sin embargo, esto no fue indicativo de que este haplotipo ancestral 7.1 careciera de un gen de resistencia, sino más bien que ese **gen de resistencia no** era el **IKBL**.

Nuestro **segundo paso** fue el empleo de **marcadores microsatélites** que nos permitieron, por una parte, la definición de haplotipo ancestral 7.1 (DQB1\***0602** / DQA1\***0102** / DRB1\***1501** / D6S273-**5** / BAT2-**3** / TNFa**11b4c1d3e3** / IKBLC o **T** / MICA-**5.1**/ D6S2223-**2**) y, por otra, la ayuda que podían proporcionar en el intento de ubicar el gen de protección. Los datos indicaron que existe la misma resistencia llevando sólo la pareja DRB1\*1501/a11b4c1d3e3 que llevando todos y cada uno de los marcadores específicos del haplotipo. Es decir, este **gen de protección** que buscamos **no** es **exclusivo** del **HA 7.1** sino que, más bien, está presente en cualquier haplotipo que porte la combinación DRB1\*1501/a11b4c1d3e3. Estos resultados dejarían abierta la posibilidad de que ambos marcadores indiquen la presencia de dos genes que cuando aparecen juntos en un mismo individuo, sea en el mismo o distinto cromosoma, otorgan una protección relativa a la enfermedad.

También en acalasia se ha observado una llamativa disminución de la aparición conjunta de los alelos DRB1\*1501 y TNFa11b4c1d3e3<sup>319</sup>. En un primer momento se pensó que el haplotipo ancestral 7.2, cuya región de clase III es idéntica a la del HA 7.1, pudiera asimismo proteger de esta enfermedad autoinmune. Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio apuntan a que éste no es el caso de la acalasia ni de la esclerosis múltiple. Parece, pues, necesario la aparición conjunta del DRB1\*1501 y TNFa11b4c1d3e3, y su regiones cromosómicas adyacentes, para detectar el efecto protector. Una vez más se puede pensar que podría existir este efecto cuando ambos marcadores se encuentren en trans y no ser específicos de un haplotipo determinado.

Aparte de en la esclerosis múltiple y en la acalasia, en otras enfermedades autoinmunes se conoce la existencia de alelos de protección en el MHC. Es ya clásica la resistencia que el DRB1\*1501 otorga en IDDM<sup>320</sup> o la recientemente descrita protección marcada por el alelo MICA-6 en artritis reumatoide<sup>232,233</sup>.

Aunque desgraciadamente el **mecanismo de acción** de este **gen de protección** en **esclerosis múltiple** es absolutamente **desconocido**, sería deseable que investigaciones ulteriores permitieran determinar su modo de acción; así obtendríamos nuevas posibilidades terapéuticas aplicadas al tratamiento de esta patología y de otras enfermedades de base autoinmune.

Tras haber discutido la existencia de varios genes, tanto de susceptibilidad como de resistencia en el **HLA**, nos planteamos, a continuación, saber si **fuera** de esta región existen otros posibles **genes candidatos** de **susceptibilidad** a padecer **esclerosis múltiple**.

#### V.B. ESTUDIO GENÉTICO **FUERA** DEL MHC

Hemos escogido como objeto de estudio los genes de dos citocinas anti-inflamatorias (**IL-10** e **IL-1Ra**) por el **importante papel** que podrían desempeñar en la **patogénesis** de la enfermedad y por ser **ambos loci polimórficos**.

Ya esperábamos que las asociaciones que pudieran encontrarse fueran débiles, puesto que ninguno de estos genes se han detectado en los barridos genómicos efectuados en la EM. Además, de la propia **naturaleza poligénica** de la enfermedad, se deduce que son muchos los **genes implicados, cada uno** de ellos con un **pequeño efecto**. Sin embargo, pensamos que nuestro elevado tamaño muestral es capaz de detectar incluso efectos relativamente reducidos. Así, confiamos plenamente en que los **resultados negativos** obtenidos en esta tesis (como en el caso del antagonista del receptor de la IL-1) son indicativos de una **no contribución biológicamente significativa** de este gen a la enfermedad.

#### V.B.1. ASOCIACIÓN DEL IL-1Ra A LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Ya se había publicado anteriormente que el **alelo 2** del **VNTR**, presente en el segundo intrón del gen IL-1RN, se **asociaba** a diversas **enfermedades autoinmunes**<sup>118</sup>. Sin embargo, la mayoría de las asociaciones descritas han sido con posterioridad objeto de discusión en la literatura, sin que en muchos de los casos se haya llegado a un consenso definitivo. De igual manera, la existencia de profundos **desequilibrios de ligamiento** entre los alelos de los genes **IL-1RN, IL-1A** e **IL-1B** ha complicado averiguar cuál de las variantes alélicas presentes es la primariamente responsable de las asociaciones que se han detallado. A este respecto aunque sí se sabe que esta secuencia VNTR del antagonista contiene **tres sitios de unión a proteínas**, no se conoce su importancia fisiológica *in vivo* aunque es probable su implicación en la modulación de la tasa de transcripción del gen<sup>122</sup>. Diversos investigadores han indicado cómo el **alelo 2** se asocia a una **mayor producción** de la molécula del **antagonista**. Este resultado parece a primera vista paradójico porque parecería que una elevada síntesis de este antagonista tendría un efecto anti-inflamatorio y, por tanto, protector. No obstante, parece que dicho alelo 2 forma parte de un haplotipo altamente secretor de IL-1 $\beta$ , lo que explicaría su potencial autoinmune. Esto nos enseña la **precaución** que hay que tener al interpretar los estudios de asociación en genes que están ligados a otros genes también de respuesta inmune.

Si bien en nuestro trabajo no hemos sido capaces de confirmar la asociación del alelo 2 con EM que ya se había comunicado en un principio<sup>152,321</sup>, se plantea para un **futuro** la hipótesis de la posible asociación de dicho alelo a determinados subgrupos de pacientes con características clínicas delimitadas y, por tanto, su posible utilidad como **marcador pronóstico**. De todas formas queda corroborado con nuestro estudio, y eso es algo en lo que parece que todos los grupos coinciden<sup>322,323</sup>, que **no** es el **antagonista** del **receptor** de la **IL-1** un **gen de susceptibilidad principal** en la mayoría de enfermos de **esclerosis múltiple**.

Por otra parte, es un objetivo futuro de nuestro grupo intentar correlacionar la **presencia** de dicho alelo **2** con la **eficacia terapéutica** de los fármacos disponibles. Por último, y adentrándonos ya en el campo de las nuevas terapias inmunológicas, cabe mencionar los experimentos realizados en ratones. Estos consistían en la administración de un vector transgénico para el gen del antagonista en fibroblastos de pacientes con artritis reumatoide, o la inyección intravenosa del antagonista en pacientes afectados de esta misma enfermedad<sup>324,325</sup>. La futura aplicación de dicho enfoque a pacientes con esclerosis múltiple requiere estudios ulteriores.

#### VI.B.2. ASOCIACIÓN DE LA IL-10 A LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Son escasos los estudios de asociación de esclerosis múltiple con el gen de la IL-10, tanto en las posiciones polimórficas del promotor (-1082, -819 y -592) como en los microsatélites (IL-10R e IL-10G)<sup>258,260,266,267</sup>. En ninguno de ellos se habían alcanzado resultados positivos. Nosotros hemos tenido la posibilidad de estudiar familias de EM que nos han permitido establecer con confianza los haplotipos implicados. Además, el método de tipaje utilizado también nos ha concedido realizar por vez primera un estudio haplotipando el promotor con el microsatélite IL-10G, el más polimórfico de los dos. Nuestros resultados apuntan hacia un ligero pero significativo **aumento** en la frecuencia fenotípica del alelo **IL-10G12**. Estos datos obtenidos en el estudio caso-control fueron compatibles con los obtenidos en el estudio TDT, si bien en este último caso no se consiguió una significación estadística. Como ya se sabe, el análisis TDT se caracteriza por

no detectar pequeñas asociaciones, por lo que la confirmación de este resultado requerirá un nuevo y amplio estudio caso-control en la misma población.

Este microsatélite, como muchos otros (IL-10G11-15), se encuentra **ligado** al haplotipo de promotor **ACC** y **menos** frecuentemente al **GCC**. Sólo cuando el ACC va acompañado del alelo IL-10G12, está aumentado este promotor; en cambio, el estudio de esta región promotora sola demostró que no afectaba por sí misma a la susceptibilidad.

Si no es el promotor se plantea qué otros polimorfismos pueden ser responsables de la asociación encontrada. Recientemente se han descrito un cierto número de SNPs en la región 5', además de los por nosotros estudiados<sup>326</sup>. Dado que no se disponen aún de datos poblacionales suficientes, no se puede determinar si dichos polimorfismos son merecedores de un estudio caso-control en esclerosis múltiple. Al igual que con otros polimorfismos estudiados en esta tesis, la base patofisiológica de la asociación encontrada se desconoce. Lo que sí sabemos es que dicha **asociación no depende** ni del **sexo**, ni de la **forma clínica**, ni de la **presencia o no** del **HLA-DRB1\*1501**.

Nuevamente como en casos anteriores nos surge la duda de si los marcadores estudiados en este gen podrían tener **utilidad** en relación con la diferente **respuesta** a los distintos **tratamientos**. En este sentido cabe mencionar que el **IFN-β**, inmunosupresor efectivo en la esclerosis múltiple, modula la producción de IL-12 en el tejido afectado<sup>36</sup>. Sabiendo que la **IL-12** y la **IL-10** son dos actores contrapuestos en el delicado balance **Th1/Th2**, es factible pensar que variaciones genéticas en el locus IL-10 puedan afectar negativamente a dicho equilibrio, y que cuando esto ocurre, el IFN-β funciona restableciendo el correcto balance. En este sentido, podría pensarse que la **mayor** o **menor respuesta** a dicho **tratamiento** pudiera asociarse con los **polimorfismos** de la **IL-10**. Y no sólo eso, sino que quizás en un futuro se puedan emplear dichos polimorfismos como **herramientas** para el clínico con el objeto de establecer el protocolo de administración adecuado de IFN-β.

Para finalizar, nos gustaría indicar que dada la participación de diversos genes en la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple, es posible que esta patología sea un **punto final** al que se pueda llegar a través de **más** de un **itinerario fisiopatológico**. Así, se podría explicar la enorme variabilidad de la enfermedad no sólo en el aspecto clínico, sino epidemiológico e incluso de respuesta a tratamientos<sup>158,291,327</sup>.

Una **mejor definición** de los **grupos clínicos** podrá, en un futuro, permitir un **estudio genético** de **mayor precisión** que nos revele no sólo qué genes afectan a la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple, sino también cuáles intervienen en la sintomatología, velocidad de progresión, pronóstico y, como se ha ido mencionando en esta tesis, la respuesta a las terapias utilizadas.

Esta tesis ha hecho posible, por el gran volumen de muestras analizadas y el elevado número de marcadores utilizados, un mejor conocimiento de los factores genéticos implicados en la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple en la población española.

## VII. CONCLUSIONES

**1ª-** El alelo **-376A** del **promotor** del gen **TNFA** (clase III del MHC) se **asocia primariamente** a la susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple, independientemente de la región de clase II.

**2ª-** La **presencia combinada** de los alelos **HLA-DRB1\*1501** y **TNF-376A** en un mismo individuo **incrementa** considerablemente la **susceptibilidad** a padecer esclerosis múltiple en comparación con el efecto de cada uno de ellos por separado.

**3ª-** La **presencia combinada** del alelo **HLA-DRB1\*1501** y los **microsatélites TNFa11b4c1d3e3** en un mismo sujeto **disminuye** notablemente la **susceptibilidad** a padecer esclerosis múltiple conferida por el DRB1\*1501 solo.

**4ª-** El acusado **desequilibrio de ligamiento** existente en el complejo mayor de histocompatibilidad **dificulta** la **localización exacta** del **gen** o **genes moduladores** de la **susceptibilidad** a padecer esclerosis múltiple.

**5ª-** El alelo **12** del microsatélite **IL-10G**, ubicado en el cromosoma 1, es un **marcador** de **susceptibilidad** de la esclerosis múltiple.

**6ª-** **Ningún alelo** del **gen** del **antagonista** del **receptor** de la **IL-1**, situado en el cromosoma 2, se **asocia** a la **susceptibilidad** a padecer esclerosis múltiple en nuestra población.

**7ª-** La forma clínica **Primaria-Progresiva** **no** se **diferencia genéticamente** de la forma mayoritaria **Remitente-Recurrente** en los loci estudiados.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Kurtzke, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* **33**, 1444-1452. (1983).
2. Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A. et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* **13**, 227-231. (1983).
3. Pujol, R. & Jaraquemada, D. in *Inmunología Clínica. Bases moleculares y celulares* (ed. Martínez, J. P.) 129-142 (ARÁN Ediciones, 1999).
4. Rudge, P. The value of natural history studies of multiple sclerosis. *Brain* **122**, 591-592. (1999).
5. Cottrell, D. A., Kremenchutzky, M., Rice, G. P., Hader, W., Baskerville, J. & Ebers, G. C. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 6. Applications to planning and interpretation of clinical therapeutic trials in primary progressive multiple sclerosis. *Brain* **122**, 641-647. (1999).
6. Weinshenker, B. G., Rice, G. P., Noseworthy, J. H., Carriere, W., Baskerville, J. & Ebers, G. C. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain* **114**, 1045-1056. (1991).
7. Weinshenker, B. G., Issa, M. & Baskerville, J. Long-term and short-term outcome of multiple sclerosis: a 3-year follow-up study. *Arch Neurol* **53**, 353-358. (1996).
8. Sadovnick, A. D., Baird, P. A. & Ward, R. H. Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet* **29**, 533-541. (1988).
9. Sadovnick, A. D., Armstrong, H., Rice, G. P., Bulman, D., Hashimoto, L. et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* **33**, 281-285. (1993).
10. Sawcer, S., Jones, H. B., Feakes, R., Gray, J., Smaldon, N. et al. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* **13**, 464-468. (1996).

11. Ebers, G. C., Kukay, K., Bulman, D. E., Sadovnick, A. D., Rice, G. et al. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* **13**, 472-476. (1996).
12. Haines, J. L., Ter-Minassian, M., Bazyk, A., Gusella, J. F., Kim, D. J. et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet* **13**, 469-471. (1996).
13. Kuokkanen, S., Sundvall, M., Terwilliger, J. D., Tienari, P. J., Wikstrom, J. et al. A putative vulnerability locus to multiple sclerosis maps to 5p14-p12 in a region syntenic to the murine locus Eae2. *Nat Genet* **13**, 477-480. (1996).
14. Martinez-Naves, E., Victoria-Gutierrez, M., Uria, D. F. & Lopez-Larrea, C. The germline repertoire of T cell receptor beta-chain genes in multiple sclerosis patients from Spain. *J Neuroimmunol* **47**, 9-13. (1993).
15. Wood, N. W., Sawcer, S., Kellar Wood, H., Holmans, P., Clayton, D. et al. The T-cell receptor beta-locus and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology* **45**, 1859-1863 (1995).
16. Epplen, C., Jackel, S., Santos, E. J., D'Souza, M., Poehlau, D. et al. Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol* **41**, 341-352. (1997).
17. Walter, M. A., Gibson, W. T., Ebers, G. C. & Cox, D. W. Susceptibility to multiple sclerosis is associated with the proximal immunoglobulin heavy chain variable region. *J Clin Invest* **87**, 1266-1273. (1991).
18. Tienari, P. J., Wikstrom, J., Sajantila, A., Palo, J. & Peltonen, L. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet* **340**, 987-991. (1992).
19. Weinshenker, B. G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* **14**, 291-308. (1996).
20. Poser, C. M. Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta Neurol Scand Suppl* **161**, 11-22 (1995).
21. Kurtzke, J. F. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand Suppl* **161**, 23-33 (1995).
22. Weinshenker, B. G. Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol* **36**, S6-11. (1994).

23. Fernandez, O., Luque, G., San Roman, C., Bravo, M. & Dean, G. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Velez- Malaga, southern Spain. *Neurology* **44**, 425-429. (1994).
24. McCarthy, M. The "gender gap" in autoimmune disease. *Lancet* **356**, 1088. (2000).
25. Duquette, P., Pleines, J., Girard, M., Charest, L., Senecal-Quevillon, M. & Masse, C. The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* **19**, 466-471. (1992).
26. Soldan, S. S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L. et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* **3**, 1394-1397. (1997).
27. Sriram, S., Stratton, C. W., Yao, S., Tharp, A., Ding, L. et al. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **46**, 6-14. (1999).
28. Steinman, L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* **85**, 299-302. (1996).
29. Kivisakk, P., Trebst, C., Eckstein, D. J., Kerza-Kwiatecki, A. P. & Ransohoff, R. M. Chemokine-based therapies for MS: how do we get there from here? *Trends Immunol* **22**, 591-593. (2001).
30. Godessart, N. & Kunkel, S. L. Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* **13**, 670-675. (2001).
31. Giovannoni, G. & Hartung, H. P. The immunopathogenesis of multiple sclerosis and Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Neurol* **9**, 165-177. (1996).
32. Coyle, P. K. The neuroimmunology of multiple sclerosis. *Adv Neuroimmunol* **6**, 143-154 (1996).
33. Martínez-Cáceres, E. Controversias en la patología de la esclerosis múltiple. *Neuroinmunología* **2**, 36-43 (1998).
34. Martino, G., Furlan, R., Brambilla, E., Bergami, A., Ruffini, F. et al. Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis. *J Neuroimmunol* **109**, 3-9. (2000).

35. Rajan, A. J., Gao, Y. L., Raine, C. S. & Brosnan, C. F. A pathogenic role for gamma delta T cells in relapsing-remitting experimental allergic encephalomyelitis in the SJL mouse. *J Immunol* **157**, 941-949. (1996).
36. Karp, C. L., Biron, C. A. & Irani, D. N. Interferon beta in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key? *Immunol Today* **21**, 24-28. (2000).
37. Archelos, J. J., Storch, M. K. & Hartung, H. P. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **47**, 694-706. (2000).
38. Hartung, H. P. Pathogenesis of inflammatory demyelination: implications for therapy. *Curr Opin Neurol* **8**, 191-199. (1995).
39. Gold, R., Hartung, H. P. & Toyka, K. V. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* **6**, 88-91. (2000).
40. Steinman, L. Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron* **24**, 511-514. (1999).
41. Drescher, K. M., Pease, L. R. & Rodriguez, M. Antiviral immune responses modulate the nature of central nervous system (CNS) disease in a murine model of multiple sclerosis. *Immunol Rev* **159**, 177-193. (1997).
42. Noronha, A. & Arnason, B. in *Clinical Immunology: Principles and Practice* (eds. Rich, R. R., Fleisher, T. A., Schwartz, B. D., Shearer, W. T. & Strober, W.) 1364-1376 (Mosby, St Louis, 1996).
43. Yong, V. W., Chabot, S., Stuve, O. & Williams, G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* **51**, 682-689. (1998).
44. Noronha, A., Toscas, A. & Jensen, M. A. Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **46**, 145-153. (1993).
45. Rudick, R. A., Ransohoff, R. M., Lee, J. C., Peppler, R., Yu, M. et al. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* **50**, 1294-1300. (1998).
46. Rep, M. H., Hintzen, R. Q., Polman, C. H. & van Lier, R. A. Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. *J Neuroimmunol* **67**, 111-118. (1996).
47. Lu, H. T., Riley, J. L., Babcock, G. T., Huston, M., Stark, G. R. et al. Interferon (IFN) beta acts downstream of IFN-gamma-induced class II transactivator messenger

RNA accumulation to block major histocompatibility complex class II gene expression and requires the 48- kD DNA-binding protein, ISGF3-gamma. *J Exp Med* **182**, 1517-1525. (1995).

48. Leppert, D., Waubant, E., Burk, M. R., Oksenberg, J. R. & Hauser, S. L. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **40**, 846-852. (1996).

49. Calabresi, P. A., Tranquill, L. R., Dambrosia, J. M., Stone, L. A., Maloni, H. et al. Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Ann Neurol* **41**, 669-674. (1997).

50. Bornstein, M. B., Miller, A., Slagle, S., Weitzman, M., Crystal, H. et al. A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* **317**, 408-414. (1987).

51. Johnson, K. P., Brooks, B. R., Cohen, J. A., Ford, C. C., Goldstein, J. et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing- remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* **45**, 1268-1276. (1995).

52. Johnson, K. P., Brooks, B. R., Cohen, J. A., Ford, C. C., Goldstein, J. et al. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* **50**, 701-708. (1998).

53. Comi, G. & Filippini, D. Copaxone MRI Study Group: The effect of glatirameracetate (Copaxone) on disease activity as measured by cerebral MRI in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). *Neurology* **52**, A289 (1999).

54. Dalakas, M. C. Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases. *Ann Intern Med* **126**, 721-730. (1997).

55. Fazekas, F., Deisenhammer, F., Strasser-Fuchs, S., Nahler, G. & Mamoli, B. Randomised placebo-controlled trial of monthly intravenous immunoglobulin therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. Austrian Immunoglobulin in Multiple Sclerosis Study Group. *Lancet* **349**, 589-593. (1997).

56. Achiron, A., Gabbay, U., Gilad, R., Hassin-Baer, S., Barak, Y. et al. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis. Effect on relapses. *Neurology* **50**, 398-402. (1998).

57. Sorensen, P. S., Wanscher, B., Jensen, C. V., Schreiber, K., Blinkenberg, M. et al. Intravenous immunoglobulin G reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* **50**, 1273-1281. (1998).
58. Goodkin, D. E., Bailly, R. C., Teetzen, M. L., Hertsgaard, D. & Beatty, W. W. The efficacy of azathioprine in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* **41**, 20-25. (1991).
59. Yudkin, P. L., Ellison, G. W., Ghezzi, A., Goodkin, D. E., Hughes, R. A. et al. Overview of azathioprine treatment in multiple sclerosis. *Lancet* **338**, 1051-1055. (1991).
60. Fidler, J. M., DeJoy, S. Q., Smith, F. R., 3rd & Gibbons, J. J., Jr. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone- treated mice. *J Immunol* **136**, 2747-2754. (1986).
61. Edan, G., Miller, D., Clanet, M., Confavreux, C., Lyon-Caen, O. et al. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **62**, 112-118. (1997).
62. Millefiorini, E., Gasperini, C., Pozzilli, C., D'Andrea, F., Bastianello, S. et al. Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing- remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome. *J Neurol* **244**, 153-159. (1997).
63. The Canadian cooperative trial of cyclophosphamide and plasma exchange in progressive multiple sclerosis. The Canadian Cooperative Multiple Sclerosis Study Group. *Lancet* **337**, 441-446. (1991).
64. Weiner, H. L., Mackin, G. A., Orav, E. J., Hafler, D. A., Dawson, D. M. et al. Intermittent cyclophosphamide pulse therapy in progressive multiple sclerosis: final report of the Northeast Cooperative Multiple Sclerosis Treatment Group. *Neurology* **43**, 910-918. (1993).
65. Topham, D. J., Nag, B., Arimilli, S. & Sriram, S. A synthetic peptide from the third hypervariable region of major histocompatibility complex class II beta chain as a vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8005-8009. (1994).
66. Spack, E. G. Treatment of autoimmune diseases through manipulation of antigen presentation. *Crit Rev Immunol* **17**, 529-536 (1997).

67. Goodkin, D. E., Shulman, M., Winkelhake, J., Waubant, E., Andersson, P. et al. A phase I trial of solubilized DR2:MBP84-102 (AG284) in multiple sclerosis. *Neurology* **54**, 1414-1420. (2000).
68. Hogancamp, W. E., Rodriguez, M. & Weinschenker, B. G. The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* **72**, 871-878. (1997).
69. Benacerraf, B. & Germain, R. N. The immune response genes of the major histocompatibility complex. *Immunol Rev* **38**, 70-119 (1978).
70. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* **401**, 921-923. (1999).
71. Gruen, J. R. & Weissman, S. M. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* **90**, 4252-4265. (1997).
72. Olerup, O. & Hillert, J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* **38**, 1-15. (1991).
73. Madsen, L. S., Andersson, E. C., Jansson, L., Krogsgaard, M., Andersen, C. B. et al. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* **23**, 343-347. (1999).
74. Kawamura, K., Yamamura, T., Yokoyama, K., Chui, D. H., Fukui, Y. et al. HLA-DR2-restricted responses to proteolipid protein 95-116 peptide cause autoimmune encephalitis in transgenic mice. *J Clin Invest* **105**, 977-984. (2000).
75. Farrall, M. Mapping genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Lancet* **348**, 1674-1675 (1996).
76. Old, L. El factor de necrosis tumoral. *Investigación y Ciencia* **142**, 28-37 (1988).
77. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501. (2001).
78. Screaton, G. & Xu, X. N. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr Opin Immunol* **12**, 316-322. (2000).
79. Armitage, R. J. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* **6**, 407-413. (1994).
80. Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V. & Boldin, M. P. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* **17**, 331-367. (1999).

81. Chaplin, D. D. & Fu, Y. Cytokine regulation of secondary lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol* **10**, 289-297. (1998).
82. Canella, B. & Raine, C. S. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* **37**, 424-435 (1995).
83. Hauser, S. L. Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. *Ann Neurol* **38**, 702-704. (1995).
84. Robinson, W. H., Genovese, M. C. & Moreland, L. W. Demyelinating and neurologic events reported in association with tumor necrosis factor alpha antagonism: by what mechanisms could tumor necrosis factor alpha antagonists improve rheumatoid arthritis but exacerbate multiple sclerosis? *Arthritis Rheum* **44**, 1977-1983. (2001).
85. Pociot, F., D'Alfonso, S., Compasso, S., Scorza, R. & Richiardi, P. M. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* **42**, 501-504. (1995).
86. Wilson, A. G., de Vries, N., Pociot, F., di Giovine, F. S., van der Putte, L. B. & Duff, G. W. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* **177**, 557-560. (1993).
87. Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O. & Duff, G. W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3195-3199. (1997).
88. McGuire, W., Hill, A. V., Allsopp, C. E., Greenwood, B. M. & Kwiatkowski, D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* **371**, 508-510. (1994).
89. Bahram, S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* **76**, 1-60 (2000).
90. Lanier, L. L. On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol* **2**, 23-27. (2001).
91. Groh, V., Steinle, A., Bauer, S. & Spies, T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* **279**, 1737-1740. (1998).
92. Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., Ohno, S., Ando, H. et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1298-1303. (1997).

93. Perez-Rodriguez, M., Corell, A., Arguello, J. R., Cox, S. T., McWhinnie, A. et al. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* **55**, 162-165. (2000).
94. Ota, M., Katsuyama, Y., Mizuki, N., Ando, H., Furihata, K. et al. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* **49**, 448-454. (1997).
95. Allcock, R. J., Christiansen, F. T. & Price, P. The central MHC gene IKBL carries a structural polymorphism that is associated with HLA-A3,B7,DR15. *Immunogenetics* **49**, 660-665. (1999).
96. de la Concha, E. G., Fernandez-Arquero, M., Lopez-Nava, G., Martin, E., Allcock, R. J. et al. Susceptibility to severe ulcerative colitis is associated with polymorphism in the central MHC gene IKBL. *Gastroenterology* **119**, 1491-1495. (2000).
97. Degli-Esposti, M. A., Leelayuwat, C., Daly, L. N., Carcassi, C., Contu, L. et al. Updated characterization of ancestral haplotypes using the Fourth Asia- Oceania Histocompatibility Workshop panel. *Hum Immunol* **44**, 12-18. (1995).
98. Marshall, B., Leelayuwat, C., Degli-Esposti, M. A., Pinelli, M., Abraham, L. J. & Dawkins, R. L. New major histocompatibility complex genes. *Hum Immunol* **38**, 24-29. (1993).
99. Martin, M., Mann, D. & Carrington, M. Recombination rates across the HLA complex: use of microsatellites as a rapid screen for recombinant chromosomes. *Hum Mol Genet* **4**, 423-428. (1995).
100. Gallagher, G., Eskdale, J. & Miller, S. A highly polymorphic microsatellite marker in the human MHC class III region, close to the BAT2 gene. *Immunogenetics* **46**, 357-358 (1997).
101. Udalova, I. A., Nedospasov, S. A., Webb, G. C., Chaplin, D. D. & Turetskaya, R. L. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics* **16**, 180-186. (1993).
102. Brinkman, B. M., Keet, I. P., Miedema, F., Verweij, C. L. & Klein, M. R. Polymorphisms within the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human immunodeficiency virus type 1-seropositive persons. *J Infect Dis* **175**, 188-190. (1997).

103. Nedospasov, S. A., Udalova, I. A., Kuprash, D. V. & Turetskaya, R. L. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene. *J Immunol* **147**, 1053-1059. (1991).
104. Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A. et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* **13**, 399-408. (1996).
105. Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* **170**, 2081-2095. (1989).
106. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pober, J. S. in *Inmunología Celular y Molecular* (ed. McGraw-Hill-Interamericana) 243-279 (W. B. Saunders Company, 2000).
107. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765 (2001).
108. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-274. (1993).
109. Kennedy, M. K., Torrance, D. S., Picha, K. S. & Mohler, K. M. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* **149**, 2496-2505. (1992).
110. Issazadeh, S., Lorentzen, J. C., Mustafa, M. I., Hojeberg, B., Mussener, A. & Olsson, T. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol* **69**, 103-115. (1996).
111. Huhn, R. D., Radwanski, E., Gallo, J., Affrime, M. B., Sabo, R. et al. Pharmacodynamics of subcutaneous recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **62**, 171-180. (1997).
112. Huhn, R. D., Pennline, K., Radwanski, E., Clarke, L., Sabo, R. & Cutler, D. L. Effects of single intravenous doses of recombinant human interleukin-10 on subsets of circulating leukocytes in humans. *Immunopharmacology* **41**, 109-117. (1999).

113. van Deventer, S., Elson, C. & Fedorak, R. Multiple dose of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* **113**, 383-389 (1997).
114. Kim, J. M., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Khan, T. A. & Moore, K. W. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* **148**, 3618-3623. (1992).
115. Dinarello, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095-2147. (1996).
116. Sims, J. E. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol* **14**, 117-122. (2002).
117. Underhill, D. M. & Ozinsky, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* **14**, 103-110. (2002).
118. Arend, W. P., Malyak, M., Guthridge, C. J. & Gabay, C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* **16**, 27-55 (1998).
119. Hirsch, E., Irikura, V. M., Paul, S. M. & Hirsh, D. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11008-11013. (1996).
120. Patterson, D., Jones, C., Hart, I., Bleskan, J., Berger, R. et al. The human interleukin-1 receptor antagonist (IL1RN) gene is located in the chromosome 2q14 region. *Genomics* **15**, 173-176. (1993).
121. Tarlow, J. K., Blakemore, A. I., Lennard, A., Solari, R., Hughes, H. N. et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* **91**, 403-404. (1993).
122. Danis, V. A., Millington, M., Hyland, V. J. & Grennan, D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* **99**, 303-310. (1995).
123. Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., De Saint Basile, G., DeVillartay, J. P., Di Santo, J. P. et al. Naturally occurring primary deficiencies of the immune system. *Annu Rev Immunol* **15**, 93-124. (1997).
124. Vyse, T. J. & Todd, J. A. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* **85**, 311-318. (1996).

125. Sawcer, S., Goodfellow, P. N. & Compston, A. The genetic analysis of multiple sclerosis. *Trends Genet* **13**, 234-239. (1997).
126. Rosati, G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* **22**, 117-139. (2001).
127. Kurtzke, J. F. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *J Neurovirol* **6**, S134-140. (2000).
128. Kellar-Wood, H. F., Wood, N. W., Holmans, P., Clayton, D., Robertson, N. & Compston, D. A. Multiple sclerosis and the HLA-D region: linkage and association studies. *J Neuroimmunol* **58**, 183-190. (1995).
129. Compston, A. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1623-1634. (1999).
130. Ebers, G. C., Sadovnick, A. D. & Risch, N. J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* **377**, 150-151. (1995).
131. Berardelli, P. Herpesvirus linked to multiple sclerosis. *Science* **278**, 1710. (1997).
132. Boman, J., Roblin, P. M., Sundstrom, P., Sandstrom, M. & Hammerschlag, M. R. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in the central nervous system of patients with MS. *Neurology* **54**, 265. (2000).
133. Wucherpfennig, K. W. & Strominger, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705. (1995).
134. Dyment, D. A., Willer, C. J., Scott, B., Armstrong, H., Ligers, A. et al. Genetic susceptibility to MS: a second stage analysis in Canadian MS families. *Neurogenetics* **3**, 145-151. (2001).
135. Baranzini, S. E., Elfstrom, C., Chang, S. Y., Butunoi, C., Murray, R. et al. Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J Immunol* **165**, 6576-6582. (2000).
136. Whitney, L. W., Becker, K. G., Tresser, N. J., Caballero-Ramos, C. I., Munson, P. J. et al. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* **46**, 425-428. (1999).

137. Hensiek, A. E., Sawcer, S. J., Feakes, R., Deans, J., Mander, A. et al. HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **72**, 184-187. (2002).
138. Weatherby, S. J., Thomson, W., Pepper, L., Donn, R., Worthington, J. et al. HLA-DRB1 and disease outcome in multiple sclerosis. *J Neurol* **248**, 304-310. (2001).
139. Ma, J. J., Nishimura, M., Mine, H., Saji, H., Ohta, M. et al. HLA-DRB1 and tumor necrosis factor gene polymorphisms in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **92**, 109-112. (1998).
140. Kioy, P. G. Emerging picture of multiple sclerosis in Kenya. *East Afr Med J* **78**, 93-96. (2001).
141. Jersild, C., Dupont, B., Fog, T., Platz, P. J. & Svejgaard, A. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis. *Transplant Rev* **22**, 148-163. (1975).
142. Hauser, S. L., Fleischnick, E., Weiner, H. L., Marcus, D., Awdeh, Z. et al. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with multiple sclerosis. *Neurology* **39**, 275-277. (1989).
143. Clerici, N., Hernandez, M., Fernandez, M., Rosique, J. & Alvarez-Cermeno, J. Multiple sclerosis is associated with HLA-DR2 antigen in Spain. *Tissue Antigens* **34**, 309-311. (1989).
144. Liblau, R. & Gautam, A. M. HLA, molecular mimicry and multiple sclerosis. *Rev Immunogenet* **2**, 95-104 (2000).
145. Das, P., Abraham, R. & David, C. HLA transgenic mice as models of human autoimmune diseases. *Rev Immunogenet* **2(1)**, 105-114 (2000).
146. Zipp, F., Windemuth, C., Pankow, H., Dichgans, J., Wienker, T. et al. Multiple sclerosis associated amino acids of polymorphic regions relevant for the HLA antigen binding are confined to HLA-DR2. *Hum Immunol* **61**, 1021-1030. (2000).
147. Spurkland, A., Ronningen, K. S., Vandvik, B., Thorsby, E. & Vartdal, F. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes may jointly determine susceptibility to develop multiple sclerosis. *Hum Immunol* **30**, 69-75. (1991).
148. Hillert, J. Human leukocyte antigen studies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **36**, S15-17. (1994).

149. Yaouanq, J., Semana, G., Eichenbaum, S., Quelvennec, E., Roth, M. P. et al. Evidence for linkage disequilibrium between HLA-DRB1 gene and multiple sclerosis. The French Research Group on Genetic Susceptibility to MS. *Science* **276**, 664-665. (1997).
150. Laaksonen, M., Pastinen, T., Sjoroos, M., Kuokkanen, S., Ruutiainen, J. et al. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis- a Finnish family study. *J Neuroimmunol* **122**, 140-145. (2002).
151. McDonnell, G. V., Mawhinney, H., Graham, C. A., Hawkins, S. A. & Middleton, D. A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis. *J Neurol Sci* **165**, 77-83. (1999).
152. de la Concha, E. G., Arroyo, R., Crusius, J. B., Campillo, J. A., Martin, C. et al. Combined effect of HLA-DRB1\*1501 and interleukin-1 receptor antagonist gene allele 2 in susceptibility to relapsing/remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **80**, 172-178. (1997).
153. Runmarker, B., Andersson, C., Oden, A. & Andersen, O. Prediction of outcome in multiple sclerosis based on multivariate models. *J Neurol* **241**, 597-604. (1994).
154. Masterman, T., Ligers, A., Olsson, T., Andersson, M., Olerup, O. & Hillert, J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **48**, 211-219. (2000).
155. Runmarker, B. & Andersen, O. Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty- five years of follow-up. *Brain* **116**, 117-134. (1993).
156. Gulcher, J. R., Vartanian, T. & Stefansson, K. Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Clin Neurosci* **2**, 246-252 (1994).
157. Rook, G. A., Ristori, G., Salvetti, M., Giovannoni, G., Thompson, E. J. & Stanford, J. L. Bacterial vaccines for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune disorders. *Immunol Today* **21**, 503-508. (2000).
158. Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. & Lassmann, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* **47**, 707-717. (2000).
159. Fusco, C., Andreone, V., Coppola, G., Luongo, V., Guerini, F. et al. HLA-DRB1\*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing- remitting multiple sclerosis. *Neurology* **57**, 1976-1979. (2001).

160. Luomala, M., Elovaara, I., Ukkonen, M., Koivula, T. & Lehtimäki, T. The combination of HLA-DR1 and HLA-DR53 protects against MS. *Neurology* **56**, 383-385. (2001).
161. Marrosu, M. G., Murru, R., Murru, M. R., Costa, G., Zavattari, P. et al. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Genet* **10**, 2907-2916. (2001).
162. Marrosu, M. G., Murru, M. R., Costa, G., Cucca, F., Sotgiu, S. et al. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet* **61**, 454-457. (1997).
163. Corradu, F., Sawcer, S., D'Alfonso, S., Lai, M., Hensiek, A. et al. A genome screen for multiple sclerosis in Sardinian multiplex families. *Eur J Hum Genet* **9**, 621-626. (2001).
164. Ligers, A., Dymont, D. A., Willer, C. J., Sadovnick, A. D., Ebers, G. et al. Evidence of linkage with HLA-DR in DRB1\*15-negative families with multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* **69**, 900-903. (2001).
165. Karni, A., Kohn, Y., Safirman, C., Abramsky, O., Barcellos, L. et al. Evidence for the genetic role of human leukocyte antigens in low frequency DRB1\*1501 multiple sclerosis patients in Israel. *Mult Scler* **5**, 410-415. (1999).
166. Serjeantson, S. W., Gao, X., Hawkins, B. R., Higgins, D. A. & Yu, Y. L. Novel HLA-DR2-related haplotypes in Hong Kong Chinese implicate the DOB1\*0602 allele in susceptibility to multiple sclerosis. *Eur J Immunogenet* **19**, 11-19. (1992).
167. Jacob, C. O. Tumor necrosis factor alpha in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunol Today* **13**, 122-125. (1992).
168. Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T. et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun* **2**, 61-70. (2001).
169. Brennan, F. M., Gibbons, D. L., Cope, A. P., Katsikis, P., Maini, R. N. & Feldmann, M. TNF inhibitors are produced spontaneously by rheumatoid and osteoarthritic synovial joint cell cultures: evidence of feedback control of TNF action. *Scand J Immunol* **42**, 158-165. (1995).
170. Braun, J., Yin, Z., Spiller, I., Siegert, S., Rudwaleit, M. et al. Low secretion of tumor necrosis factor alpha, but no other Th1 or Th2 cytokines, by peripheral blood

mononuclear cells correlates with chronicity in reactive arthritis. *Arthritis Rheum* **42**, 2039-2044. (1999).

171. Kwiatkowski, D., Hill, A. V., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J. et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **336**, 1201-1204. (1990).

172. Sharief, M. K. & Hentges, R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* **325**, 467-472. (1991).

173. Peter, J. B., Boctor, F. N. & Tourtellotte, W. W. Serum and CSF levels of IL-2, sIL-2R, TNF-alpha, and IL-1 beta in chronic progressive multiple sclerosis: expected lack of clinical utility. *Neurology* **41**, 121-123. (1991).

174. Jacob, C. O., Fronck, Z., Lewis, G. D., Koo, M., Hansen, J. A. & McDevitt, H. O. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1233-1237. (1990).

175. Abraham, L. J. & Kroeger, K. M. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* **66**, 562-566. (1999).

176. Allen, R. D. Polymorphism of the human TNF-alpha promoter--random variation or functional diversity? *Mol Immunol* **36**, 1017-1027. (1999).

177. Huang, D. R., Pirskanen, R., Matell, G. & Lefvert, A. K. Tumour necrosis factor-alpha polymorphism and secretion in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* **94**, 165-171. (1999).

178. Kroeger, K. M., Steer, J. H., Joyce, D. A. & Abraham, L. J. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* **12**, 110-119. (2000).

179. Maurer, M., Kruse, N., Giess, R., Kyriallis, K., Toyka, K. V. & Rieckmann, P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha promoter is not associated with disease progression in multiple sclerosis patients. *J Neurol* **246**, 949-954. (1999).

180. Bayley, J. P., de Rooij, H., van den Elsen, P. J., Huizinga, T. W. & Verweij, C. L. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine* **14**, 316-323. (2001).

181. Price, P., Witt, C., Allcock, R., Sayer, D., Garlepp, M. et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev* **167**, 257-274. (1999).

182. Wilson, A. G., Gordon, C., di Giovine, F. S., de Vries, N., van de Putte, L. B. et al. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* **24**, 191-195. (1994).

183. Pociot, F., Wilson, A. G., Nerup, J. & Duff, G. W. No independent association between a tumor necrosis factor-alpha promoter region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* **23**, 3050-3053. (1993).

184. Sotgiu, S., Pugliatti, M., Serra, C., Rosati, G., Dolei, A. & Marrosu, M. G. Tumor necrosis factor 2 allele does not contribute to increased tumor necrosis factor-alpha production in Sardinian multiple sclerosis. *Ann Neurol* **46**, 799-800. (1999).

185. Brinkman, B. M., Zuijdeest, D., Kaijzel, E. L., Breedveld, F. C. & Verweij, C. L. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* **46**, 32-41 (1995).

186. Kaijzel, E. L., van Krugten, M. V., Brinkman, B. M., Huizinga, T. W., van der Straaten, T. et al. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* **4**, 724-733. (1998).

187. Chagani, T., Pare, P. D., Zhu, S., Weir, T. D., Bai, T. R. et al. Prevalence of tumor necrosis factor-alpha and angiotensin converting enzyme polymorphisms in mild/moderate and fatal/near-fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 278-282. (1999).

188. Louis, E., Peeters, M., Franchimont, D., Seidel, L., Fontaine, F. et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? *Clin Exp Immunol* **119**, 64-68. (2000).

189. Hirv, K., Seyfarth, M., Uibo, R., Kull, K., Salupere, R. et al. Polymorphisms in tumour necrosis factor and adhesion molecule genes in patients with inflammatory bowel

disease: associations with HLA-DR and -DQ alleles and subclinical markers. *Scand J Gastroenterol* **34**, 1025-1032. (1999).

190. Rood, M. J., van Krugten, M. V., Zanelli, E., van der Linden, M. W., Keijsers, V. et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **43**, 129-134. (2000).

191. McGarry, F., Walker, R., Sturrock, R. & Field, M. The -308.1 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor gene is associated with ankylosing spondylitis independent of HLA-B27. *J Rheumatol* **26**, 1110-1116. (1999).

192. Kunstmann, E., Epplen, C., Elitok, E., Harder, M., Suerbaum, S. et al. Helicobacter pylori infection and polymorphisms in the tumor necrosis factor region. *Electrophoresis* **20**, 1756-1761. [pii] (1999).

193. Kamizono, S., Yamada, A., Higuchi, T., Kato, H. & Itoh, K. Analysis of tumor necrosis factor-alpha production and polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene in individuals with a history of Kawasaki disease. *Pediatr Int* **41**, 341-345. (1999).

194. Barber, M. D., Powell, J. J., Lynch, S. F., Gough, N. J., Fearon, K. C. & Ross, J. A. Two polymorphisms of the tumour necrosis factor gene do not influence survival in pancreatic cancer. *Clin Exp Immunol* **117**, 425-429. (1999).

195. Wihlborg, C., Sjoberg, J., Intaglietta, M., Axdorph, U., Pisa, E. K. & Pisa, P. Tumour necrosis factor-alpha cytokine promoter gene polymorphism in Hodgkin's disease and chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **104**, 346-349. (1999).

196. Craandijk, J., van Krugten, M. V., Verweij, C. L., van der Velden, U. & Loos, B. G. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* **29**, 28-34. (2002).

197. Lu, L. Y., Ding, W. Z., Fici, D., Deulofeut, R., Cheng, H. H. et al. Molecular analysis of major histocompatibility complex allelic associations with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Arthritis Rheum* **40**, 1138-1145. (1997).

198. Owens, T., Wekerle, H. & Antel, J. Genetic models for CNS inflammation. *Nat Med* **7**, 161-166. (2001).

199. Davidson, A. & Diamond, B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* **345**, 340-350. (2001).

200. Woodroffe, M. N. Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* **45**, S6-10. (1995).

201. Kollias, G., Douni, E., Kassiotis, G. & Kontoyiannis, D. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* **169**, 175-194. (1999).
202. He, B., Navikas, V., Lundahl, J., Soderstrom, M. & Hillert, J. Tumor necrosis factor alpha-308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis. *J Neuroimmunol* **63**, 143-147. (1995).
203. Wingerchuk, D., Liu, Q., Sobell, J., Sommer, S. & Weinshenker, B. G. A population-based case-control study of the tumor necrosis factor alpha-308 polymorphism in multiple sclerosis. *Neurology* **49**, 626-628. (1997).
204. Braun, N., Michel, U., Ernst, B. P., Metzner, R., Bitsch, A. et al. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci Lett* **215**, 75-78. (1996).
205. Weinshenker, B. G., Wingerchuk, D. M., Liu, Q., Bissonet, A. S., Schaid, D. J. & Sommer, S. S. Genetic variation in the tumor necrosis factor alpha gene and the outcome of multiple sclerosis. *Neurology* **49**, 378-385. (1997).
206. D'Alfonso, S., Colombo, G., Della Bella, S., Scorza, R. & Momigliano-Richiardi, P. Association between polymorphisms in the TNF region and systemic lupus erythematosus in the Italian population. *Tissue Antigens* **47**, 551-555. (1996).
207. Brinkman, B. M., Huizinga, T. W., Kurban, S. S., van der Velde, E. A., Schreuder, G. M. et al. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol* **36**, 516-521. (1997).
208. Vinasco, J., Beraun, Y., Nieto, A., Fraile, A., Mataran, L. et al. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **49**, 74-78. (1997).
209. Hohler, T., Kruger, A., Schneider, P. M., Schopf, R. E., Knop, J. et al. A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol* **109**, 562-565. (1997).
210. Cookson, S., Constantini, P. K., Clare, M., Underhill, J. A., Bernal, W. et al. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* **30**, 851-856. (1999).

211. Czaja, A. J., Cookson, S., Constantini, P. K., Clare, M., Underhill, J. A. & Donaldson, P. T. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **117**, 645-652. (1999).
212. Huizinga, T. W., Westendorp, R. G., Bollen, E. L., Keijsers, V., Brinkman, B. M. et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* **72**, 149-153. (1997).
213. Anlar, B., Alikasifoglu, M., Kose, G., Guven, A., Gurer, Y. & Yakut, A. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in children with multiple sclerosis. *Neuropediatrics* **32**, 214-216. (2001).
214. Lucotte, G., Bathelier, C. & Mercier, G. TNF-alpha polymorphisms in multiple sclerosis: no association with -238 and -308 promoter alleles, but the microsatellite allele a11 is associated with the disease in French patients. *Mult Scler* **6**, 78-80. (2000).
215. Knight, J. C., Udalova, I., Hill, A. V., Greenwood, B. M., Peshu, N. et al. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* **22**, 145-150. (1999).
216. Kaijzel, E. L., Brinkman, B. M., van Krugten, M. V., Smith, L., Huizinga, T. W. et al. Polymorphism within the tumor necrosis factor alpha (TNF) promoter region in patients with ankylosing spondylitis. *Hum Immunol* **60**, 140-144. (1999).
217. Fernandez-Arquero, M., Arroyo, R., Rubio, A., Martin, C., Vigil, P. et al. Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology* **53**, 1361-1363. (1999).
218. Weinschenker, B. G., Hebrink, D. D., Atkinson, E. J. & Kantarci, O. H. Association of a tumor necrosis factor alpha polymorphism with MS susceptibility. *Neurology* **57**, 1341-1342 (2001).
219. Yen, J. H., Chen, C. J., Tsai, W. C., Lin, C. H., Ou, T. T. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *J Rheumatol* **28**, 1788-1792. (2001).
220. Fraile, A., Nieto, A., Beraun, Y., Vinasco, J., Mataran, L. & Martin, J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* **51**, 386-390. (1998).

221. Kato, T., Honda, M., Kuwata, S., Juji, T., Kunugi, H. et al. Novel polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha gene: No association with narcolepsy. *Am J Med Genet* **88**, 301-304. (1999).
222. Negoro, K., Kinouchi, Y., Hiwatashi, N., Takahashi, S., Takagi, S. et al. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterology* **117**, 1062-1068. (1999).
223. Hohjoh, H., Nakayama, T., Ohashi, J., Miyagawa, T., Tanaka, H. et al. Significant association of a single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene promoter with human narcolepsy. *Tissue Antigens* **54**, 138-145. (1999).
224. Seki, N., Kamizono, S., Yamada, A., Higuchi, T., Matsumoto, H. et al. Polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **54**, 194-197. (1999).
225. Date, Y., Seki, N., Kamizono, S., Higuchi, T., Hirata, T. et al. Identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5'-flanking region of the TNFalpha gene and HLA genes. *Arthritis Rheum* **42**, 2577-2582. (1999).
226. Hamaguchi, K., Kimura, A., Seki, N., Higuchi, T., Yasunaga, S. et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in type 1 diabetes: HLA-B and -DRB1 alleles are primarily associated with the disease in Japanese. *Tissue Antigens* **55**, 10-16. (2000).
227. Hohjoh, H. & Tokunaga, K. Allele-specific binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor-alpha gene (TNFA) promoter. *Genes Immun* **2**, 105-109. (2001).
228. Brinkman, B. M., Kaijzel, E. L., Huizinga, T. W., Giphart, M. J., Breedveld, F. C. & Verweij, C. L. Detection of a C-insertion polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) gene. *Hum Genet* **96**, 493. (1995).
229. Cohen, R., Metzger, S., Nahir, M. & Chajek-Shaul, T. Association of the MIC-A gene and HLA-B51 with Behcet's disease in Arabs and non-Ashkenazi Jews in Israel. *Ann Rheum Dis* **61**, 157-160. (2002).
230. Salvarani, C., Boiardi, L., Mantovani, V., Olivieri, I., Ciancio, G. et al. Association of MICA alleles and HLA-B51 in Italian patients with Behcet's disease. *J Rheumatol* **28**, 1867-1870. (2001).

231. Yabuki, K., Ota, M., Goto, K., Kimura, T., Nomura, E. et al. Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative caucasian patients with ankylosing spondylitis. *Hum Immunol* **60**, 83-86. (1999).
232. Martinez, A., Fernandez-Arquero, M., Balsa, A., Rubio, A., Alves, H. et al. Primary association of a MICA allele with protection against rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **44**, 1261-1265. (2001).
233. Singal, D. P., Li, J. & Zhang, G. Microsatellite polymorphism of the MICA gene and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **19**, 451-452. (2001).
234. Zeine, R., Pon, R., Ladiwala, U., Antel, J. P., Fillion, L. G. & Freedman, M. S. Mechanism of gammadelta T cell-induced human oligodendrocyte cytotoxicity: relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **87**, 49-61. (1998).
235. Stinissen, P., Vandevyver, C., Medaer, R., Vandegaer, L., Nies, J. et al. Increased frequency of gamma delta T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. Reactivity, cytotoxicity, and T cell receptor V gene rearrangements. *J Immunol* **154**, 4883-4894. (1995).
236. Shimonkevitz, R., Colburn, C., Burnham, J. A., Murray, R. S. & Kotzin, B. L. Clonal expansions of activated gamma/delta T cells in recent-onset multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 923-927. (1993).
237. Herr, M., Dudbridge, F., Zavattari, P., Cucca, F., Guja, C. et al. Evaluation of fine mapping strategies for a multifactorial disease locus: systematic linkage and association analysis of IDDM1 in the HLA region on chromosome 6p21. *Hum Mol Genet* **9**, 1291-1301. (2000).
238. Allcock, R. J., de la Concha, E. G., Fernandez-Arquero, M., Vigil, P., Conejero, L. et al. Susceptibility to multiple sclerosis mediated by HLA-DRB1 is influenced by a second gene telomeric of the TNF cluster. *Hum Immunol* **60**, 1266-1273. (1999).
239. Matsuzaka, Y., Makino, S., Nakajima, K., Tomizawa, M., Oka, A. et al. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens* **57**, 397-404. (2001).
240. Ribas, G., Neville, M., Wixon, J. L., Cheng, J. & Campbell, R. D. Genes encoding three new members of the leukocyte antigen 6 superfamily and a novel member of Ig superfamily, together with genes encoding the regulatory nuclear chloride ion channel protein (hRNCC) and an N omega- N omega-dimethylarginine dimethylaminohydrolase

homologue, are found in a 30-kb segment of the MHC class III region. *J Immunol* **163**, 278-287. (1999).

241. Singal, D. P., Li, J., Ye, M. & Lei, K. D6S273 microsatellite polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **52**, 353-358. (1998).

242. van der Linden, M. W., van der Slik, A. R., Zanelli, E., Giphart, M. J., Pieterman, E. et al. Six microsatellite markers on the short arm of chromosome 6 in relation to HLA-DR3 and TNF-308A in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* **2**, 373-380. (2001).

243. Nejentsev, S., Gombos, Z., Laine, A. P., Vejjola, R., Knip, M. et al. Non-class II HLA gene associated with type 1 diabetes maps to the 240- kb region near HLA-B. *Diabetes* **49**, 2217-2221. (2000).

244. Feenstra, M., Veltkamp, M., van Kuik, J., Wiertsema, S., Slootweg, P. et al. HLA class I expression and chromosomal deletions at 6p and 15q in head and neck squamous cell carcinomas. *Tissue Antigens* **54**, 235-245. (1999).

245. Hashimoto, M., Nakamura, N., Obayashi, H., Kimura, F., Moriwaki, A. et al. Genetic contribution of the BAT2 gene microsatellite polymorphism to the age-at-onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum Genet* **105**, 197-199. (1999).

246. Singal, D. P., Li, J. & Zhu, Y. HLA class III region and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **18**, 485-491. (2000).

247. Singal, D. P., Li, J. & Lei, K. Genetics of rheumatoid arthritis (RA): two separate regions in the major histocompatibility complex contribute to susceptibility to RA. *Immunol Lett* **69**, 301-306. (1999).

248. van der Slik, A. R., Shing, D. C., Eerligh, P. & Giphart, M. J. Subtyping for TNF $\alpha$  microsatellite sequence variation. *Immunogenetics* **52**, 29-34. (2000).

249. Hajeer, A. H. & Hutchinson, I. V. Influence of TNF $\alpha$  gene polymorphisms on TNF $\alpha$  production and disease. *Hum Immunol* **62**, 1191-1199. (2001).

250. Hajeer, A. H., Worthington, J., Davies, E. J., Hillarby, M. C., Poulton, K. & Ollier, W. E. TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* **49**, 222-227. (1997).

251. Khoo, S. H., Pepper, L., Snowden, N., Hajeer, A. H., Vallely, P. et al. Tumour necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. *Aids* **11**, 423-428. (1997).

252. D'Alfonso, S., Cappello, N., Carcassi, C., Fasano, M. & Momigliano-Richiardi, P. in *HLA: Proceedings of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference* (ed. Charron, D.) 125-127 (EDK, Paris, 1997).
253. Oturai, A., Larsen, F., Ryder, L. P., Madsen, H. O., Hillert, J. et al. Linkage and association analysis of susceptibility regions on chromosomes 5 and 6 in 106 Scandinavian sibling pair families with multiple sclerosis. *Ann Neurol* **46**, 612-616. (1999).
254. Coraddu, F., Sawcer, S., Feakes, R., Chataway, J., Broadley, S. et al. HLA typing in the United Kingdom multiple sclerosis genome screen. *Neurogenetics* **2**, 24-33. (1998).
255. Kirk, C. W., Droogan, A. G., Hawkins, S. A., McMillan, S. A., Nevin, N. C. & Graham, C. A. Tumour necrosis factor microsatellites show association with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **147**, 21-25. (1997).
256. Boiko, A. N., Guseva, M. E., Guseva, M. R., Boiko, S. Y., Sudomoina, M. A. et al. Clinico-immunogenetic characteristics of multiple sclerosis with optic neuritis in children. *J Neurovirol* **6 Suppl 2**, S152-155. (2000).
257. Lie, B. A., Sollid, L. M., Ascher, H., Ek, J., Akselsen, H. E. et al. A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. *Tissue Antigens* **54**, 162-168. (1999).
258. Pickard, C., Mann, C., Sinnott, P., Boggild, M., Hawkins, C. et al. Interleukin-10 (IL10) promoter polymorphisms and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **101**, 207-210. (1999).
259. Luomala, M., Lehtimäki, T., Elovaara, I., Wang, X., Ukkonen, M. et al. A study of interleukin-1 cluster genes in susceptibility to and severity of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **185**, 123-127. (2001).
260. Maurer, M., Kruse, N., Giess, R., Toyka, K. V. & Rieckmann, P. Genetic variation at position -1082 of the interleukin 10 (IL10) promoter and the outcome of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **104**, 98-100. (2000).
261. Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H. & Gallagher, G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* **46**, 120-128 (1997).
262. Eskdale, J. & Gallagher, G. A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. *Immunogenetics* **42**, 444-445 (1995).

263. Eskdale, J., Kube, D. & Gallagher, G. A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL10 gene. *Immunogenetics* **45**, 82-83 (1996).
264. Eskdale, J., Keijsers, V., Huizinga, T. & Gallagher, G. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin- 10 (IL-10) locus. *Genes Immun* **1**, 151-155. (1999).
265. Eskdale, J., Gallagher, G., Verweij, C. L., Keijsers, V., Westendorp, R. G. & Huizinga, T. W. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9465-9470. (1998).
266. He, B., Xu, C., Yang, B., Landtblom, A. M., Fredrikson, S. & Hillert, J. Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **86**, 13-19. (1998).
267. McDonnell, G. V., Kirk, C. W., Hawkins, S. A. & Graham, C. A. An evaluation of interleukin genes fails to identify clear susceptibility loci for multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **176**, 4-12. (2000).
268. Eskdale, J., Wordsworth, P., Bowman, S., Field, M. & Gallagher, G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* **49**, 635-639. (1997).
269. Bioque, G., Crusius, J. B., Koutroubakis, I., Bouma, G., Kostense, P. J. et al. Allelic polymorphism in IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* **102**, 379-383. (1995).
270. Tarlow, J. K., Clay, F. E., Cork, M. J., Blakemore, A. I., McDonagh, A. J. et al. Severity of alopecia areata is associated with a polymorphism in the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J Invest Dermatol* **103**, 387-390. (1994).
271. Tarlow, J. K., Cork, M. J., Clay, F. E., Schmitt-Egenolf, M., Crane, A. M. et al. Association between interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) gene polymorphism and early and late-onset psoriasis. *Br J Dermatol* **136**, 147-148. (1997).
272. Blakemore, A. I., Tarlow, J. K., Cork, M. J., Gordon, C., Emery, P. & Duff, G. W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **37**, 1380-1385. (1994).
273. Blakemore, A. I., Watson, P. F., Weetman, A. P. & Duff, G. W. Association of Graves' disease with an allele of the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 111-115. (1995).

274. Blakemore, A. I., Cox, A., Gonzalez, A. M., Maskil, J. K., Hughes, M. E. et al. Interleukin-1 receptor antagonist allele (IL1RN\*2) associated with nephropathy in diabetes mellitus. *Hum Genet* **97**, 369-374. (1996).
275. Kantarci, O. H., Atkinson, E. J., Hebrink, D. D., McMurray, C. T. & Weinshenker, B. G. Association of two variants in IL-1beta and IL-1 receptor antagonist genes with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **106**, 220-227. (2000).
276. Sciacca, F. L., Canal, N. & Grimaldi, L. M. Induction of IL-1 receptor antagonist by interferon beta: implication for the treatment of multiple sclerosis. *J Neurovirol* **6 Suppl 2**, S33-37. (2000).
277. Perini, P., Tiberio, M., Sivieri, S., Facchinetti, A., Biasi, G. & Gallo, P. Interleukin-1 receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor-alpha receptor type I and II, and soluble E-selectin serum levels in multiple sclerosis patients receiving weekly intramuscular injections of interferon-beta1a. *Eur Cytokine Netw* **11**, 81-86. (2000).
278. Kimura, A. & Sasazuki, T. in *HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference* (eds. Tsuji, K., Aizawa, M. & Sasazuki, T.) 397-419 (Oxford University Press, Oxford, 1991).
279. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular Cloning* (1989).
280. Verduyn, W., Doxiadis, II, Anholts, J., Drabbels, J. J., Naipal, A. et al. Biotinylated DRB sequence-specific oligonucleotides. Comparison to serologic HLA-DR typing of organ donors in eurotransplant. *Hum Immunol* **37**, 59-67. (1993).
281. Tremmel, M., Opelz, G. & Mytilineos, J. High-resolution typing for HLA-DRB1\*15 and -DRB1\*16 by fluorescence- marked sequence-specific priming (TaqMan assay). *Tissue Antigens* **54**, 508-516. (1999).
282. Mullighan, C. G., Marshall, S. E., Bunce, M. & Welsh, K. I. Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of common variable immunodeficiency. *Genes Immun* **1**, 137-148. (1999).
283. Cavet, J., Middleton, P. G., Segall, M., Noreen, H., Davies, S. M. & Dickinson, A. M. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus- host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood* **94**, 3941-3946. (1999).
284. Ewens, W. J. & Spielman, R. S. The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture. *Am J Hum Genet* **57**, 455-464. (1995).

285. Spielman, R. S., McGinnis, R. E. & Ewens, W. J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* **52**, 506-516. (1993).
286. Spielman, R. S. & Ewens, W. J. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* **59**, 983-989. (1996).
287. Nepom, G. T. & Erlich, H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **9**, 493-525. (1991).
288. Van Lambalgen, R., Sanders, E. A. & D'Amaro, J. Sex distribution, age of onset and HLA profiles in two types of multiple sclerosis. A role for sex hormones and microbial infections in the development of autoimmunity? *J Neurol Sci* **76**, 13-21. (1986).
289. Whitacre, C. C., Reingold, S. C. & O'Looney, P. A. A gender gap in autoimmunity. *Science* **283**, 1277-1278. (1999).
290. Olerup, O., Hillert, J., Fredrikson, S., Olsson, T., Kam-Hansen, S. et al. Primarily chronic progressive and relapsing/remitting multiple sclerosis: two immunogenetically distinct disease entities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7113-7117. (1989).
291. Hillert, J., Gronning, M., Nyland, H., Link, H. & Olerup, O. An immunogenetic heterogeneity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **55**, 887-890. (1992).
292. Haegert, D. G., Michaud, M., Schwab, C. & Francis, G. S. Multiple sclerosis and HLA class II susceptibility and resistance genes. *J Neurosci Res* **26**, 66-73. (1990).
293. Allen, M., Sandberg-Wollheim, M., Sjogren, K., Erlich, H. A., Petterson, U. & Gyllensten, U. Association of susceptibility to multiple sclerosis in Sweden with HLA class II DRB1 and DQB1 alleles. *Hum Immunol* **39**, 41-48. (1994).
294. Dyment, D. A., Sadovnick, A. D., Ebers, G. C. & Sadnovich, A. D. Genetics of multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* **6**, 1693-1698. (1997).
295. Hockertz, M. K., Paty, D. W. & Beall, S. S. Susceptibility to relapsing-progressive multiple sclerosis is associated with inheritance of genes linked to the variable region of the TcR beta locus: use of affected family-based controls. *Am J Hum Genet* **62**, 373-385. (1998).
296. Price, S. E., Sharpe, G., Boots, A., Poutsma, A., Mason, C. et al. Role of myelin basic protein and proteolipid protein genes in multiple sclerosis: single strand conformation polymorphism analysis of the human sequences. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**, 457-467. (1997).

297. Ibsen, S. N. & Clausen, J. Genetic susceptibility to multiple sclerosis may be linked to polymorphism of the myelin basic protein gene. *J Neurol Sci* **131**, 96-98. (1995).
298. Vandevyver, C., Stinissen, P., Cassiman, J. J. & Raus, J. Myelin basic protein gene polymorphism is not associated with chronic progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **52**, 97-99. (1994).
299. Rose, J., Gerken, S., Lynch, S., Pisani, P., Varvil, T. et al. Genetic susceptibility in familial multiple sclerosis not linked to the myelin basic protein gene. *Lancet* **341**, 1179-1181. (1993).
300. Michael, N. L., Louie, L. G., Rohrbaugh, A. L., Schultz, K. A., Dayhoff, D. E. et al. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* **3**, 1160-1162. (1997).
301. Jean, S., Quelvennec, E., Alizadeh, M., Guggenbuhl, P., Birebent, B. et al. DRB1\*15 and DRB1\*03 extended haplotype interaction in primary Sjogren's syndrome genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* **16**, 725-728. (1998).
302. Mehrian, R., Quismorio, F. P., Jr., Strassmann, G., Stimmler, M. M., Horwitz, D. A. et al. Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **41**, 596-602. (1998).
303. Wang, X., DeKosky, S. T., Wisniewski, S., Aston & Kamboh, M. I. Genetic association of two chromosome 14 genes (presenilin 1 and alpha 1-antichymotrypsin) with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **44**, 387-390. (1998).
304. Martinez, A., Fernandez-Arquero, M., Pascual-Salcedo, D., Conejero, L., Alves, H. et al. Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 1366-1370. (2000).
305. Moghaddam, P., de Knijf, P. & Roep, B. Genetic structure of IDDM1. Two separate regions in the major histocompatibility complex contribute to susceptibility or protection. *Diabetes* **47**, 263-269 (1998).
306. de la Concha, E. G., Fernandez-Arquero, M., Vigil, P., Rubio, A., Maluenda, C. et al. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *Hum Immunol* **61**, 513-517. (2000).
307. Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Fuentes, D., Riestra, S., Bousono, C. et al. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201. *Gut* **50**, 336-340. (2002).

308. Navikas, V. & Link, H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* **45**, 322-333. (1996).
309. Selmaj, K. W. & Raine, C. S. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* **23**, 339-346. (1988).
310. Zipp, F., Weber, F., Huber, S., Sotgiu, S., Czlonkowska, A. et al. Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor- $\alpha$  by HLA-DR2+ T cells. *Ann Neurol* **38**, 723-730. (1995).
311. Zhou, P., Cao, H., Smart, M. & David, C. Molecular basis of genetic polymorphism in major histocompatibility complex-linked proteasome gene (Lmp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2681-2684. (1993).
312. Marusina, K., Iyer, M. & Monaco, J. J. Allelic variation in the mouse Tap-1 and Tap-2 transporter genes. *J Immunol* **158**, 5251-5256. (1997).
313. Bell, R. B. & Ramachandran, S. The relationship of TAP1 and TAP2 dimorphisms to multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol* **59**, 201-204. (1995).
314. Hillert, J. & Olerup, O. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DO6,Dw2 haplotype. *Neurology* **43**, 163-168. (1993).
315. Franciotta, D., Dondi, E., Bergamaschi, R., Piccolo, G., d'Eril, G. V. et al. HLA complement gene polymorphisms in multiple sclerosis. A study on 80 Italian patients. *J Neurol* **242**, 64-68. (1995).
316. Roth, M. P., Dolbois, L., Borot, N., Pontarotti, P., Clanet, M. & Coppin, H. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene polymorphisms and multiple sclerosis: no evidence of disease association with MOG. *J Neuroimmunol* **61**, 117-122. (1995).
317. Roth, M. P., Dolbois, L., Borot, N., Amadou, C., Clanet, M. et al. Three highly polymorphic microsatellites at the human myelin oligodendrocyte glycoprotein locus, 100 kb telomeric to HLA-F. Characterization and relation to HLA haplotypes. *Hum Immunol* **43**, 276-282. (1995).
318. Ott, J., Bhattacharya, S., Chen, J. D., Denton, M. J., Donald, J. et al. Localizing multiple X chromosome-linked retinitis pigmentosa loci using multilocus homogeneity tests. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 701-704. (1990).

319. de la Concha, E. G., Fernandez-Arquero, M., Conejero, L., Lazaro, F., Mendoza, J. L. et al. Presence of a protective allele for achalasia on the central region of the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens* **56**, 149-153. (2000).
320. Thomson, G. HLA DR antigens and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* **36**, 1309-1317. (1984).
321. Crusius, J. B., Pena, A. S., Van Oosten, B. W., Bioque, G., Garcia, A. et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and multiple sclerosis. *Lancet* **346**, 979. (1995).
322. Semana, G., Yaouanq, J., Alizadeh, M., Clanet, M. & Edan, G. Interleukin-1 receptor antagonist gene in multiple sclerosis. *Lancet* **349**, 476. (1997).
323. Huang, W. X., He, B. & Hillert, J. An interleukin 1-receptor-antagonist gene polymorphism is not associated with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **67**, 143-144. (1996).
324. Dayer, J. M., Feige, U., Edwards, C. K., 3rd & Burger, D. Anti-interleukin-1 therapy in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* **13**, 170-176. (2001).
325. Muller-Ladner, U., Roberts, C. R., Franklin, B. N., Gay, R. E., Robbins, P. D. et al. Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J Immunol* **158**, 3492-3498. (1997).
326. Gibson, A. W., Edberg, J. C., Wu, J., Westendorp, R. G., Huizinga, T. W. & Kimberly, R. P. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **166**, 3915-3922. (2001).
327. Lassmann, H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* **4**, 93-98. (1998).