



Facultad de Medicina  
Dpto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular e  
Inmunología

**Estudio de variantes genéticas y análisis  
epigenético de *loci* asociados a Esclerosis  
Múltiple**

**Tesis Doctoral**  
**Mercedes Delgado García**

Sevilla 2014



**Estudio de variantes genéticas y análisis epigenético de *loci* asociados a Esclerosis Múltiple.**

**Mercedes Delgado García**





# **TESIS DOCTORAL**

Presentada por la licenciada Mercedes Delgado García, para optar al grado  
de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Dirigida por:

Don Miguel Lucas Lucas

Doña Fuencisla Matesanz del Barrio

Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología

Facultad de Medicina

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2014





Don Miguel Lucas Lucas, Doctor en Medicina y Cirugía, y Doña  
Fuencisla Matesanz del Barrio, Doctora en Ciencias Biológicas,

Certifican que:

Doña Mercedes Delgado García, licenciada en Biología, ha realizado el trabajo con el título “Estudio de variantes genéticas y análisis epigenético de *loci* asociados a Esclerosis Múltiple” en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Sevilla bajo nuestra dirección. Consideramos además que dicho trabajo tiene el rigor científico necesario para ser sometido a juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Sevilla para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos el presente certificado, en Sevilla, a 10  
de Julio de 2014

Fdo.: Miguel Lucas Lucas

Fuencisla Matesanz del Barrio



Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las  
estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros genes.

James Watson

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradecer el apoyo recibido por parte de mis directores de tesis, Miguel Lucas y Fuencisla Matesanz, por haber confiado en mí para realizar este proyecto y a su vez darme la oportunidad de comenzar, aprender y realizarme en el mundo de la Biología Molecular y la Genética, mundo que me apasionaba desde mis primeros contactos con la biología y que me motivaron a estudiar la licenciatura.

No me quiero olvidar de ninguno de los que durante estos 5 años han formado parte de mi día a día, ya sea en el Hospital, en el departamento de la Facultad o en mis estancias en el “López Neyra” de Granada: a Paqui, que con su infinita sabiduría he podido aprender de ella a desenvolverme en el laboratorio, a Verónica, de la que cogí el relevo aquellas vacaciones de verano de 2009 y en las que tanto aprendí, a Rufino, que su llegada al laboratorio supuso un apoyo científico e impulsó nuestro espíritu de trabajo en equipo, y a Rocío, a la que he echado de menos desde el primer día en que decidió emprender su aventura alemana, por su alegría permanente y los buenos ratos vividos. Agradecer también a todos los compañeros de Granada, y en especial a María, por la acogida afectuosa y la ayuda recibida desde el primer día. A todos los que forman parte del departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología, de la facultad de Medicina: M<sup>a</sup> Carmen Gómez, M<sup>a</sup> Carmen Naranjo, M<sup>a</sup> José, Gonzalo, María, Javier, Elizabeth, Antonio Pérez, Flori, Víctor, Carmen y Ketama y de los que estuvieron y marcharon, Rafa, Enriqueta y Marga. A todos los compañeros del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital, a su directora Concha González, a los residentes y a los que ya no lo son, como Enrique y Carmen Bermudo. Además de las compañeras de extracciones e Isabel Torres, por su ayuda en todo momento. Por último, no puedo

acabar este párrafo sin agradecer a la Asociación Neuroinvest la financiación de esta tesis, a Guillermo Izquierdo por su entusiasmo y ayuda en los proyectos, y a los componentes del Servicio de Neurología por la ayuda prestada en el flujo de selección y recolección de muestras, así como a todos los responsables de los hospitales que han colaborado en los estudios de genotipado: Hospital Virgen de las Nieves de Granada, Hospital Carlos Haya de Málaga y Hospitales San Carlos y Ramón y Cajal de Madrid.

A mis padres, mi hermano y al resto de la familia, por alegraros de mis éxitos y apoyarme en mis desvanecimientos a lo largo de la carrera de obstáculos que supone realizar una tesis doctoral.

A todos mis amigos y a mis “biologüitas” M<sup>a</sup> Carmen, Anamari, Marta y Ana, ¡qué haría yo sin vosotras!, me ha tocado ser la primera, os voy abriendo el camino.

Y a Rafa, por ser mi apoyo incondicional, y un ejemplo perfecto de sacrificio y duro trabajo para lograr los éxitos. Ahora me toca a mí verte avanzar y disfrutar de tu tesis. Es infinito lo que me das.



## ABREVIATURAS

**APC:** (del inglés “antigen-presenting cell”) célula presentadora de antígenos

**BHE:** barrera hematoencefálica

**BOC:** bandas oligoclonales

**cADN:** ADN complementario

**CDR:** regiones determinantes de complementariedad

**CIS:** (del inglés “Clinically isolated syndrome”) síndrome clínicamente aislado

**CNV:** (del inglés “copy number variation”) variación en el número de copias

**DNMT:** ADN-metiltransferasa

**dNTP:** desoxinucleótido

**ddNTP:** didesoxinucleótido

**DUB:** enzima deubiquitinasa

**EAE:** encefalitis autoinmune experimental

**EBV:** virus de Epstein-Barr

**EM:** esclerosis múltiple

**eQTLs:** (del inglés “Expression quantitative trait loci”) Variantes asociadas a expresión génica

**GFAP:** proteína gliofibrilar ácida

**GWAS:** (del inglés “Genome-wide association study”) estudios de asociación del genoma completo

**HAT:** histona acetiltransferasa

**HDAC:** histona desacetilasa

**HDACi:** inhibidor de desacetilasa de histonas

**HDM:** desmetilasa de histonas

**HHV6:** virus del herpes humano

**HLA:** antígeno leucocitario humano

**HMT:** metiltransferasa de histonas

**HW:** equilibrio Hardy-Weinberg

**Ig:** inmunoglobulina

**IGHC:** (del inglés “immunoglobulin heavy chain”) cadena pesada de la inmunoglobulina

**IL:** interleuquina

**LCL:** líneas celulares linfoblastoides

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**LD:** (del inglés “linkage disequilibrium”) desequilibrio de ligamiento

**MBD:** dominios de unión a metil-CpG

**MBP:** proteína básica de mielina

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad

**miARN:** microARN

**MLPA:** multiplex ligation-dependent probe amplification

**MMP:** metaloproteinasas de la matriz

**NaPA:** fenilacetato de sodio

**NaPB:** fenilbutirato

**OD:** odds ratio

**OPCs:** población celular progenitora de oligodendrocitos

**PAD:** peptidilarginina deiminasa

**PMA:** (del inglés 4 $\beta$ -phorbol-12 $\beta$ -myristate-13 $\alpha$ -acetate) forbol de miristato acetato

**PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PK:** proteín kinasa

**PP:** proteín fosfatasa

**PPMS:** esclerosis múltiple primaria progresiva

**PRMS:** esclerosis múltiple progresiva recurrente

**qPCR:** PCR a tiempo real o cuantitativa

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**RSS:** secuencias señales de recombinación

**RRMS:** esclerosis múltiple remitente-recidivante

**SI:** sistema inmune

**SNC:** sistema nervioso central

**SNP:** Polimorfismo de nucleótido simple

**SPMS:** esclerosis múltiple secundaria progresiva

**TdT:** enzima deoxinucleotidil transferasa terminal

**Th:** linfocitos T helper

**TTV:** Torque Teno Virus

**VPA:** ácido valproico





**ÍNDICE**

## ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>1. DEFINICIÓN Y GENERALIDADES DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....</b>	<b>21</b>
1.1. Clínica de la Esclerosis Múltiple.....	22
1.2. Síntomas de la Esclerosis Múltiple.....	25
1.3. Diagnóstico de la Esclerosis Múltiple .....	25
1.4. Tratamientos de la Esclerosis Múltiple .....	26
<b>2. COMPONENTE AMBIENTAL DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....</b>	<b>30</b>
2.1. Componente hormonal .....	31
2.2. El virus de Epstein-Barr .....	32
2.3. Otros componentes ambientales .....	33
<b>3. COMPONENTE GENÉTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE, FACTORES DE RIESGO.....</b>	<b>34</b>
3.1. El Antígeno Leucocitario Humano (HLA).....	36
3.2. Factores genéticos no-HLA.....	39
3.2.1. Los estudios de Asociación (GWAS) .....	39
<b>4. COMPONENTE EPIGENÉTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....</b>	<b>41</b>
4.1. El Nucleosoma .....	42

## ÍNDICE

4.2. Los mecanismos Epigenéticos y la Regulación Génica .....	43
4.2.1. Metilación de ADN.....	43
4.2.2. Modificación de Histonas .....	43
4.2.3. Silenciamiento por microARNs.....	46
4.3. Epigenética y Esclerosis Múltiple .....	47
5. COMPONENTE INMUNOLÓGICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	48
5.1. La Barrera Hematoencefálica (BHE) .....	49
5.2. Las células del Sistema Nervioso Central .....	51
5.3. El Sistema Inmune Innato .....	51
5.4. El Sistema Inmune Adaptativo .....	53
5.4.1. El Sistema Inmune Celular .....	53
5.4.2. El Sistema Inmune Humoral.....	54
5.4.2.1. Los Autoanticuerpos en Esclerosis Múltiple .....	55
5.4.2.2. Los Linfocitos B residentes en el Sistema Nervioso Central. Secreción de inmunoglobulinas y Bandas Oligoclonales .....	57
5.4.2.3. Las Inmunoglobulinas .....	59
5.4.2.4. El <i>Locus</i> de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas .....	62
5.4.2.5. Importancia del <i>Locus</i> de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas en Esclerosis Múltiple.....	63
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>67</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
1. SELECCIÓN DE MUESTRAS .....	75

1.1. Estudio HLA.....	75
1.2. Estudio de secuenciación del gen <i>KCNJ10</i> .....	76
1.3. Estudio de expresión génica y epigenética.....	77
1.4. Estudios de asociación de SNPs a Esclerosis Múltiple .....	77
1.4.1. SNP rs1130183 .....	77
1.4.2. SNP rs11621145 .....	78
1.5. Estudio de asociación de los Índices de Inmunoglobulina G (IgG) e Inmunoglobulina M (IgM) con el polimorfismo rs11621145 .....	79
1.6. Estudio de asociación de las bandas oligoclonales de la Inmunoglobulina M (IgM) con el polimorfismo rs11621145 .....	80
1.7. Estudio de variación del número de copias del <i>Locus</i> de la Cadena Pesada de la Inmunoglobulina G (IgG).....	80
2. EXTRACCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO.....	81
2.1. Extracción de ADN genómico .....	81
2.1.1. Método de extracción salina .....	82
2.1.2. Método de extracción automática.....	83
2.2. Extracción de ARN total y retrotranscripción de ADN complementario (cADN) ....	83
2.3. Purificación de ADN a partir de bandas de gel de agarosa .....	85
3. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO .....	86
3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	86
3.2. PCR a tiempo real (qPCR) .....	88
3.3. Secuenciación de ADN.....	90

## ÍNDICE

3.4. Genotipado para el estudio de asociaciones de SNPs a Esclerosis Múltiple.....	92
4. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS .....	93
4.1. Células mononucleares de sangre periférica .....	93
4.2. Cultivos celulares .....	94
4.3. Línea Celular JURKAT .....	96
5. MEDICIÓN DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	96
6. TÉCNICA MLPA Y DISEÑO DE SONDAS .....	97
7. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	101
8. ESTADÍSTICA .....	103
8.1. HLA.....	103
8.2. Asociación de SNPs individuales al riesgo de padecer Esclerosis Múltiple.....	104
8.3. Asociación del SNP rs11621145 a los Índices de Inmunoglobulinas.....	105
8.4. Análisis de expresión genética .....	105
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>109</b>
1. ASOCIACIÓN DEL HAPLOTIPO DE HLA <i>DRB1*1501-DQB1*0602</i> A ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	111

2. EL GEN <i>KCNJ10</i> Y LA BÚSQUEDA DE ALTERACIONES EN SU SECUENCIA .....	115
2.1. Secuenciación del gen <i>KCNJ10</i> .....	115
2.2. Análisis de asociación del SNP rs1130183 .....	118
3. EFECTOS FUNCIONALES DE LOS FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS A ESCLEROSIS MÚLTIPLE. REGULACIÓN EPIGENÉTICA .....	119
3.1. Validación de sondas para cuantificar por RT-MLPA los niveles de expresión génica.....	119
3.2. Tiempo óptimo de respuesta celular a PMA .....	120
3.3. Regulación de la expresión génica por PMA y HDACis en PBMCs.....	121
3.4. Regulación de la expresión génica por PMA y HDACis en células JURKAT .....	126
3.5. Medición de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) asociados a cambios epigenéticos.....	127
4. EFECTOS FUNCIONALES DEL SNP rs11621145 DEL <i>LOCUS</i> DE LA CADENA PESADA DE LA IgG.....	130
4.1. Selección del SNP rs1161145 y análisis de asociación a Esclerosis Múltiple.....	130
4.2. Análisis de asociación del SNP rs11621145 con el Índice de Inmunoglobulina G (I IgG) en pacientes de Esclerosis Múltiple .....	135
4.3 Análisis de asociación del SNP rs11621145 con el Índice de Inmunoglobulina M (I IgM) en pacientes de Esclerosis Múltiple .....	135
4.4. Análisis de asociación del SNP rs11621145 con las bandas oligoclonales de IgG e IgM en pacientes de Esclerosis Múltiple.....	137
4.5. Análisis de variación en el número de copias en el <i>locus</i> de la cadena pesada de la IgG por MLPA .....	138

<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>149</b>
1. ASOCIACIÓN DEL HAPLOTIPO DE HLA <i>DRB1*1501-DQB1*0602</i> COMO COMPONENTE DE MAYOR SUSCEPTIBILIDAD EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	151
2. EL GEN <i>KCNJ10</i> Y LA PRODUCCIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	155
3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A ESCLEROSIS MÚLTIPLE POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS .....	157
4. EL <i>LOCUS</i> DE LA CADENA PESADA DE LA INMUNOGLOBULINA G Y SU IMPORTANCIA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	161
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>175</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>195</b>





**RESUMEN**

## RESUMEN

## RESUMEN

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad autoinmune y neurodegenerativa de patogenia compleja, en la que en su mecanismo de susceptibilidad se barajan fenómenos multifactoriales genéticos y ambientales.

El haplotipo *DRB5\*0101-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602* del antígeno leucocitario humano (HLA) presenta la susceptibilidad genética más fuerte.

Gracias a los estudios de GWAS (Genome-Wide Association Studies), se han determinado *loci* asociados a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple fuera de la región del HLA (en su mayor parte, en estas regiones se codifican genes relacionados con el sistema inmune). No obstante, el conjunto de factores genéticos asociados hasta la fecha no explican claramente el componente hereditario de la enfermedad, es por ello que están emergiendo trabajos de investigación enfocados a otro tipo de mecanismos, como los epigenéticos.

Por otro lado, el componente inmunológico tiene un peso importante en el desarrollo de la Esclerosis Múltiple. El mecanismo de acción del sistema inmune no es sencillo, ya que convergen los componentes innato, adaptativo y las propias células inmunológicas del Sistema Nervioso Central.

Basándonos en los antecedentes de enfermedad compleja tanto en la aparición, desarrollo y respuesta a tratamientos, y en la bibliografía descrita hasta la fecha, se consideró de gran interés estudiar en profundidad ciertos aspectos genéticos e inmunológicos de la Esclerosis Múltiple.

Es por ello que el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el de estudiar las bases genéticas de los procesos inmunológicos que se dan a lo largo del desarrollo de la Esclerosis Múltiple. Para ello hemos dividido el trabajo en 4 bloques:

1. El estudio del haplotipo HLA en pacientes de Esclerosis Múltiple del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, para determinar si nuestra población de estudio concuerda con otras poblaciones estudiadas a nivel mundial. Comprobando que los genotipos referentes al sistema HLA en nuestra cohorte son muy similares a los descritos, confirmando que el haplotipo HLA *DRB1\*1501-DQB1\*0602* es el componente genético mejor asociado a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple.

2. Estudio de asociación de variantes del gen *KCNJ10* con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple, con el objeto de explorar el posible origen genético de la aparición de autoanticuerpos anti-KIR4.1 (la proteína que codifica) en la enfermedad. Este hallazgo cuenta actualmente con cierta discrepancia científica debido a que existe disparidad de resultados. Encontrando que el único polimorfismo detectado en la zona codificante del gen *KCNJ10*, rs1130183, no se asocia con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple, con lo que la aparición de autoanticuerpos no parece estar relacionado con la alteración de secuencia de la proteína.

3. Otros mecanismos asociados al desarrollo de la Esclerosis Múltiple. Es el caso del mecanismo epigenético de acetilación/desacetilación de histonas, que hemos considerado necesario estudiar por ser un componente clave en otras patologías. Para ello, hemos estudiado el efecto de dos potentes inhibidores de desacetilasas de histonas, el ácido valproico y el fenilbutirato, en la regulación de ciertos genes inmunológicos asociados a Esclerosis Múltiple en estudios previos de GWAS. Los resultados obtenidos

proponen al ácido valproico como un componente que *in vitro* activa la expresión de genes inmunológicos bajo el ambiente inflamatorio en el que se encuentran las células mononucleares de pacientes con Esclerosis Múltiple, no obstante, los mecanismos bajo los que actúa no están clarificados.

4. Análisis de variantes del *locus* donde se codifican los genes de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGHC) respecto a la presencia de bandas oligoclonales IgG, IgM y niveles de inmunoglobulinas intratecales en pacientes de Esclerosis Múltiple, con el objeto de explorar la posible implicación genética en estos importantes marcadores de la enfermedad y la progresión. Observando que la variante, rs11621145, se asocia con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple. Además, encontramos que el alelo de riesgo para la enfermedad se asocia también con un menor índice de IgG y mayor de IgM intratecal, así como, una mayor presencia de bandas oligoclonales IgM en los pacientes de Esclerosis Múltiple. Estos resultados apuntan a que esta variante está alterando el cambio de isoformas de IgM a IgG.

En este trabajo hemos explorado la implicación genética y epigenética en la patología de la Esclerosis Múltiple. Hemos corroborado el importante papel del HLA en la susceptibilidad genética a padecer la enfermedad y hemos descrito por primera vez la asociación del *locus* IGHG asociado a la enfermedad y los niveles de inmunoglobulinas.







## **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### 1. DEFINICIÓN Y GENERALIDADES DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad crónica autoinmune del Sistema Nervioso Central (SNC), caracterizada por inflamación, desmielinización y degeneración axonal (Okseberg JR, 2008). Afecta a adultos jóvenes de entre 20 y 40 años, en mayor proporción a mujeres que a hombres (3:1) (Trojano M, 2012), con una prevalencia global variable dependiendo de la región de estudio, aunque en términos generales varía de 15 a 250 enfermos por cada 100.000 individuos (Kingwell E, 2013).

La neuropatología de la Esclerosis Múltiple es un tema complejo y controvertido, donde existen inclinaciones hacia dos teorías principales. La primera y ampliamente aceptada, apunta a que la Esclerosis Múltiple se desarrolla en individuos genéticamente susceptibles, como resultado de un proceso inflamatorio autoinmune sobre las vainas de mielina, activado bajo condiciones ambientales. Proceso en el que se incluye la presencia de infiltrados de células de extirpe inmune, la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) y la activación glial. Esta hipótesis está ampliamente apoyada bibliográficamente, pero el origen de las lesiones iniciales que provocan la cascada inmune sigue sin estar aclarado (Karussis D, 2014).

La segunda teoría argumenta que se trata de una enfermedad compleja, en la cual, a lo largo de su curso, se dan procesos independientes de inflamación, desmielinización, neurodegeneración, gliosis y reparación, y que estos procesos son los responsables de la

## INTRODUCCIÓN

heterogeneidad y variabilidad que se dan en la expresión de la enfermedad y su histopatología, el pronóstico, e incluso de la respuesta al tratamiento (Fernández O, 2013).

Pese a todo, ha sido en las últimas dos décadas cuando un gran número de trabajos han facilitado y potenciado la comprensión de la naturaleza de la Esclerosis Múltiple. No obstante, debido a que el mecanismo patogénico sigue siendo incierto, a la heterogeneidad clínica y a la respuesta terapéutica impredecible, la investigación básica es necesaria para aclarar los componentes de su etiología y fisiopatología, así como del tratamiento (Gray SG, 2006).

### **1.1. Clínica de la Esclerosis Múltiple**

En términos generales, el progreso patogénico de la Esclerosis Múltiple sigue la siguiente evolución: inicio inflamatorio seguido de daños desmielinizantes leves, que en las primeras fases pueden revertir, pero debido al progreso de la enfermedad, la acumulación gradual de daño produce lesiones más extensas y, la consecuente pérdida de función (Trapp BD, 1998; Bjartmar C, 2001).

Los patrones de manifestación clínica se caracterizan por la amplia variabilidad en su curso, ya que pueden ir desde casos silenciosos hasta formas graves de desmielinización. Generalmente nos encontramos con un curso episódico, con frecuentes intervalos de exacerbaciones, seguidos de periodos de remisión, en los cuáles se produce como consecuencia un aumento progresivo de degeneración axonal y de los

cuerpos celulares nerviosos, además de una atrofia cortical, que produce disminución del volumen cerebral (Figura 1).

La Esclerosis Múltiple puede seguir diferentes patrones de evolución y rangos variables de acumulación de discapacidad. Los principales patrones encontrados los resumimos a continuación:

- Síndrome clínicamente aislado (CIS): primer brote registrado, clasificado como posible forma de inicio.
- Remitente recidivante (RRMS): brotes seguidos de remisiones parciales o totales; es el patrón más prevalente.
- Primaria progresiva (PPMS): afectación clínica progresiva sin remisiones claras.
- Secundaria progresiva (SPMS): clínica de remitente recidivante, seguido de una progresión a un curso posterior de patrón primario-progresivo.
- Progresiva recurrente (PRMS): Forma progresiva con brotes.

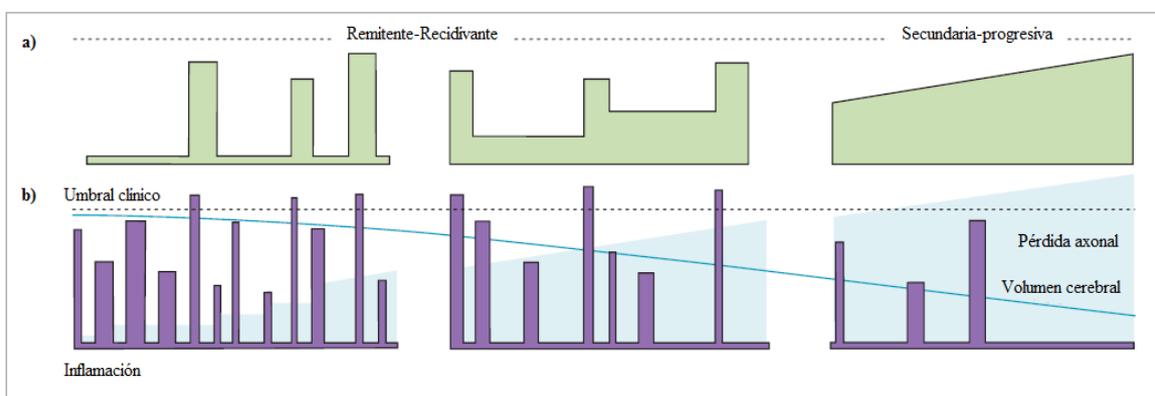
Los estudios sobre la evolución natural de la enfermedad han demostrado que, antes de ser diagnosticados de Esclerosis Múltiple, los pacientes pueden sufrir un evento neurológico denominado CIS, y que en el 80-85% de los casos, la enfermedad se inicia con los brotes del patrón RRMS. La mayoría de los que comienzan con RRMS, evolucionan a los 10-15 años con una disfunción neurológica que progresa de forma gradual, lo que constituye la SPMS.

En cambio, en el 10-20% de los pacientes, la enfermedad sigue un curso gradualmente progresivo desde el comienzo, lo que define la PPMS. Por último, en una pequeña proporción de los pacientes en los que la enfermedad es progresiva desde el inicio, pueden sobrevenir brotes, lo que constituye la forma clínica PRMS (De Andrés C, 2003).

## INTRODUCCIÓN

En el 40% de los pacientes con SPMS se siguen produciendo brotes. Estos últimos son los responsables de la acumulación de daño irreversible. Es por ello que este patrón es el que causa mayor incapacidad. Los procesos que conducen a SPMS son desconocidos, no obstante se sugiere que la transición clínica hacia la forma SPMS ocurre cuando los daños neuronales alcanzan un umbral que no puede ser compensado por la plasticidad del SNC (Farez MF, 2009).

Existen además trabajos en los que ligan la transición a SPMS a un cambio en la respuesta inflamatoria del SNC, ya que las células dendríticas de pacientes con SPMS, secretan más interleuquina 12 (IL-12) e IL-18 que en controles o pacientes con RRMS (Balashov KE, 2000; Karni A, 2002), y generalmente ocurre en ausencia de nuevas lesiones inflamatorias, lo cual abre las puertas a la idea de que otros mecanismos estén asociados en esta etapa de la Esclerosis Múltiple (Rovaris M, 2006).



**Figura 1:** *Clínica de la Esclerosis Múltiple.* a) Representación de las fases episódicas de brotes en las formas remitente-recidivante y secundaria progresiva. b) Representación de los niveles de inflamación focales y la consecuente pérdida axonal y de volumen cerebral. Los apartados a) y b) se deben observar como un conjunto, pues uno es consecuencia de otro, ya que los focos de inflamación son los responsables de los brotes episódicos, y la pérdida axonal y neurodegeneración son consecuencia de los brotes y los responsables de la sintomatología progresiva (Adaptado de Compston A, 2008).

## **1.2. Síntomas de la Esclerosis Múltiple**

Los pacientes de Esclerosis Múltiple presentan una amplia variedad de déficits neurológicos, como la pérdida de funciones motoras (debilidad, espasticidad), sensoriales (dolor radicular, parestesias) y neurocognitivas, la neuritis óptica, la ataxia y la incontinencia. No obstante, los síntomas son variables dependiendo del curso clínico, gravedad, duración y evolución del mismo (Compton A, 2008). Con el tiempo, y cuando la enfermedad está muy evolucionada, se observan otras alteraciones, como deterioro cognitivo, depresión, labilidad emocional, disartria, disfagia, vértigo, tetraparesia progresiva, disfunción sexual y espasticidad, entre otras (Noseworthy JH, 2000).

## **1.3. Diagnóstico de la Esclerosis Múltiple**

El diagnóstico de esta patología no es sencillo, debido a la heterogeneidad de la aparición y de su curso, y a que algunos síntomas son similares a otras enfermedades neurológicas. En 2001, un comité encabezado por el doctor McDonald, estableció los criterios diagnósticos de la Esclerosis Múltiple (McDonald WI, 2001), donde se desarrolló una revisión de las técnicas y metodología seguidas en los diagnósticos, para poder demostrar de manera objetiva la difusión de las lesiones en el tiempo y en el espacio. En este método se integran estudios clínicos, como la resonancia magnética para detectar las lesiones, y los estudios de potenciales evocados para medir la capacidad de respuesta del SNC a los estímulos; y los paraclínicos, como el estudio de bandas oligoclonales (BOC). Desde entonces, este criterio ha resultado muy útil para el

diagnóstico precoz de la Esclerosis Múltiple, con un alto grado de especificidad y sensibilidad. No obstante, desde entonces numerosas revisiones realizan un seguimiento de los criterios diagnósticos, adaptándolos a los nuevos avances en el conocimiento de la enfermedad. La última revisión publicada (Lublin FD, 2014) recomienda un seguimiento prospectivo, además de afirmar que se necesita más investigación para definir mejor el valor de la resonancia magnética y los biomarcadores en la evaluación, confirmación o revisión de los fenotipos de Esclerosis Múltiple.

De hecho, los estudios que identifican biomarcadores (aunque aún no están validados) podrán permitir hacer un diagnóstico más temprano de la enfermedad, establecer un mejor pronóstico e incluso monitorizar la respuesta al tratamiento.

Por definición, un biomarcador óptimo debe de ser sensible, específico, sencillo, estable en el tiempo, reproducible y que los costes de su medición sean efectivos. La medición y evaluación de los biomarcadores hacen que estos indicadores sean claves para los procesos patológicos de la Esclerosis Múltiple, o incluso de las respuestas farmacológicas (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

### **1.4. Tratamientos de la Esclerosis Múltiple**

Debido a la complejidad de la patología y a la diversidad de expresión de la sintomatología, existen diferentes tipos de tratamientos, los cuales intentan reducir las recaídas o reparar las lesiones. Los tratamientos convencionales son limitados, no obstante, han sido introducidas nuevas terapias. A continuación se exponen las diferentes vías de actuación.

Clásicamente, los pacientes con ataques agudos son tratados con glucocorticoides (Filippini G, 2000). En los casos en los que existen patrones de recaídas y remisiones, se ofrece un tipo de tratamiento con una terapia que modifique en la medida de lo posible el curso de la enfermedad. Aquí nos encontramos con los clásicos tratamientos inmunomoduladores, como pueden ser el interferón  $\beta$ , el acetato de glatiramer (Arnason, B. G., 1999; Hohlfeld, R., 1999), el natalizumab, el fingolimod y la teriflunomida. Los rangos de eficacia y seguridad son diferentes (figura 2), no obstante, todos disminuyen las recaídas y ralentizan la acumulación de las lesiones cerebrales debido a que tienen diferentes dianas biológicas que acaban inhibiendo la síntesis de la IL-17, responsable de gran parte de los procesos autoinmunes de diversas patologías, entre las que está la Esclerosis Múltiple (Harrington, LE, 2005; Amadi-Obi A, 2007).

Estos clásicos tratamientos antiinflamatorios, inmunosupresores e inmunomoduladores sólo han demostrado un efecto beneficioso en las formas clínicas con brotes y no han sido efectivos en las formas progresivas (De Andrés C, 2003; Hemmer B, 2007). Es por ello que cada vez está más cerca la idea del tratamiento personalizado, en función de las características de cada paciente y de la progresión de la enfermedad. Gracias a numerosos ensayos clínicos y a los logros en investigación, la gama de tratamientos es actualmente amplia, aunque no perfecta (Hauser SL, 2013) (figura 2).

Los inyectables de primera generación, son bastante seguros, pero moderados en eficacia. Las terapias orales son más recientes, y presentan una serie de riesgos conocidos y también las incertidumbres relacionadas con una experiencia limitada en el uso clínico. Por último, las terapias de infusión, son las más eficaces contra la enfermedad inflamatoria, pero conllevan a un mayor riesgo (Castro-Borrero W, 2012).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 2:** Representación de los tratamientos actuales en Esclerosis Múltiple en base a su seguridad y eficacia. Los nombres resaltados en negrita corresponden a medicamentos aprobados por la US Food and Drug Administration. E= emergente; círculo blanco= descatalogado; símbolo píldora= tratamiento oral; símbolo jeringa= inyectable (Adaptado de Hauser SL, 2013).

Se están produciendo además nuevos hallazgos, ya sea de tratamientos de composición oral (Ringheim GE, 2013), o de ésteres de ácido fumárico, que aumentan la transcripción de genes protectores de la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por lo tanto protegen al SNC frente a los daños oxidativos, siendo una alternativa efectiva a los clásicos inmunomoduladores inyectables (Arnold P, 2014). Otras novedades podemos encontrarlas en los tratamientos potenciadores de la remielinización. Un buen ejemplo es la Benzotropina, utilizada en Parkinson por su actividad anticolinérgica (Eshleman AJ, 1994), y que ha sido identificada como una alternativa para combatir la Esclerosis Múltiple, ya que disminuye significativamente la gravedad clínica de los síntomas de RRMS en el modelo animal de Esclerosis Múltiple, la encefalitis autoinmune experimental (EAE) (Madsen LS, 1999), y estimula la proliferación de una población celular progenitora de oligodendrocitos (OPCs), dando lugar a una mayor remielinización y a una recuperación funcional. Es por ello que estos

resultados proporcionan la primera evidencia *in vivo* que apoya la idea del beneficio combinando de inmunosupresores y los potenciadores de la remielinización (Deshmukh, 2013).

Destacar además que existen nuevas terapias en vías de investigación y ensayos clínicos, en las que podemos incluir en primer lugar las terapias con linfocitos B, que representan una nueva clase de opciones fácilmente administradas, bien toleradas y altamente eficaces (Hauser SL, 2008; Kappos L, 2011).

Por otro lado, nos encontramos con los ensayos en el uso de cannabinoides (los componentes químicos activos de la marihuana, *Cannabis sativa*) y sus receptores CB(1) y CB(2), debido a que producen una amplia gama de efectos centrales y periféricos, incluyendo funciones cognitivas e inmunológicas, con aplicaciones clínicas beneficiosas (Rom S, 2013). En la industria farmacéutica tienen la esperanza de aprovechar este potencial de los cannabinoides, sin los efectos psicotrópicos sobre el SNC y el periférico (Ruggieri MR Sr, 2011).

Señalar por último, el potencial de los ensayos clínicos con células madre. Estos estudios surgen por la necesidad de buscar una alternativa a los tratamientos con eficacia modesta y con más toxicidad de la deseable que sólo consiguen la reducción de la progresión de la enfermedad, pero no la bloquean. En un principio se pensó en la posible función remielinizante como única función de estas células pluripotentes, aunque posteriormente se ha observado que se puede mejorar la inmunidad a nivel de la sangre. Los estudios realizados apoyan el potencial del efecto terapéutico de las células mesenquimales, dada su implicación en la reparación del SNC (Fernández O, 2011), y el de las células madre hematopoyéticas, que renovarían el pool de linfocitos T y por lo tanto disminuiría la actividad inflamatoria (Muraro PA, 2005). No obstante, el riesgo

## INTRODUCCIÓN

que conlleva este tipo de técnicas actualmente es muy elevado y requiere de más estudios. De momento existen resultados prometedores en modelos animales de EAE (Chen L, 2014; Hackett C, 2014).

En resumen, la Esclerosis Múltiple es una enfermedad compleja, debido a su patogenia complicada, de causas múltiples y no dilucidadas en su conjunto (Muñoz-Culla M 2013); a que su mecanismo patogénico no está aún clarificado y; a la heterogeneidad clínica y la impredecible respuesta terapéutica (McFarland HF, 2007). Además, en sus factores de riesgo, se barajan fenómenos de combinación de elementos genéticos y ambientales (Handel AE, 2010), de tal manera que la enfermedad se desarrolle en individuos genéticamente susceptibles a un ataque autoinmune hacia las vainas de mielina, activados por factores ambientales (Sospedra M, 2005).

## **2. COMPONENTE AMBIENTAL DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Como se ha introducido anteriormente, la teoría más aceptada sobre la aparición y evolución de la Esclerosis Múltiple, apunta a la existencia de una combinación de los componentes genético y ambiental.

Los estudios en los que asocian factores ambientales son numerosos, aunque no todos aclaratorios. A continuación se exponen los factores ambientales mejor estudiados:

## 2.1. Componente hormonal

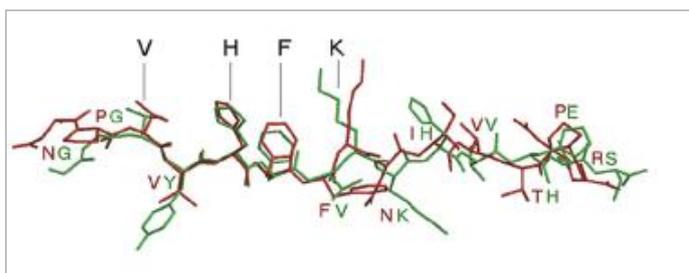
Bibliográficamente existen datos que sugieren que las hormonas sexuales podrían estar implicadas en la actividad de la enfermedad, ya que la susceptibilidad a padecerla es mayor en las mujeres, y el pico de incidencia ocurre entre los 20-40 años, durante la edad fértil. En cambio, cuando la enfermedad debuta entre los 45-50 años, que coincide con la edad de la menopausia natural, la incidencia se iguala en ambos sexos (De Andrés C, 2001; Duquette P, 2002). No obstante, no se debe confundir el fenómeno de la baja incidencia a edades más maduras con los cambios hormonales que se dan en las mujeres en la menopausia.

Por otro lado, podemos incluir que en hombres, pese a poseer un ratio más bajo de desarrollo de la enfermedad, presentan un curso más grave y desarrollan más frecuentemente la forma PPMS (Fernández O, 2011).

Entre las hormonas señaladas, citamos a los estrógenos, que parecen tener un papel dual, debido a que en la pubertad, cuando la incidencia de aparición de la Esclerosis Múltiple es más alta, los niveles de estrógenos se encuentran muy elevados; en cambio, durante el embarazo, el estriol (el estrógeno más elevado) junto con la progesterona, parecen tener un efecto protector. En concreto durante el tercer trimestre de gestación, ya que la evolución de la enfermedad es menor y los síntomas disminuyen, y este periodo coincide con el momento en el que más elevados están los niveles de estas hormonas. Además, tras el parto, los niveles hormonales vuelven a la normalidad y los brotes y síntomas reaparecen (Bove R, 2014).

## 2.2. El virus de Epstein-Barr

Diversos virus han sido asociados a la predisposición a desarrollar Esclerosis Múltiple (Borkosky SS, 2012), entre ellos, el virus del herpes humano (HHV6), o el virus de Epstein-Barr (EBV), que es el candidato a ser el factor ambiental más estudiado. En este último caso, la Esclerosis Múltiple podría deberse a un mimetismo molecular, por la similitud estructural entre un antígeno de este virus y los epítomos existentes en la proteína básica de la mielina (MBP) (Figura 3), en concreto de 4 aminoácidos localizados en el sitio de reconocimiento (valina, histidina, fenilalanina y lisina), que haría que los linfocitos que hubieran reaccionado contra el antígeno vírico reaccionaran también contra la MBP (Lang HL, 2002). De hecho, diversos estudios epidemiológicos de cohorte y meta-análisis en grandes poblaciones han demostrado un riesgo de susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple tras haber sufrido infección por el EBV (Ramagopalan SV, 2010).



**Figura 3:** Superposición de los péptidos de EBV (verde) y MBP (rojo) basados en la estructura del MHC II. Los 4 aminoácidos marcados (V= valina, H= histidina, F= fenilalanina, y K= lisina) son críticos para el reconocimiento por parte del linfocito T, y son comunes de ambas estructuras (Adaptado de Lang HL, 2002).

Señalar por otro lado, que hallazgos más recientes apuntan a los Torque Teno Virus (TTV) como posibles responsables de la etiopatogénesis de la Esclerosis Múltiple, pero la relación que se establece entre el TTV y el SNC no está clara. En un estudio de

Borkosky *et al.* en 2012, apuntan a que exista una posible interacción entre EBV y TTV a lo largo de la etiología y progresión de la Esclerosis Múltiple (Borkosky SS, 2012). Además, se sospecha que la infección en el SNC por TTV incrementa la expresión local de los mediadores inflamatorios que encontramos en el proceso patológico, ya que la carga viral en los pacientes es diferente dependiendo del fenotipo clínico de la enfermedad (Mancuso R, 2013).

### **2.3. Otros componentes ambientales**

Por un lado, se acepta la idea de que existe un factor ambiental, en función de la variable prevalencia geográfica (Compston A, 2008), existiendo mayor incidencia en la latitud norte (60-45° N) (O’Gorman C, 2013), siendo por lo tanto más prevalente en el norte de Europa, Norteamérica, sudeste de Australia y Nueva Zelanda, y menor en las zonas subtropicales.

Una explicación para el efecto de la latitud en la incidencia de la Esclerosis Múltiple es la de que la exposición al sol protege contra la enfermedad debido a que eleva los niveles corporales de vitamina D (Ascherio A, 2007). Se asocia que las personas expuestas a más vitamina D (ya sea por recibir más horas de sol o por tomarla en alimentos o complementos alimenticios) poseen una menor predisposición a padecer la enfermedad (Ramagopalan SV, 2010), ya que la vitamina D tiene efectos inmunoreguladores (Okseberg J, 2008), asociando por lo tanto, la menor radiación efectiva en los países de mayor latitud, a la prevalencia geográfica de poseer el mayor riesgo de padecer la enfermedad (Fernández O, 2011).

Por último, las observaciones más recientes apuntan a las dietas ricas en sodio, que aumentaron el potencial patogénico de los linfocitos T helper 17 (Th17) en EAE (Kleinewietfeld M, 2013; Wu C, 2013) y el empeoramiento de los síntomas de los pacientes de Esclerosis Múltiple. Demostrando por lo tanto, la relación directa entre los niveles de sal consumidos y el empeoramiento de los procesos de la enfermedad (Farez MF, 2014).

### **3. COMPONENTE GENÉTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE, FACTORES DE RIESGO**

El fenotipo de la enfermedad no se comporta según un patrón de herencia mendeliano clásico y no se atribuye a alelos de un único *locus* (Lander ES, 1994). Los riesgos de recurrencia familiar han sido clásicamente muy estudiados en Esclerosis Múltiple. Estos estudios epidemiológicos indican una agregación familiar, ya que está bien establecido que la prevalencia de la Esclerosis Múltiple en las regiones del norte de Europa o América es de aproximadamente 0,1 a 0,2%, pero para las personas con un miembro de la familia afectada, existe un aumento sustancial de riesgo relativo de padecerla, y estos se dan más o menos en proporción a la dotación genética compartida entre el pariente afectado y el individuo (Compston A, 2005). Además, también se ha observado que existen grupos étnicos aislados que son resistentes a desarrollar la enfermedad, como por ejemplo los gitanos en Hungría o las poblaciones hispanas, indias y orientales en Norteamérica (Kalman B, 1999; Okseberg JR, 2010). Pese a que los resultados de estos estudios son muy variables, en general se ha asociado un riesgo

más elevado a padecer la enfermedad en regiones del norte, atribuido a la prevalencia aumentada con la latitud (O’Gorman C, 2013), tal y como se detalló en el apartado 2.3.

Por todo esto, y aunque los factores ambientales tienen gran peso, el componente genético es, sin duda, parte de una cadena causal que conduce a desarrollar la enfermedad.

Por un lado, el antígeno leucocitario humano (HLA), es el *locus* mejor asociado con la Esclerosis Múltiple en la mayoría de la población. No obstante, el HLA por sí sólo es incapaz de explicar el componente genético de la susceptibilidad a padecer la enfermedad, debido a que la falta de un modelo homogéneo de transmisión ha impedido la plena explotación de las técnicas epidemiológicas genéticas clásicas, y por lo tanto, han sido ineficaces en la búsqueda de genes de susceptibilidad adicionales (Okseberg JR, 2008).

Por el otro, y gracias a la llegada de los estudios de GWAS (estudios de asociación de nucleótido simple, del inglés “genome-wide association studies”) (Base de Datos MSGene, <http://www.msgene.org/>) se han asociado a la Esclerosis Múltiple otros factores genéticos, los llamados SNPs (polimorfismo de nucleótido simple, del inglés “Single Nucleotide Polymorphism”). Hasta el momento, más de 100 *loci* han sido asociados por el Consorcio Internacional de Esclerosis Múltiple (IMSGC, 2013), la mayoría en genes con funciones en el Sistema Inmune (SI). No obstante, los efectos de las variantes de predisposición genética, son modestos, ya que estos estudios alcanzan a explicar sólo el 25% de la heredabilidad de la Esclerosis Múltiple, y, probablemente, la heredabilidad faltante se explique en parte por variantes raras que los análisis de GWAS no son capaces de detectar.

## INTRODUCCIÓN

Se entiende por variantes raras aquellas que se encuentran presentes en menos del 1% de la población, y los estudios de éstas por agregaciones familiares, han sido exitosos en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Kang SJ, 2006; Yu Z, 2011). Esto plantea la posibilidad de que las variantes raras formen parte de la genética del componente neurodegenerativo, y que las comunes pertenezcan a la genética del inmunológico, ya que en Esclerosis Múltiple nos encontramos con ambos procesos (Lin R, 2013).

Es por ello que la investigación actual sugiere de la existencia de las variantes raras y de que los SNPs se combinen para crear la vulnerabilidad en la Esclerosis Múltiple. Por lo tanto, los esfuerzos actuales se centran en la comprensión de cómo la gran cantidad de alelos de riesgo genéticos asociados interactúan para intervenir en el riesgo familiar, así como dentro de las poblaciones (Cree BA, 2014) y su influencia con el ambiente, ya que otros mecanismos, como los epigenéticos, pueden estar ejerciendo funciones concretas sobre la expresión génica dentro de este complejo marco de interacciones.

A continuación se desarrollan los principales hitos en el estudio del componente genético de la Esclerosis Múltiple.

### **3.1. El Antígeno Leucocitario Humano (HLA)**

El HLA es un sistema genético complejo, formado por una agrupación de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (región 6p21.3) (Uría DF, 2000), en una

región llamada Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Los genes que pertenecen a esta región son componentes clave del SI, y codifican a glicoproteínas de superficie celular muy polimórfica que determinan la especificidad del reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T. Existe un alto grado de variación genética entre individuos en la población.

En la década de los 70 comenzaron los primeros estudios en los que se asoció la región HLA a los desórdenes autoinmunes. En Esclerosis Múltiple se asoció el haplotipo de HLA *DRB5\*0101-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602* con la susceptibilidad más fuerte para padecer la enfermedad en la población norte-europea, región con un acusado desequilibrio de ligamiento (LD), al menos en la población de origen caucásico (Jersild C, 1972; Jersild C, 1975; Begovich AB, 1992; Fogdell A, 1995; Ebers GC, 1998).

La asociación de este haplotipo (que parece ser exclusiva del género femenino (Celius EG, 2000; Irizar H, 2012; Zabay-Becerril JM, 2004)) apunta a una presentación de antígeno específica en el mecanismo patogénico de la Esclerosis Múltiple. Existen evidencias de que el mecanismo implica la presentación de MBP unida a moléculas de MHC de Clase II en linfocitos T específicos. De hecho, los complejos *DRB1\*1501-MBP* (85-99) han sido demostrados en lesiones de cerebro en Esclerosis Múltiple (Krogsgaard M, 2000), aunque este hecho por sí sólo no es suficiente para explicar la asociación con la enfermedad.

Un enfoque diferente de la asociación del haplotipo lo plantea la identificación de eQTLs (variantes asociadas a expresión, del inglés “expression quantitative trait *loci*”). Consisten en estudiar de forma simultánea la variación genética mediante GWAS y los niveles de expresión de los genes que se estén examinando. Son estudios a gran escala

## INTRODUCCIÓN

en los que realizan mapeos completos de los factores genéticos que determinan los cambios en los niveles de expresión. En un estudio de eQTLs, identificaron una alta correlación de un SNP perteneciente a *DRB1\*1501* (rs3135388) con una alta expresión en los genes *DRB1*, *DRB5* y *DQB1* de la población caucásica. Estos datos sugirieron que los niveles altos de expresión de los genes *DR* y *DQ* junto con las propiedades estructurales específicas del alelo, podrían ser el efecto causal en Esclerosis Múltiple y en otras enfermedades autoinmunes (Alcina A, 2012).

El notable LD que presenta la región asociada a la población caucásica ha dificultado la determinación del principal gen HLA que confiere el riesgo (Alcina A, 2012). No obstante, diferentes haplotipos se observan en otras poblaciones (Marrosu M, 1998; Caballero A, 1999), incluso existen estudios de asociación en poblaciones afro-americanas que sugieren que el alelo *DRB1\*1501* por sí sólo determina la susceptibilidad a Esclerosis Múltiple (McElroy JP, 2010).

Haciendo alusión a la diferencia de haplotipos de HLA dependiendo de las poblaciones, y a la genética en general, es muy importante señalar, debido a la situación geográfica en la que nos encontramos, que la población de la Península Ibérica posee características genéticas peculiares. El principal motivo se debe a la estratégica posición geográfica en la que se encuentra; en el extremo suroeste del continente europeo, y en contacto marítimo con el Océano Atlántico y el mar Mediterráneo que a su vez forman parte de las inmediaciones con África. Es por ello que la Península Ibérica, y en especial Andalucía, hayan sido a lo largo de la historia una fuente constante de migración humana, con la consecuencia de que las poblaciones andaluzas actuales posean una mezcla de marcadores genéticos explicados por los movimientos históricos documentados, como el asentamiento de la civilización de los Tartessos, el ascenso y

caída del Imperio Romano y las diferentes migraciones asociadas a la expansión y decadencia del Islam en la Edad Media (Ambrosio B, 2010; Hernández CL, 2014).

### **3.2. Factores Genéticos no-HLA**

La investigación de factores genéticos fuera del HLA comenzó con la hipótesis de la búsqueda de genes candidatos para poder explicar la patología de la enfermedad.

Además de la región del HLA, se buscaron diversos genes que presentasen asociación a Esclerosis Múltiple. Los resultados no encontraron asociaciones significativas con la enfermedad, debido a que la mayoría de estos trabajos se realizaron mediante estudios de ligamiento en familias (Kalman B, 1999; Hoffjan S, 2010) y estos trabajos no presentaban el mejor enfoque debido a la falta de grandes familias y al hecho de que los factores genéticos podrían tener un efecto modesto en el fenotipo de una vía multigénica, haciéndose obvio, por lo tanto, la necesidad de diseñar otros tipos de estudios que se dirigiesen mejor a dilucidar el componente genético de la Esclerosis Múltiple. Fue entonces cuando surgieron los estudios de asociación de genómica masiva, los GWAS.

#### **3.2.1. Los Estudios de Asociación (GWAS)**

En los últimos años, ha cobrado especial importancia el desarrollo de los estudios de GWAS. En estos estudios de asociación, se escanea el genoma completo por bloques de LD sin una hipótesis establecida, es decir, se buscan *loci* asociados a la enfermedad

## INTRODUCCIÓN

sin establecer la función, de este modo, se comparan las frecuencias alélicas entre pacientes y controles, en poblaciones genéticamente homogéneas, y se determina si existe algún tipo de asociación estadísticamente significativa.

Un SNP se define como la existencia simultánea de diferentes alelos que afectan a un único nucleótido en una posición definida (*locus*) en una población de genomas. La frecuencia de los SNPs puede determinarse en cada población y puede variar en distintos grupos étnicos o geográficos.

Los estudios de asociación tienen menos poder que los estudios de ligamiento, pero mejor resolución, siendo el mejor enfoque para encontrar diferencias en una enfermedad multigénica como la Esclerosis Múltiple, en la que se espera que variantes comunes contribuyan con la susceptibilidad de la enfermedad (Muñoz-Culla, 2013).

En un principio, estos estudios eran muy discordantes debido a que, o bien se solapaban, o bien no eran coincidentes. Entre otros motivos, porque la enfermedad es muy heterogénea y tiene un amplio espectro de fenotipos, y todo esto afecta a la homogeneidad de los grupos creados para estos estudios y también porque entre los diferentes trabajos había diferencias que contribuían a la no coincidencia de resultados.

En la actualidad los estudios de asociación son más íntegros y concluyentes, gracias al desarrollo de las nuevas tecnologías, como la de los microarrays y gracias al consenso de los trabajos del IMSGC, que hasta el momento, han asociado a la enfermedad más de 100 *loci* (IMSGC, 2013).

Como se detalló anteriormente, debido a que los SNPs tampoco pueden explicar el 100% de la heredabilidad, que tampoco lo conseguía el HLA, actualmente se barajan otras teorías, como la de la existencia de asociación con variantes raras, llegando incluso a plantearse la influencia de que otro tipo de variantes genéticas (inversiones,

inserciones, deleciones, variación en el número de copias de una región cromosómica (CNV)) estén influyendo en la susceptibilidad y progresión de la enfermedad. Al mismo tiempo la existencia de las interacciones entre genes y el medioambiente, podrían modificar el riesgo genético, además de ser muy probable la presencia de fenómenos epistáticos que camuflen los efectos. Incluso la susceptibilidad de los genes podrían estar sujetos a modificaciones epigenéticas, lo que incrementaría la complejidad de la herencia de la Esclerosis Múltiple (Okseberg JR, 2013).

#### **4. COMPONENTE EPIGENÉTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

El estudio de los mecanismos epigenéticos ha ganado especial relevancia en los últimos años, ya que son los responsables de llevar a cabo cambios en el estado de la expresión de genes, y por lo tanto en el fenotipo celular, sin modificar la secuencia de ADN (Jaenisch R, 2003). Estos mecanismos están presentes tanto en los procesos celulares normales como en los anormales o en enfermedad, y pueden estar condicionados por efectos ambientales y/o por las experiencias vividas. A su vez, son esenciales en el desarrollo y diferenciación celular, y en la protección contra virus, además de parecer críticos en la integración de señales endógenas y ambientales durante la vida de una célula o un organismo (Champagne FA, 2010; Handel AE, 2010).

Datos emergentes sugieren que los mecanismos epigenéticos (metilación de ADN, modificación de histonas como acetilación, citrulinación, metilación, fosforilación o ubiquitinación, y el silenciamiento post-transcripcional asociado a microARN (miARN)) juegan un papel importante en enfermedades neurodegenerativas y en otras

## INTRODUCCIÓN

enfermedades como el cáncer, las patogénesis retrovirales y las enfermedades cardiovasculares (Minucci, S 2001; Saha RN, 2006; Haberland M, 2009).

En Esclerosis Múltiple se ha descrito que los mecanismos epigenéticos no funcionan de forma aislada, sino que podrían actuar de forma sinérgica con los factores de riesgo ambientales y con sus niveles de exposición, en una compleja red de interacciones (Véase capítulo 4.3) (Zhou Y, 2014).

### **4.1. El Nucleosoma**

El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina. Está compuesto por un octámero de histonas (un dímero de la histona H2A, otro de la H2B y un tetrámero de las histonas H3/H4) rodeado por 146 pares de bases de ADN. La regulación de la expresión génica se da a muchos niveles, uno de los cuáles ocurre debido a la variabilidad dinámica de la arquitectura del nucleosoma, y es alcanzada vía condensación/relajación del mismo (Gray SG, 2006). A continuación se exponen los mecanismos epigenéticos implicados en los procesos de regulación.

## 4.2. Los Mecanismos Epigenéticos y la Regulación Génica

### 4.2.1. Metilación de ADN

La metilación de ADN es el mecanismo epigenético más estudiado. Consiste en una reacción catalizada por las enzimas ADN-metiltransferasas (DNMTs), las cuáles añaden un grupo metilo ( $-\text{CH}_3$ ) al carbono 5 de los nucleótidos de citosina en las islas CpG. Las islas CpG son regiones con alta frecuencia de repeticiones de citosinas y guaninas, típicas de promotores (Bird A, 2002). Gracias a este sencillo mecanismo, si el ADN no está metilado, los factores de transcripción pueden unirse al ADN, resultando en una activación de la expresión génica. Por el contrario, cuando el ADN se encuentra metilado, las proteínas con dominio de unión a metil-CpG (MBD) se unen a los dinucleótidos metilados e inactivan la cromatina, es decir, la reprimen transcripcionalmente (Zhou Y, 2014). Figura 4, apartado a).

### 4.2.2. Modificación de Histonas Figura 4, apartado b).

**Acetilación de histonas:** Las histonas que favorecen la compactación del ADN son acetiladas (añadiendo un grupo acetilo  $\text{CH}_3\text{CO}^-$ ) en los residuos de lisina de sus extremos amino terminales, por las histona acetiltransferasas (HAT). Mediante estas reacciones se afecta la organización de la cromatina de manera electrostática al neutralizar la carga positiva que poseen los residuos de lisina. Esto da lugar a una

## INTRODUCCIÓN

apertura nucleosomal, y por lo tanto a una mayor accesibilidad a elementos reguladores de la transcripción génica.

Las histona desacetilasas (HDAC), son un tipo de enzimas que eliminan los grupos acetilo, en una actividad enzimática opuesta a la descrita anteriormente para las HAT, con lo que el ADN vuelve a compactarse.

Mediante este mecanismo, se regula la expresión génica a distintos niveles, por ejemplo; la desacetilación de histonas provoca la compactación de la cromatina y su consecuente represión de la transcripción génica. Además, niveles bajos de acetilación, inducen metilación del ADN y con ello el silenciamiento génico. Por el contrario, una elevada acetilación protege contra la metilación del ADN (Vaissière T, 2008). Es por ello que la acetilación de histonas está inversamente relacionada con la metilación de ADN, de manera que cuando la cromatina se encuentra en un estado hipoacetilado, se induce la metilación del ADN (y viceversa), lo que provoca represión transcripcional. Es decir, la acetilación de histonas protege de la metilación del ADN (Caiafa P, 2005; Vaissière T, 2008).

Por último, señalar que estas enzimas reguladoras (HATs y HDACs) no sólo alteran el estado de acetilación de las histonas, sino que también alteran interacciones vía proteína-proteína, jugando un papel crítico en muchos procesos celulares como la transcripción, el ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis (Gray SG, 2001).

**Metilación de histonas:** La metilación de histonas (adición de un grupo metilo  $-CH_3$ ) puede favorecer tanto la activación como la represión de la transcripción. Además de la metilación de lisinas, también está documentada la metilación de residuos de arginina, siempre asociados a activación de la transcripción, en contraste con la metilación de

lisinas, asociados tanto a activación como a represión de la expresión génica. La metilación de histonas es un proceso enzimático controlado por metiltransferasas (HMTs) y desmetilasas (HDMs) de histonas (Völkel P, 2007).

**Citrulinación de histonas:** Mediada por la familia de enzimas peptidilarginina deiminadas (PAD), las cuáles convierten los residuos metilados de arginina (R) en citrulina (Ci). Eliminan las cargas positivas de la arginina afectando a la conformación de la cromatina. Debido a que la metilación de residuos de arginina en la histona H3 se ha ligado a la transcripción activa, este mecanismo ha sido considerado como un mecanismo importante para antagonizar la transcripción y actividad de los genes (Dieker J, 2010; Zhou Y, 2014).

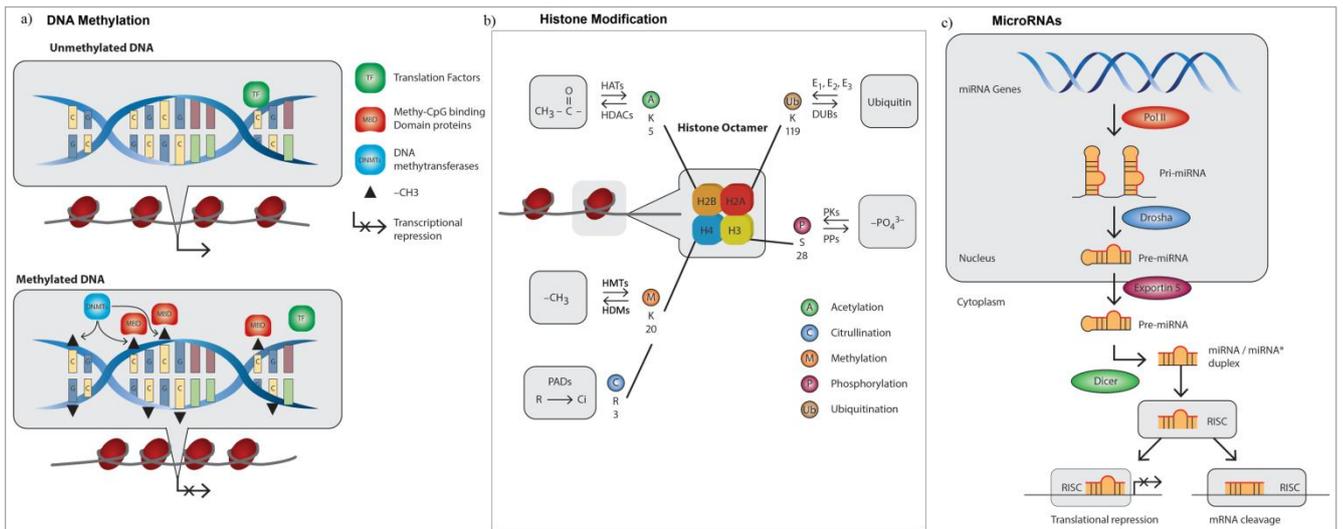
**Fosforilación de histonas:** Adición de un grupo fosfato ( $-\text{PO}_4^{3-}$ ) a los residuos aminoacídicos serina (S), treonina (T) y tirosina (Y), o eliminación en el proceso opuesto de defosforilación. Esta modificación añade una significativa carga negativa extra a la histona que, de este modo, influirá en la estructura de la cromatina. Generalmente es transitoria y regula funciones esenciales de las células. Reacciones catalizadas por la interacción entre proteín kinasas (PKs) y proteín fosfatasas (PPs) respectivamente (Dieker J, 2010; Zhou Y, 2014).

**Ubiquitinación de histonas:** Adición de un péptido de ubiquitina de 9 kDa, catalizado por tres enzimas diferentes (la activadora (E1), la conjugadora (E2) y la enzima isopéptido ligasa (E3)). La eliminación del péptido es catalizada por enzimas deubiquitinasas (DUBs) (Zhou Y, 2014).

### 4.2.3. Silenciamiento por MicroARNs

Los miARNs son pequeñas secuencias de ARN (21-23 pares de bases) codificadas a partir de ADN genómico. Una vez procesados (debido a que son codificados como largos transcritos, escindidos en el núcleo, transportados al citoplasma y procesados (por la enzima Dicer) a miARNs maduros) se unen a secuencias complementarias en la región 3'UTR del ARNm e inducen su represión transcripcional o su degradación, es decir, pertenecen a una maquinaria de regulación de la expresión génica. Para ello, forma parte de un complejo multiprotéico de silenciamiento denominado RISC (del inglés *RNA induced silencing complex*).

Los miARNs están asociados a la regulación de procesos tales como el desarrollo embriológico, la diferenciación celular, la apoptosis o la respuesta inmune. Al mismo tiempo, los miARNs han sido también asociados a la regulación de genes que modulan la metilación del ADN o la modificación de histonas, e inversamente la expresión de miARNs está regulada por la metilación del ADN y por modificaciones de histonas (Brooks WH 2010). Figura 4, apartado c).



**Figura 4:** Representación gráfica de los mecanismos epigenéticos. a) Metilación del ADN; b) Modificación de histonas; c) MicroARNs (Adaptado de Zhou Y, 2014).

### 4.3. Epigenética y Esclerosis Múltiple

La relación de la epigenética y la Esclerosis Múltiple está actualmente descrita a través de varios mecanismos.

Por un lado está descrito que los pacientes de Esclerosis Múltiple presentan un estado de hipometilación en el gen *PADI2*, que afecta a la vía de señalización de la citrulinación de la MBP, y promueve su autoescisión y formación de nuevos epítomos reconocibles por el SI (Faraco G, 2011).

También existen trabajos que describen anomalías de los niveles de miARNs en enfermos, los cuáles actúan sobre diversas vías de señalización (Keller A, 2009; Otaegui D, 2009; Cox MB, 2010).

Por último, citar que la homeostasis de la acetilación de histonas es una clave importante en la activación del SI y en la supervivencia neuronal (Faraco G, 2011).

## INTRODUCCIÓN

Diferentes inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACis) han sido asociados a la Esclerosis Múltiple debido a sus características antiinflamatorias y neuroprotectoras. Por ejemplo, el fenilacetato de sodio (NaPA) y su precursor sintético, el fenilbutirato (NaPB), reducen la neuroinflamación y el proceso de la enfermedad en EAE (Dasgupta S, 2003). El ácido valproico (VPA) también reduce la severidad y la duración de EAE debido a que el VPA podría suprimir la inflamación sistémica y local para mejorar el resultado de la EAE (Zhang Z, 2012). La tricostatina A, reduce los síntomas de la EAE, además de cambiar los niveles de expresión de genes relacionados con el proceso autoinmune (Camelo S, 2005). Y más recientemente, el Vorinostato, mejora también los síntomas de la EAE (Ge Z, 2013).

## **5. COMPONENTE INMUNOLÓGICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La existencia de una desenfrenada respuesta inmune proinflamatoria parece ser un componente fundamental en el desarrollo de la Esclerosis Múltiple, a la vez de ser la primera característica a tener en cuenta para las opciones terapéuticas.

Mientras que en el modelo animal EAE, el sistema es más simple, consistiendo principalmente en una respuesta de linfocitos T específicos de mielina, que son activados en la periferia y se infiltran en el SNC; en los humanos, la pérdida de la homeostasis inmunológica, implica a un amplio repertorio (Ho PP, 2012; Srivastava R, 2012), proporcionado por los componentes del SI innato, adaptativo y de las propias células integrantes del SNC, los cuales determinan el resultado de la enfermedad (Agrawal SM, 2007; Weiner HL, 2008).

De hecho, en la forma RRMS existe una respuesta inmune con una amplia activación de la microglía y de infiltrados celulares masivos en el SNC. Al mismo tiempo, en los pacientes que desarrollan gradualmente la fase SPMS, se desarrolla una degeneración axonal y neuronal y una extensa desmielinización cortical (Bö L, 2003; Frohman EM, 2005; Bö L, 2006).

Por lo tanto, en este proceso se produce una compleja red de reacciones inmunológicas en las que nos encontramos con una activación del componente innato del SI, una acción citotóxica en el SNC por parte de linfocitos T proinflamatorios específicos de mielina (Sercarz EE, 2000), y una respuesta inmune humoral mediante anticuerpos producidos por células plasmáticas (Burgoon MP, 2004).

### **5.1. La Barrera Hematoencefálica (BHE)**

El compartimento del SNC es un lugar inmunoprivilegiado, debido a que la BHE restringe el movimiento de mediadores solubles y leucocitos desde la periferia al SNC. La BHE es un mecanismo que tiene el SNC para proteger sus delicadas redes neuronales de las amenazas inflamatorias, y, por lo tanto posee unas características anatómicas y funcionales únicas. Nos encontramos ante una estructura compleja, compuesta por células endoteliales, astrocitos, pericitos y células mieloides, localizada entre los vasos sanguíneos y el SNC y cuya función es restringir el acceso de componentes químicos o biológicos, patógenos y células inmunes al interior del cerebro, teniendo un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Daneman R, 2009).

## INTRODUCCIÓN

Aun así, el SNC tiene lugares de vigilancia inmune, como el compartimento ventrículo-meníngeo que comprende los ventrículos y el espacio subaracnoideo rellenos de líquido cefalorraquídeo (LCR), y el plexo coroideo y meníngeo asociados, los cuáles contienen poblaciones residentes de macrófagos y células dendríticas (Ransohoff RM, 2003).

La ruptura de la BHE es una característica clave de la Esclerosis Múltiple, en la cual existe una infiltración perivascular de células inflamatorias en el SNC. No está claro si la ruptura de la BHE precede la infiltración celular o si es consecuencia de la acumulación de leucocitos perivascuales (Larochelle C, 2011). Pese a todo, este fenómeno se considera el paso inicial del proceso de la patología (Shimizu F, 2013) y en general, de las enfermedades desmielinizantes.

De hecho, la entrada de células (reguladoras de la respuesta inmune o implicadas en el proceso desmielinizante) desde la periferia al SNC es una etapa crítica. Se trata de un proceso que requiere de la adherencia y de la trans migración de estas células a través de la BHE. Es probable que las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que se expresan por los linfocitos T activados, monocitos, astrocitos y células de la microglía, puedan estar implicadas de forma directa en este proceso de la trans migración perivascular, permitiendo que las células inflamatorias accedan al SNC (Gray SG, 2006). Por último, señalar que la influencia que ejercen las células inmunes son debidas al efecto de producción de citoquinas, ROS y MMPs (Larochelle C, 2011).

## 5.2. Las células del Sistema Nervioso Central

Dentro del SNC existen poblaciones celulares de microglía y astrocitos que expresan moléculas coestimuladoras y secretan citoquinas que pueden afectar a la evolución de los procesos inflamatorios de la Esclerosis Múltiple. Durante las recaídas de la enfermedad se produce un incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD28/B7-2, CD40 Y CD40L) que activan a los linfocitos T, y durante las remisiones se produce CTLA-4, molécula que provoca la disminución de las funciones efectoras. Además, las neuronas también secretan sustancias como  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  e IL12 en periodos activos y  $\text{TGF}\beta$  durante las remisiones (Agrawal SM, 2007). Estos mecanismos descritos forman parte de la maquinaria natural de reparación de daños del SNC. El problema para este sistema surge cuando la cantidad de daño acumulado es tan elevado que el SNC no puede repararlos por sí sólo.

## 5.3. El Sistema Inmune Innato

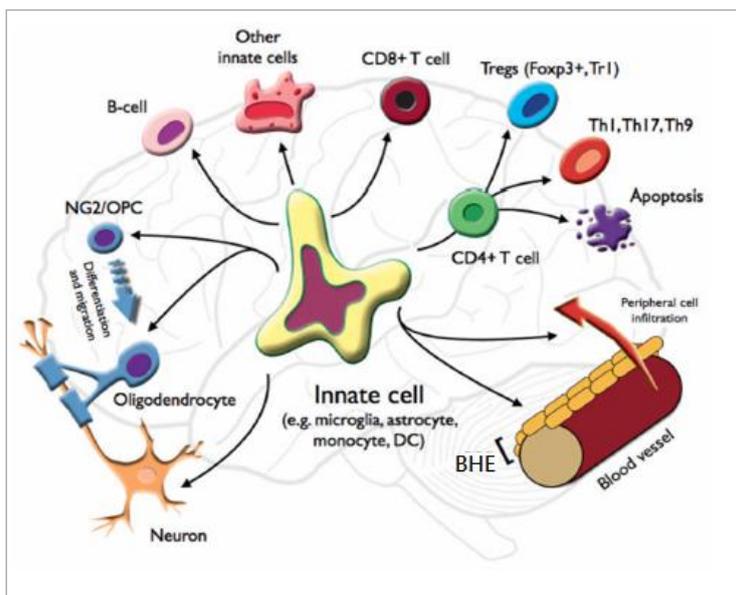
El componente innato del SI tiene un papel crucial en la iniciación y fases tempranas de las formas de Esclerosis Múltiple RRMS y PPMS.

El mecanismo bajo el cual el componente innato del SI actúa en las enfermedades desmielinizantes, lo podemos resumir del siguiente modo:

Las células del componente inmunológico innato del SNC (microglía, astrocitos, monocitos, células dendríticas...) pueden reclutar células del exterior del SNC, afectando a la integridad de la BHE. Éstas a su vez, pueden activar a linfocitos T  $\text{CD4}^+$  y los modifican en diferentes fenotipos: efectoras (linfocitos Th1, Th17 y/o Th9),

## INTRODUCCIÓN

reguladores (Foxp3<sup>+</sup>, Treg y Tr1) o induciendo apoptosis. Otra función importante que tienen estas células es la de activar y modular a linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y a linfocitos B. Por último, afectan directamente a los procesos desmielinizantes (descomponiendo la mielina, afectando con ello a la viabilidad neuronal) y de remielinización natural en las primeras fases de la enfermedad en las que los daños no son muy extensos (promoviendo la maduración de los precursores de oligodendrocitos, NG2/OPC, y su migración al sitio de la lesión, además de modular el crecimiento axonal) (Figura 5) (Mayo L, 2012).



**Figura 5:** Papel del SI Innato en la modulación de enfermedades desmielinizantes del SNC (Adaptado de Mayo L, 2012).

## 5.4. El Sistema Inmune Adaptativo

### 5.4.1. El Sistema Inmune Celular

El principal foco de la investigación tradicional ha estado centrado en los linfocitos T como mediadores clave de la inmunopatología de la Esclerosis Múltiple. Las principales evidencias más recientes que apoyan el papel fundamental de los linfocitos T en la Esclerosis Múltiple los podemos resumir en los siguientes puntos:

a) Los resultados del estudio más completo de GWAS, en el que se asociaron más de 100 variantes al riesgo de padecer Esclerosis Múltiple (IMSGC, 2011) apuntaron a que todos los SNPs asociados formaban parte de genes del SI, la mayoría de ellos asociados con las funciones de los linfocitos T, seguidos por la de los linfocitos B con función de célula presentadora de antígeno (APC) a linfocitos T.

b) La mayoría de los tratamientos actuales inmunomoduladores, inmunosupresores y esteroideos tienen sus dianas en linfocitos T.

c) La opción del trasplante de células madre hematopoyéticas, pese a contener un riesgo elevado, permite la renovación del repertorio de linfocitos T (Muraro PA, 2005), y por lo tanto es defendida como un posible tratamiento en casos en los que la evolución del paciente es muy progresiva y está muy avanzada, como una opción que eliminaría la actividad inflamatoria en el SNC.

d) Por último, la evidencia de que ha sido asociada la pérdida de quiescencia de los linfocitos T con el fenómeno de recaídas de la desmielinización inflamatoria,

entendiendo de nuevo el papel esencial de los linfocitos T en el proceso patológico de la Esclerosis Múltiple (Constantinescu CS, 2014).

En general, nos encontramos con dos tipos principales de linfocitos T:

- **Los linfocitos Th o CD4<sup>+</sup>:** dentro de los cuales existen 3 poblaciones principales con diferentes papeles en la enfermedad: Los Th1 y Th17; con actividad proinflamatoria, en los que se ha hipotetizado una colaboración entre ambas para atravesar la BHE y ejercer su acción en el SNC (Edwards LJ, 2010). Y los Th2, con una actividad dual, siendo por un lado antiinflamatoria, y por el otro activando a los linfocitos B y a la producción de anticuerpos (Frohman EM, 2005; Sanjabi S, 2009).
- **Los linfocitos T reguladores:** En circunstancias normales suprimen los fenómenos autoinmunes. Ocurre entonces que en Esclerosis Múltiple y en otras patologías autoinmunes existe deficiencia de linfocitos T reguladores (Miyara M, 2011), ya que existe una disminución de la maduración y migración desde el timo, así como de las funciones supresoras de linfocitos del tipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, e incluso en la desregulación de la secreción de citoquinas en pacientes (Zozulya AL, 2008).

### 5.4.2. El Sistema Inmune Humoral

Pese a que las hipótesis clásicas han propuesto a los linfocitos T como componentes claves de la patogénesis de la Esclerosis Múltiple, estudios histopatológicos han planteado la asociación del SI adaptativo humoral, sugerida por la acumulación en

lesiones cerebrales, meninges y LCR de linfocitos B, células plasmáticas productoras de anticuerpos y anticuerpos (Baranzini SE, 1999; Cepok S, 2005). En condiciones naturales, los linfocitos B no pueden atravesar la BHE, pero pueden hacerlo tras el proceso inflamatorio y la consecuente ruptura de la barrera, y favorecer la progresión de la Esclerosis Múltiple por diferentes vías: bien como APC a linfocitos T, promoviendo por lo tanto la coestimulación de linfocitos T auto-reactivos, o por la producción de autoanticuerpos específicos contra la mielina (Sospedra M, 2005).

#### **5.4.2.1. Los Autoanticuerpos en Esclerosis Múltiple**

Las estrategias convencionales para determinar los autoanticuerpos de los pacientes con Esclerosis Múltiple se han centrado en cribados serológicos de las inmunoglobulinas (Ig) mediante microarrays. No obstante, la identificación de los antígenos y anticuerpos que participan en este proceso no está completa, y por ello, las dianas moleculares de las respuestas humorales no se conocen bien.

Uno de los estudios más relevantes fue el realizado por Quintana *et al.*, en el cual encontraron patrones de anticuerpos vinculados a diferentes etapas de la Esclerosis Múltiple (Quintana FJ, 2008).

Más reciente es el trabajo en el que identificaron anticuerpos anti proteína KIR4.1 en un subgrupo de pacientes de Esclerosis Múltiple (46%) (Srivastava R, 2012). Posteriormente también se han identificado en niños con enfermedades desmielinizantes (57%) y con Esclerosis Múltiple o CIS (>50%) (Kraus V, 2014).

## INTRODUCCIÓN

KIR4.1 es una proteína codificada por el gen *KCNJ10* (Chr1 1q23.2), y pertenece a la familia de canales de potasio de tipo rectificador de entrada. Forma un heterodímero con otra proteína del canal de potasio KIR5.1 y juntas son responsables del transporte de potasio en las células gliales en el cerebro, concluyendo que esta proteína (pese a no tener muy claro el origen de la aparición de los anticuerpos) es clave en la respuesta de un subgrupo de pacientes de Esclerosis Múltiple (Srivastava R, 2012).

El mismo grupo ha publicado posteriormente otro trabajo, en el que, bajo los antecedentes de que la disfunción o delección del gen *KCNJ10* en humanos y ratones estaba asociada con un fenotipo de desmielinización severa, que sugería un papel esencial de estas proteínas para la función de las células gliales (Neusch C, 2001; Djukic B, 2007). Analizaron el patrón de expresión de KIR4.1 en tejido cerebral, comprobando que la proteína se encuentra expresada en oligodendrocitos y astrocitos en controles sanos y no en pacientes de Esclerosis Múltiple, interpretando estos resultados como un mecanismo en el que la expresión de KIR4.1 en las células gliales y las alteraciones de la etapa dependiente de la inmunoreactividad de KIR4.1 en las lesiones de Esclerosis Múltiple son compatibles con la respuesta inmune contra KIR4.1 (Schirmer L, 2014). No obstante estos resultados no han sido confirmados, ya que la prevalencia de los anticuerpos anti-KIR4.1 ha sido cuestionada en un par de estudios posteriores, encontrando en el primero una reactividad anti-KIR4.1 en sólo el 7,5% de los pacientes con Esclerosis Múltiple (Nerrant E, 2014), y <1% en el segundo (Brickshawana A, 2014). Las causas de aparición hasta el momento son desconocidas, no obstante, se sugiere que la aparición de estos anticuerpos podría ser simplemente un epifenómeno, en lugar de una señal de causalidad (Filippi M, 2014).

### **5.4.2.2. Los Linfocitos B residentes en el Sistema Nervioso Central.**

#### **Secreción de Inmunoglobulinas y Bandas Oligoclonales**

Existe además una población de linfocitos B residentes en el LCR en el proceso inflamatorio del SNC. En este proceso nos encontramos con la maduración por afinidad dirigida por antígenos (véase apartado 5.4.2.3.) y la diferenciación terminal de los linfocitos B, que contribuyen a la secreción clonal de IgG y a las BOC de IgG, localizados dentro de los infiltrados perivasculares y en los folículos linfoides de las meninges en el SNC (Prineas JW, 1979; Serafini B, 2004). Por lo tanto, el papel de los linfocitos B residentes en el LCR, parece ser importante en la inflamación del SNC, aunque su contribución a la evolución y progresión de la Esclerosis Múltiple está menos clara (Kuenz B, 2008).

Es por ello que el incremento de IgG en el LCR de pacientes es medido a través de su síntesis intratecal o mediante el estudio de BOC. De hecho, la detección de un perfil oligoclonal de IgG exclusivo del LCR ayuda al diagnóstico de Esclerosis Múltiple en el contexto clínico adecuado, ya que esta enfermedad está asociada a un aumento de la concentración proteica del LCR, que puede atribuirse a una permeabilidad alterada de la BHE, a la síntesis intratecal de Ig o a una combinación de ambas. Estas mediciones cuantitativas y cualitativas son un sello de calidad en el protocolo de diagnóstico de la Esclerosis Múltiple, pese a que el mecanismo por el cual se produce este incremento no está totalmente aclarado (Buck D, 2013).

Sin embargo, la elevación de la síntesis intratecal de IgG y la presencia de BOC no son exclusivas de esta patología, ya que las podemos encontrar en otras infecciones y enfermedades neurológicas inflamatorias (Owens GP, 2000; Lang B, 2003). Pese a ello,

## INTRODUCCIÓN

está documentado que aproximadamente el 90-95% de los pacientes de Esclerosis Múltiple poseen BOC positivas para IgG y de éstos, aproximadamente el 70% tienen además una síntesis intratecal elevada (Buck D, 2013), es por ello que los podemos considerar como características del origen autoinmune de las lesiones de la Esclerosis Múltiple (Disanto G, 2012).

Para la cuantificación de la producción intratecal de IgG, es de gran utilidad el índice de IgG (I. IgG) (Lefvert AK, 1985), calculado mediante la siguiente fórmula:  $I. IgG = (IgG\ LCR / IgG\ suero\ sanguíneo) / (albúmina\ LCR / albúmina\ suero\ sanguíneo)$ . Este índice es variable entre pacientes, pero permanece estable a lo largo de la evolución de la enfermedad. La misma fórmula puede ser aplicada para cuantificar la producción de las demás  $Ig_s$ .

Es interesante señalar el estudio del I. IgM y de las BOC de IgM. Las IgM son producidas por linfocitos B  $CD5^+$  y son responsables de la síntesis intratecal de IgM en los pacientes de Esclerosis Múltiple (Villar LM, 2005). La importancia de la IgM radica de que está descrito que dentro de los pacientes de Esclerosis Múltiple, el 40% posee BOC positivas para IgM (Villar LM, 2002), y estas bandas están asociadas a un peor pronóstico en las primeras etapas de la enfermedad (Villar LM, 2003).

No obstante, pese a todas las evidencias y estudios que existen, la hipótesis de la autoinmunidad tiene limitaciones. Limitaciones debidas a lagunas de conocimientos y a otros estudios que plantean la posibilidad de que la Esclerosis Múltiple resulte de un proceso neurodegenerativo primario y que la inflamación sea una consecuencia secundaria (Hauser SL, 2013).

### 5.4.2.3. Las Inmunoglobulinas

Las Ig o anticuerpos son las estructuras de reconocimiento de los linfocitos B. Están localizadas en la superficie de estas células. También las encontramos como moléculas efectoras libres, una vez han sido liberadas por los linfocitos B maduros o células plasmáticas.

Se trata de proteínas heterodiméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L), del tipo  $\kappa$  o  $\lambda$  y dos cadenas pesadas (H). Funcionalmente se separan en dos zonas: el dominio variable, con capacidad de reconocimiento de los antígenos, y el dominio constante, con especificidad de las funciones efectoras (Figura 6).

Los dominios variables se crean por medio de una compleja serie de reordenamientos de genes que, sufren hipermutaciones somáticas después de la exposición al antígeno para permitir afinar la maduración. En esta zona encontramos 3 regiones determinantes de complementariedad (CDRs), flanqueadas por regiones relativamente constantes.

En los dominios constantes se produce el cambio de clase o isotipo “switch” de Ig. Encontramos 5 isotipos diferentes: IgM, IgG (con subdivisión de subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (con subdivisión de subclases IgA1 e IgA2), IgD e IgE (Schroeder HW, 2010).

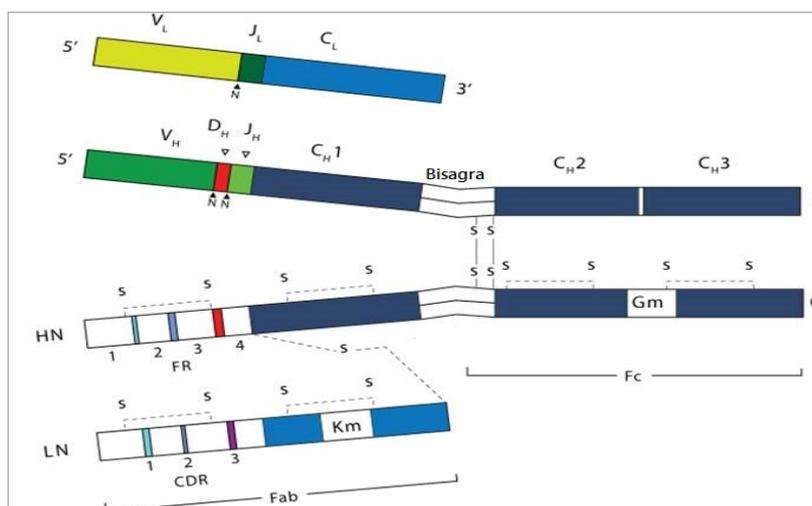
El cambio de clase de Ig se produce en los linfocitos B maduros sometidos a estimulación antigénica. Este proceso se da en condiciones de inmunización o infección y ocurre por un mecanismo de recombinación intracromosómica de las regiones “S” (regiones de 20-80 pares de bases, compuestas por repeticiones de secuencias

## INTRODUCCIÓN

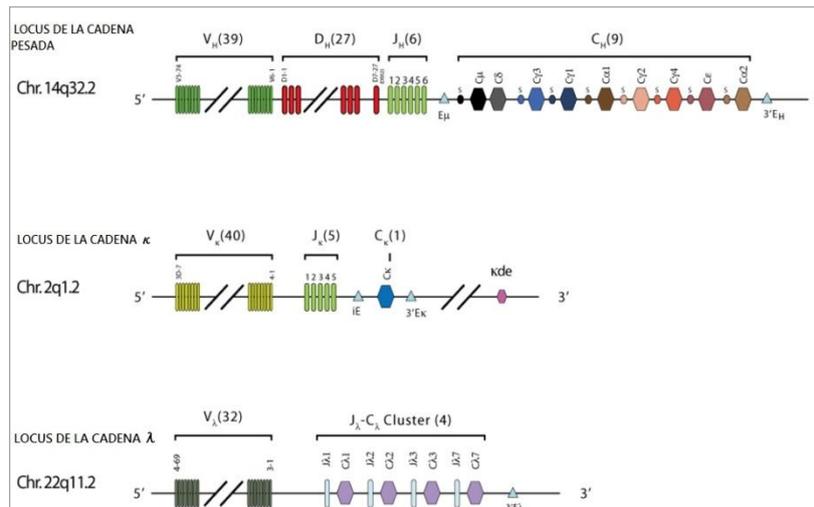
nucleotídicas, cuyo contenido es rico en guaninas y citosinas), localizadas proximalmente de cada fragmento de la región constante de la cadena pesada (Chr14q32.2) (Figuras 6 y 7).

Las cadenas pesadas y ligeras están codificadas por familias separadas de multigenes, y los dominios individuales variables y constantes son codificados por elementos independientes: los segmentos V(D)J para los dominios variables y exones individuales para dominios constantes. A su vez, las cadenas ligeras y pesadas están codificadas por diferentes *locus*: Las cadenas ligeras de subclase  $\kappa$  están codificadas por el *locus* con localización Chr22.q11.2, y las de subclase  $\lambda$  en Chr.2q1.2. Ambas contienen segmentos V, J y C.

Por otro lado, las cadenas pesadas están codificadas por los genes localizados en Chr.14q32.2, las cuáles, además de contener los segmentos citados en las cadenas ligeras, también contienen los segmentos D, responsables de la diversidad (Figura 7).



**Figura 6:** Estructura de una inmunoglobulina. H= cadena pesada; L= cadena ligera; Fab= dominio variable; Fc= dominio constante; N=extremo amino terminal; C= extremo carboxi terminal; S-S= puente disulfuro; CDR= regiones determinantes de complementariedad; Gm y Km= alotipo (marcador genético) (Adaptado de Schroeder HW, 2010).



**Figura 7:** Representación de la organización cromosómica de los loci de las diferentes cadenas de las inmunoglobulinas. Los números muestran la cantidad de genes funcionales de cada segmento (Adaptado de Schroeder HW, 2010).

Por último señalar el proceso de reordenamiento de las cadenas, el cual es la base de la generación de la diversidad combinatoria, y es llevado a cabo mediante un complejo mecanismo. En este mecanismo intervienen principalmente unas secuencias señales de recombinación (RSS) (localizadas en el extremo 3' de los segmentos V y 5' de los segmentos J, además de flanquear ambos lados de los segmentos D de las cadenas pesadas), y el complejo recombinasa V(D)J, complejo que porta diversas enzimas.

#### 5.4.2.4. El *Locus* de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas

Localizado en el cromosoma 14 (Chr.14q32.2), el *locus* de la cadena pesada de las Ig es considerado más complejo que los de las cadenas ligeras (Figura 7).

El dominio variable le confiere especificidad a la Ig. Está compuesto por aproximadamente 80 genes VH, de los cuáles, unos 40 son funcionales y están localizados próximos al telómero del brazo largo del cromosoma, 27 genes DH y 6 genes JH. Todos flanqueados por secuencias RSS.

El mecanismo general de reordenamiento consta de las siguientes etapas:

1. Los segmentos DH pueden reordenarse por inversión o delección, y cada gen puede ser traducido en cada uno de los 3 marcos de lectura. Esto da a cada segmento de genes DH el potencial de codificar 6 fragmentos de péptidos diferentes.
2. Seguidamente al proceso de reordenamiento, le sucede una etapa que crea una horquilla de ligación entre los extremos 5' y 3' del segmento de reordenación. Para resolver esta estructura, el extremo 3' sobresale, con una secuencia nucleotídica palindrómica, llamada unión P.
3. En cada proceso recombinatorio, se pierden varios nucleótidos de la secuencia original, es por eso que la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (perteneciente al complejo recombinasa V(D)J), añade numerosos nucleótidos N entre los segmentos V/D y D/J, para reemplazar o añadir a los de la secuencia de la línea germinal original. La imprecisión de este proceso de unión y la variación de la adición de nucleótidos permiten la generación de las 3 zonas CDR.

El dominio constante posee la función efectora de la Ig. Existen 4 isotipos: CH1, CH2, CH3 y CH4. Pertenecientes a las Ig G, A, D, M respectivamente. La Ig E también pertenece al isotipo CH4.

Todos ellos se diferencian porque en su composición tienen diferentes aminoácidos. Aún así, todos tienen el mismo tipo de plegamiento tridimensional con 3 ó 4 cadenas  $\beta$  unidas por puentes disulfuro. Los cambios en esta región constante pueden afectar significativamente el resultado final de la interacción antígeno-anticuerpo, además de poder también afectar la cinética de unión de antígenos a la región variable. Es por eso que influyen en el reconocimiento del antígeno.

#### **5.4.2.5. Importancia del *Locus* de la Cadena Pesada de las Inmunoglobulinas en Esclerosis Múltiple**

La consideración de la importancia del *locus* IGHC en pacientes con Esclerosis Múltiple surgió a raíz de una publicación en 2013 de Buck *et al.* (Buck D, 2013).

En este estudio, bajo la hipótesis de que factores genéticos podrían influenciar el grado de síntesis de IgG en el LCR, se realizó un estudio de GWAS en el que identificaron variantes asociadas con el I. IgG en pacientes con Esclerosis Múltiple. 5 de ellas localizadas en el *locus* IGHC y se encontraban en LD.

En esta región, 4 genes IGHG: *IGHG1*, *IGHG2*, *IGHG3* e *IGHG4* codifican para la región constante de las 4 subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 respectivamente.

## INTRODUCCIÓN

Los polimorfismos en este *locus* podrían influir en las interacciones entre IgG con el receptor neonatal Fc gamma, el cual es expresado en la BHE y pensaron por lo tanto, que podrían estar implicados en la homeostasis de IgG y en la rotura de la barrera (Schlachetzki F, 2002; Roopenian DC, 2007; Garg A, 2009).

Además, como no encontraron asociación de estos SNPs con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple, hipotetizaron que estas variantes influirían en la regulación de las respuestas de IgG independientemente de la enfermedad, concluyendo por lo tanto que el grado de síntesis intratecal de IgG en pacientes con Esclerosis Múltiple está determinado genéticamente de forma parcial, y que futuros estudios serían muy interesantes para averiguar de qué forma juegan las variantes genéticas en el curso y evolución de la Esclerosis Múltiple.





## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Partiendo de la complejidad que engloba en su conjunto a los fenómenos asociados a la Esclerosis Múltiple y tomando como base los antecedentes de los estudios de genética, epigenética e inmunología expuestos anteriormente, nuestra hipótesis general es que los componentes genéticos y epigenéticos de los procesos autoinmunes son cruciales en el desarrollo de la enfermedad.

Por ello nos planteamos las siguientes sub-hipótesis y objetivos:

1. Dado que las variantes de HLA *DRB1\*1501* y *DQB1\*0602* están en casi total LD en la población caucásica y que el haplotipo que forman se asocia a Esclerosis Múltiple en esta población, nos planteamos si en la cohorte de pacientes de Esclerosis Múltiple del Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla, dadas sus características étnicas, podríamos distinguir si alguna de las dos variantes predomina en la asociación con la enfermedad.

2. Dado que se ha descrito la aparición de autoanticuerpos contra la proteína KIR4.1 en los pacientes de Esclerosis Múltiple, nos planteamos si alguna variante génica que pudiera producir modificaciones en la proteína o en su procesamiento, pudiese estar implicada en este fenómeno. Por este motivo vamos a estudiar la secuencia del gen *KCNJ10*, que codifica la proteína KIR4.1. Por otro lado, dada la importancia de esta proteína en la enfermedad analizaremos las variantes que podamos detectar respecto a la susceptibilidad a la enfermedad.

3. Debido a que los estudios de GWAS no consiguen explicar la heredabilidad de la Esclerosis Múltiple, estudiaremos las posibles variaciones en la expresión por mecanismos epigenéticos, en una selección de genes inmunológicos asociados por GWAS, con la idea de que potencien en cierto grado el significado biológico de los genes asociados. En concreto vamos a estudiar el mecanismo de acetilación/desacetilación de histonas, ya que es un mecanismo muy estudiado y reconocido por su importancia en diversas patologías.

4. Dado que los niveles de inmunoglobulinas intratecales de los pacientes de Esclerosis Múltiple están alterados, que las BOC de IgG son marcadores de la enfermedad y las BOC de IgM son marcadores de severidad, nos planteamos si variantes en el *locus* de las inmunoglobulinas podrían tener un papel en este fenotipo asociado a la patología. Por esta razón nos planteamos estudiar la posible asociación de variantes del *locus* IGHC con susceptibilidad, niveles intratecales de inmunoglobulinas y BOC.





## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. SELECCIÓN DE MUESTRAS

En esta tesis doctoral se ha trabajado con diferentes grupos de muestras, según las exigencias de cada tipo de estudio.

El flujo de recogida de muestras fue establecido en colaboración con las Unidades de Gestión Clínica de Neurociencia de los siguientes hospitales: Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla), Hospital Carlos Haya (Málaga), Hospital Virgen de las Nieves (Granada) y Centro Regional de Transfusión Sanguínea Granada/Almería y el Hospital Clínico San Carlos y Hospital Ramón y Cajal (Madrid), donde todos los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado, bien para la extracción de ADN o bien para los estudios funcionales de ARN. Todos los consentimientos fueron regulados y aprobados por el Comité Ético de Investigación de los hospitales participantes citados. A continuación se detallan los grupos seleccionados para cada uno de ellos.

#### 1.1. Estudio de HLA

Para el estudio del haplotipo *DRB1\*1501-DQB1\*0602* como componente de susceptibilidad en Esclerosis Múltiple se seleccionó la cohorte de pacientes del Hospital

## MATERIAL Y MÉTODOS

Universitario Virgen Macarena de Sevilla. En un total de 575 pacientes y 1427 controles, todos de origen español.

En este grupo se incluyeron todos aquellos a los que se les realizó el diagnóstico de Esclerosis Múltiple, incluyendo en el grupo de pacientes a los que se diagnosticaron enfermos de Esclerosis Múltiple, y en el de controles todos los que, independientemente de ser individuos sanos o enfermos de otra patología no inflamatoria, el diagnóstico para Esclerosis Múltiple resultó ser negativo (Tabla 1).

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN A HLA	EM	CONTROL
N	575	1427
EDAD MEDIA Y RANGO (AÑOS)	43,26 (17-88)	---
% MUJERES	68,52	57,25
% SÍNDROME CLÍNICO AISLADO	6,91	---
% PRIMARIA PROGRESIVA	6,18	---
% REMITENTE RECIDIVANTE	76	---
% SECUNDARIA PROGRESIVA	10,36	---
% PROGRESIVA RECURRENTE	0,55	---

**Tabla 1:** Datos demográficos de la cohorte seleccionada para los estudios de asociación del HLA a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple. Abreviaturas: EM (Esclerosis Múltiple)

### 1.2. Estudio de secuenciación del gen *KCNJ10*

Fueron seleccionados un total de 20 pacientes con Esclerosis Múltiple clínicamente definidas (80% mujeres) procedentes de la cohorte de pacientes del Hospital Universitario Virgen Macarena.

### **1.3. Estudio de expresión génica y epigenética**

Fueron seleccionados 56 pacientes con sospecha de Esclerosis Múltiple, de estos, 21 fueron diagnosticados de Esclerosis Múltiple clínicamente definida. Finalmente, sólo se tuvieron en cuenta para los estudios de expresión génica 19 pacientes (2 de ellos fueron eliminados del estudio por problemas metodológicos con los cultivos celulares), los cuáles, aún no seguían ningún tipo de tratamiento (68,4 % mujeres, edad media 39,1 años (rango 27-57)). También se recogieron muestras de sangre de 16 controles sanos, sin historia de enfermedad inflamatoria (compuestos por personal de laboratorio y donantes anónimos).

### **1.4. Estudios de asociación de SNPs a Esclerosis Múltiple**

#### **1.4.1. SNP rs1130183**

Para el genotipado del SNP rs1130183 se utilizaron un total de 2575 muestras de ADN, siendo 1337 de pacientes de Esclerosis Múltiple y 1238 de controles sanos. Los pacientes procedían de los hospitales de Sevilla y Granada (Hospital Universitario Virgen Macarena y Hospital Virgen de las Nieves, respectivamente). Los controles procedían del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada y Almería. Los datos demográficos de la cohorte se detallan en la tabla 2.

## MATERIAL Y MÉTODOS

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN A EM	EM	CONTROL
N	1337	1238
EDAD MEDIA Y DESV ESTÁNDAR	43,21 ( $\pm$ 11,52)	40,74 ( $\pm$ 13,22)
Forma (%)		
RR	77,1	
SP	21,1	
CIS	0,7	
PP	1,1	
% MUJERES	67,76	65,4

**Tabla 2:** Datos demográficos de la cohorte seleccionada para los estudios de asociación del SNP rs1130183 a Esclerosis Múltiple. Abreviaturas: EM (Esclerosis Múltiple), RR (forma remitente-recidivante), SP (forma secundaria progresiva), CIS (síndrome clínico aislado) y PP (forma primaria progresiva).

### 1.4.2. SNP rs11621145

Para los estudios de genotipado del SNP rs11621145 se utilizaron un total de 2726 ADN de pacientes de Esclerosis Múltiple y 2133 ADN de controles sanos; procedentes de los siguientes hospitales:

Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla: 988 pacientes de Esclerosis Múltiple (67% mujeres. Edad media 42 años).

Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla; Hospital Virgen de las Nieves de Granada y Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada y Almería: 1070 controles sanos (67% mujeres. Edad media 41 años).

Hospital Carlos Haya de Málaga: 647 pacientes de Esclerosis Múltiple (67,7% de mujeres. Edad media 45 años) y 402 controles sanos (67% mujeres. Edad media 42 años).

Hospitales San Carlos y Ramón y Cajal, de Madrid: 1091 pacientes de Esclerosis Múltiple (54% de mujeres) y 661 controles sanos (66% de mujeres) (Ver tabla 3).

	SEVILLA/GRANADA		MÁLAGA		MADRID	
<b>ESTUDIO DE ASOCIACIÓN A EM</b>	<b>EM</b>	<b>CONTROL</b>	<b>EM</b>	<b>CONTROL</b>	<b>EM</b>	<b>CONTROL</b>
<b>N</b>	988	1070	647	402	1091	661
<b>EDAD MEDIA (años)</b>	42	41	45	42	45	48
<b>% MUJERES</b>	67	67	67,7	67	54	66
<b>% PRIMARIA PROGRESIVA</b>	6,3		1,4		4,2	
<b>ESTUDIO DE I.Ig</b>	<b>EM SEVILLA</b>		<b>EM MADRID</b>		<b>NO EM-NO INFLAMATORIAS</b>	
<b>N</b>	362		179		414	
<b>EDAD MEDIA (años)</b>	35		37			
<b>% MUJERES</b>	70		70			
<b>MEDIA GEOMÉTRICA I IgG (rango)</b>	0,96 (0,41-6,63)		1 (0,28-3,77)		0,48 (0,32-0,76)	
<b>MEDIA GEOMÉTRICA I IgM (rango)</b>	0,17 (0,01-5,53)		0,19 (0,02-2,86)		0,075 (0,2-0,61)	

**Tabla 3:** Datos demográficos de la cohorte seleccionada para los estudios de asociación del SNP rs11621145 a Esclerosis Múltiple y a los índices de Ig. Abreviaturas: EM (Esclerosis Múltiple)

### 1.5. Estudio de asociación de los Índices de Inmunoglobulina G (IgG) e Inmunoglobulina M (IgM) con el polimorfismo rs11621145

Para el estudio de asociación de los índices de IgG e IgM al SNP rs11621145 se utilizaron las mediciones de la cuantificación de las Igs de LCR y suero sanguíneo (procedentes del protocolo de diagnóstico rutinario de laboratorio de BOC para Esclerosis Múltiple).

La cohorte de pacientes estudiada pertenecía a los siguientes hospitales:

Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla: 362 pacientes de Esclerosis Múltiple y 414 pacientes con otras enfermedades no inflamatorias (migrañas, hidrocefalias normotensivas, Alzheimer, Parkinson, ictus cerebrales...) y Hospital Ramón y Cajal de Madrid: 179 pacientes de Esclerosis Múltiple (Tabla 3).

### **1.6. Estudio de asociación de las bandas oligoclonales de la Inmunoglobulina M (IgM) con el polimorfismo rs11621145**

Para cuantificar este parámetro, se utilizó la misma cohorte de pacientes de Esclerosis Múltiple que en el apartado 1.5., de los Hospitales Virgen Macarena de Sevilla y Ramón y Cajal de Madrid.

### **1.7. Estudio de variación del número de copias del *Locus* de la Cadena Pesada de la Inmunoglobulina G (IgG)**

Fueron seleccionados 60 ADN de pacientes de Esclerosis Múltiple clínicamente definida, procedentes del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, y 25 ADN de Líneas Celulares Linfoblastoides (LCL) (tabla 4), correspondientes a la colección de líneas celulares del proyecto 1000 Genomas obtenidos del repositorio Coriell.

NUMERO LABORATORIO	NOMBRE LCL	NÚMERO LABORATORIO	NOMBRE LCL
LCL1	NA11830	LCL19	NA12155
LCL2	NA11881	LCL20	NA12716
LCL3	NA11992	LCL21	NA12717
LCL4	NA11832	LCL22	NA12750
LCL6	NA12006	LCL23	NA12813
LCL7	NA12004	LCL24	NA12814
LCL8	NA11993	LCL25	NA12872
LCL10	NA12005	LCL26	NA12874
LCL14	NA06985	LCL27	NA06994
LCL15	NA11994	LCL28	NA11829
LCL16	NA12043	LCL29	NA12762
LCL17	NA12044	LCL30	NA12815
LCL18	NA12144		

**Tabla 4:** *Relación de las LCL utilizadas en este estudio.*

## 2. EXTRACCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

### 2.1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico fue obtenido a partir de sangre periférica de los sujetos (pacientes y controles sanos) mediante dos procedimientos diferentes; con el método salino clásico o utilizando el kit de extracción semiautomática “Maxwell<sup>®</sup> 16 Blood DNA Purification Kit” (Promega).

### 2.1.1. Método de extracción salina

A continuación se describe el protocolo general utilizado para la extracción manual de ADN mediante el método salino:

- Recoger 10 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA (anticoagulante) y añadir 2,5 ml de dextrano T500 (Pharmacosmos) en suero fisiológico al 6%. Agitar bien y dejar reposar 60 minutos.
- Recoger el sobrenadante y centrifugar 10 minutos a 1620 xg, a la temperatura de 4°C.
- Desechar el sobrenadante y dar un choque hipotónico con 5 ml de buffer de lisis de hematíes (Red Blood Cell Lysis Buffer, ROCHE) y agitar a temperatura ambiente 10 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 720 xg a la temperatura de 4°C.
- Desechar el sobrenadante y añadir 3 ml de tampón de lisis de leucocitos, 200 µl de SDS al 10% y 35 µl de proteinasa-K (20 mg/ml) (Proteinase K, recombinant PCR Grade, Roche).
- Incubar toda la noche a 37°C.
- Añadir 1 ml de NaCl 6 M y agitar con el “vortex” hasta que quede homogéneo.
- Centrifugar 30 minutos a 2200 xg a la temperatura de 4°C.
- Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 8 ml de etanol absoluto frío. Agitar suavemente girando el tubo.
- El ADN se visualiza como un precipitado blanquecino. Se recoge con un asa estéril.
- Dejar secar el material genético para que se evaporen los restos de etanol. Una vez esté completamente seco, resuspender en 500 µl de Tris-HCl-EDTA (10:1).

### **2.1.2. Método de extracción automática**

Para la extracción semiautomática “Maxwell<sup>®</sup> 16 Blood DNA Purification Kit” (Promega), se siguieron las instrucciones del fabricante, mediante el cual, añadiendo un volumen máximo de 600 µl de sangre, el equipo de extracción automática “MAXWELL 16” (Promega) se encarga de realizar todo el proceso de extracción y purificación de ADN.

Posteriormente a la extracción de ADN, fue determinada la concentración y pureza de cada muestra, mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

## **2.2. Extracción de ARN total y retrotranscripción a ADN complementario (cADN)**

El ARN total fue purificado de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por el método del TRIsure<sup>®</sup> (Bioline):

- Lisar las células con TRIsure<sup>®</sup> (1 ml por cada  $5 \times 10^6$  células) e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRIsure<sup>®</sup> y mezclar vigorosamente durante 15 segundos.
- Incubar 3 minutos a temperatura ambiente, y centrifugar 15 minutos a 12000 xg, a 4 °C.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Transferir la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo nuevo y precipitar el ARN con isopropanol (500 µl por cada ml de TRIsure<sup>®</sup> utilizado). Incubar 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 10 minutos a 12000 xg, a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 75% (con el mismo volumen que se utilizó de TRIsure<sup>®</sup>). Agitar con el “vortex” las muestras y centrifugar 5 minutos a 7500 xg a 4°C.
- Desechar el sobrenadante y dejar secar completamente.
- Resuspender con 40 µl de agua libre de ARNAsa.

La concentración de ARN obtenida se cuantifica (al igual que el ADN) en el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Seguidamente y de forma inmediata se retrotranscribe el ARNm a ADNc (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, ROCHE), mediante un procedimiento con dos etapas principales:

La primera de ellas es una incubación a 65°C durante 10 minutos del ARN (concentraciones ajustadas con agua libre de ARNAsas) con los cebadores (anchored-oligo(dt)<sub>18</sub> primers (2,5 µM) y/o random primers (60 µM)), y la segunda, que comprende la síntesis de ADNc, en la cual se añade buffer de transcriptasa inversa (1X), inhibidor de ARNasa (20U) , mezcla de dNTPs (1 mM cada dNTP) y la enzima transcriptasa inversa (10U); siguiendo los siguientes pasos de incubación: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C. Con el ADNc que obtenemos al final de la reacción, se realizará una PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) (véase apartado 3.2). El ARN sobrante se congela a -80°C (para evitar su degradación).

### 2.3. Purificación de ADN a partir de bandas de gel de agarosa

La purificación de ADN amplificado se realizó según el protocolo del kit “Agarose Gel DNA Extraction Kit” (Roche), mediante el cual, a partir de un fragmento de agarosa que contiene la banda del ADN de interés, se homogeniza y diluye la agarosa, eliminándola en diferentes etapas de centrifugación y lavados con buffers, para finalmente obtener el ADN limpio de impurezas y listo para seguir trabajando con él. El protocolo utilizado lo podemos resumir en las siguientes etapas:

- La banda de material genético amplificado se corta con un bisturí y se pesa en una balanza de precisión.
- Añadir 300 µl de Buffer de solubilización de agarosa por cada 100 mg de agarosa que tengamos.
- Añadir 10 µl de “Silica” y homogeneizar bien.
- Incubar 10 minutos a 60°C, agitando con el “vortex” cada 3 minutos.
- Centrifugar a máxima potencia 30 segundos y descartar el sobrenadante.
- Añadir 500 µl de Buffer “Nucleic Acid Binding” y homogeneizar agitando con el “vortex”.
- Centrifugar a máxima potencia 30 segundos y descartar el sobrenadante.
- Añadir de nuevo 500 µl de Buffer “Nucleic Acid Binding” y homogeneizar agitando con el “vortex”.
- Centrifugar a máxima potencia 30 segundos y descartar el sobrenadante.
- Secar el pellet completamente.
- Resuspender en 50 µl de buffer de elución e incubar 10 minutos agitando.
- Centrifugar a máxima potencia 30 segundos y pasar el sobrenadante (correspondiente al material genético purificado) a un tubo nuevo.

### **3. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO**

#### **3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en los termocicladores AB Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), Mastercycler personal (Eppendorf) y MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad).

Los programas de PCR utilizados tenían las siguientes etapas: desnaturalización de 94°C durante 5 minutos; de 35 a 40 ciclos con las etapas de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación entre 55-70°C durante 30 segundos y una extensión de 72°C durante 30 segundos. Para finalizar la PCR, se hace una extensión final de 72°C durante 10 minutos. El volumen de reacción fue de 10-50 µl, con una concentración de ADN molde igual a 1 ng/µl, 0,25 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxinucleótido (dNTP) (Promega), buffer de PCR (con 15 mM de MgCl<sub>2</sub>) 10X a concentración final de 1X (Applied Biosystems) y 0,025 U/µl de Taq Polimerasa AmpliTaq® (Applied Biosystems).

El resultado de cada amplificación se analiza y comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarose D-1 Low EEO, Laboratorios Conda) al 1,5% en buffer 1X TBE (0,89 M Tris Borate pH 8,3 + 20 mM Na<sub>2</sub> EDTA, Laboratorios Conda). Utilizando el marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Maker XIV, 100 base pair ladder (Roche).

En el caso de que estos productos de PCR tengan que ser secuenciados, se cortan con un bisturí las bandas del gel de agarosa y se procede a la purificación tal y como se

detalla en el apartado 2.3. de esta sección. Todos los cebadores utilizados se diseñaron con el software online “Primer3” y se encargaron a IDT (Integrated DNA technologies). Las secuencias de todos ellos se muestran en la tabla 5. Los cebadores HPRT1, IL2RA, IL7RA, CD6, TNFRSF1A, UBAC2, PTGER4 y ROR $\gamma$  fueron utilizados en la puesta a punto de las amplificaciones de los genes de los que estudiamos la expresión génica en base a mecanismos epigenéticos (ver apartado 3.2). Con los cebadores KC1, KC2A, KC2B y KC2C se pusieron a punto las PCR de secuenciación del gen *KCNJ10*, y con los cebadores 602, 1501 y CHLA se pusieron a punto y se realizaron las PCR de tipado de HLA.

CEBADOR		SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO AMPLIFICACIÓN (PB)
<b>HPRT1</b>	F	AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G	101
	R	GAC TTT GCT TTC CTT GGT CAG G	
<b>IL2RA</b>	F	CAT TTT GCA GAC GCT CTC AG	154
	R	GAG CCT TCC AGG TCA CTG C	
<b>IL7RA</b>	F	CTC CAA GCC TCT GCT TCT CA	177
	R	TGG AAC ATC TTT GTA AGA AAC CAA	
<b>CD6</b>	F	GGA GGC ATG CAA CTC TTC A	163
	R	CTC GGA CTC AGA CTA TGA GCA	
<b>TNFRSF1A</b>	F	CGT GCA CTC CAG GCT TTT	207
	R	GTG TGT GGC TGC AGG AAG AA	
<b>UBAC2</b>	F	TGG GTT CAA GTG TCC AAG AA	157
	R	GGA CTG CAG CTT TTC ACC TC	
<b>PTGER4</b>	F	GAT GGC CTG CAA ATC TGG	134
	R	TCA TCT TAC TCA TTG CCA CCT C	
<b>ROR<math>\gamma</math></b>	F	AGG GCT CCA AGA GAA AAG GA	153
	R	CTT TCC ACA TGC TGG CTA CA	
<b>KC1</b>	F	CCC CTC CTC CAT TCA CAC AAA GT	298
	R	GGC AGA ACT CCT TCA TCA GG	
<b>KC2A</b>	F	ACA AGA ACA CAT AAG CGA CA	503
	R	ATG GTG GTT TGG GAT TCA AG	
<b>KC2B</b>	F	CAC TCA CTG GAG CCT TCC TC	500
	R	CAC CAG CTC AAA GTC ACC CT	
<b>KC2C</b>	F	TTC AGA CCC ACC AAA CCA AG	548
	R	TAC CAG GGC ATT GGA AGA GA	
<b>602</b>	F	CGT GCG TCT TGT GAC CAG AT	121
	R	GCT GTT CCA GTA CTC GGC AT	
<b>1501</b>	F	TCC TGT GGC AGC CTA AGA G	197
	R	CCG CGC CTG CTC CAG GAT	
<b>CHLA</b>	F	TGC CAA GTG GAG CAC CCA A	779
	R	GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT	

**Tabla 5:** Listado de los cebadores utilizados en esta tesis doctoral. Todos fueron diseñados con el software online “Primer3” y comprados en IDT Integrated DNA technologies.

### 3.2. PCR a tiempo real (qPCR)

Mediante qPCR se cuantifica la expresión de los genes *IL2RA*, *IL7RA*, *CD6*, *TNFRSF1A*, *UBAC2*, *PTGER4* Y *ROR $\gamma$*  (los criterios de selección de estos genes se

encuentran detallados en el apartado 4.2.). Las secuencias de los cebadores se muestran en la tabla 5. La amplificación del ADNc se realiza usando el kit SYBR Premix Ex Taq (TAKARA). Las qPCR fueron realizadas en el termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System bajo el siguiente protocolo: 40 ciclos con las etapas de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 58°C durante 30 segundos y una extensión de 72°C durante 30 segundos.

Debido a que el marcador fluorescente SYBR<sup>®</sup> Green es un agente intercalante de doble hebra de ADN y su principal limitación es que al unirse al total de ácidos nucleicos de la reacción, pueden emitir señales luminosas tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son (primer-dimers), fue necesario identificar los productos específicos a través del análisis de la temperatura de fusión (Ririe KM, 1997), añadiendo la curva de disociación al programa de amplificación.

El volumen de reacción fue de 20 µl, con 2 µl de ADNc con concentraciones entre 2 y 5 ng/µl (dependiendo de la calidad de la purificación de ARN), 10 µl de SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2X), 0,4 µl de cada cebador (10 µM), 0,4 µl ROX<sup>™</sup> Reference Dye (50X) y 6,8 µl de H<sub>2</sub>O destilada.

Los niveles de expresión se normalizaron respecto al gen constitutivo *HPRT1* (NM\_000194) (Vandesompele J, 2002), y fueron calculados por el método Pfaffl (Pfaffl MW, 2001).

$$Ratio = \frac{(E_{gen\ de\ interés})^{\Delta Ct(control-muestra)}}{(E_{gen\ constitutivo})^{\Delta Ct(control-muestra)}}$$

Donde “CT” es el ciclo al que empieza a cuantificarse la amplificación y “E” es la eficiencia de la amplificación de cada gen. Las eficiencias de cada par de cebadores fueron calculadas usando diluciones seriadas de una concentración conocida de ADNc,

mediante una posterior representación de CT versus el logaritmo en base 10 de la concentración de partida. Seguidamente fue realizada la recta de regresión y su consecuente ecuación. Finalmente, la eficiencia fue obtenida a partir de la siguiente ecuación: Eficiencia de PCR =  $10^{(-1/\text{pendiente de la recta})} - 1$ ).

En la tabla 6 se muestran las ecuaciones de la recta de cada gen y el valor de las respectivas eficiencias.

CEBADOR	EC. RECTA	R <sup>2</sup>	EFICIENCIA
HPRT1	$y = -2,3621x + 30,031$	R <sup>2</sup> = 0,9989	1,65
IL2RA	$y = -2,8684x + 32,109$	R <sup>2</sup> = 0,9766	1,23
IL7RA	$y = -2,9286x + 23,684$	R <sup>2</sup> = 0,9811	1,20
CD6	$y = -3,0779x + 27,981$	R <sup>2</sup> = 0,9802	1,11
TNFRFS1A	$y = -2,7676x + 25,127$	R <sup>2</sup> = 0,9801	1,30
UBAC2	$y = -3,5784x + 25,795$	R <sup>2</sup> = 0,9950	0,90
PTGER4	$y = -3,1067x + 28,323$	R <sup>2</sup> = 0,9600	1,10
ROR $\gamma$	$y = -2,6496x + 32,852$	R <sup>2</sup> = 0,9568	1,38

**Tabla 6:** Ecuaciones de la recta de los genes cuantificados y sus correspondientes eficiencias.

### 3.3. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN fue llevada a cabo según el método descrito de secuenciación enzimática por Sanger (Sanger F, 1977), mediante el cual, a través de una hebra de ADN monocatenaria (previa desnaturalización), se sintetizan nuevas cadenas complementarias en un proceso similar a una PCR convencional, con la salvedad de que además de los cuatro dNTPs, se incluyen 4 didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorocromos diferentes. Estos ddNTPs difieren de los dNTPs normales en que les falta el grupo hidroxilo en el extremo 3'. Esta falta de grupo hidroxilo impide la formación del enlace fosfodiéster, es decir, la elongación de la cadena que se sintetiza. En el

proceso de la amplificación se añaden los ddNTPs al azar, dando como resultado fragmentos de todos los tamaños posibles dentro de la secuencia diana, marcados con un fluorocromo específico de cada base (A, T, C o G), fragmentos que serán visualizados por electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El programa de PCR de secuenciación siguió el siguiente protocolo: en un volumen de reacción total de 10  $\mu$ l, añadir 5  $\mu$ l de ADN purificado, 1  $\mu$ l de cebador (forward o reverse, dependiendo de la cadena que nos interese secuenciar) y 4  $\mu$ l de mezcla 1:1 de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 y BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5X Sequencing Buffer (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems). La reacción de PCR fue realizada en los termocicladores AB Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), Mastercycler personal (Eppendorf) y MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad), bajo las siguientes etapas: 96°C durante 60 segundos y 25 ciclos con las etapas de desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, hibridación a 50°C durante 5 segundos y una extensión de 60°C durante 75 segundos.

Acabada la amplificación, fue necesaria la purificación del producto obtenido, añadiendo a los 10  $\mu$ l iniciales de producto de PCR, 10  $\mu$ l de resina (XTerminator™ Solution) y 45  $\mu$ l de SAM™ Solution (BigDye® XTerminator™ Purification Kit, Applied Biosystems) y agitando la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez finalizado el tiempo de agitación, se centrifugan los tubos a 1000 xg durante 3 minutos.

Finalmente se visualizó la secuencia de nucleótidos en forma de electroferograma, mediante electroforesis capilar.

### **3.4. Genotipado para el estudio de asociaciones de SNPs a Esclerosis Múltiple**

El genotipado de los SNPs se realizó mediante la tecnología TaqMan (Applied Biosystems, CA, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante, con un termociclador ABI 7900HT (Applied Biosystems, CA, USA), y la siguiente mezcla de reacción en un volumen total de 5,2 µl por pocillo, en placas de 384 pocillos: 1 µl de ADN (10 ng), 0,06 µl de sonda TaqMan, 1,98 µl de mezcla de reacción y 2,16 µl de H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q.

Las sondas TaqMan tienen el fluoróforo en el extremo 3', y una molécula "quencher" en el 5', cuya función es bloquear al fluoróforo. En el transcurso de la PCR, la sonda hibrida con el amplicón sin emitir fluorescencia. Cuando la polimerasa llega al lugar donde se encuentra la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3' y escinde el "quencher" del fluoróforo, obteniendo como resultado la emisión de fluorescencia (relacionada con la cantidad de producto de PCR).

En el desarrollo de esta técnica, se utilizan dos sondas TaqMan marcadas con fluoróforos diferentes (Vic y Fam).

Cada sonda hibrida con una variante del SNP que se esté estudiando. Una vez finalizado el proceso de amplificación, la fluorescencia emitida por ambas sondas es analizada con el software específico del termociclador.

## 4. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS

### 4.1. Células mononucleares de sangre periférica

Los PBMCs son purificados a partir de muestras de sangre en EDTA por gradiente de densidad con Lymphoprep<sup>®</sup>:

- Diluir la sangre a 1:1 con suero fisiológico frío.
- Añadir en tubos Falcon (capacidad 15 ml) 1,5 ml de Lymphoprep atemperado con  $1077 \pm 0.001$  g/ml de densidad. Seguidamente inclinar el tubo unos  $45^\circ$  y dejar resbalar despacio la sangre diluida, por las paredes del mismo, con cuidado de no mezclar las interfases.
- Centrifugar a 400 xg (con freno) durante 30 minutos, a temperatura ambiente.
- Recolectar el halo blanquecino de PBMCs y lavar añadiendo 5 ml de suero fisiológico.
- Centrifugar a 300 xg durante 10 minutos.
- Es importante señalar que si quedan hematíes, pueden ser eliminados añadiendo buffer de lisis de hematíes (Red Blood Cell Lysis Buffer, ROCHE).
- Además, si existe exceso de plaquetas en la muestra, se eliminan centrifugando un par de veces a 200 xg, de esta manera los PBMCs sedimentarán y las plaquetas formarán parte del sobrenadante.

#### 4.2. Cultivos celulares

Una vez son purificados los PBMCs, se cultivan a una densidad de  $10^6$  células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza), 5 mM de L-glutamina y los antibióticos Penicilina y Estreptomina al 1% (en proporción 1:1) (Gibco, Invitrogen. Carlsbad, CA). Los cultivos se mantienen en una incubadora a 37°C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas (tiempo seleccionado como el óptimo al que los PBMCs están más activados).

El control de activación de los cultivos se realiza con PMA 80 nM (4 $\beta$ -phorbol-12 $\beta$ -myristate-13 $\alpha$ -acetate; produce la activación de la proteína kinasa C). (Sigma-Aldrich®) (López-González MA, 1998). Y los HDACi añadidos son el VPA 2 mM (Sigma) y el NaPB 2 mM (MERCK).

Previamente, es necesaria la puesta a punto del tiempo idóneo para la obtención de la respuesta celular óptima. Para ello, se cultivan PBMCs de controles sanos, estimulados con PMA (80 nM), en un rango de tiempo de 0 a 22 horas. Estos experimentos son realizados en 3 preparaciones independientes. La viabilidad celular es comprobada, contándolas al microscopio, teñidas con Azul Tripán (LONZA).

La selección de los HDACis se basó en las evidencias registradas en la bibliografía sobre los efectos neuroprotectores en EAE y porque su interés está creciendo mundialmente por sus características (Iannitti T, 2011): Como HDACi, el NaPB está siendo testado en enfermedades neuronales (por ejemplo atrofia muscular espinal) (Andreassi C, 2004) y en ensayos clínicos en el tratamiento del cáncer (Bhalla K, 2004; Phuphanich S, 2005; Mims A, 2013). Además, es esencial en desórdenes del ciclo de la urea y en la hiperamonemia (Brusilow SW, 1991), debido a que actúa como un

sumidero de amonio en la ruta metabólica en la cual en NaPB es oxidado a fenilacetato por beta-oxidación (Spira AI, 2003).

El otro HDACi seleccionado, el VPA es un ácido graso de cadena corta y ramificada, un compuesto establecido para el tratamiento de la epilepsia y el síndrome bipolar (Gurvich N, 2002), debido a que inhibe canales de iones y canales de GABA. Además, el VPA presenta efectos beneficiosos en depresiones clínicas (Calabrese JR, 1989) y en migrañas, entre otras enfermedades. Como HDACi, el VPA podría influenciar muchas rutas en el ciclo celular y, por esta razón, el VPA tiene mucho interés para su uso en las terapias contra el cáncer (Cincarová L, 2013; Feng D, 2013).

Para estos estudios de expresión génica fueron seleccionados un grupo de 6 genes asociados a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple por estudios de GWAS: el gen de la subunidad  $\alpha$  del receptor de la IL2 (*IL2RA*) (NM\_000417), el de la subunidad  $\alpha$  del receptor de la IL7 (*IL7RA*) (NM\_002185), el de la molécula coestimuladora CD6 (*CD6*) (NM\_006725), el gen del receptor del factor de necrosis tumoral 1A (*TNFRSF1A*) (NM\_001065) (IMSGC, 2011), el del receptor 4 de la prostaglandina E (*PTGER4*) (NM\_000958) (Matesanz F, 2012) y el gen del dominio 2 de UBA (*UBAC2*) (NM\_001144072) (IMSGC, 2013). Incluimos además en el estudio el gen del factor de transcripción de los linfocitos Th17 (*ROR $\gamma$* ) (NM\_005060), que, pese a no estar asociado a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple, juega un importante papel en las enfermedades autoinmunes por la activación de los linfocitos Th17 (Maddur MS, 2012).

La expresión génica fue cuantificada purificando el ARN total y realizando la retrotranscripción del ARNm a ADNc, para finalmente cuantificar la expresión génica por qPCR.

#### **4.3. Línea Celular JURKAT**

La línea celular JURKAT, se obtuvo de LGC/ATCC. Esta línea de linfocitos T fue utilizada como control de activación celular en controles sanos. Se hicieron un total de 10 cultivos, bajo las mismas condiciones descritas en los PBMCs.

### **5. MEDICIÓN DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

La medición de ROS fue monitorizada con un luminómetro (Berthold LB 9500C). Estos son producidos por la oxidación quimioluminiscente del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione) tras la activación celular por PMA. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

Incubar PBMCs a una densidad de 50000 células/500 µl PBS, añadir luminol (10 µM) y medir en el luminómetro el valor basal (unidades en cuentas por segundos (cps)). Una vez están las células estabilizadas, inyectar los siguientes compuestos con microjeringas, a través de una ranura hermética para la luz: PMA (0,1 µM) y/o VPA (gradiente de concentración de 0,1- 3 mM). Todo el proceso es realizado a 37 °C y el tiempo de incubación con los reactivos es ajustado a cada condición de ensayo.

Esta técnica fue complementaria para ensayar y comprobar el potencial de los HDACis como posibles modificadores de la producción de ROS en la activación celular, así como la respuesta conocida del PMA como control de integridad funcional.

## 6. TÉCNICA MLPA Y DISEÑO DE SONDAS

MLPA (Multiplex Ligation-dependent probe Amplification) es una técnica comercializada por MRC-Holland<sup>®</sup> que permite amplificar simultáneamente y en un mismo tubo multitud de genes (hasta 50 diferentes). Los kits comercializados son utilizados en investigación y en diagnóstico de enfermedades genéticas, porque son muy útiles para detectar CNV, para determinar el estado de metilación, detectar mutaciones puntuales conocidas, o para la cuantificación de la expresión génica (RT-MLPA).

La técnica cuenta con una base sencilla mediante la cual un conjunto de pares de sondas adyacentes (todas con longitudes diferentes) hibridan con el ADN (a 60°C), y tienen extremos comunes, complementarios a una única secuencia de cebadores, permitiendo así, después de una ligación de los dos fragmentos (a 54°C), la amplificación de todas ellas en una PCR convencional (temperatura de alineamiento 60°C). Finalmente, los productos de PCR son fácilmente detectables mediante electroforesis capilar en el secuenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) (Figura 8).

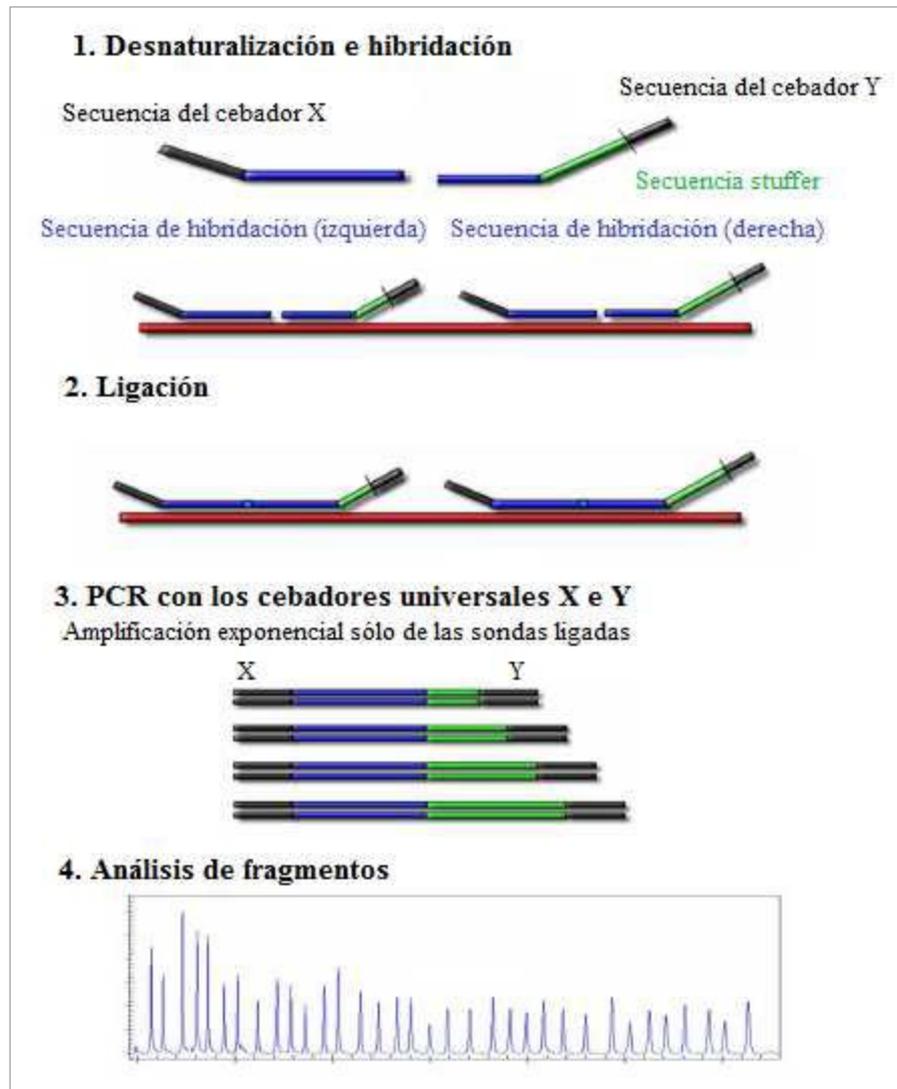
En esta tesis, se han diseñado sondas que hibridan con regiones del *locus* IGHC de regiones que no están contempladas en kits comerciales. El diseño se ha llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante y se han introducido con éxito en un kit de sondas de referencia (SALSA MLPA probemix P300-A2 Human DNA Reference-2).

Las características principales a tener en cuenta para el diseño de las sondas son:

- Búsqueda de la región de interés, preferiblemente en zona exónica, sin que posea ningún tipo de homología con otras secuencias humanas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- El porcentaje de GC debe estar en torno al 50% (sobre todo en la parte izquierda de la sonda).
- Que la región elegida no tenga SNPs, para evitar la hibridación parcial de la sonda con el material genético.
- Que no exista solapamiento de secuencias entre las diferentes sondas que se incluyan en el ensayo.
- La longitud de las sondas debe ser exclusiva, siendo obligatorio que posean como mínimo 4 nucleótidos de diferencia entre las diferentes sondas. La longitud de las regiones que hibridan, deben ser al menos de 21 nucleótidos cada una.
- Se puede utilizar una secuencia llamada “stuffer” para dar el tamaño deseado a la sonda. Esta secuencia no tiene homología con el genoma humano, pertenece al fago T7 (Dunn JJ, 1983).
- La temperatura de alineamiento de las sondas tiene que tener una temperatura mínima absoluta de 68°C.
- Si no se usa secuencia stuffer, la secuencia adyacente a la región del cebador en la parte izquierda debe comenzar por el nucleótido adenina (A).
- La energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de cada región de la sonda debe ser preferiblemente  $>0$ . (para evitar que la secuencia hibride con ella misma y forme estructuras secundarias)



**Figura 8:** Resumen gráfico del fundamento de la técnica de MLPA: las secuencias de hibridación derechas e izquierdas se unen a la secuencia complementaria de ADN. Ambas sondas se unirán por una ADN-ligasa y se amplificarán en una PCR múltiple con unos cebadores universales. Los resultados se visualizan en forma de picos mediante electroforesis capilar (Adaptado de MRC-Holland).

En una etapa anterior al diseño de las sondas para el *locus* IGHC, se diseñaron sondas para medir la regulación por mecanismos epigenéticos de la expresión de los genes asociados a Esclerosis Múltiple. Este proceso de diseño difirió en el anterior en que RT-MLPA es una variante mediante la cual, a partir de ARN, se retrotranscriben específicamente los genes de interés. Al ADNc obtenido se le añaden las sondas que

## MATERIAL Y MÉTODOS

hibridan con los fragmentos génicos para los cuales están diseñadas. El proceso que continúa es común al ensayo convencional de MLPA.

El desarrollo de esta técnica de RT-MLPA se planteó como una alternativa a la cuantificación por qPCR, ya que en una sola reacción de PCR podríamos amplificar hasta 50 genes diferentes, y por lo tanto sería un proceso más rápido y sencillo. No obstante, los resultados no fueron informativos, debido a la multitud de posibilidades de interpretación. Por ello, la medición se realizó mediante qPCR (ver apartado 3.2. de esta sección).

Ver tablas 7 y 8 con las secuencias de las sondas diseñadas.

SONDA	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (bases)
<b>IL2RA-LPO</b>	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ACC GGG CAG ATG GTT TAT TAT CAG TGC GTC CAG GGA T	55
<b>IL2RA-RPO</b>	ACA GGG CTC TAC ACA GAG GTC CTG CTG AGA GCG TCT GTC TAG ATT GGA TCT TGC TGG CAC	60
<b>IL7RA-LPO</b>	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ACG CCT GGC TGG GAA TGT CAG TGC ATG TGA CGC CCC T	55
<b>IL7RA-RPO</b>	ATT CTC TCC TCT TCC AGG TCC CTA GAC TCT AGA TTG GAT CTT GCT GGC AC	50
<b>CD6-LPO</b>	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ACC TGC CCA GCC TCC TGT GGC CCT GAC CAC CTT CTA CAA TTC CCA GCG GCA	69
<b>CD6-RPO</b>	TCG GGT CAC AGA TGA GGA GGT CCA GCA AAG CAG GTT CCA GAT GCC ACC TCT AGA TTG GAT CTT GCT GGC AC	71
<b>TNFRSF1A-LPO</b>	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ACG TGT GTG GCT GCA GGA AGA ACC AGT ACC GGC ATT ATT GGA GTG A	64
<b>TNFRSF1A-RPO</b>	AAA CCT TTT CCA GTG CTT CAA TTG CAG CCT CTG CCT CTC TAG ATT GGA TCT TGC TGG CAC	60
<b>UBAC2-LPO</b>	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ACC TCA TCT GGA TTG TAG CCA TAA GTG GAC TTA TGT CCG GTC TGT GCT	66
<b>UBAC2-RPO</b>	ACG ACA GCA AAA TGT TCC AGG TGC ATC AGG TGC TCT GCA TCC CCA GTC TAG ATT GGA TCT TGC TGG CAC	69
<b>PTGER4-LPO</b>	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ACT CGC TCC AAA CTT GGC TGA TAT AAC TGG T	49
<b>PTGER4-RPO</b>	TGA CGA ATA CTC GCA CCA CGA GCG GGA TGG AGC AGT CTA GAT TGG ATC TTG CTG GCA	57
<b>RORc-LPO</b>	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ACC TAT AGC GAC TTA CGG ACT CTG CCA GAA TGA CCA GAT TGT GCT TCT CA	68
<b>RORc-RPO</b>	AAG CAG GAG CAA TGG AAG TGG TGC TGG TTA GGA TGT GCC GGG CCT ACA ATG TCT AGA TTG GAT CTT GCT GGC AC	74

**Tabla 7:** Secuencias de las sondas diseñadas para cuantificar expresión génica por el método RT-MLPA

SONDA	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (bases)
45.2-LPO	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ATC CTT CAT CCA TCC ATC ATA TAT CCA TCT GTC CAT CC	56
45.2-RPO	TCC ATC CAG CCA TTT ACC CAC CCA TCT CAC AGT GTT CTA GAT TGG ATC TTG CTG GCA C	58
66-LPO	GGG TTC CCT AAG GGT TGG ATG TGG ACA GCA CAG AAG ATA GTG TCA GGT GG	50
66-RPO	GGA CAG CAC GGG GGA CAG TGT CAG TCT CAC AGT GTA CGG ACC TAA AGT CTA GAT TGG ATC TTG CTG GCA C	70
ESV98-LPO	GGG TTC CCT AAG GGT TGG AGT CTT GGG GTG TAG GTT CAG TTT CTG TGG CAG GTT TGG ATT A	61
ESV98-RPO	GGT GGC TCA CAG TGC TAG GAT CTG TGA CTC TGA GGT ACC CTT TAA CAG GTT TCT AGA TTG GAT CTT GCT GGC AC	74

**Tabla 8:** *Secuencias de las sondas diseñadas para cuantificar CNV por el método MLPA*

## 7. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Debido a la heterogeneidad de la aparición y del curso de la Esclerosis Múltiple, y a que algunos síntomas son similares a otras enfermedades neurológicas, el diagnóstico de la Esclerosis Múltiple no es sencillo.

En 2001, McDonald realizó una revisión de los criterios para el diagnóstico, para poder demostrar de manera objetiva la difusión de las lesiones en el tiempo y en el espacio. Con ello estableció los criterios diagnósticos de la Esclerosis Múltiple, criterios que integran métodos clínicos (resonancia magnética) y paraclínicos en el laboratorio (estudio de BOC de IgG) (McDonald WI, 2001).

La concentración de IgG del LCR está aumentada por síntesis local en los pacientes con Esclerosis Múltiple. Por ello la detección de un perfil oligoclonal de IgG exclusivo del LCR permite confirmar el diagnóstico de Esclerosis Múltiple en el contexto clínico adecuado. A continuación se detallan los pasos a seguir para la realización del estudio de las BOC, debido a la importancia que tiene en el desarrollo de este trabajo.

Los pasos principales para la realización del estudio de BOC son los siguientes:

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. A los pacientes con sospecha de Esclerosis Múltiple se les realiza una punción lumbar y una extracción de sangre periférica.
2. Medir las concentraciones de albúmina e Igs a las muestras de LCR y suero sanguíneo resultantes de las extracciones por nefelometría (técnica basada en la dispersión de la radiación que atraviesan las partículas de materia). Esta medición es crucial para ajustar las concentraciones de compuestos para poder seguir con el procedimiento diagnóstico y para poder cuantificar los índices de Igs. La cuantificación de los índices de Igs fue inicialmente descrita por Lefvert y Link para la IgG, pudiéndose aplicar para las demás Igs. La fórmula es la siguiente: 
$$\frac{((\text{Ig en LCR}) / (\text{Ig en suero sanguíneo}))}{((\text{Albúmina en LCR}) / (\text{Albúmina en suero sanguíneo}))}$$
 (Lefvert AK, 1985).

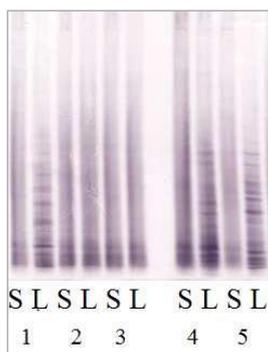
Por último se procede a la detección de las BOC por el método de isoelectroenfoque. Esta técnica parte de la base de que las proteínas presentes en el LCR y en el suero sanguíneo se separan por su punto isoeléctrico en un gradiente de pH, en un gel de agarosa.

Una vez finalizado el isoelectroenfoque, se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y se incuba con anticuerpos anti-IgG o anti-IgM marcados (previamente hemos tenido que seleccionar diferentes programas de carrera electroforética). Por último, se añade una solución sustrato para visualizar las BOC (sistemas estreptavidina-biotina o fosfatasa alcalina, dependiendo del marcaje inicial del anticuerpo).

Por un lado, la detección de BOC de IgG es útil para el diagnóstico de Esclerosis Múltiple. Por el otro, la detección de BOC de IgM es utilizada para la evaluación de la

posible evolución de la enfermedad, ya que es un marcador de peor pronóstico (Villar LM, 2003).

Se considera que un paciente es positivo para BOC cuando éstas aparecen en el LCR y no en el suero sanguíneo (Figura 9).



**Figura 9:** Imagen obtenida de un estudio diagnóstico de BOC. Se enumeran muestras de 5 pacientes diferentes. Cada muestra consta de suero sanguíneo (S) y LCR (L). Los pacientes que muestran el perfil oligoclonal en el LCR y no en el suero son considerados positivos, en este caso, los números 1, 4 y 5.

## 8. ESTADÍSTICA

### 8.1. HLA

Las frecuencias de los genotipos HLA *DRB1\*1501* y HLA *DQB1\*0602* fueron calculadas para pacientes de Esclerosis Múltiple y controles, mediante el test de chi cuadrado con el software SPSS 15.0. Los valores de significación menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. También fueron calculados los valores "odds ratios" (ORs). Los análisis de regresión logística y resumen de estimación de un conjunto de cohortes mediante meta-análisis fueron realizados con el software Stata12

(College Station, TX, USA). Para el meta-análisis se usaron los efectos aleatorios y fijados, y se estimó la heterogeneidad por el índice  $I^2$  y el valor estadístico Q.

## **8.2. Asociación de SNPs individuales al riesgo de padecer Esclerosis Múltiple**

Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de los marcadores SNPs bialélicos estudiados fueron determinados mediante el test exacto de Fisher (Wigginton JE, 2005).

La frecuencias genotípicas fueron determinadas mediante el software “PLINK V.1.07” (Purcell S, 2007), ajustando los modelos dominante, recesivo y aditivo, y considerando el más significativo. Usamos regresión logística para determinar el mejor modelo de asociación y para calcular los ORs, es decir, el efecto en la patología, junto con los intervalos de confianza de la distribución del 95% y el valor “p”. La regresión logística utiliza el test de máxima verosimilitud, comparando el efecto de cada SNP ajustado por el resto de los marcadores asociados en el análisis inicial. Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico "SNP assoc R package". Para evitar falsos positivos debido a las pruebas múltiples, y para asegurar que el SNP analizado no esté en completo desequilibrio, utilizamos el método de Benjamini-Hochberg, que es muy consistente contra la dependencia positiva y controla el índice de descubrimientos falsos (Benjamini Y, 1995; Sarkar SK, 2006).

El mismo procedimiento fue seguido para evaluar la asociación del SNP rs11621145 con la presencia/ausencia de BOC.

### 8.3. Asociación del SNP rs11621145 a los Índices de Inmunoglobulinas

Para evaluar la asociación entre los índices de Igs G y M (IgG e IgM) y el SNP rs11621145, los índices fueron transformados a logaritmos. Una vez transformados, se realizó regresión lineal en PLINK V.1.07. Para cada cohorte obtuvimos el coeficiente  $\beta$ , el intervalo de confianza al 95% y el valor “p”, usando los modelos aditivos y dominantes.

El resumen de estimación de todas las cohortes fue realizado con un meta-análisis con el software Stata12 (College Station, TX, USA). Se usaron los modelos de efectos aleatorios y fijados, y la heterogeneidad fue estimada por el índice  $I^2$  y el valor estadístico Q.

### 8.4. Análisis de expresión genética

Las expresiones relativas de los genes *IL2RA*, *IL7RA*, *CD6*, *TNFRSF1A*, *UBAC2*, *PTGER4* y *ROR $\gamma$*  fueron analizadas con el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS, Chicago, USA), mediante el test U Mann-Whitney para distribuciones no-paramétricas.







## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### 1. ASOCIACIÓN DEL HAPLOTIPO DE HLA *DRB1\*1501-DQB1\*0602* A ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Las variantes alélicas para los genotipos de HLA *DRB1\*1501* (NM\_002124.3) y HLA *DQB1\*0602* (NM\_002123.4) fueron amplificadas mediante PCR e identificadas por separación en electroforesis de gel de agarosa, obteniendo que la variante *DRB1\*1501* está presente en el 36,52% de los pacientes y únicamente en el 18,71% en la población control. Por otra parte la variante *DQB1\*0602* también se encuentra en mayor proporción en los pacientes, siendo 34,78% en enfermos y 18,15% en controles. Del tratamiento estadístico de los datos, tanto de la totalidad de la cohorte como estratificándola por género y forma clínica, obtuvimos los resultados que se describen a continuación:

1. Los genotipos estudiados pertenecen a una región con un fuerte LD (Begovich AB, 1992). Para cuantificar el grado de LD en nuestra cohorte, se realizó un análisis de regresión logística con los datos obtenidos de frecuencias de ambos genotipos, obteniendo un  $r^2$  de 0,47, comprobando con ello la dependencia de los dos factores.

Mediante el test estadístico Chi cuadrado se mostró la asociación de ambos genotipos con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple (ver tabla 9). Es por ello que los resultados obtenidos con los pacientes de nuestro Hospital, apoyan los resultados de asociación previamente publicados (Jersild C, 1972; Jersild C, 1975; Fogdell A, 1995; Ebers GC, 1998).

## RESULTADOS

2. La asociación de los genotipos a Esclerosis Múltiple según el género fue positiva para ambos sexos (ver tabla 10). Existe descrita en la bibliografía una asociación exclusiva del sexo femenino (Celius EG, 2000; Zabay-Becerril JM, 2004; Irizar H, 2012). Pese a que en nuestros resultados, la asociación es mayor en mujeres, en hombres también es significativa.

El análisis de regresión logística de interacción entre ambos sexos no reflejó significación estadística para ninguno de los genotipos ( $p=0,236$  para *DRB1\*1501* y  $p=0,413$  para *DQB1\*0602*), no pudiendo concluir por ello que existan diferencias entre ambos sexos en ninguno de los casos.

3. Por último, hemos subdividido el grupo de pacientes entre las diferentes formas clínicas de las que están diagnosticados, y las hemos comparado por separado con el grupo control. De los 575 pacientes, obtuvimos los datos de 550, los cuales 34 eran CIS, 418 RRMS, 57 SPMS, 38 PPMS y 3 PRMS. Los PRMS fueron descartados del análisis debido al número bajo de muestras. En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que existen diferencias significativas en todas las formas de Esclerosis Múltiple, menos para los pacientes clasificados como CIS, que no se asocian al genotipo *DRB1\*1501* con respecto a los controles ( $p=0,25$ ).

Para descartar que la subdivisión en grupos más pequeños, al perder poder estadístico, generase resultados erróneos, se compararon los valores entre las diferentes formas de Esclerosis Múltiple. Los resultados de comparación de genotipos entre los grupos realizados mostraron que no existe diferencia entre ellos (tabla 12), es decir, no existe diferencia significativa dentro del grupo de pacientes entre las diferentes formas clínicas de Esclerosis Múltiple y el genotipo HLA.

		EM	CONTROLES	TODOS	$\chi^2$ (p)	OR (AL 95% IC)
<b>HLA DRB1*1501</b>	1501+	210 (36,52%)	267 (18,71%)	477 (23,83%)	71,64 (2,58e <sup>-17</sup> )	2,50 (2,01-3,10)
	1501-	365 (63,48%)	1160 (81,29%)	1525 (76,17%)		
<b>TOTAL</b>		<b>575</b>	<b>1427</b>	<b>2002</b>		
<b>HLA DQB1*0602</b>	0602+	200 (34,78%)	259 (18,15%)	459 (22,93%)	64,17 (1,14e <sup>-15</sup> )	2,41 (1,93-2,99)
	0602-	375 (65,22%)	1168 (81,85%)	1543 (77,07%)		
<b>TOTAL</b>		<b>575</b>	<b>1427</b>	<b>2002</b>		

**Tabla 9:** Estudio de asociación de los genotipos de HLA DRB1\*1501 y DQB1\*0602 a Esclerosis Múltiple. Resultados del test chi-cuadrado mediante el software SPSS 15.0. Encontramos una alta asociación de ambos genotipos a Esclerosis Múltiple. Abreviaturas: EM (Esclerosis Múltiple), OR (Odds ratio), IC (intervalo de confianza).

	HLA DRB1*1501	EM	CONTROLES	TODOS	$\chi^2$ (p)	OR (AL 95% IC)
<b>FEMENINO</b>	1501+	155 (39,34%)	159 (19,46%)	314 (25,93%)	54,69 (1,41e <sup>-13</sup> )	2,68 (2,06-3,50)
	1501-	239 (60,66%)	658 (80,54%)	897 (74,07%)		
<b>TOTAL</b>		<b>394</b>	<b>817</b>	<b>1211</b>		
<b>MASCULINO</b>	1501+	55 (30,39%)	108 (17,70%)	163 (20,61%)	13,72 (0,0002)	2,03 (1,39-2,96)
	1501-	126 (69,61%)	502 (82,30%)	628 (79,39%)		
<b>TOTAL</b>		<b>181</b>	<b>610</b>	<b>791</b>		
	HLA DQB1*0602	EM	CONTROLES	TODOS	$\chi^2$ (p)	
<b>FEMENINO</b>	0602+	146 (37,06%)	155 (18,97%)	301 (24,86%)	46,54 (8,97e <sup>-12</sup> )	2,51 (1,92-3,29)
	0602-	248 (62,94%)	662 (81,03%)	910 (75,14%)		
<b>TOTAL</b>		<b>394</b>	<b>817</b>	<b>1211</b>		
<b>MASCULINO</b>	0602+	54 (29,83%)	104 (17,05%)	158 (19,97%)	14,27 (0,0002)	2,07 (1,41-3,03)
	0602-	127 (70,17%)	506 (82,95%)	633 (80,03%)		
<b>TOTAL</b>		<b>181</b>	<b>610</b>	<b>791</b>		

**Tabla 10:** Estudio de asociación de los genotipos de HLA DRB1\*1501 y DQB1\*0602 a Esclerosis Múltiple según género. Resultados del test chi-cuadrado mediante el software SPSS 15.0. La asociación de ambos genotipos existe en los dos géneros por separado, siendo más fuerte en mujeres. Abreviaturas: EM (Esclerosis Múltiple), OR (Odds ratio), IC (intervalo de confianza).

RESULTADOS

	CIS	PP	RR	SP	CONTROL
<b>N</b>	34	38	418	57	1427
<b>*1501 +</b>	9 (26,47%)	17 (44,74%)	155 (37,08%)	20 (35,09)	267 (18,71%)
<b>*1501 -</b>	25 (73,53%)	21 (55,26%)	263 (62,92%)	37 (64,91%)	1160 (81,29%)
<b>χ<sup>2</sup> (p)</b>	1,31 (0,25)	16,04 (6,19e <sup>-5</sup> )	61,85 (3,71e <sup>-15</sup> )	9,42 (0,002)	
<b>OR (AL 95% IC)</b>	1,56 (0,72-3,39)	3,52 (1,83-6,76)	2,56 (2,02-3,25)	2,35 (1,35-4,11)	
<b>*0602 +</b>	11 (32,35%)	16 (42,11%)	146 (34,93%)	19 (33,33%)	259 (18,15%)
<b>*0602 -</b>	23 (67,65%)	22 (57,89%)	272 (65,07%)	38 (66,67%)	1168 (81,85%)
<b>χ<sup>2</sup> (p)</b>	4,45 (0,04)	13,93 (0,0002)	53,12 (3,13e <sup>-13</sup> )	8,30 (0,004)	
<b>OR (AL 95% IC)</b>	2,16 (1,04-4,48)	3,28 (1,70-6,33)	2,42 (1,90-3,08)	2,26 (1,28-3,98)	

**Tabla 11:** Comparación de las frecuencias de los genotipos DRB1\*1501 y DQB1\*0602 entre las diferentes formas registradas en nuestros pacientes de Esclerosis Múltiple y los controles. Resultados del test chi-cuadrado mediante el software SPSS 15.0. Encontramos diferencias de aparición de los genotipos en todas las formas de Esclerosis Múltiple con respecto al grupo control, a excepción del grupo CIS en el genotipo DRB1\*15:01. Abreviaturas: CIS (síndrome clínico aislado), PP (Esclerosis Múltiple primaria progresiva), RR (Esclerosis Múltiple recurrente recidivante), SP (Esclerosis Múltiple secundaria progresiva), OR (Odds ratio), IC (intervalo de confianza).

DR/DQ	CIS	PP	RR	SP
<b>CIS</b>	-----	0,73 (0,39) 1,52 (0,58-3,99)	0,09 (0,76) 1,12 (0,53-2,37)	0,01 (0,92) 0,96 (0,39-2,37)
<b>PP</b>	2,60 (0,11) 2,25 (0,83-6,08)	-----	0,78 (0,38) 1,36 (0,69-2,66)	0,75 (0,39) 1,46 (0,62-3,39)
<b>PR</b>	1,53 (0,22) 1,64 (0,75-3,60)	0,87 (0,351) 1,37 (0,70-2,68)	-----	0,56 (0,81) 1,07 (0,60-1,93)
<b>SP</b>	0,73 (0,39) 0,67 (0,26-1,70)	0,89 (0,35) 1,50 (0,65-3,47)	0,09 (0,77) 1,09 (0,61-1,95)	-----

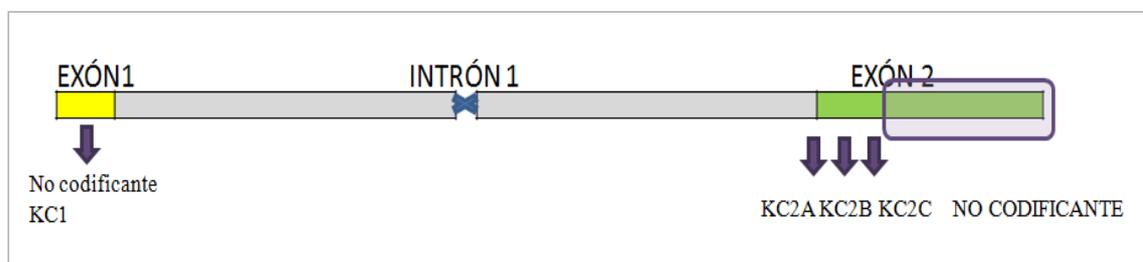
**Tabla 12:** Comparación de las frecuencias de los genotipos DRB1\*1501 y DQB1\*0602 entre las diferentes formas de la enfermedad. Resultados del test chi-cuadrado mediante el software SPSS 15.0. No se observan diferencias significativas en ninguna de las combinaciones 2 a 2 realizadas entre subgrupos de pacientes en ninguno de los genotipos estudiados. Abreviaturas: CIS (síndrome clínico aislado), PP (Esclerosis Múltiple primaria progresiva), RR (Esclerosis Múltiple recurrente recidivante), SP (Esclerosis Múltiple secundaria progresiva), OR (Odds ratio).

## 2. EL GEN *KCNJ10* Y LA BÚSQUEDA DE ALTERACIONES EN SU SECUENCIA

### 2.1. Secuenciación del gen *KCNJ10*

Partiendo de los antecedentes descritos en la introducción sobre la asociación de autoanticuerpos anti KIR4.1 a Esclerosis Múltiple, se estudió la secuencia de *KCNJ10*, el gen que codifica la proteína, con el objeto de ver si alguna variante se encuentra asociada a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple, o pudiera existir algún tipo de alteración de secuencia que tuviera como consecuencia una modificación estructural de la proteína, y por lo tanto se reconociera como extraña.

El gen *KCNJ10* (NM\_002241) consta de 2 exones, de los cuáles el primero no es codificante, y el segundo contiene 1140 pares de bases en la zona codificante. El primer exón fue secuenciado al completo y del segundo se secuenció la región codificante, con 4 pares de cebadores (denominados KC1, KC2A, KC2B y KC2C) que acotaban la zona (ver figura 10). El ensayo fue realizado en un grupo de 20 pacientes con Esclerosis Múltiple clínicamente definida.

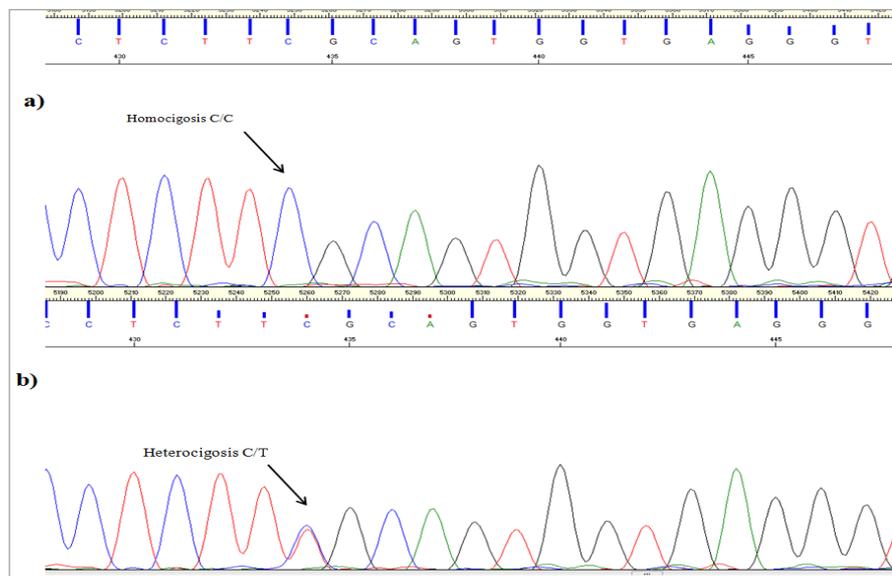


**Figura 10:** Representación esquemática del gen *KCNJ10* y la posición de los cebadores diseñados.

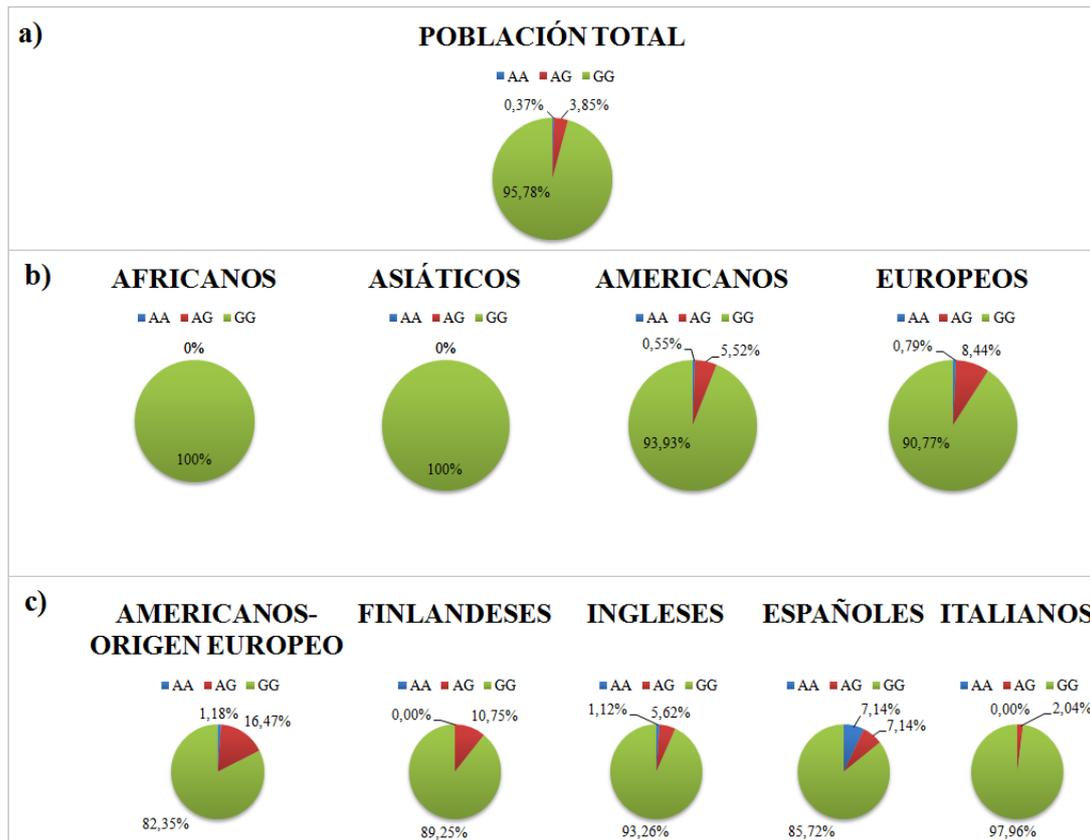
## RESULTADOS

Los resultados mostraron una secuencia muy conservada en la que sólo encontramos dos pacientes heterocigotos (C/T) para una variante alélica en posición 811 del exón 2, siendo el genotipo silvestre C/C (Figura 11).

Posteriormente, se realizó una búsqueda en las bases de datos de “NCBI” y el proyecto de “1000 genomas” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> y <http://browser.1000genomes.org/index.html>). Se comprobó que la variante estaba descrita como rs1130183. Este SNP produce un cambio de aminoácido (arginina a cisteína) en la secuencia proteica (en inglés, “missense”). Cabe señalar además que esta variante es exclusiva de la población caucásica (Figura 12), inexistente en africanos y asiáticos. Además, dentro de la población europea, la española cuenta con un amplio porcentaje de homocigotos TT (figura 12 c)).



**Figura 11:** Electroferograma comparativo del resultado de secuenciación del gen *KCNJ10*. a) Paciente homocigoto para la variante rs1130183. b) Paciente heterocigoto para la variante rs1130183.



**Figura 12:** Distribución del SNP rs1130183 en la población. a) Distribución total. b) Distribución por continentes. c) Distribución en la población europea estudiada. Datos obtenidos del proyecto 1000 genomas.

Bajo la hipótesis de que el SNP pudiera estar implicado en la producción de anticuerpos contra la proteína KIR4.1, intentamos mediante técnicas de ELISA cuantificar la producción de dichos anticuerpos en los pacientes, siendo imposible la puesta a punto de esta técnica, con lo que no pudimos testar nuestra hipótesis.

## 2.2. Análisis de asociación del SNP rs1130183

Dada la relevancia que la presencia de anticuerpos contra la proteína KIR4.1 parece tener en la patología de la Esclerosis Múltiple, quisimos determinar si la variante rs1130183 se asocia con la susceptibilidad a padecer la enfermedad.

El análisis de asociación a Esclerosis Múltiple del SNP rs1130183 se llevó a cabo en una cohorte de 2575 muestras totales, de las cuales 1337 eran de pacientes de Esclerosis Múltiple y 1238 eran de controles sanos. La desviación HW fue probada utilizando el test exacto de Fisher (Wigginton JE, 2005). El valor del estadístico “p” fue en todos los casos  $>0,05$ , con el consecuente significado de que el SNP se encontraba en equilibrio HW en la población de estudio (Tabla 13).

El resultado del test de asociación de las frecuencias alélicas a Esclerosis Múltiple fue negativo, concluyendo por lo tanto que la variante no estaba asociada con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple (ver tabla 13).

### Test Equilibrio Hardy Weinberg

	N	TT	TC	CC	p
<b>TODOS</b>	2575	8 (0,31%)	232 (9,01%)	2335 (90,68%)	0,384
<b>EM</b>	1337	4 (0,30%)	128 (9,57%)	1205 (90,13%)	0,773
<b>CONTROLES</b>	1238	4 (0,32%)	104 (8,40%)	1130 (91,28%)	0,312

### Test asociación

	n	T	C	OR	p
<b>EM</b>	1337	136 (5,09%)	2538 (94,91%)	1,13	0,346
<b>CONTROLES</b>	1238	112 (4,52%)	2364 (95,48%)		

**Tabla 13:** Detalle de los test aplicados para la determinación de la asociación del SNP rs1130183 a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple. Abreviaturas: EM (Esclerosis Múltiple), OR (Odds ratio).

### **3. EFECTOS FUNCIONALES DE LOS FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS A ESCLEROSIS MÚLTIPLE. REGULACIÓN EPIGENÉTICA**

Tal y como se detalla en el apartado 4 de material y métodos, se incubaron PBMCs de controles sanos y de pacientes con Esclerosis Múltiple, así como linfocitos T de la línea celular JURKAT, con los estímulos PMA, VPA y NaPB. El cultivo de la línea celular fue útil para comprobar las respuestas celulares en los controles que no poseían ningún tipo de antecedente inflamatorio, pero que al ser un número bajo de muestras y de origen humano, poseían una variabilidad biológica lo suficientemente elevada como para hacer que este control fuese necesario.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

#### **3.1. Validación de sondas para cuantificar por RT-MLPA los niveles de expresión génica**

La técnica RT-MLPA es una variante de la de MLPA, que permite la cuantificación de la expresión de hasta 50 genes diferentes en una única reacción de PCR. Esta técnica se planteó como una alternativa idónea a la cuantificación tradicional por qPCR por ser más rápida, y a la cuantificación por microarrays, por ser más económica.

## RESULTADOS

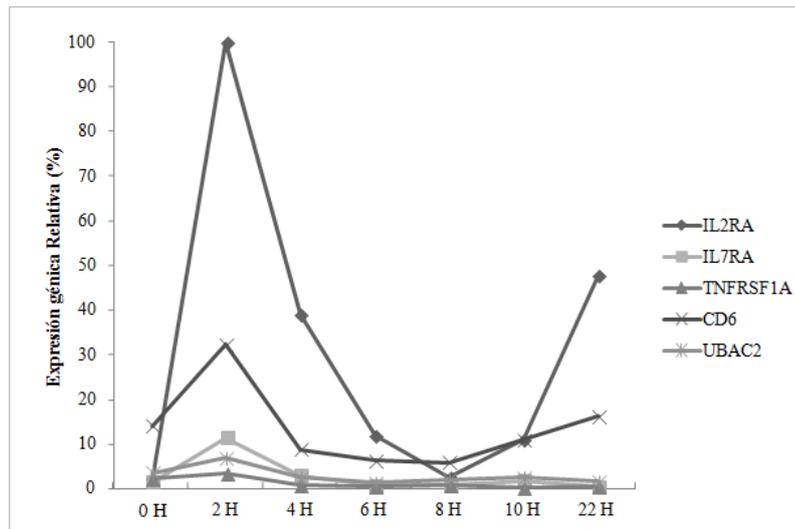
Se realizó el diseño de 7 pares de sondas (ver tabla 7), para, una vez hubiésemos comprobado que funcionaban perfectamente y que podíamos cuantificar el nivel de expresión génica de todos ellos, poder ampliar la técnica con más genes de interés.

Los resultados obtenidos no fueron informativos debido a que las posibilidades de interpretación de los datos eran múltiples. Es por ello que finalmente nos decantamos por continuar el estudio con la técnica qPCR.

### **3.2. Tiempo óptimo de respuesta celular a PMA**

Se realizaron un total de 3 experimentos idénticos e independientes para comprobar el tiempo óptimo de activación celular. Para ello se estimularon con PMA PBMCs procedentes de muestras de controles sanos. Los resultados fueron reproducibles en todos ellos, comprobando que los genes que estábamos activando tenían su pico de expresión máxima a las 2 horas de incubación. La viabilidad celular fue superior al 90% en los diferentes ensayos y tiempos de cultivo.

No se incluyeron en este estudio *PTGER4* ni *ROR $\gamma$*  debido a que la inclusión de genes ocurrió en una fase posterior del proceso (Figura 13).



**Figura 13:** Respuestas de expresión génica en un curso temporal de estimulación de PBMCs de controles sanos frente a PMA (80 nM). Los valores normalizados obtenidos se representan en porcentajes. Estos resultados fueron reproducibles en un total de 3 experimentos independientes.

### 3.3. Regulación de la expresión génica por PMA y HDACis en PBMCs

1. Comparación de los valores de expresión obtenidos con los diferentes estímulos entre controles y pacientes de Esclerosis Múltiple, para todos los genes estudiados: Las diferencias en respuestas de expresión génica entre PBMCs de controles sanos y pacientes, pese a ser en algunos casos diferente, estadísticamente no fueron significativas. En la tabla 14 se muestran los resultados.

## RESULTADOS

CONT vs PAC	ESTÍMULO		
	PMA (p)	VPA (p)	NaPB (p)
<i>IL2RA</i>	0,196	0,309	0,446
<i>IL7RA</i>	0,88	0,324	0,959
<i>CD6</i>	0,564	0,64	0,581
<i>TNFRSF1A</i>	0,132	0,056	0,945
<i>UBAC2</i>	0,683	0,313	0,754
<i>PTGER4</i>	0,652	0,431	0,622
<i>ROR<math>\gamma</math></i>	0,186	0,643	0,791

**Tabla 14:** Resultados de la comparación de expresión génica entre pacientes y controles. 19 pacientes de Esclerosis Múltiple y 16 controles sanos sin historia de enfermedad inflamatoria fueron utilizados en este estudio. Se ha aplicado el test U Mann-Whitney para distribuciones no paramétricas (SPSS 15.0) a las respuestas a PMA, VPA y NaPB halladas entre controles sanos y pacientes de Esclerosis Múltiple. Los valores “p” <0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. En este caso, no obtuvimos diferencias de expresión entre los PBMCs de controles y pacientes.

2. Comparación de los valores de activación celular dentro de un mismo grupo, entre niveles basales de expresión y el alcanzado con los diferentes estímulos:

El PMA fue utilizado como control positivo de activación celular debido a que, *in vitro* imita la señal de activación de los linfocitos T, ya que es un potente activador de la Proteín Kinasa C. Los resultados fueron los esperados debido a que produjo una elevación de los niveles de expresión en *IL2RA* (en controles sanos y en pacientes de Esclerosis Múltiple) e *IL7RA* (resultados de controles, en pacientes no fue estadísticamente significativo), debido a que estos fenómenos de activación se encuentran descritos bibliográficamente (Hughes-Fulford M, 2005). Es por ello que pudimos comprobar que los PBMCs estaban respondiendo a los estímulos de forma correcta.

Por un lado, en los genes *UBAC2* y *CD6* no se ha detectado ningún indicio de cambios en la expresión génica (ni de activación ni de inhibición), con ninguno de los estímulos aplicados (ni HDACis, ni PMA).

Por el otro lado, de los HDACis utilizados, el NaPB no produjo ningún tipo de efecto en los genes y muestras estudiadas.

Con respecto al VPA, sí fue cuantificada una modificación en la expresión relativa de PBMCs, modificación exclusiva de pacientes con Esclerosis Múltiple. Este compuesto incrementó estadísticamente en las muestras de pacientes la expresión del gen *RORγ*, comparándola con los valores de expresión basales y con los valores de estimulación por PMA. También incrementó el patrón de expresión del gen *TNFRSF1A* (también en PBMCs de pacientes de Esclerosis Múltiple) en comparación con los valores de estimulación con PMA.

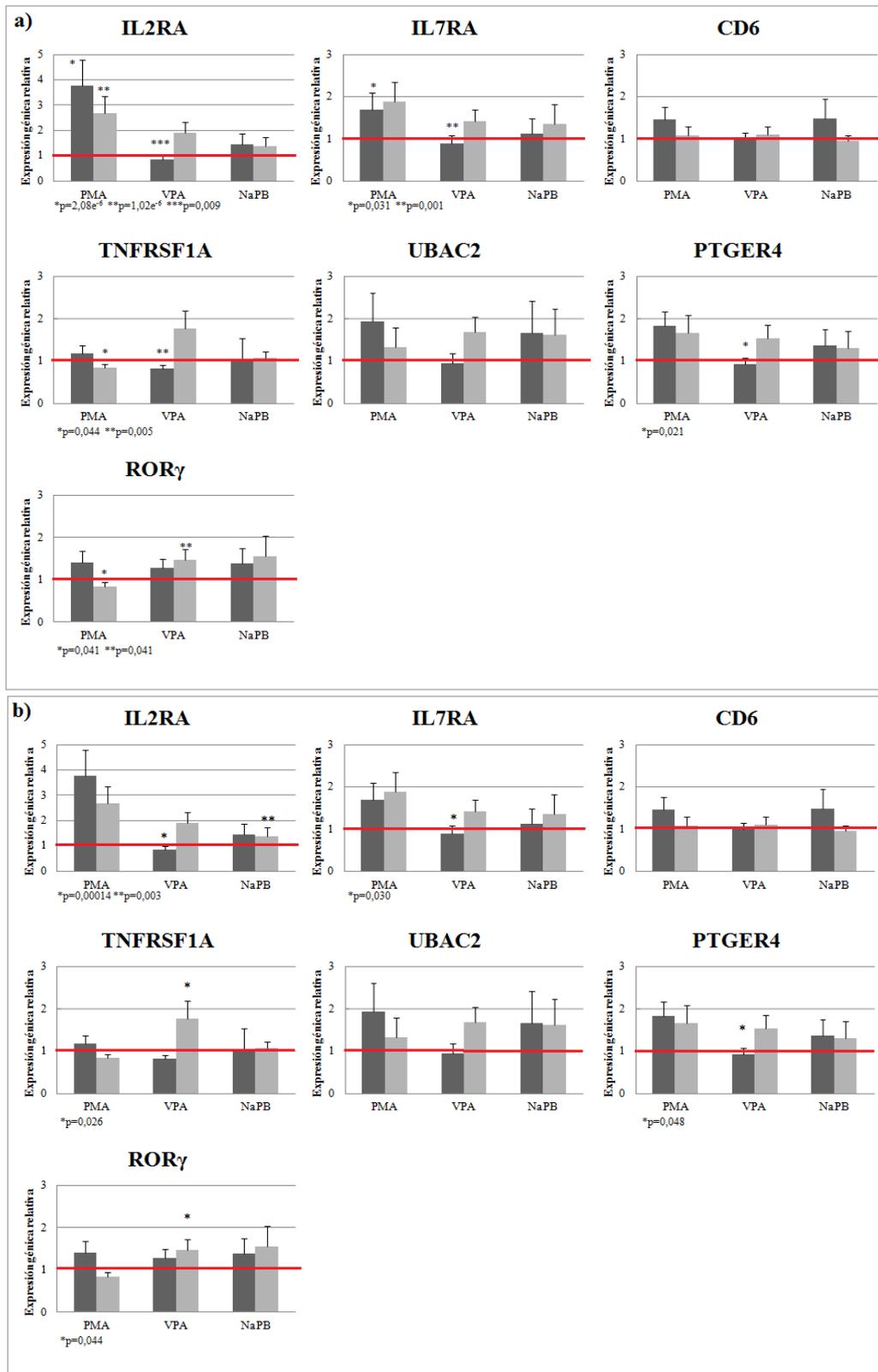
El efecto de los genes *IL2RA*, *IL7RA* and *PTGER4*, fue el contrario al que ocurría con los anteriores, es decir, en los controles sanos, los valores de expresión génica después de la exposición al VPA fueron estadísticamente inferiores a los valores basales y a los valores obtenidos con PMA.

Estos resultados sugieren al VPA como un compuesto que aumenta los niveles de expresión génica en condiciones experimentales en los PBMCs de pacientes con Esclerosis Múltiple (ver tabla 15 y figura 14).

RESULTADOS

Valor Basal		PMA	VPA	NaPB	PMA		VPA	NaPB
<i>IL2RA</i>	Control	2,08 e <sup>-6</sup>	<b>0,009</b>	0,543	<i>IL2RA</i>	Control	1,4 e <sup>-4</sup>	0,62
	EM	1,02 e <sup>-6</sup>	0,778	0,258		EM	0,231	<b>0,003</b>
<i>IL7RA</i>	Control	<b>0,031</b>	<b>0,001</b>	0,543	<i>IL7RA</i>	Control	<b>0,03</b>	0,387
	EM	0,293	0,737	0,465		EM	0,614	0,152
<i>CD6</i>	Control	0,763	0,672	1	<i>CD6</i>	Control	0,419	0,971
	EM	0,551	0,762	1		EM	0,861	0,878
<i>TNFRSF1A</i>	Control	1	<b>0,005</b>	0,416	<i>TNFRSF1A</i>	Control	0,193	0,573
	EM	<b>0,044</b>	0,075	1		EM	<b>0,026</b>	0,379
<i>UBAC2</i>	Control	0,766	0,093	0,543	<i>UBAC2</i>	Control	0,428	0,8
	EM	0,512	0,075	0,512		EM	0,35	1
<i>PTGER4</i>	Control	0,053	<b>0,021</b>	1	<i>PTGER4</i>	Control	<b>0,048</b>	0,424
	EM	0,512	0,737	0,108		EM	0,867	0,234
<i>RORγ</i>	Control	0,35	0,672	1	<i>RORγ</i>	Control	0,815	0,97
	EM	<b>0,041</b>	<b>0,041</b>	0,762		EM	<b>0,044</b>	0,29

**Tabla 15:** Resultados de la comparación de la expresión génica cuantificada con la estimulación de HDACis con respecto a los valores basales y los alcanzados con PMA. Resultados del test U Mann-Whitney para distribuciones no paramétricas (SPSS 15.0). En la parte izquierda de la tabla se representan los resultados comparando los valores obtenidos con los diferentes estímulos con respecto al valor basal. En la parte derecha se representan los resultados comparando los valores obtenidos con los HDACis con respecto al valor de PMA. Los valores de significación < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos (indicados en negrita).



**Figura 14:** Representación de la expresión relativa de cada gen, después de incubar los PBMCs con PMA, VPA y NaPB. Las barras horizontales de color rojo corresponden al umbral del nivel basal (relativizados con el valor constante = 1, mediante el método Pfaffl). a) resultados con respecto al nivel basal. b) resultados con respecto a los valores de expresión con PMA. Los asteriscos representan los datos significativos representados en la tabla 15.

### 3.4. Regulación de la expresión génica por PMA y HDACis en células JURKAT

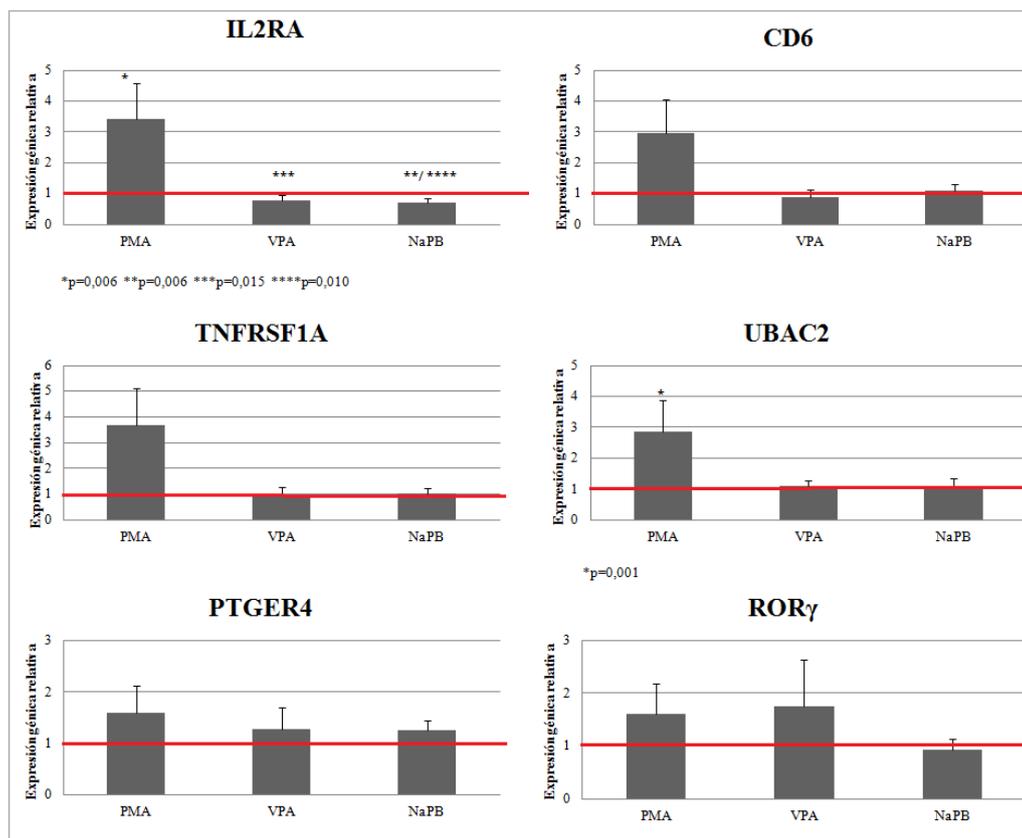
Como se puede comprobar en la figura anterior (figura 14) la variabilidad biológica en las muestras utilizadas era muy elevada. Para tener un control interno de calidad de los resultados obtenidos se realizaron los experimentos con la línea celular de linfocitos T JURKAT.

El PMA estimuló a todos los genes, pero significativamente a *IL2RA* y a *UBAC2*, no obstante, la activación de *UBAC2* por PMA fue novedosa, ya que en los cultivos con PBMCs de controles sanos no obtuvimos ningún resultado con respecto a este gen. Los HDACis no indujeron el aumento de la expresión génica a excepción de NaPB que redujo suavemente la expresión de *IL2RA*. En la tabla 16 y figura 15 se muestran estos resultados, en los que por problemas metodológicos hubo que descartar de los análisis los resultados obtenidos con *IL7RA*.

Es por ello que, pese a existir diferencias en cuanto a los niveles de expresión entre células JURKAT y PBMCs de controles, en términos generales obtuvimos la misma respuesta de no activación de genes con los HDACis. Este hecho potencia los resultados obtenidos de activación de la expresión en PBMCs de pacientes de Esclerosis Múltiple.

Valor Basal	<i>IL2RA</i>	<i>CD6</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>UBAC2</i>	<i>PTGER4</i>	<i>ROR<math>\gamma</math></i>
PMA	<b>0,006</b>	0,075	0,075	<b>0,001</b>	1	0,669
VPA	0,243	0,313	0,594	0,594	1	0,72
NaPB	<b>0,006</b>	0,594	0,594	0,594	0,161	1
PMA	<i>IL2RA</i>	<i>CD6</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>UBAC2</i>	<i>PTGER4</i>	<i>ROR<math>\gamma</math></i>
VPA	<b>0,015</b>	0,082	0,151	0,056	0,573	0,681
NaPB	<b>0,01</b>	0,222	0,151	0,222	1	0,731

**Tabla 16:** Resultados de la comparación de la expresión génica cuantificada con la estimulación de HDACis con respecto a los valores basales y los alcanzados con PMA en los linfocitos T de la línea celular JURKAT. Resultados del test U Mann-Whitney para distribuciones no paramétricas (SPSS 15.0). Los valores < 0,05 son considerados estadísticamente significativos (indicados en negrita).



**Figura 15:** Representación de la expresión relativa de cada gen, en JURKAT incubadas con PMA, VPA y NaPB. Las barras horizontales rojas corresponden al umbral del nivel basal (relativizados con el valor constante = 1, mediante el método Pfaffl). Los asteriscos representan los datos significativos representados en la tabla correspondiente.

### 3.5. Medición de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) asociados a cambios epigenéticos

Con el fin de complementar los estudios de activación celular por la acción de los HDACis sobre los PBMCs, y para dilucidar los mecanismos por los que puede actuar el VPA en la activación de la expresión de los genes descritos, procedimos a la cuantificación de la producción de ROS en PBMCs de controles sanos.

La importancia del estudio de la posible vía de acción por la producción/inhibición de ROS radica en que en diversas patologías, el mecanismo de acción de los HDACis

## RESULTADOS

está asociado a la modificación de la generación de ROS. Por ejemplo, en cáncer está descrito que los HDACis SAHA, TSA y MS27J inducen ROS (Zhu Y, 2013). Otro ejemplo lo encontramos en determinadas infecciones bacterianas, donde los HDACis inhiben la generación de ROS y NOS (especies reactivas del nitrógeno) en macrófagos, con lo que reducen el potencial de fagocitar bacterias (Mombelli M, 2011).

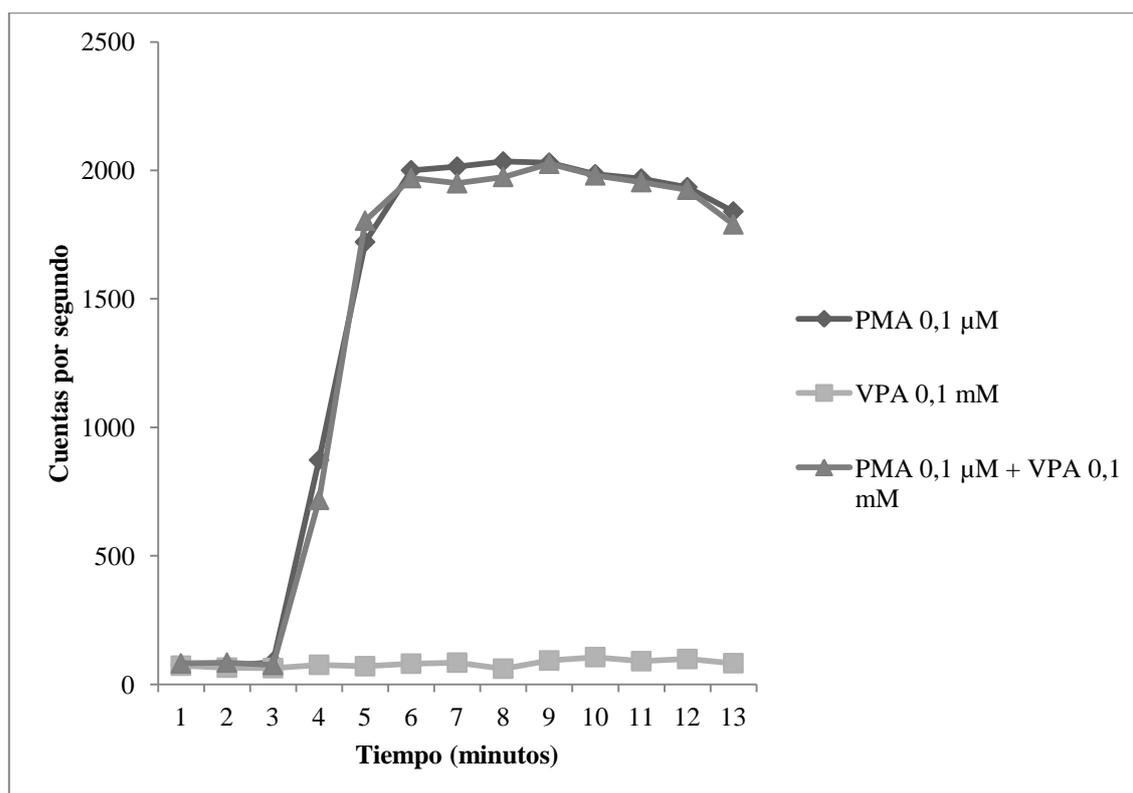
Es por ello que nos planteamos la posibilidad de que el mecanismo de acción que provoca el aumento de la expresión génica por VPA estuviera directamente relacionado con la generación de ROS.

El PMA fue de nuevo utilizado como control de activación de producción de ROS. La cinética de activación celular y generación de ROS inducida por PMA es una respuesta sencilla, en la que, tras añadirlo, se produce una activación lenta y gradual, llegando a estabilizarse en el nivel máximo en unos minutos. Finalmente vuelve lentamente a los valores basales (figura 16). Los resultados de producción de ROS con VPA fueron los siguientes:

1. Una vez estabilizados los valores basales de producción de ROS por los PBMCs incubados con luminol, se añadieron concentraciones crecientes de VPA (de 0 mM a 3 mM) a los PBMCs (50000 células/500  $\mu$ l PBS). El VPA por sí sólo, no modificó los valores basales de activación celular a ninguna de las concentraciones ensayadas.

2. Los valores de activación obtenidos con PMA no se modificaron en presencia de VPA (0,1 mM), ni activándolos ni reprimiéndolos.

En la figura 16 se representa la cinética general de acción obtenida con PMA, VPA y la combinación de ambos.



**Figura 16:** Respuesta celular de la producción de ROS con los estímulos PMA y VPA, obtenidos del luminómetro. Representación de la cinética general de acción del PMA (0,1 μM) (rombos), VPA (0,1 mM) (cuadrados) y ambos (triángulos).

#### **4. EFECTOS FUNCIONALES DEL SNP rs11621145 DEL *LOCUS* DE LA CADENA PESADA DE LA IgG**

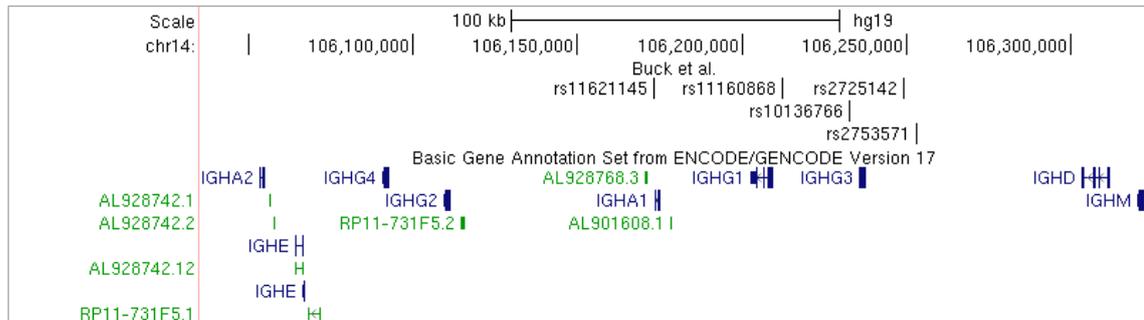
##### **4.1. Selección del SNP rs11621145 y análisis de asociación a Esclerosis Múltiple**

Bajo los antecedentes de un trabajo previo (Buck D, 2013) que determinó que variantes en el *locus* IGHC se asociaban con el I. IgG intratecal en pacientes de Esclerosis Múltiple, hemos analizado estas variantes para realizar nuestro estudio.

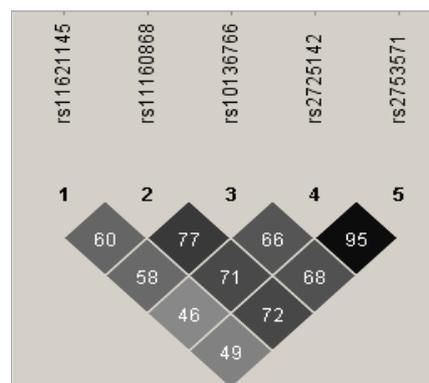
En dicho trabajo, los 5 SNPs localizados en el *locus* IGHC (Chr 14q32.2) asociados a los valores de I. IgG en pacientes de Esclerosis Múltiple fueron los siguientes: rs11621145, rs11160868, rs10136766, rs2725142 y rs2753571 (figura 17), argumentando con ello que estos haplotipos específicos podrían afectar a la síntesis intratecal de IgG (Buck D, 2013) (ver tabla 17 con los resultados de la asociación).

En nuestro trabajo de investigación, hemos analizado la relación de estas variantes en 379 individuos procedentes del proyecto 1000 Genomas de la población caucásica (Centre d' Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) (CEU), Finns (FIN), British (GBR), Toscani (TSI)) (1000 Genomes Project Consortium, 2010). Los análisis de LD y de equilibrio de HW de las variantes mostraron que todas se encontraban en alto LD, con  $r^2 > 0,49-0,95$  (figura 18). Asimismo, a excepción del rs11621145, los polimorfismos estudiados no se encontraban en equilibrio HW. El SNP rs11621145 era además, el segundo con mayor valor de asociación, es por ello que fue seleccionado como candidato para replicar el estudio de Buck *et al.* en nuestro grupo de pacientes,

además de ampliarlo, estudiando la asociación al I. IgM, a las BOC de IgG e IgM y al riesgo de padecer la enfermedad.



**Figura 17:** Mapa del locus IGHC. Se representan los 5 SNPs asociados en el trabajo de Buck *et al.*, 2013 (rs11621145, rs11160868, rs10136766, rs2725142 y rs2753571). Los genes codificantes se representan en azul, los representados en verde corresponden a los no codificantes.



**Figura 18:** LD en los 5 SNPs asociados al I IgG en el trabajo de Buck *et al.* Los datos han sido obtenidos del proyecto 1000 Genomas para la población caucásica. El LD se encuentra expresado en  $r^2$ .

META-ANÁLISIS						
SNP	POSICIÓN EN CHR.14	VALOR HW	MAF	ALELOS	BETA	P
rs11621145	106172880	0,5331	0,372	A:G	0,215	3,1 e <sup>-14</sup>
rs11160868	106212273	0,0234	0,358	C:T	0,206	1,9 e <sup>-13</sup>
rs10136766	106232585	0,0096	0,393	G:A	0,229	7,5 e <sup>-16</sup>
rs2725142	106249173	0,0057	0,391	C:G	0,185	1,5 e <sup>-11</sup>
rs2753571	106252699	0,0059	0,397	C:A	0,18	6,5 e <sup>-11</sup>

**Tabla 17:** Relación de los SNPs asociados al I. IgG en pacientes de Esclerosis Múltiple en Buck et al. 2013. Los datos de equilibrio HW y MAF (frecuencia del alelo minoritario) proceden de 1000 Genomes Project Consortium, 2010.

El SNP rs11621145 fue genotipado en una cohorte de pacientes del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla y controles sanos procedentes de una colección conjunta del Hospital Universitario Virgen Macarena junto con el Hospital Virgen de las Nieves de Granada y el Centro de transfusión sanguínea de Granada y Almería. El estudio fue además ampliado con dos grupos de pacientes pertenecientes al Hospital Carlos Haya de Málaga y a los Hospitales San Carlos y Ramón y Cajal de Madrid. Los datos demográficos de las poblaciones se encuentran detallados en la tabla 3, en el apartado de material y métodos. Tanto en las 3 cohortes como en la cohorte combinada, los controles estuvieron en equilibrio HW.

Se realizó un análisis de regresión logística en la cohorte combinada para los modelos dominante, recesivo y aditivo. Los resultados mostraron que el modelo dominante era el que mejor se ajustaba a los datos (tabla 18). Además, nos revelaron que la variante rs11621145 estaba asociada a padecer Esclerosis Múltiple, mostrando que el alelo G (alelo minoritario de la variante) ejercía un efecto protector, es decir, los sujetos que portan la variante G son menos susceptibles a desarrollar la enfermedad.

SNP	A.MIN	A.MAY	TEST	EM	CONTROLES	CHI <sup>2</sup>	GL	p
rs11621145	G	A	GENO	279/1065/1505	266/1027/1025	37,9	2	5,90e <sup>-09</sup>
rs11621145	G	A	TREND	1623/4075	1559/3077	30,23	1	3,83e <sup>-08</sup>
rs11621145	G	A	ALÉLICO	1623/4075	1559/3077	31,75	1	1,76e <sup>-08</sup>
rs11621145	G	A	DOMINANTE	1344/1505	1293/1025	37,88	1	7,51e <sup>-08</sup>
rs11621145	G	A	RECESIVO	279/2570	266/2052	3,835	1	5,02e <sup>-02</sup>

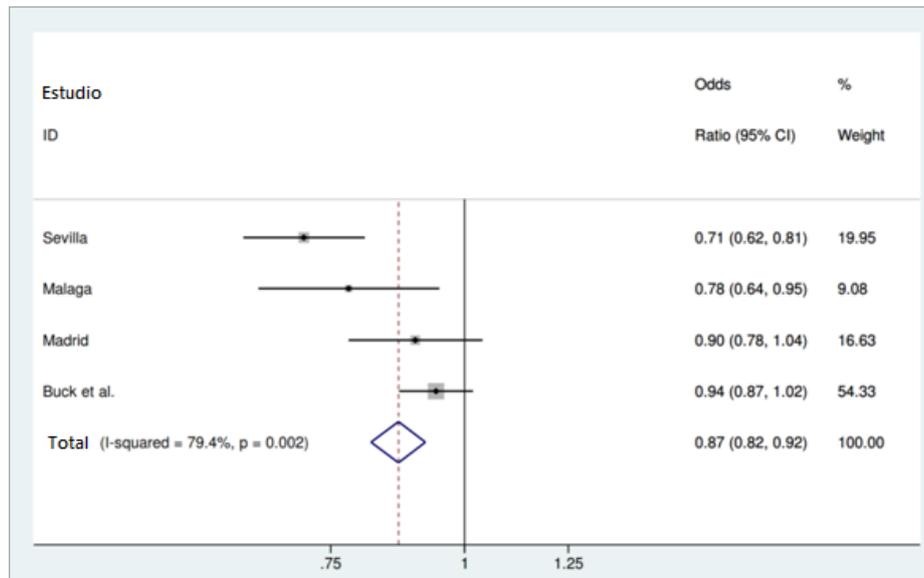
**Tabla 18:** Resultados de los análisis de regresión logística aplicados a la cohorte combinada Madrid, Málaga y Sevilla-Granada. El modelo dominante fue el que mejor se ajustó a los datos. Abreviaturas: A.MIN (alelo minoritario); A.MAY (alelo mayoritario), GL (grados de libertad)

La asociación a la enfermedad fue demostrada tanto en las tres cohortes por separado, en un meta-análisis realizado con todas ellas, así como en el meta-análisis en el que se incluyeron los datos de la cohorte británica publicados por Buck *et al.* (Tabla 19 y figura 19).

	GENOTIPOS			MODELO DOMINANTE					
	GG (%)	AG (%)	AA (%)	OR			P		
SEV EM	88 (8,9)	356 (36)	544 (55,1)	0,6218 (0,522-0,74)			9,205 e <sup>-8</sup>		
SEV CONT	133 (12,4)	475 (44,4)	462 (43,2)						
MÁL EM	51 (8)	253 (39)	343 (53)	0,6919 (0,5381-0,8896)			0,004		
MÁL CONT	36 (9)	188 (46,8)	178 (44,2)						
MAD EM	126 (11,5)	405 (37,1)	560 (51,4)	0,8114 (0,6776-0,986)			0,03554		
MADCONT	72 (11)	282 (42,6)	307 (46,4)						
TOT EM	265 (9,7)	1014 (37,2)	1447 (53,1)	OR <sup>1</sup>	OR(R) <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	P(R) <sup>4</sup>	Q <sup>5</sup>	I <sup>6</sup>
TOT CONT	241 (11,3)	945 (44,3)	947 (44,4)	0,6982	0,7019	1,05e <sup>-9</sup>	3,05e <sup>-05</sup>	0,1363	49,82

**Tabla 19:** Resultados del análisis del modelo dominante de asociación del SNP rs11621145 a Esclerosis Múltiple. Abreviaturas: SEV (Sevilla), MÁL (Málaga), MAD (Madrid), EM (Esclerosis Múltiple), CONT (Controles), OR (Odds Ratio), OR<sup>1</sup> (odds ratio estimada de efectos fijos); OR(R)<sup>2</sup> (odds ratio estimada de efectos aleatorios), P<sup>3</sup> (valor p del meta-análisis de efectos fijos), P(R)<sup>4</sup> (valor p del meta-análisis de efectos aleatorios), Q<sup>5</sup> (valor p para el test de la Q de Cochran), I<sup>6</sup> (índice de heterogeneidad I<sup>2</sup> (0-100)).

## RESULTADOS



**Figura 19:** Diagrama del meta-análisis del efecto global del SNP *rs11621145* asociado con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple en las tres cohortes analizadas y la de Buck *et al.* Los cuadrados grises representan las estimaciones del efecto para las cohortes individuales, y las líneas horizontales representan los intervalos de confianza del 95% de las estimaciones. El rombo corresponde a la estimación global bajo el modelo de efectos fijos. Valor de p para la estadística Q de Cochran; I cuadrado para el índice de heterogeneidad (0-100).

Estos resultados fueron de vital relevancia, debido a que la variante no había sido asociada a Esclerosis Múltiple, ni en el estudio de Buck *et al.* ni en los de GWAS, ya que la cobertura de la región en la que se encuentra el *locus* era muy baja en los chips, y no hay datos de SNPs en esta región (IMSGC, 2011). Aún así, la frecuencia del alelo G en nuestra cohorte de estudio fue 0,33. Esta frecuencia es similar a la que hay descrita para la población caucásica, de 0,39 (proyecto 1000 Genomas). En cambio para la población africana la frecuencia se sitúa en 0,97.

#### **4.2. Análisis de asociación del SNP rs11621145 con el Índice de Inmunoglobulina G (I IgG) en pacientes de Esclerosis Múltiple**

Para analizar la asociación de la variante de estudio al I. IgG, realizamos una regresión lineal en dos cohortes de pacientes de Esclerosis Múltiple, ajustadas por sexo y edad y pertenecientes al Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla (491) y al Hospital Ramón y Cajal de Madrid (182). Los datos demográficos de las poblaciones se encuentran detallados en la tabla 3 del apartado de material y métodos.

El análisis fue realizado con los modelos aditivo y dominante, pero, al igual que ocurría con el estudio de asociación a Esclerosis Múltiple, el modelo dominante fue el que mejor se adaptó a los resultados. Los resultados mostraron una asociación con el I. IgG (tabla 20). Nuestro índice  $\beta$  (0,212) fue inferior al del trabajo de Buck *et al.* (0,215), no obstante nuestros resultados siguen siendo estadísticamente significativos, mostrando que los pacientes de Esclerosis Múltiple que portan el alelo G tienen los valores de I. IgG más elevados.

#### **4.3. Análisis de asociación del SNP rs11621145 con el Índice de Inmunoglobulina M (I IgM) en pacientes de Esclerosis Múltiple**

Con respecto a la asociación del alelo G del SNP al I. IgM, se aplicaron los mismos análisis estadísticos que en el apartado anterior, y encontramos el efecto opuesto, es decir, los pacientes de Esclerosis Múltiple que portaban el alelo G, tenían menores

## RESULTADOS

índices de IgM. Esta asociación fue de igual forma estadísticamente significativa (tabla 20).

Es por ello que, con los resultados hasta ahora descritos, podemos afirmar que los individuos que portaban el alelo G, presentan menos riesgo de padecer Esclerosis Múltiple, y en el grupo de pacientes con esta patología que lo portan, existe una relación con respecto a los valores altos de I. IgG y bajos de I. IgM.

Para poder dilucidar si este efecto era exclusivo de los pacientes de Esclerosis Múltiple, se amplió el estudio con un grupo de pacientes con diversas enfermedades no inflamatorias (tipo migrañas, hidrocefalias, Alzheimer, Parkinson o infartos cerebrales, entre otras), todos procedían del Hospital Universitario Virgen Macarena, siendo el resultado de la asociación negativo, es decir, no estaba el SNP rs11621145 asociado con el I. IgG de estos pacientes, por lo tanto, la asociación es exclusiva de Esclerosis Múltiple.

			Sevilla			Madrid			Meta-Análisis		
			N	BETA	p	N	BETA	p	N	BETA	p
EM	IgG	ADIT	362	0,147	1,42e <sup>-4</sup>	176	0,101	0,066	538	0,132	2,52e <sup>-5</sup>
		DOM	362	0,215	2,60e <sup>-5</sup>	176	0,187	0,014	538	0,207	6,85e <sup>-7</sup>
	IgM	ADIT	292	-0,219	0,007	173	-0,227	0,013	465	-0,223	2,2e <sup>-4</sup>
		DOM	292	-0,295	0,0063	173	-0,252	0,048	465	-0,277	7,24e <sup>-4</sup>
No EM	IgG	ADIT	414	0,003	0,73						
		DOM	414	0,007	0,57						
	IgM	ADIT	414	0,003	0,73						
		DOM	414	0,0064	0,92						

**Tabla 20:** Resultados del análisis de regresión lineal de asociación de la variante rs11621145 y el logaritmo de los índices de IgG e IgM. Abreviaturas: N (número de muestras), EM (Esclerosis múltiple), NO EM (Muestras de pacientes con enfermedades no inflamatorias), ADIT (modelo aditivo), DOM (modelo dominante)

#### 4.4. Análisis de asociación del SNP rs11621145 con las bandas oligoclonales de IgG e IgM en pacientes de Esclerosis Múltiple

La mayoría de los pacientes utilizados en este trabajo tenían BOC positivas para IgG, es por ello que cuando se realizó el análisis de asociación de BOC de IgG al SNP rs11621145, no se detectó asociación, debido a la limitación del análisis por el bajo número de pacientes con BOC de IgG negativas.

Por otro lado, se estudió también la asociación de la variante con las BOC de IgM, donde sí obtuvimos resultados positivos de asociación, en ambas cohortes y en el meta-análisis (tabla 21). En este caso, el modelo aditivo fue el que mejor se ajustó a nuestros resultados. Por lo tanto, los resultados mostraron que los portadores del alelo G presentaban baja susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple, y dentro del grupo de pacientes que lo tenían, existía una relación con respecto a los valores altos de I. IgG y bajos de I. IgM, además de estar asociado con una baja probabilidad de tener BOC positivas para IgM.

	Alelo	N	Modelo dominante		Modelo aditivo	
			OR	p	OR	p
Sevilla	G	255	0,4321 (0,2582-0,7231)	0,001	0,4937 (0,3267-0,7458)	8,0 e <sup>-4</sup>
Madrid	G	179	0,319 (0,1698-0,5991)	3,8 e <sup>-4</sup>	0,4102 (0,2521-0,6674)	3,3 e <sup>-4</sup>
Meta-Análisis			0,3827	2,35 e <sup>-6</sup>	0,4569	1,08 e <sup>-6</sup>

**Tabla 21:** Resultados del estudio de asociación de las BOC de IgM al SNP rs11621145. Abreviaturas: OR (odds ratio), P (valor de p asintótico para el estadístico T).

#### **4.5. Análisis de variación en el número de copias en el *locus* de la cadena pesada de la IgG por MLPA**

A excepción del SNP rs11621145, las variantes que se asociaron al I. IgG en pacientes con Esclerosis Múltiple (Buck D, 2013) no se encontraban en equilibrio HW, no obstante el conjunto de los 5 SNPs se encuentran en LD, con lo que planteamos el estudio de la causa de la falta de equilibrio.

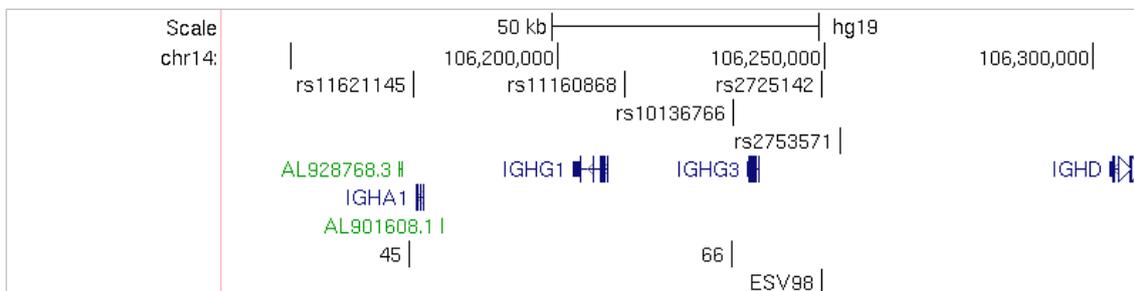
Para ello, nos planteamos cual sería la causa de la asociación entre el I. IgG e IgM y las variantes de la región. Esta región acumula múltiples polimorfismos tanto de única base como CNVs con lo que quisimos comprobar si inserciones o deleciones en la región pudieran ser la causa de esta asociación.

Tal y como se detalla en el apartado 6 de material y métodos, para poder detectar este fenómeno, se realizó un diseño de sondas para incluirlas en la técnica MLPA<sup>®</sup>.

La región del *locus* IGHC que engloba a los 5 SNPs asociados al I. IgG en pacientes con Esclerosis Múltiple abarca aproximadamente 80 kb (79819 pb) (figura 17). En esta región encontramos un alto número de secuencias repetitivas y ricas en guanina y citosina. Con estas características de secuencia, típicas de las regiones de reordenamiento de Igs, a priori no fue sencillo encontrar una región exclusiva de secuencia y que cumpliera los requisitos para el diseño de sondas.

Finalmente, fueron diseñadas con éxito 3 sondas, adyacentes a 3 de los SNPs asociados: rs11621145, rs10136766 y rs2725142 (Figura 20 con localización en el *locus*). Las sondas fueron incluidas en un kit comercial de sondas de referencia SALSA MLPA probemix P300-A2 Human DNA Reference-2.

La localización de las sondas dentro de las de referencia seguía el patrón indicado en la tabla 22.



**Figura 20:** Localización de las sondas dentro del locus de estudio. Se representa el mapa del locus con los SNPs asociados según Buck *et al.* y los genes pertenecientes a la región de estudio (en azul los codificantes). La sonda 1 es llamada “45”, la 2 es “66” y la 3 es “ESV98”.

LONGITUD (NUCLEÓTIDOS)	SONDA
64	FRAG Q (CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN)
70	FRAG Q (CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN)
76	FRAG Q (CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN)
82	FRAG Q (CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN)
88	FRAG D (INDICAN DESNATURALIZACIÓN)
92	FRAG D (INDICAN DESNATURALIZACIÓN)
109	REFERENCIA
114	SONDA 1 (45)
120	SONDA 2 (66)
129	REFERENCIA
135	SONDA 3 (ESV98)
148	REFERENCIA

**Tabla 22:** Posición de las sondas diseñadas, y su inclusión dentro del kit de sondas de referencia “SALSA MLPA probemix P300-A2 Human DNA Reference-2”. Dentro de este kit nos encontramos con las sondas de referencia, con los fragmentos Q (que son indicadores de la cantidad y calidad de ADN añadido) y con los fragmentos D (que son indicadores de desnaturalización). Es por ello que el conjunto de sondas de referencia además de mostrarnos los fragmentos (picos) de referencia, nos indica si la muestra tiene la calidad óptima. De esta forma, y teniendo en cuenta todos los factores e indicaciones del fabricante, podemos validar nuestros resultados de una forma fiable.

En una primera fase del estudio, se realizó la cuantificación de la reordenación del locus IGHC en ADN de 25 LCL diferentes. Esta cuantificación fue necesaria para comprobar la sensibilidad y especificidad de la técnica y de las sondas diseñadas, ya que

## RESULTADOS

estas líneas, al ser clones de linfocitos B maduros, tienen reordenada la región de estudio. En los resultados obtenidos encontramos reordenaciones en el *locus* en 15 LCL diferentes, ya fuese por deleciones parciales o totales (1 o 2 alelos) o por duplicaciones (ver figura 21 con un ejemplo de los electroferogramas obtenidos y tabla 23 con la relación de alteraciones detectadas en las diferentes LCL).

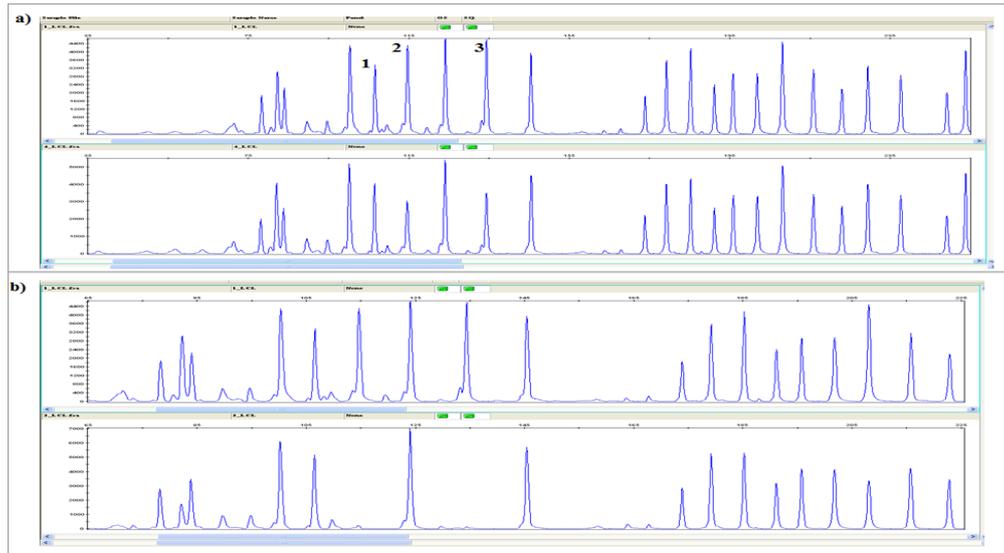
Los resultados fueron detectados *de visu* y cuantificados matemáticamente. En estas muestras, los resultados *de visu* fueron muy claros, no obstante se aplicó un algoritmo matemático para comprobar que los resultados no estaban enmascarados. El algoritmo que aplicamos es utilizado en el software Coffalyser. Este software está específicamente diseñado para cuantificar los resultados de los diferentes kits de MLPA. Sin embargo, decidimos aplicar directamente los cálculos en los que se basa el programa y cuantificarlos uno a uno, teniendo en cuenta en todo momento los posibles datos de registro erróneos (por ejemplo ruido de fondo, etc) que pudiese interferir en la cuantificación de resultados, eliminándolos. Para ello, tomamos los valores de las alturas de los picos correspondientes a cada sonda y los normalizamos con respecto a la altura de diferentes sondas de referencia, dividiendo la altura de la sonda de referencia entre la altura de la sonda problema (X). Posteriormente, al valor normalizado de la muestra control (sin CNV), se le dividió el valor normalizado de cada muestra problema (Y). Por último, de cada muestra teníamos diferentes valores “Y” ( $Y_1...Y_n$ ), procedente de las referencias tenidas en cuenta para normalizarlas, es por ello que realizamos una media aritmética (Z). Por lo tanto, el valor de Z cuantificaba matemáticamente el grado de deleción o duplicación del fragmento en cuestión: si Z es  $\sim 1$  (rango de error  $\pm 0,3$ ), nos encontramos ante una muestra sin CNV; Z  $\sim 0,5$  indica deleción en un alelo; Z  $\sim 0$  indica deleción total de la región que cubre la sonda, y Z  $\sim 1,5$  es indicativo de

duplicación de 1 alelo. En la tabla 22 se representa el valor Z de cada sonda para cada LCL estudiada, coincidiendo los valores con la predicción realizada *de visu*.

Nº REGISTRO	Z sonda 1 (rs11621145)	Z sonda 2 (rs10136766)	Z sonda 3 (rs2725142)	SONDA 1 (rs11621145)	SONDA 2 (rs10136766)	SONDA 3 (rs2725142)
LCL1	1,00	1,00	1,00			
LCL3	1,09	0,00	0,00		DELECCIÓN (2 alelos)	DELECCIÓN (2 alelos)
LCL4	1,02	0,60	0,64		DELECCIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (1 alelo)
LCL16	1,07	0,65	0,69		DELECCIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (1 alelo)
LCL20	1,08	0,64	0,64		DELECCIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (1 alelo)
LCL19	1,36	0,00	0,00		DELECCIÓN (2 alelos)	DELECCIÓN (2 alelos)
LCL18	1,34	1,11	1,26			
LCL14	1,10	1,05	1,18			
LCL17	1,08	1,03	1,24			
LCL15	1,10	0,60	0,55		DELECCIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (1 alelo)
LCL24	1,25	1,09	0,99			
LCL26	1,06	0,00	0,58		DELECCIÓN (2 alelos)	DELECCIÓN (1 alelo)
LCL27	0,79	0,00	0,00		DELECCIÓN (2 alelos)	DELECCIÓN (2 alelos)
LCL28	1,13	0,00	0,00		DELECCIÓN (2 alelos)	DELECCIÓN (2 alelos)
LCL29	1,52	0,67	0,68	DUPLICACIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (1 alelo)
LCL30	0,96	0,99	0,72			
LCL2	1,03	0,72	0,70			
LCL6	1,20	0,55	0,60		DELECCIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (1 alelo)
LCL7	1,16	0,54	0,72		DELECCIÓN (1 alelo)	
LCL8	0,97	1,07	1,15			
LCL10	1,26	0,00	0,00		DELECCIÓN (2 alelos)	DELECCIÓN (2 alelos)
LCL21	1,16	0,94	1,04			
LCL22	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LCL23	0,99	0,30	0,53		DELECCIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (1 alelo)
LCL25	1,45	0,00	0,00	DUPLICACIÓN (1 alelo)	DELECCIÓN (2 alelos)	DELECCIÓN (2 alelos)

**Tabla 23:** Resultados del análisis de CNV en 25 LCLs. Se cuantificaron 15 muestras con reordenación de secuencia.

## RESULTADOS



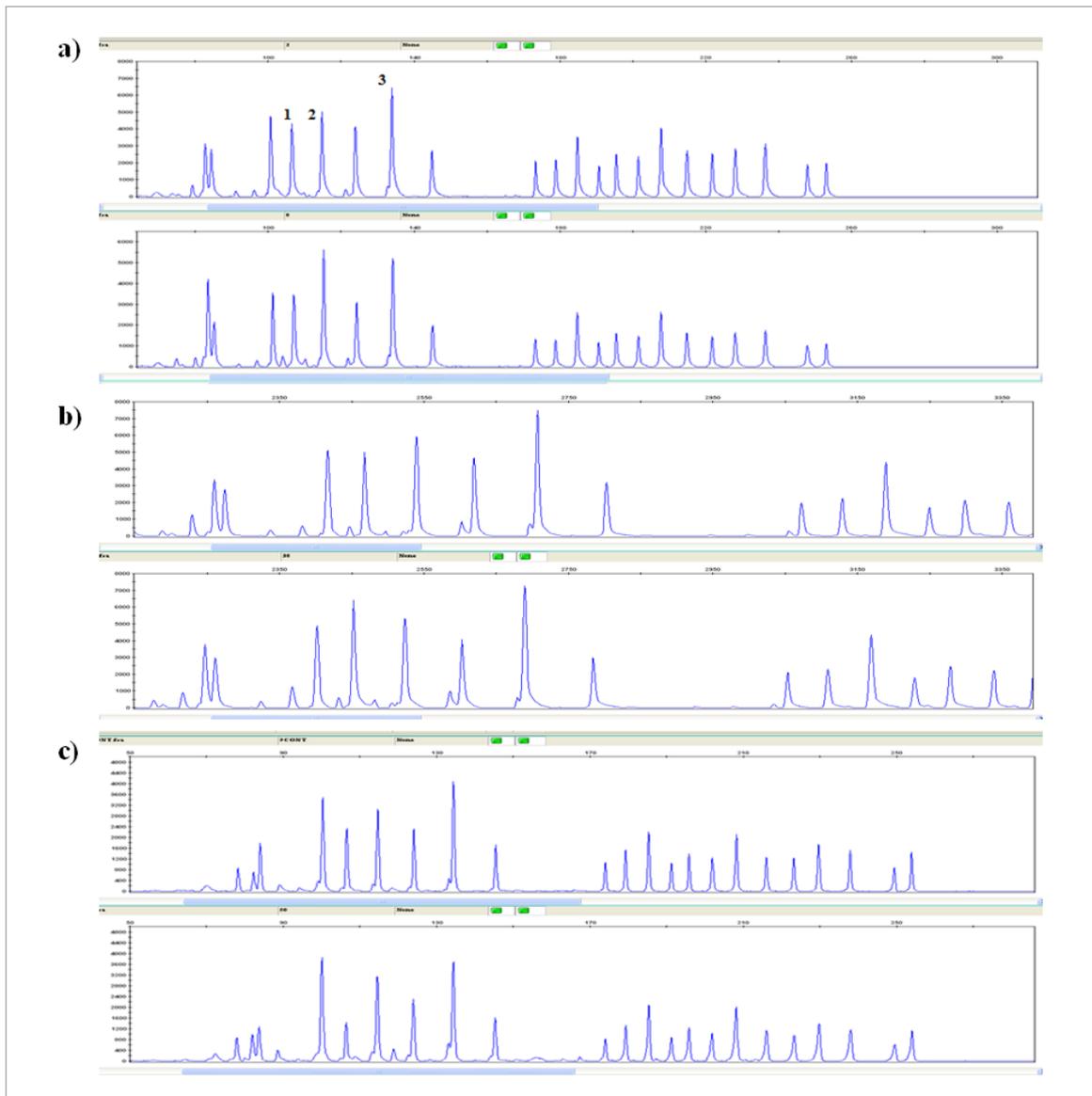
**Figura 21:** Representación de los resultados obtenidos en LCL con el método MLPA y las sondas incluidas. Se representan a modo de ejemplo ilustrativo dos resultados diferentes. De cada apartado (a y b), el electroferograma superior corresponde a una muestra control. La numeración de las sondas creadas se muestra en el gráfico superior del apartado a, siendo la misma en todos los electroferogramas. a) Delección de un alelo registrada en las sondas 2 y 3 en la LCL4. b) Delección completa registrada en las sondas 2 y 3 en la LCL3.

Superada esta primera fase de puesta a punto de la técnica y realizada la comprobación de que efectivamente podíamos detectar CNV con las sondas diseñadas, procedimos a realizar el estudio en un grupo de 60 pacientes con Esclerosis Múltiple, procedentes de la cohorte utilizada para el estudio de asociación del SNP rs11621145 a la enfermedad. La selección se basó en el resultado del genotipo estudiado. Para ello incluimos 20 pacientes con genotipo GG, 20 AG y 20 AA. Los resultados fueron los siguientes: la muestra 20 se eliminó del estudio, por problemas de conservación. Con respecto a las 59 restantes, encontramos CNV en 3 pacientes. En el paciente número 8, con genotipo GG, fue detectada una duplicación de la sonda 2, en el paciente 38, con genotipo AG, cuantificamos una duplicación de la sonda 1, y en el paciente 50, con genotipo AA, fue detectada una delección en la sonda 1 (figura 22). Estos resultados fueron también comprobados al cuantificarlos matemáticamente con el mismo método

explicado anteriormente para las LCL (tabla 24). Además, los datos obtenidos fueron reproducibles y por lo tanto, confirmados.

Nº(Geno tipo)	Z sonda 1 (rs11621145)	Z sonda 2 (rs10136766)	Z sonda 3 (rs2725142)	SONDA 1 (rs11621145)	SONDA 2 (rs10136766)	SONDA 3 (rs2725142)
1(GG)	0,99	1,04	0,98			
2(GG)	0,95	0,93	0,95			
3(GG)	1,17	0,87	1,03			
4(GG)	0,89	0,85	0,95			
5(GG)	0,85	1,03	0,97			
6(GG)	0,93	0,96	0,93			
7(GG)	0,81	1,08	0,92			
8(GG)	1,02	1,40	1,02			DUPLICACIÓN (1 alelo)
9(GG)	0,97	1,06	1,02			
10(GG)	1,15	1,13	1,21			
11(GG)	0,93	0,98	0,91			
12(GG)	0,84	0,93	0,89			
13(GG)	1,09	1,02	1,06			
14(GG)	1,14	1,05	1,04			
15(GG)	0,86	1,00	0,95			
16(GG)	0,80	0,96	0,83			
17(GG)	1,05	0,99	0,98			
18(GG)	0,98	1,00	1,00			
19(GG)	1,15	1,05	1,23			
21(AG)	0,90	0,94	0,89			
22(AG)	0,94	1,01	0,96			
23(AG)	0,88	0,94	0,92			
24(AG)	1,00	1,00	1,00			
25(AG)	1,05	1,00	0,98			
26(AG)	0,95	1,00	0,94			
27(AG)	1,00	1,00	1,00			
28(AG)	0,90	0,98	0,92			
29(AG)	1,22	1,06	1,21			
30(AG)	0,99	1,04	0,96			
31(AG)	1,05	1,03	1,04			
32(AG)	1,02	1,00	0,94			
33(AG)	1,10	1,04	1,14			
34(AG)	0,95	1,31	1,11			
35(AG)	1,09	1,05	1,13			
36(AG)	1,01	0,99	0,98			
37(AG)	1,18	1,00	1,04			
38(AG)	1,40	0,99	1,06			DUPLICACIÓN (1 alelo)
39(AG)	1,23	1,08	1,13			
40(AG)	1,09	1,01	1,02			
41(AA)	1,00	1,00	1,00			
42(AA)	1,06	0,98	1,13			
43(AA)	0,97	0,93	0,94			
44(AA)	0,91	1,02	0,95			
45(AA)	1,05	0,92	1,09			
46(AA)	0,96	1,04	1,09			
47(AA)	0,80	0,98	0,84			
48(AA)	1,03	0,97	1,01			
49(AA)	1,01	0,96	0,93			
50(AA)	0,59	0,98	0,86			DELECCIÓN (1 alelo)
51(AA)	1,00	1,00	1,00			
52(AA)	0,86	1,01	0,94			
53(AA)	0,92	1,06	0,91			
54(AA)	1,00	0,98	0,93			
55(AA)	1,06	1,01	1,05			
56(AA)	0,99	1,05	1,00			
57(AA)	1,02	1,01	0,86			
58(AA)	1,05	1,04	0,99			
59(AA)	1,16	0,99	1,09			
60(AA)	1,16	1,11	1,00			

**Tabla 24:** Resultados del análisis de CNV en 60 pacientes con Esclerosis Múltiple. Se cuantificaron 3 muestras con CNV.



**Figura 22:** Representación de los resultados obtenidos con el método MLPA y las nuevas sondas incluidas, en pacientes de Esclerosis Múltiple. Se representan los dos resultados obtenidos. De cada apartado (a y b), el electroferograma superior corresponde a una muestra control sin CNV. La numeración de las sondas creadas se muestra en el gráfico superior del apartado a, siendo la misma en todos los electroferogramas. a) Duplicación de un alelo registrada en la sonda 2 en el paciente número 8. b) duplicación de un alelo registrado en la sonda 1 en el paciente número 38. c) Delección de un alelo registrada en la sonda 1 en el paciente número 50.

De las 3 CNV detectadas, cada una pertenecía a un paciente de genotipo diferente, no encontrando ninguna CNV asociada a alguno de los genotipos analizados. La falta de poder estadístico, hace que no sea posible poder concluir la relación exacta entre los genotipos y las CNV encontradas.

No obstante, los resultados han mostrado que la técnica posee una alta especificidad y sensibilidad, y que el diseño de sondas sintéticas para incluirlas en los kits comercializados, son una alternativa buena y novedosa.







## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### 1. ASOCIACIÓN DEL HAPLOTIPO DE HLA *DRB1\*1501-DQB1\*0602* COMO COMPONENTE DE MAYOR SUSCEPTIBILIDAD EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La asociación del haplotipo HLA *DRB1\*1501-DQB1\*0602* al riesgo de padecer Esclerosis Múltiple está apoyada bibliográficamente desde la década de los 70, bajo la teoría tradicional que discute el mecanismo patogénico por la presentación específica de antígenos, debida a propiedades estructurales específicas de los receptores. No obstante, esta teoría no explica completamente la asociación con la enfermedad y existen teorías alternativas, como la propuesta por Alcina *et al.*, en la que añaden a la anterior, que los niveles de expresión de los genes DR y DQ sean los responsables del proceso patogénico de la Esclerosis Múltiple (Alcina A, 2012).

La confirmación de la asociación en nuestra cohorte de estudio (procedentes del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla) nos ha permitido comprobar que los pacientes de esta región geográfica siguen las mismas directrices genéticas en lo relativo al sistema HLA, a pesar de sus características étnicas (ver apartado 3.1 de introducción).

Además, mediante análisis de regresión comprobamos que en nuestro grupo de estudio ambos genotipos seguían estando en LD ( $r^2 = 0,47$ ), sin destacar significativamente uno sobre el otro (frecuencias de aparición casi idénticas).

## DISCUSIÓN

En las tablas 25 y 26 se comparan los resultados obtenidos con los de otros trabajos de similares características, publicados en población española, además de la realización de un meta-análisis. Estos estudios coinciden en los resultados de asociación del HLA a Esclerosis Múltiple, no obstante, en el trabajo presentado en esta tesis, los niveles de significación de la asociación son superiores debidos a que el tamaño muestral es mayor. En el meta-análisis realizado se obtuvo como resultado la asociación del genotipo de HLA DRB1\*1501 al riesgo de padecer Esclerosis Múltiple, en la población general y en el género femenino. Con respecto al genotipo *DQB1\*0602* no existen suficientes datos publicados. Nuestros resultados mostraban que la asociación a la susceptibilidad de padecer la enfermedad no era exclusiva de las mujeres, no obstante, los resultados de meta-análisis no apoyan los datos de asociación de DRB1\*1501 al género masculino (tablas 25 y 26 y figuras 23, 24 y 25).

Por otro lado, hemos observado la no dependencia del haplotipo a los diferentes cursos clínicos de la Esclerosis Múltiple. Pese a no existir diferencias significativas entre pacientes con CIS y controles en el genotipo *DRB1\*1501* ( $p= 0,25$ ), la heterogeneidad del número de casos de cada grupo forzó a realizar la comparación entre las formas de Esclerosis Múltiple, resultando negativa cualquier diferencia de genotipos entre ellas. Estos datos sí están en concordancia con otros trabajos (McDonnell GV, 1999) en los que tampoco reportaron diferencias. No obstante, debido a la complejidad que caracteriza a la Esclerosis Múltiple, no siempre resulta sencillo definir el curso clínico de la enfermedad, es por ello que la clasificación de los pacientes en las diferentes formas puede sufrir modificaciones con la evolución y/o revisión de los mismos.

Además, se observa en las tablas que nuestro tamaño muestral es mayor a los demás estudios. El número de muestras elevado nos confiere mayor poder estadístico.

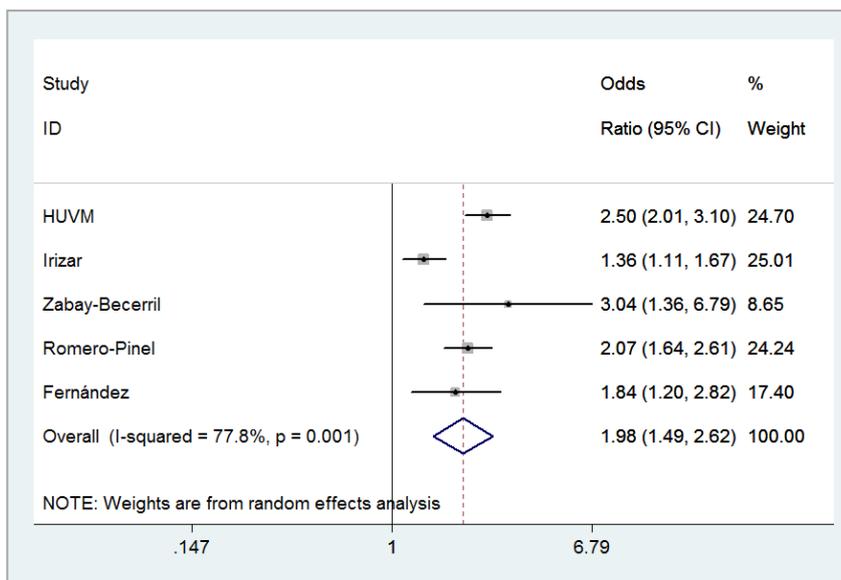
<i>DRB1*1501</i>		EM	CONTROLES	$\chi^2$ (p)	OR (AL 95% IC)
<b>HUVM</b>	TOTAL	575 (28,72%)	1427 (71,28%)	2,58e <sup>-17</sup>	2,50 (2,01-3,10)
	MUJERES	394 (19,68%)	817 (40,81%)	1,41e <sup>-13</sup>	2,68 (2,06-3,50)
	HOMBRES	181 (9,04%)	610 (30,47%)	0,0002	2,03 (1,39-2,96)
<b>Irizar H, 2012</b>	TOTAL	220 (36,07%)	390 (63,93%)	0,004	1,36 (1,11-1,68)
	MUJERES	129 (23,50%)	185 (33,70%)	<0,001	1,66 (1,28-2,15)
	HOMBRES	90 (16,39%)	145 (26,41%)	0,784	0,94 (0,67-1,32)
<b>Zabay-Becerril JM, 2004</b>	TOTAL	42 (28,19%)	107 (71,81%)	0,005	3,04 (1,36-6,79)
	MUJERES	22 (14,77%)	61 (40,94%)	0,0004	6,62 (2,16-2,027)
	HOMBRES	20 (13,42%)	46 (30,87%)	NS	
<b>Romero-Pinel L, 2011</b>	TOTAL	380 (25,89%)	1088 (74,11%)	<0,001	2,07 (1,64-2,60)
	MUJERES				
	HOMBRES				
<b>Fernández O, 2009</b>	TOTAL	200 (50,38%)	197 (49,62%)	0,0052	1,84 (1,20-2,82)
	MUJERES				
	HOMBRES				
<b>Meta-análisis</b>	TOTAL	1417 (30,6%)	3209 (69,4%)	2,245e <sup>-06</sup>	1,98 (1,49-2,62)
	MUJERES	545 (20,2%)	1063 (39,4%)	0,0004	2,49 (1,50-4,13)
	HOMBRES	291 (10,8%)	801 (29,7%)	0,4065	1,38 (0,65-2,92)

**Tabla 25:** Comparación de los valores de asociación del genotipo *DRB1\*1501* entre nuestro trabajo y otros trabajos publicados de similares características. Abreviaturas: EM (Esclerosis Múltiple), OR (Odds ratio), IC (intervalo de confianza), NS (no significación).

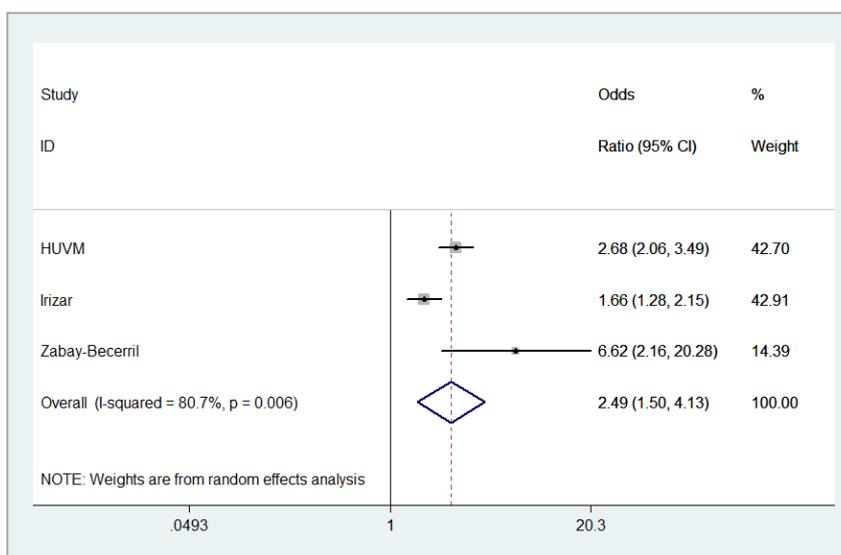
<i>DQB1*0602</i>		EM	CONTROLES	$\chi^2$ (p)	OR (AL 95% IC)
<b>HUVM</b>	TOTAL	575 (28,72%)	1427 (71,28%)	1,14e <sup>-15</sup>	2,41 (1,93-2,99)
	MUJERES	394 (19,68%)	817 (40,81%)	8,97e <sup>-12</sup>	2,51 (1,92-3,29)
	HOMBRES	181 (9,04%)	610 (30,47%)	0,0002	2,07 (1,41-3,03)
<b>Fernández O, 2009</b>	TOTAL	200 (50,38%)	197 (49,62%)	0,025	1,94 (1,26-2,98)
	MUJERES				
	HOMBRES				

**Tabla 26:** Comparación de los valores de asociación del genotipo *DQB1\*0602* entre nuestro trabajo y otro trabajo publicado de similares características. Abreviaturas: EM (Esclerosis Múltiple), OR (Odds ratio), IC (intervalo de confianza).

## DISCUSIÓN

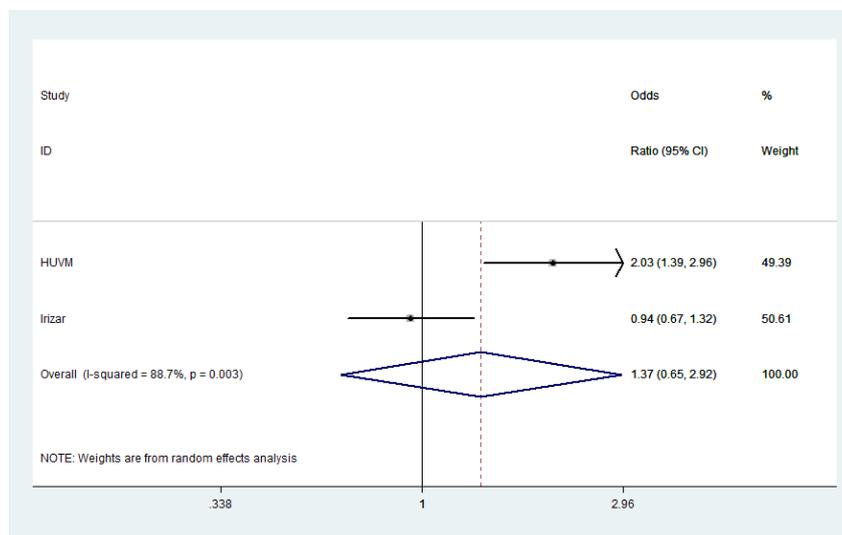


**Figura 23:** Diagrama del meta-análisis del efecto global de DRB1\*1501 asociado con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple en la cohorte del Hospital Universitario Virgen Macarena (HUVM) y en los trabajos revisados sobre población española. Los cuadrados grises representan las estimaciones del efecto para las cohortes individuales, y las líneas horizontales representan los intervalos de confianza del 95% de las estimaciones. El rombo corresponde a la estimación global bajo el modelo de efectos fijos. Valor de p para la estadística Q de Cochran; I cuadrado para el índice de heterogeneidad (0-100).



**Figura 24:** Diagrama del meta-análisis del efecto global de DRB1\*1501 asociado con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple en la cohorte femenina del Hospital Universitario Virgen Macarena (HUVM) y en los trabajos revisados sobre población española. Los cuadrados grises representan las estimaciones del efecto para las cohortes individuales, y las líneas horizontales

representan los intervalos de confianza del 95% de las estimaciones. El rombo corresponde a la estimación global bajo el modelo de efectos fijos. Valor de p para la estadística Q de Cochrane; I cuadrado para el índice de heterogeneidad (0-100).



**Figura 25:** Diagrama del meta-análisis del efecto global de DRB1\*1501 asociado con la susceptibilidad a padecer Esclerosis Múltiple en la cohorte masculina del Hospital Universitario Virgen Macarena (HUVVM) y en los trabajos revisados sobre población española (sólo existen datos en Irizar et al.). Los cuadrados grises representan las estimaciones del efecto para las cohortes individuales, y las líneas horizontales representan los intervalos de confianza del 95% de las estimaciones. El rombo corresponde a la estimación global bajo el modelo de efectos fijos. Valor de p para la estadística Q de Cochrane; I cuadrado para el índice de heterogeneidad (0-100).

## 2. EL GEN *KCNJ10* Y LA PRODUCCIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los resultados de la secuenciación del gen *KCNJ10* en pacientes de Esclerosis Múltiple indican que no existe ninguna variante que se asocie con la enfermedad, aunque no pudimos ver si la variante rs1130183 descrita en este trabajo tenga alguna

## DISCUSIÓN

relación con la producción de autoanticuerpos descrita en pacientes de Esclerosis Múltiple.

La proteína KIR4.1 es indispensable para mantener el gradiente electroquímico de los astrocitos perisinápticos, es por ello que los pacientes de Esclerosis Múltiple con anticuerpos anti-KIR4.1 podrían ver disminuidos los niveles de la proteína en las células gliales y alterar la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) en astrocitos, posiblemente a través de la activación del complemento en los sitios de expresión de KIR4.1. También es posible que los anticuerpos interfieran con el canal de KIR4.1, perturbando el tampón de potasio y la homeostasis del neurotransmisor, y produciendo como consecuencia la lesión de tejidos (Srivastava R, 2012).

Por otro lado, el gen *KCNJ10* tiene funciones claves en otras patologías, como por ejemplo en las epilepsias idiopáticas generalizadas, donde ha sido asociada la misma variante (Buono RJ, 2004; Lenzen KP, 2005), o en el Síndrome EAST, donde existen descritas dos mutaciones con cambio de sentido, responsables en último término de la clínica (Bockenbauer D, 2009).

La falta de consenso a la hora de asociar la producción de autoanticuerpos en pacientes de Esclerosis Múltiple para la proteína KIR4.1 (Srivastava R, 2012; Brickshawana A, 2014; Nerrant E, 2014) imposibilita la inclusión definitiva de este mecanismo autoinmune dentro de la patogenia de la enfermedad.

El estudio de la secuencia del gen *KCNJ10* en los pacientes de Esclerosis Múltiple tenía como objetivo aclarar el posible mecanismo bajo el que se producen los autoanticuerpos. Dado que no encontramos asociación entre la variante y la enfermedad, apuntamos a que el mecanismo por el que se producen los anticuerpos podría ser independiente a la existencia de la variante.

### **3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A ESCLEROSIS MÚLTIPLE POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS**

Existen descritos diferentes mecanismos moleculares en los procesos neurodegenerativos asociados con los complejos proteína-HDACs que actúan sobre la expresión génica y la apoptosis neuronal, con la proliferación de las células inmunes como consecuencia (Belyaev ND, 2004; Romm E, 2005).

De hecho, el papel neuroprotector de los HDACs parece extenderse en enfermedades como la Esclerosis Múltiple, que comparte mecanismos de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis neuronal (Gray SG, 2006). El alto potencial terapéutico que se describe asociado a los HDACs en Esclerosis Múltiple es debido a la disminución de los efectos inflamatorios (Dasgupta S, 2003; Camelo S, 2005; Zhang Z, 2012; Ge Z, 2013), efectos que son muy amplios y reflejan una acción combinada de mecanismos de transcripción que convergen en la interfaz de la supervivencia, diferenciación o la activación celular (Gray SG, 2006).

El NaPB y el VPA fueron seleccionados para estos estudios por sus efectos neuroprotectores y antiinflamatorios en EAE y porque su interés actualmente está creciendo en otras patologías, tal y como se ha descrito previamente (ver material y métodos, apartado 4.2).

En primer lugar, no hemos podido revelar si el NaPB juega o no un papel en los genes estudiados, ya que no hemos detectado modificación alguna en la expresión génica.

## DISCUSIÓN

Con respecto al VPA, hemos mostrado que modifica el patrón de expresión de algunos de estos genes inmunológicos, exclusivo de los pacientes con Esclerosis Múltiple. Estos resultados tienden a implicar que el VPA actúe dentro del ambiente inflamatorio del proceso de la enfermedad y no en estado de reposo, es decir, libre de patología inflamatoria. No obstante, el papel que ejerce no está claro, debido a que el VPA no modificó la producción de ROS, y el estrés oxidativo es una característica fundamental en el proceso degenerativo asociado a la inflamación en Esclerosis Múltiple (Miller E, 2013).

Llegados a este punto, es importante señalar que en este trabajo hemos tenido dos dificultades importantes: la primera de ellas era que no teníamos suficiente poder estadístico para determinar el efecto exacto de estos compuestos en los PBMCs de los pacientes de Esclerosis Múltiple, ya que el tamaño muestral con el que se ha trabajado ha sido pequeño. Este efecto se puede comprobar en los resultados, ya que pese a encontrar una activación clara del VPA en PBMCs de pacientes, las diferencias de expresión entre pacientes y controles no resultaron significativas, y que con un mayor número de muestras, los errores de variabilidad biológica se hubieran minimizado y la diferencia entre controles y pacientes hubiera sido detectada.

El principal motivo por el que hemos tenido dificultades para reclutar a un gran número de pacientes con Esclerosis Múltiple en un período corto de tiempo se debe a que los requeríamos sin ningún tipo de tratamiento que pudiese modificar la maquinaria inmunológica natural del proceso. Con este propósito, el protocolo seguido fue el de la recolección de sangre de pacientes bajo sospecha de Esclerosis Múltiple que se sometieran a las pruebas diagnósticas, y que, una vez obtuvimos los resultados, se eliminaron los datos de todos aquellos que no fueron diagnosticados de Esclerosis Múltiple.

El tiempo empleado en la recolección y procesado de muestras duró aproximadamente un año, ya que desde que se recoge la muestra hasta que podemos acceder a los resultados de diagnóstico, pasan meses, es por ello que hubo que procesar todas las muestras por igual, de una forma inmediata, para evitar la degradación de la muestra, y realizamos la cuantificación a un total de 56 pacientes que se encontraban bajo sospecha, de los que sólo 21 fueron diagnosticados pacientes de Esclerosis Múltiple, y de esos, 2 hubo que eliminarlos del estudio por problemas metodológicos.

Con los 35 pacientes que no tenían Esclerosis Múltiple se intentó hacer el estudio estadístico para ver si existía algún tipo de diferencias en la expresión de los genes de estudio. El inconveniente para la realización de la comparación fue que no teníamos un grupo homogéneo (algunos tenían otro tipo de enfermedad desmielinizante, y otros con enfermedades no inflamatorias tipo cefaleas o incluso ictus), lo que imposibilitó continuar con el estudio de estos, ya que era muy difícil hacer subdivisiones sin que disminuyera drásticamente el número de muestras en cada grupo, y con ello, los cálculos comparativos eran inviables.

El segundo inconveniente con el que nos encontramos fue que sólo hemos estudiado 7 genes asociados a Esclerosis Múltiple. Actualmente hay descritos más de 100, número que resulta imposible cuantificar por qPCR, ya que necesitaríamos mucho más tiempo de trabajo que el necesario para realizar una tesis doctoral, sin olvidar el coste que necesitaría.

Otras alternativas a la cuantificación por qPCR serían la de realizar la cuantificación con la técnica RT-MLPA, que por falta de experiencia y tiempo fue descartada, o la cuantificación a través de microarrays.

## DISCUSIÓN

Un ejemplo real de trabajos similares con microarrays lo encontramos en uno realizado por Zhang *et al.* en 2012, en el que reportó el aumento de la expresión de 445 genes y la disminución de 183 genes en la línea celular K562 (Zhang XZ, 2012). No obstante, este tipo de trabajos no llegan a ser fáciles de interpretar, ya que la apreciación de los mecanismos en una amplia regulación de genes es compleja; debido a que hay una gran cantidad de mecanismos *cis* y *trans* asociados a estos procesos y que no podemos controlar en un cultivo celular.

Otro punto de interés a abordar en esta discusión es que los genes que hemos estudiado están asociados con diferentes enfermedades autoinmunes por estudios de GWAS (ver tabla 27). A pesar de que los SNPs asociados no son los mismos, sería muy interesante poder replicar el estudio con pacientes de otras enfermedades autoinmunes, para estudiar si los SNPs tienen funciones específicas, ya sea en la regulación epigenética de los procesos o en el desarrollo de las enfermedades, o si hay un mecanismo de acción común en todos ellos.

GEN	OTRAS ENFERMEDADES CON DIFERENTES POLIMORFISMOS ASOCIADOS EN EL MISMO GEN
<i>IL2RA</i>	Enfermedad de Crohn, Artritis idiopática juvenil, Colangitis esclerosante primaria, Alopecia Areata, Artritis reumatoide, Enfermedad del tiroides autoinmune, Diabetes tipo I y Enfermedad inflamatoria del intestino
<i>IL7RA</i>	Cirrosis biliar primaria y colitis ulcerosa
<i>CD6</i>	Enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa
<i>TNFRSF1A</i>	Espondilitis anquilosante y Cirrosis biliar primaria
<i>UBAC2</i>	Enfermedad de Crohn, Diabetes tipo I, Colitis Ulcerosa y enfermedad inflamatoria del intestino
<i>PTGER4</i>	Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa
<i>ROR<math>\gamma</math></i>	Enfermedad de Crohn, Diabetes tipo I, Colitis Ulcerosa y enfermedad inflamatoria del intestino

**Tabla 27:** *Enfermedades autoinmunes asociadas por mecanismos de GWAS a los genes estudiados* (Datos procedentes de la base de datos ImmunoBase).

Es por ello, que dejamos este capítulo abierto, con la idea de poder ampliarlo en un futuro cercano, para poder demostrar que el componente genético de susceptibilidad a desarrollar la Esclerosis Múltiple se encuentra bajo la influencia de mecanismos epigenéticos.

#### **4. EL *LOCUS* DE LA CADENA PESADA DE LA INMUNOGLOBULINA G Y SU IMPORTANCIA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Queriendo indagar en los mecanismos genéticos asociados a los procesos inmunológicos en Esclerosis Múltiple, estudiamos el *locus* IGHC. Estos estudios surgieron a partir del trabajo que publicaron Buck *et al.* en el año 2013, en el que asoció 5 SNPs localizados en dicho *locus* al I. IgG en pacientes con Esclerosis Múltiple.

De los SNPs asociados, 4 de ellos se encontraban en desequilibrio HW en los datos provenientes de la población caucásica del proyecto 1000 Genomas, es por ello que nos decidimos a profundizar en el 5°, el rs11621145, que sí se encontraba en equilibrio HW. Posiblemente la ausencia de equilibrio HW en estos 4 SNPs sea debida a que las líneas celulares empleadas en los estudios del proyecto 1000 Genomas son líneas linfoblastoides inmortalizadas con el EBV. En los linfocitos de origen ya se habrían producido el cambio de isotipo y por lo tanto deleccionado regiones del *locus* IGHC. Esto explica también que se tenga poca información de las variantes de esta región y que este *locus* esté tan pobremente representado en los estudios de GWAS.

## DISCUSIÓN

En nuestros estudios hemos confirmado los resultados descritos por Buck *et al.* de asociación de la variante al I. IgG en los pacientes. Además se ha asociado el polimorfismo a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple (asociación que no encontraron Buck *et al.* en su cohorte de pacientes), al I. IgM y a las BOC de IgM.

Los efectos opuestos observados en la asociación entre los índices de IgG e IgM y el SNP, junto con la localización del polimorfismo en el *locus* IGHC, apuntan a una alteración en el equilibrio de la respuesta inmune innata y a la asociada a linfocitos T como causa final de la asociación.

Por un lado, en la respuesta inmune mediada por linfocitos T, los linfocitos B IgM cambian de clase a IgG, IgA o IgE por inmunización o infección (Stavnezer J, 2008). Este fenómeno ocurre por recombinación en las regiones “S”, localizadas proximalmente a cada gen del fragmento constante de la cadena pesada (figura 7). Este proceso es dirigido por citoquinas que inducen la transcripción desde promotores localizados aguas arriba de cada aceptor de la región S.

Se han descrito elementos cis-reguladores dentro del *locus* IGHC que participan en la regulación de la expresión génica y del cambio de isotipo. Además, diversos experimentos con ratones *knock-out* han demostrado la importancia de la transcripción génica de la cadena pesada para un cambio eficiente de isotipo (Jung S, 1993; Zhang J, 1993; Oruc Z, 2007). De hecho, polimorfismos humanos de la región reguladora, localizada en el extremo 3' del *locus* IGHC regulan la transcripción de las cadenas pesadas, con lo que potencian los cambios de isotipo (Hu Y, 2000). De hecho un polimorfismo localizado en la región 3' del locus de los genes IGHC se asocia con la deficiencia selectiva de IgA (una inmunodeficiencia común primaria) y con efectos en las concentraciones de IgM. Es por ello que el estudio de los polimorfismos de esta

región en las enfermedades humanas es una herramienta útil para investigar la función de estas regiones reguladoras que confieren las características inmunes (Giambra V, 2009).

Por otro lado, tenemos que anotar que la asociación entre el I. Ig y el SNP rs11621145 sólo ocurre en Esclerosis Múltiple, y no en otras enfermedades no inflamatorias. Es decir, que parece ser que el efecto del polimorfismo está condicionado por la enfermedad.

Una explicación la podríamos dar a través del ambiente inflamatorio del cerebro en los pacientes de Esclerosis Múltiple, que podría ser en último término el causante de los efectos observados, ya que, como se ha explicado anteriormente, las citoquinas (producidas por los linfocitos Th y las APC) determinan el isotipo en el cuál los linfocitos B podrían cambiar de clase, induciendo la transcripción de los promotores localizados cerca de las regiones “S”.

Los promotores para los 4 IGHC están diferencialmente regulados, es decir, no responden de igual forma a los estímulos. De hecho, existen diversos trabajos que apuntan a la producción de isotipos específicos de IgG en LCR de pacientes de Esclerosis Múltiple (Salier JP, 1981; Goust JM, 1984). Es por ello que el perfil de las citoquinas producidas en el cerebro de estos pacientes podría inducir el cambio de clase, y su proceso podría estar alterado por el polimorfismo.

En nuestros resultados hemos asociado el SNP a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple. Buck *et al.* no lo asoció, pero sus datos son compatibles con los nuestros. Además tampoco ha sido asociado en estudios de GWAS, debido a que las variantes del *locus* IGHC no han sido bien capturadas en estos trabajos.

## DISCUSIÓN

En nuestros resultados también hemos observado que el alelo minoritario de la variante, “G”, tiene un efecto protector, es decir, que los individuos homocigotos para “AA” son los que tienen más riesgo de desarrollar Esclerosis Múltiple, además de estar asociado el alelo “A” a tener un alto I. IgM y BOC de IgM y un bajo I. IgG.

Podríamos pensar que como “A” es el alelo mayoritario, la función basal podría estar asociada con este alelo, y los individuos que portasen “G”, podrían haber adquirido un ratio mayor de cambio de isotipo. No obstante esta teoría se descarta debido a que el alelo A es casi inexistente en la población africana.

Es por ello que, ya que se desconoce la causa última del efecto de la variante, podríamos pensar que el polimorfismo fue adquirido en la evolución humana más reciente y fue conservado en la población no africana.

La razón última por la que estos efectos en los índices intratecales y en las BOC de IgM pueden contribuir al riesgo de padecer Esclerosis Múltiple no está clara. Sin embargo, el isotipo de anticuerpo es importante para determinar las funciones efectoras de los mismos. La región CH está unida a los receptores FC en muchos tipos celulares. Diferentes regiones CH poseen diferentes afinidades por estas proteínas, por eso, está muy influenciada por la función y determinación si el complejo antígeno-anticuerpo pudiese activar a las células.

Estudios clínicos y patológicos implican mecanismos dependientes de anticuerpos en la inmunopatogénesis de la Esclerosis Múltiple. Por lo tanto, algún efecto en el isotipo de los anticuerpos pueden afectar a la susceptibilidad de padecer Esclerosis Múltiple.

Por último, con el fin de explorar deleciones o inserciones en el locus como las posibles causas de la asociación de las variantes con los efectos descritos con las IGs, nos decidimos a cuantificar las CNV.

La técnica MLPA<sup>®</sup> ha resultado ser idónea para este tipo de cuantificaciones, y el diseño de sondas específicas de las regiones de interés ha permitido de una manera sencilla y no muy costosa alcanzar los objetivos propuestos, con la posibilidad de ampliar la técnica a otras regiones y poder mapear más zonas del *locus*.

Sin embargo, las CNV encontradas no parecían estar relacionadas con el SNP analizado aunque no podemos descartar totalmente esta posibilidad debido al discreto número de pacientes analizados y la baja frecuencia de estas CNVs.







## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. El haplotipo de HLA *DRB1\*1501-DQB1\*0602* está asociado al riesgo de padecer Esclerosis Múltiple en la cohorte de pacientes del Hospital Universitario Virgen Macarena, siguiendo la tendencia general como locus que aporta mayor susceptibilidad, sin que ninguna de las dos variantes por separado predomine con respecto a la otra. Esta no es exclusiva de género ni de curso clínico de la enfermedad.
2. *KCNJ10* es un gen muy conservado, donde a lo largo de su secuencia se ha detectado una sola variante (rs1130183). Esta variante no está asociada a Esclerosis Múltiple.
3. El VPA modifica el patrón de expresión de genes inmunológicos asociados a Esclerosis Múltiple bajo el ambiente inflamatorio de la enfermedad. El mecanismo exacto por el cual ejerce esta acción no está aclarado.
4. El alelo G del polimorfismo rs11621145, localizado en el *locus* IGHC, está asociado a Esclerosis Múltiple, bajo un efecto protector. Este alelo se asocia también a valores altos de I. IgG, bajos de I.IgM y a la ausencia de BOC para IgM, lo que apunta a un efecto del polimorfismo en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas como la causa de la asociación con la enfermedad.
5. El diseño de sondas para cuantificar CNV en el locus IGHC mediante MLPA<sup>®</sup> ha permitido la detección de CNV en pacientes de Esclerosis Múltiple,

## CONCLUSIONES

comprobándose el buen funcionamiento de la técnica para poder ser aplicada en otros estudios de biología molecular.





**BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

**BIBLIOGRAFÍA****A**

Agrawal SM, Yong VW. (2007) Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* **79**, 99-126

Alcina A, Abad-Grau MDM, Fedetz M, Izquierdo G, Lucas M, Fernández O, Ndagire D, Catalá-Rabasa A, Ruiz A, Gayán J, Delgado C, Arnal C, and Matesanz F. (2012) Multiple sclerosis risk variant HLA-DRB1\*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations. *PLoS One* **7**, p. e29819

Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, Gery I, Lee YS, and Egwuagu CE. (2007) TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* **13**, 711-718

Ambrosio B, Dugoujon JM, Hernández C, De La Fuente D, González-Martín A, Fortes-Lima CA, Novelletto A, Rodríguez JN, Calderón R. (2010) The Andalusian population from Huelva reveals a high diversification of Y-DNA paternal lineages from haplogroup E: Identifying human male movements within the Mediterranean space. *Ann Hum Biol* **37**, 86-107

Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C. (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression *in vitro*: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* **12**, 59-65

Arnason BG. (1999) Immunologic therapy of multiple sclerosis. *Annu Rev Med* **50**, 291-302

Arnold P, Mojumder D, Detoledo J, Lucius R, Wilms H. (2014) Pathophysiological processes in multiple sclerosis: focus on nuclear factor erythroid-2-related factor 2 and emerging pathways. *Clin Pharmacol* **24**, 35-42

Ascherio A, Munger KL. (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. *Ann Neurol* **61**, 504-513

**B**

Balashov KE, Comabella M, Ohashi T, Khoury SJ, Weiner HL. (2000) Defective regulation of IFN $\gamma$  and IL-12 by endogenous IL-10 progressive MS. *Neurology* **55**, 192-198

Baranzini SE, Jeong MC, Butunoi C, Murray RS, Bernard CC, Oksenberg JR. (1999) B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol* **163**, 5133-5144

## BIBLIOGRAFÍA

Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, Erlich HA, Klitz W. (1992) Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol* **148**, 249-258

Bhalla K, List A. (2004) Histone deacetylase inhibitors in myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol* **17**, 595-611

Bjartmar C, Trapp BD. (2001) Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: Mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* **14**, 271-278

Belyaev ND, Wood IC, Bruce AW, Street M, Trinh JB, Buckley NJ. (2004) Distinct RE1 silencing transcription factor-containing complexes interact with different target genes. *J Biol Chem* **279**, 556-561

Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc Ser B* **57**, 289-300

Biomarkers Definitions Working Group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **69**, 89-95

Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21

Bockenbauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold M, Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Landouere G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klootwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahl WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R. (2009) Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med* **360**, 1960-1970

Borkosky SS, Whitley C, Kopp-Schneider A, zur Hausen H, de Villiers EM. (2012) Epstein-Barr virus stimulates torque teno virus replication: a possible relationship to multiple sclerosis. *PLoS One* **7**, e32160

Bove R, Chitnis T. (2014) The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis. *Mult Scler* **20**, 520-526

Bö L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mörk SJ. (2003) Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 723-732

Bö L, Geurts JJ, Mörk SJ, van der Valk P. (2006) Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* **183**, 48-50

Brickshawana A, Hinson SR, Romero MF, Lucchinetti CF, Guo Y, Buttmann M, McKeon A, Pittock SJ, Chang MH, Chen AP, Kryzer TJ, Fryer JP, Jenkins SM, Cabre P, Lennon VA. (2014) Investigation of the KIR4.1 potassium channel as a putative antigen in patients with multiple sclerosis: a comparative study. *Lancet Neurol* **13**, 795-806

Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Pierre Y, Renaudineau Y. (2010) Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun* **34**, 207-219

Brusilow SW. (1991) Phenylacetylglutamine may replace urea as a vehicle for waste nitrogen excretion. *Pediatr Res* **29**, 147-150

Buck D, Albrecht E, Aslam M, Goris A, Hauenstein N, Jochim A, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium, Cepok S, Grummel V, Dubois B, Berthele A, Lichtner P, Gieger C, Winkelmann J, Hemmer B. (2013) Genetic variants in the immunoglobulin heavy chain *locus* are associated with the IgG index in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **73**, 86-94

Buono RJ, Lohoff FW, Sander T, Sperling MR, O'Connor MJ, Dlugos DJ, Ryan SG, Golden GT, Zhao H, Scattergood TM, Berrettini WH, Ferraro TN. (2004) Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility. *Epilepsy Res* **58**, 175-183

Burgoon MP, Gilden DH, Owens GP. (2004) B cells in multiple sclerosis. *Front Biosci* **9**, 786-796

## C

Caballero A, Alvéz-León S, Papais-Alvarenga R, Fernández O, Navarro G, Alonso A. (1999) DQB1\*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens* **54**, 524-526

Caiafa P, Zampieri M. (2005) DNA Methylation and Chromatin Structure: The Puzzling CpG Islands. *J Cell Biochem* **94**, 257-265

Calabrese JR, Delucchi GA. (1989) Phenomenology of rapid cycling manic depression and its treatment with valproate. *J Clin Psychiatry* **50**, Suppl: 30-44

Camelo S, Iglesias AH, Hwang D, Due B, Ryu H, Smith K, Gray SG, Imitola J, Duran G, Assaf B, Langley B, Khoury SJ, Stephanopoulos G, De Girolami U, Ratan RR, Ferrante RJ, Dangond F. (2005) Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **164**, 10-21

Castro-Borrero W, Graves D, Frohman TC, Flores AB, Hardeman P, Logan D, Orchard M, Greenberg B, Frohman EM. (2012) Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review. *Ther Adv Neurol Disord* **5**, 205-220

Celius EG, Harbo HF, Egeland T, Vartdal F, Vandvik B, Spurkiand A. (2000) Sex and age at diagnosis are correlated with the HLA-DR2, DQ6 haplotype in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **178**, 132-135

Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, Sommer N, Hartung HP, Hemmer B. (2005) Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain* **128**, 1667-1676

Champagne FA. (2010) Epigenetic influence of social experiences across the lifespan. *Dev Psychobiol* **52**, 299-311

Chen L, Coleman R, Leang R, Tran H, Kopf A, Walsh CM, Sears-Kraxberger I, Steward O, Macklin WB, Loring JF, Lane TE. (2014) Human Neural Precursor Cells Promote Neurologic Recovery in a Viral Model of Multiple Sclerosis. *Stem Cell Rep* **2**, 825-837

## BIBLIOGRAFÍA

Cinčárová L, Zdráhal Z, Fajkus J. (2013) New perspectives of valproic acid in clinical practice. *Expert Opin Investig Drugs* **22**, 1535-1547

Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Wekerle H. (2005) *McAlpine's Multiple Sclerosis*, 4th Edition, Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia.

Compston A, Coles A. (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* **372**, 1502-1517

Constantinescu CS, Gran B. (2014) The essential role of t cells in multiple sclerosis: A reappraisal. *Biomed J* **37**, 34-40

Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ, Broadley S, Scott RJ, Booth DR, Lechner-Scott J, ANZgene MSGC. (2010) MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS ONE* **5**:e12132

Cree BA. (2014) Multiple sclerosis genetics. *Handb Clin Neurol* **122**, 193-209

## D

Daneman R, Rescigno M. (2009) The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different? *Immunity* **31**, 722-735

Dasgupta S, Zhou Y, Jana M, Banik NL, Pahan K. (2003) Sodium phenylacetate inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice at multiple steps. *J Immunol* **170**, 3874-3882

De Andrés C. (2001) Implicaciones inmunoneuroendocrinas en la patogenia de la esclerosis múltiple. *Cuadernos de Esclerosis Múltiple* **8**, 24-33

De Andrés C. (2003) The interest of multiple sclerosis attacks. Physiopathology and therapy. *Rev Neurol* **36**, 1058-1064

Deshmukh VA, Tardif V, Lyssiotis CA, Green CC, Kerman B, Kim HJ, Padmanabhan K, Swoboda JG, Ahmad I, Kondo T, Gage FH, Theofilopoulos AN, Lawson BR, Schultz PG, and Lairson LL. (2013) A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature* **502**, 327-332

Dieker J, Muller S. (2010) Epigenetic histone code and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* **39**, 78-84

Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV. (2012) The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* **78**, 823-832

Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin LS, McCarthy KD. (2007) Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* **27**, 11354-11365

Dunn JJ, Studier FW. (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J Mol Biol* **166**, 477-535

Duquette P. (2002) Hormonal factors in multiple sclerosis. *MSJ* **9**, 17-25

## E

Ebers GC, Dymment DA. (1998) Genetics of multiple sclerosis. *Semin Neurol* **18**, 295-299.

Edwards LJ, Robins RA, Constantinescu CS (2010) Th17/Th1 phenotype in demyelinating disease. *Cytokine* **50**, 19-23

Eshleman AJ, Henningsen R, Neve K, and Janowsky A. (1994) Release of dopamine via the human transporter. *Mol Pharmacol* **45**, 312-316

## F

Faraco G, Cavone L, Chiarugi A. (2011) The therapeutic potential of HDAC inhibitors in the treatment of multiple sclerosis. *Mol Med* **17**, 442-447

Farez MF, Quintana FJ, Gandhi R, Izquierdo G, Lucas M, Weiner HL. (2009) Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE. *Nat Immunol* **10**, 958-964

Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, Quintana FJ, Correale J. (2014) Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (versión online)

Feng D, Wu J, Tian Y, Zhou H, Zhou Y, Hu W, Zhao W, Wei H, Ling B, Ma C. (2013) Targeting of Histone Deacetylases to Reactivate Tumour Suppressor Genes and Its Therapeutic Potential in a Human Cervical Cancer Xenograft Model. *Najbauer J, ed. PLoS One* **8**, e80657

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

Fernández-Fernández O, Alvarez-Cermeño JC, Arbizu-Urdiain T, Arroyo-González R, Arnal-García C, Casanova-Estruch B, Calles-Hernández MC, Coret-Ferrer F, Comabella M, García-Merino JA, de Las Heras V, Izquierdo G, Meca-Lallana JE, Muñoz-García D, Olascoaga J, Oreja-Guevara C, Prieto JM, Rodríguez-Antigüedad A, Tintoré M, Montalban X; Grupo Post-ECTRIMS. (2011) Revisión de las novedades presentadas en el XXVI Congreso del Comité Europeo para el Tratamiento e Investigación en Esclerosis Múltiple (ECTRIMS) (I). *Rev Neurol* **52**, 227-238

Fernández O, Arroyo-González R, Rodríguez-Antigüedad A, García-Merino JA, Comabella M, Villar LM, Izquierdo G, Tintoré M, Oreja-Guevara C, Álvarez-Cermeño

## BIBLIOGRAFÍA

JC, Meca-Lallana JE, Prieto JM, Ramió-Torrentà L, Martínez-Yélamos S, Montalban X. (2013) Biomarcadores en esclerosis múltiple. *Rev Neurol* **56**, 375-390

Filippi M, Rocca MA, Lassmann H. (2014) KIR4.1: another misleading expectation in multiple sclerosis? *Lancet Neurol* **13**, 753-755

Filippini G, Brusafferri F, Sibley WA, Citterio A, Ciucci G, Midgard R, Candelise L. (2000) Corticosteroids or ACTH for acute exacerbations in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* **4**, CD001331

Fogdell A, Hillert J, Sachs C, and Olerup O. (1995) The multiple sclerosis- and narcolepsy-associated HLA class II haplotype includes the DRB5\*0101 allele. *Tissue Antigens* **46**, 333-336

Frohman EM, Filippi M, Stuve O, Waxman SG, Corboy J, Phillips JT, Lucchinetti C, Wilken J, Karandikar N, Hemmer B, Monson N, De Keyser J, Hartung H, Steinman L, Oksenberg JR, Cree BAC, Hauser S, Racke MK (2005) Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis. Evidence and new hypotheses for future directions. *Archives of Neurology* **62**, 1345-1356

## G

Garg A, Balthasar JP. (2009) Investigation of the influence of FcRn on the distribution of IgG to the brain. *AAPS J* **11**, 553-557

Ge Z, Da Y, Xue Z, Zhang K, Zhuang H, Peng M, Li Y, Li W, Simard A, Hao J, Yao Z, Zhang R. (2013) Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, suppresses dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol* **241**, 56-66

Giambra V, Cianci R, Lolli S, Mattioli C, Tampella G, Cattalini M, Kilic SS, Pandolfi F, Plebani A, Frezza D. (2009) Allele \*1 of HS1.2 enhancer associates with selective IgA deficiency and IgM concentration. *J Immunol* **183**, 8280-8285

Goust JM and Salier JP. (1984) Imbalance in recruitment of IgG (Gm) allotype-producing B-cell subsets from blood to brain in multiple sclerosis. *Cell Immunol* **88**, 551-557

Gray SG, Ekström TJ. (2001) The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* **262**, 75-83

Gray SG, Dangond F. (2006) Rationale for the Use of Histone Deacetylase Inhibitors as a Dual Therapeutic Modality in Multiple Sclerosis. *Epigenetics* **1**, 67-75

Gurvich N, Klein PS. (2002) Lithium and valproic acid: parallels and contrasts in diverse signaling contexts. *Pharmacol Ther* **96**, 45-66

**H**

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**, 32-42

Hackett C, Knight J, Mao-Draayer Y. (2014) Transplantation of Fas-deficient or wild-type neural stem/progenitor cells (NPCs) is equally efficient in treating experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Am J Transl Res* **6**, 119-128

Handel AE, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan SV. (2010) Genetic and environmental factors and the distribution of multiple sclerosis in Europe. *Eur. J. Neurol.* **17**, 1210-1214

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, and Weaver CT. (2005) Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-1132

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH; HERMES Trial Group. (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* **358**, 676-688

Hauser SL, Chan JR, Oksenberg JR. (2013) Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Ann Neurol* **74**, 317-327

Hemmer B, Hartung HP. (2007) Toward the development of rational therapies in multiple sclerosis: what is on the horizon? *Ann Neurol* **62**, 314-326

Hernández CL, Reales G, Dugoujon JM, Novelletto A, Rodríguez JN, Cuesta P, Calderón R. (2014) Human maternal heritage in Andalusia (Spain): its composition reveals high internal complexity and distinctive influences of mtDNA haplogroups U6 and L in the western and eastern side of region. *BMC Genet* **15**, 11

Hoffjan S and Akkad DA. (2010) The genetics of multiple sclerosis: An update 2010. *Mol Cell Probes* **24**, 237-243

Hohlfeld R. (1999) Therapeutic strategies in multiple sclerosis. *J Immunotherapy Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1697-1710

Ho PP, Kanter JL, Johnson AM, Srinagesh HK, Chang EJ, Purdy TM, van Haren K, Wikoff WR, Kind T, Khademi M, Matloff LY, Narayana S, Hur EM, Lindstrom TM, He Z, Fiehn O, Olsson T, Han X, Han MH, Steinman L, Robinson WH. (2012) Identification of naturally occurring fatty acids of the myelin sheath that resolve neuroinflammation. *Sci Transl Med* **4**, 137ra73

Hu Y, Pan Q, Pardali E, Mills FC, Bernstein RM, Max EE, Sideras P, Hammarström L. (2000) Regulation of germline promoters by the two human Ig heavy chain 3' alpha enhancers. *J Immunol* **164**, 6380-6386

## BIBLIOGRAFÍA

Hughes-Fulford M, Sugano E, Schopper T, Li CF, Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A. (2005) Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell Signal* **17**, 1111-1124

## I

Iannitti T, Palmieri B. (2011) Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate. *Drugs R D* **11**, 227-249

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* **476**, 214-219.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* **45**, 1353-1360

Irizar H, Muñoz-Culla M, Zuriarrain O, Goyenechea E, Castillo-Triviño T, Prada A, Saenz-Cuesta M, De Juan D, Lopez de Munain A, Olascoaga J and Otaegui D. (2012) HLA-DRB1\*15:01 and multiple sclerosis: a female association? *Mult Scler* **18**, 569-577

## J

Jaenisch R, Bird A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33**, 245-254

Jersild C, Fog T (1972) Histocompatibility (HL-A) antigens associated with multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum* **51**, 377

Jersild C, Dupont B, Fog T, Platz PJ, Svejgaard A (1975) Histocompatibility determinants in multiple sclerosis. *Transplant Rev* **22**, 148-163

Jung S, Rajewsky K and Radbruch A. (1993) Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* **259**, 984-997

## K

Kalman B and Lublin F. (1999) The genetics of multiple sclerosis. A review. *Biomed Pharmacother* **53**, 358-370

Kang SJ, Scott WK, Li YJ, Hauser MA, van der Walt JM, Fujiwara K, Mayhew GM, West SG, Vance JM, Martin ER. (2006) Family-based case-control study of MAOA and MAOB polymorphisms in Parkinson disease. *Mov Disord* **21**, 2175-2180

Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, Yin M, Leppert D, Glanzman R, Tinbergen J, Hauser SL. (2011) Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* **378**, 1779-1787

Karni A, Koldzic DN, Bharanidharan P, Khoury SJ, Weiner HL. (2002) IL-18 is linked to raised IFN $\gamma$  in multiple sclerosis and is induced by activated CD4+ T cells via CD40-CD40 ligand interactions. *J Neuroimmunol* **125**, 134-140

Karussis D. (2014) The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *J Autoimmun* **48-49C**, 134-142

Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffer M, Lenhof HP, Ruprecht K, Meese E (2009) Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS ONE* **13**:e7440

Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW, Marrie RA. (2013) Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* **26**, 13-128

Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA. (2013) Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* **496**, 518-522

Kraus V, Srivastava R, Kalluri SR, Seidel U, Schuelke M, Schimmel M, Rostasy K, Leiz S, Hosie S, Grummel V, Hemmer B. (2014) Potassium channel KIR4.1-specific antibodies in children with acquired demyelinating CNS disease. *Neurology* **82**, 470-473

Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Cannella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, Ditzel H, Raine C, Engberg J, Fugger L. (2000) Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* **191**, 1395-1412

Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R, Gneiss C, Haemmerle M, Rainer C, Deisenhammer F, Schocke M, Berger T, Reindl M. (2008) Cerebrospinal Fluid B Cells Correlate with Early Brain Inflammation in Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* **3**:e2559

## L

Lander ES, Schork NJ. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**, 2037-2204

Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Fugger L. (2002) A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* **3**, 940-943

## BIBLIOGRAFÍA

Lang B, Dale RC, Vincent A. (2003) New autoantibody mediated disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* **16**, 351-317

Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. (2011) How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett* **585**, 3770-3780

Lefvert AK, Link H. (1985) IgG production within the central nervous system: a critical review of proposed formulae. *Ann Neurol* **17**, 13-20

Lenzen KP, Heils A, Lorenz S, Hempelmann A, Höfels S, Lohoff FW, Schmitz B, Sander T. (2005) Supportive evidence for an allelic association of the human KCNJ10 potassium channel gene with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* **63**, 113-118

Lin R, Charlesworth J, Stankovich J, Perreau VM, Brown MA; ANZgene Consortium, Taylor BV. (2013) Identity-by-descent mapping to detect rare variants conferring susceptibility to multiple sclerosis. *PLoS One* **8**: e56379

López-González MA, Lucas M, Delgado F, Diaz P. (1998) The production of free oxygen radicals and nitric oxide in the rat cochlea. *Neurochem Int* **33**, 55-59

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* **83**, 278-286

## M

Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. (2012) Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* **181**, 8-18.

Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, Strominger JL, Svejgaard A, Hjorth JP, Holmdahl R, Wucherpfennig KW, Fugger L. (1999) A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* **23**, 343-347

Mancuso R, Saresella M, Hernis A, Agostini S, Piancone F, Caputo D, Maggi F, Clerici M. (2013) Torque teno virus (TTV) in multiple sclerosis patients with different patterns of disease. *J Med Virol* **85**, 2176-2183

Marrosu M. (1998) DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. *Hum Mol Genet* **7**, 1235-1237

Matesanz F, González-Pérez A, Lucas M, Sanna S, Gayán J, Urcelay E, Zara I, Pitzalis M, Cavanillas ML, Arroyo R, Zoledziewska M, Marrosu M, Fernández O, Leyva L, Alcina A, Fedetz M, Moreno-Rey C, Velasco J, Real LM, Ruiz-Peña JL, Cucca F, Ruiz A, Izquierdo G. (2012) Genome-wide association study of multiple sclerosis confirms a novel locus at 5p13.1. *PLoS One* **7**:e36140.

- Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL. (2012) The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev* **248**, 170-187
- McDonnell GV, Mawhinney H, Graham CA, Hawkins SA, Middleton D. (1999) A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis. *J Neurol Sci* **165**, 77-83
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* **50**, 121-127
- McElroy JP, Cree BA, Caillier SJ, Gregersen PK, Herbert J, Khan OA, Freudenberg J, Lee A, Bridges SL Jr, Hauser SL, Oksenberg JR, Gourraud PA. (2010) Refining the association of MHC with multiple sclerosis in African Americans. *Hum Mol Genet* **19**, 3080-3088
- McFarland HF, Martin R. (2007) Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 913-919
- Miller E, Wachowicz B, Majsterek I. (2013) Advances in antioxidative therapy of multiple sclerosis. *Curr Med Chem* **20**, 4720-4730
- Mims A, Walker AR, Huang X, Sun J, Wang H, Santhanam R, Dorrance AM, Walker C, Hoellerbauer P, Tarighat SS, Chan KK, Klisovic RB, Perrotti D, Caligiuri MA, Byrd JC, Chen CS, James Lee L, Jacob S, Mrózek K, Bloomfield CD, Blum W, Garzon R, Schwind S, Marcucci G. (2013) Increased anti-leukemic activity of decitabine via AR-42-induced upregulation of miR-29b: a novel epigenetic-targeting approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **27**, 871-878
- Minucci S, Nervi C, Lo Coco F, Pelicci PG. (2001) Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene* **20**, 3110-3115
- Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. (2011) Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* **10**, 744-755
- Mombelli M, Lugin J, Rubino I, Chanson AL, Giddey M, Calandra T, Roger T. (2011) Histone deacetylase inhibitors impair antibacterial defenses of macrophages. *J Infect Dis* **204**, 1367-1374
- Muñoz-Culla M, Irizar H, and Otaegui D. (2013) The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates. *Appl. Clin. Genet.* **6**, 63-73
- Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, Campbell C, Memon S, Nagle JW, Hakim FT, Gress RE, McFarland HF, Burt RK, Martin R. (2005) Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med* **201**, 805-816

**N**

Nerrant E, Salsac C, Charif M, Ayrignac X, Carra-Dalliere C, Castelnovo G, Goulabchand R, Tisseyre J, Raoul C, Eliaou JF, Labauge P, Vincent T. (2014) Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis. *Mult Scler* (versión online)

Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. (2001) Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and *in vivo* myelination. *J Neurosci* **21**, 5429-5438

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* **343**, 938-52

**O**

Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. (2008) The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* **9**, 516-526

Oksenberg JR, Baranzini SE (2010) Multiple sclerosis genetics - is the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol* **6**, 429-437

Oksenberg JR. (2013) Decoding multiple sclerosis: an update on genomics and future directions. *Expert Rev Neurother* **13**, 11-19

Oruc Z, Boumédiène A, Le Bert M, Khamlichi AA. (2007) Replacement of Iggamma3 germ-line promoter by Iggamma1 inhibits class-switch recombination to IgG3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20484-20489

Otaegui D, Baranzini SE, Armañanzas R, Calvo B, Muñoz-Culla M, Khankhanian P, Inza I, Lozano JA, Castillo-Triviño T, Asensio A, Olaskoaga J, López de Muniain A (2009) Differential microRNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS ONE* **4**:e6309

O’Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA. (2013) Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology* **40**, 1-12

Owens GP, Williamson RA, Burgoon MP, Ghausi O, Burton DR, Gilden DH. (2000) Cloning the antibody response in humans with chronic inflammatory disease: immunopanning of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) brain sections with antibody phage libraries prepared from SSPE brain enriches for antibody recognizing measles virus antigens *in situ*. *J Virol* **74**, 1533-1537

**P**

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, 45e-45

Phuphanich S, Baker SD, Grossman SA, Carson KA, Gilbert MR, Fisher JD, Carducci MA. (2005) Oral sodium phenylbutyrate in patients with recurrent malignant gliomas: a dose escalation and pharmacologic study. *Neuro Oncol* **7**, 177-182

Prineas JW. (1979) Multiple sclerosis: presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. *Science* **203**, 1123-1125

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* **81**, 559-575

## Q

Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, Iglesias AH, Merbl Y, Izquierdo G, Lucas M, Basso AS, Khoury SJ, Lucchinetti CF, Cohen IR, Weiner HL. (2008) Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18889-18894

## R

Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, Handunnetthi L, Handel AE, Disanto G, Orton SM, Watson CT, Morahan JM, Giovannoni G, Ponting CP, Ebers GC, Knight JC. (2010) A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. *Genome Res* **20**, 1352-1360

Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **3**, 569-581

Ringheim GE, Lee L, Laws-Ricker L, Delohery T, Liu L, Zhang D, Colletti N, Soos TJ, Schroeder K, Fanelli B, Tian N, Arendt CW, Iglesias-Bregna D, Petty M, Ji Z, Qian G, Gaur R, Weinstock D, Cavallo J, Telsinskas J, and McMonagle-Strucko K. (2013) Teriflunomide attenuates immunopathological changes in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Neurol* **4**, 169

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**, 154-160

Rom S, Persidsky Y. (2013) Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**, 608-620

Romero-Pinel L, Pujal JM, Martínez-Yélamos S, Gubieras L, Matas E, Bau L, Torradabella M, Azqueta C, Arbizu T. (2011) HLA-DRB1: genetic susceptibility and disability progression in a Spanish multiple sclerosis population. *Eur J Neurol* **18**, 337-342

Romm E, Nielsen JA, Kim JG, Hudson LD. (2005) Myt1 family recruits histone deacetylase to regulate neural transcription. *J Neurochem* **93**, 1444-1453

## BIBLIOGRAFÍA

Roopenian DC, Akilesh S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* **7**, 715-725

Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. (2006) Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol* **5**, 343-354

Ruggieri MR Sr. (2011) Cannabinoids: potential targets for bladder dysfunction. *Handb Exp Pharmacol* **202**, 425-451

## §

Saha RN, Pahan K. (2006) HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ* **13**, 539-550

Salier JP, Goust JM, Pandey JP, Fudenberg HH. (1981) Preferential synthesis of the G1m(1) allotype of IgG1 in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *Science* **213**, 1400-1402

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467

Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA (2009) Anti-inflammatory and proinflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 447-453

Sarkar SK. (2006) False discovery and false nondiscovery rates in single-step multiple testing procedures. *Ann Stat* **34**, 394-415

Schirmer L, Srivastava R, Kalluri SR, Böttinger S, Herwerth M, Carassiti D, Srivastava B, Gempt J, Schlegel J, Kuhlmann T, Korn T, Reynolds R, Hemmer B. (2014) Differential loss of KIR4.1 immunoreactivity in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* **75**, 810-828

Schlachetzki F, Zhu C, Pardridge WM. (2002) Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. *J Neurochem* **81**, 203-206

Schroeder HW, Cavacini L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S41-52

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. (2004) Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* **14**, 164-174

Sercarz EE. (2000) Driver clones and determinant spreading. *J Autoimmun* **14**, 275-277

Shimizu F, Kanda T. (2013) Disruption of the blood-brain barrier in inflammatory neurological diseases. *Brain Nerve* **65**, 165-176

Spira AI, Carducci MA. (2003) Differentiation therapy. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 338-343

Sospedra M, Martin R. (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* **23**, 683-747

Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B, Rothhammer V, Chan A, Gold R, Berthele A, Bennett JL, Korn T, Hemmer B. (2012) Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med* **367**, 115-123

Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. (2008) Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* **26**, 261-292

## T

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* **338**, 278-285

Trojano M, Lucchese G, Graziano G, Taylor BV, Simpson S Jr, Lepore V, Grand'maison F, Duquette P, Izquierdo G, Grammond P, Amato MP, Bergamaschi R, Giuliani G, Boz C, Hupperts R, Van Pesch V, Lechner-Scott J, Cristiano E, Fiol M, Oreja-Guevara C, Saladino ML, Verheul F, Slee M, Paolicelli D, Tortorella C, D'Onghia M, Iaffaldano P, Dorenzo V, Butzkueven H; MSBase Study Group and the New Zealand MS Prevalence Study Group. (2012) Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. *PLoS One* **7**: e48078

## U

Uría DF. (2000) HLA y Esclerosis Múltiple. Estudios en la población española. *Rev Neurol* **31**, 1066-1070

## V

Vaissière T, Sawan C, Zdenko H (2008) Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* **659**, 40-48

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **13**: RESEARCH0034

Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. (2002) Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology* **58**, 824-826

Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. (2003) Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **53**, 222-226

## BIBLIOGRAFÍA

Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. (2005) Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* **115**, 187-194

Völkel P, Angrand PO. (2007) The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**, 1-20

## W

Weiner HL. (2008) A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* **255**, 3-11

Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. (2005) A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* **76**, 887-893

Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK. (2013) Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* **496**, 513-517

## Y

Yu Z, Zhu Y, Chen-Plotkin AS, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, Kalb RG, Trojanowski JQ, Lee VM, Van Deerlin VM, Gitler AD, Bonini NM. (2011) PolyQ repeat expansions in ATXN2 associated with ALS are CAA interrupted repeats. *PLoS One* **6**:e17951

## Z

Zabay-Becerril JM, Burcet-Dardé J, Mulet-Ferrer J, Soler-Farré J, Viader-Farré C. (2004) Relación entre el alelo HLADRB1\*1501 y la gravedad de la esclerosis múltiple en una muestra de población española perteneciente a las Islas Baleares: influencia del sexo. *Rev Neurol* **38**, 118-122

Zhang J, Bottaro A, Li S, Stewart V, Alt FW. (1993) A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J* **12**, 3529-3537

Zhang Z, Zhang Z-Y, Wu Y, Schluesener HJ. (2012) Valproic acid ameliorates inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis rats. *Neuroscience* **221**, 140-150

Zhou Y, Simpson S Jr, Holloway AF, Charlesworth J, van der Mei I, Taylor BV. (2014) The potential role of epigenetic modifications in the heritability of multiple sclerosis. *Mult Scler* **20**, 135-140

## BIBLIOGRAFÍA

Zhu Y, Das K, Wu J, Lee MH, Tan P. (2013) RNH1 regulation of reactive oxygen species contributes to histone deacetylase inhibitor resistance in gastric cancer cells. *Oncogene* **33**, 1527-1537

Zozulya AL, Wiendl H (2008) The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* **4**, 384-398

1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467**, 1061-1073



## APÉNDICE

### I. Artículos publicados

1. **Delgado-García M**, Matesanz F, Alcina A, Fedetz M, García-Sánchez MI, Ruiz-Peña JL, Fernández O, Pinto Medel MJ, Leyva L, Arnal C, Delgado C, López-Guerrero JA, González-Pérez A, Sáez ME, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, Picón C, Arroyo R, Varadé J, Urcelay E, Izquierdo G, Lucas M. A new risk variant for multiple sclerosis at the immunoglobulin heavy chain locus associates with intrathecal IgG, IgM index and oligoclonal bands. *Multiple Sclerosis Journal*. **ACEPTADO, PENDIENTE DE PUBLICACIÓN. Decision on Manuscript ID MSJ-14-0283.R2**
2. Mondéjar R, Solano F, Rubio R, **Delgado M**, Pérez-Sempere A, González-Meneses A, Vendrell T, Izquierdo G, Martínez-Mir A, Lucas M. (2014) Mutation prevalence of cerebral cavernous malformation genes in spanish patients. *PLoS One* **9**:e86286.
3. Mondejar R, Garcia-Moreno JM, Rubio R, Solano F, **Delgado M**, Garcia-Bravo B, Rios-Martin JJ, Martínez-Mir A, Lucas M. (2014) Clinical and molecular study of the extracellular matrix protein 1 gene in a spanish family with lipid proteinosis. *J Clin Neurol* **10**, 64-68

### II. Comunicaciones a Congresos

1. Autores: Bernal-Bayard, E. Cardenal-Muñoz, **M. Delgado-García**, F. Ramos-Morales  
Título: Study of the Salmonella type III secretion system effector SlrP  
Tipo de participación: Comunicación  
Congreso: ASM Conference on Salmonella: biology, pathogenesis and prevention  
Publicación: Libro de Resúmenes  
Lugar celebración: Aix-en-Provence, Francia (2009)
2. Autores: **M. Delgado García**, F. Matesanz Del Barrio, G. Izquierdo Ayuso, M. Lucas Lucas  
Título: genes asociados a la Esclerosis Múltiple: cambios en la expresión génica modulables por procesos epigenéticos  
Tipo de participación: Póster  
Congreso: LXIV Reunión Anual Sociedad Española Neurología  
Publicación: Libro de Resúmenes  
Lugar celebración: Barcelona, España (2012)
3. Autores: MV. Perna Rodríguez, L. Redondo, R. Mondéjar García, F. Solano, **M. Delgado García**, M. Lucas.

Título: Diagnóstico genético de la distrofia muscular oculofaríngea: presentación de un caso.

Tipo de participación: Póster

Congreso: Reunión anual de la SANAC. El laboratorio en el diagnóstico de enfermedades neurológicas.

Publicación: Libro de Resúmenes

Lugar celebración: Osuna, España (2013)

4. Autores: Mondéjar García, **M. Delgado García**, F. Solano, M. Lucas

Título: Expresión de nuevos transcritos de genes relacionados con la cavernomatosis: CCM1 y CCM2

Tipo de participación: Póster

Congreso: VII Congreso Nacional De Laboratorio Clínico

Publicación: Libro de resúmenes

Lugar celebración: Bilbao, España (2013)

5. Autores: R. Mondéjar García, N. Govea, **M. Delgado García**, F. Solano, J. Rosell, M. Lucas

Título: Importancia del estudio del cDNA en mutaciones missense. Aplicación a genes de la cavernomatosis cerebral

Tipo de participación: Póster

Congreso: VII Congreso Nacional De Laboratorio Clínico

Publicación: Libro de resúmenes

Lugar celebración: Bilbao, España (2013)

6. Autores: **M. Delgado García**, R. Mondéjar García, F. Solano Manchego, F.

Matesanz del Barrio, G. Izquierdo Ayuso, M. Lucas Lucas

Título: Detección De Variación En El Número De Copias En El Locus De La Cadena Pesada De La Inmunoglobulina G Mediante La Técnica De MLPA

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXI Reunión De La Sociedad Andaluza De Análisis Clínicos

Publicación: Libro de resúmenes

Lugar celebración: Córdoba, España (2014)

7. Autores: R. Mondéjar García, **M. Delgado García**, F. Solano Manchego, M. Lucas Lucas

Título: Regulación de la expresión de CCM1 por la región 5' no codificante en células inmunes.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXI Reunión De La Sociedad Andaluza De Análisis Clínicos

Publicación: Libro de resúmenes

Lugar celebración: Córdoba, España (2014)

8. Autores: R. Mondéjar, **M. Delgado**, F. Solano, M. Lucas

Título: Exones minoritarios: Un nuevo paradigma

Tipo de participación: Póster

Congreso: VIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

Publicación: Libro de resúmenes

Lugar celebración: Sevilla, España (2014)

9. Autores: R. Mondéjar, **M. Delgado**, F. Solano, M. Lucas  
Título: Hallazgo de un nueva isoforma de Krit1  
Tipo de participación: Póster  
Congreso: VIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico  
Publicación: Libro de resúmenes  
Lugar celebración: Sevilla, España (2014)

10. Autores: **M. Delgado García**, R. Mondéjar García, F. Solano Manchego, F. Matesanz Del Barrio, G. Izquierdo Ayuso, M. Lucas Lucas  
Título: Estudio de la regulación epigenética de genes asociados a Esclerosis Múltiple  
Tipo de participación: Póster  
Congreso: VIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico  
Publicación: Libro de resúmenes  
Lugar celebración: Sevilla, España (2014)

### **III. Otros méritos**

Premio SANAC XXI a la mejor comunicación tipo póster en la XXI reunión SANAC (8- marzo 2014, Córdoba)

Autores: **M. Delgado García**, R. Mondéjar García, F. Solano Manchego, F. Matesanz del Barrio, G. Izquierdo Ayuso, M. Lucas Lucas

Título: Detección De Variación En El Número De Copias En El Locus De La Cadena Pesada De La Inmunoglobulina G Mediante La Técnica De MLPA



# A new risk variant for multiple sclerosis at the immunoglobulin heavy chain locus associates with intrathecal IgG, IgM index and oligoclonal bands

Mercedes Delgado-García<sup>1,\*</sup>, Fuencisla Matesanz<sup>2,\*a</sup>,

Antonio Alcina<sup>2</sup>, MariaFedetz<sup>2</sup>, María Isabel García-Sánchez<sup>1</sup>, Juan Luis Ruiz-Peña<sup>1</sup>,

Oscar Fernández<sup>3</sup>, María Jesús Pinto Medel<sup>3</sup>, Laura Leyva<sup>3</sup>, Carmen Arnal<sup>4</sup>,

Concepción Delgado<sup>5</sup>, José Antonio López Guerrero<sup>6</sup>, Antonio González-Pérez<sup>7</sup>,

María E. Sáez<sup>7</sup>, Luisa María Villar<sup>8</sup>, José Carlos Álvarez-Cermeño<sup>8</sup>, Carmen Picón<sup>8</sup>,

Rafael Arroyo<sup>9</sup>, Jezabel Varadé<sup>10</sup>, Elena Urcelay<sup>10</sup>, Guillermo Izquierdo<sup>1,\*</sup> and

Miguel Lucas<sup>11,\*</sup>

**\* These authors contributed equally to this work**

- 1 Unidad de Esclerosis Múltiple, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, Spain,
- 2 Department of CellBiology and Immunology, Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (IPBLN), CSIC, Granada, Spain,
- 3 Unidad de Gestión Clínica de Neurociencias. Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA). Hospital Regional Universitario de Málaga. Málaga, Spain,
- 4 Servicio de Neurología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain,
- 5 Centro Regional de Transfusión Sanguínea Granada-Almería, Ganada, Spain,
- 6 Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, Spain,
- 7 Centro Andaluz de Estudios Bioinformáticos (CAEBi), Sevilla, Spain,

- 8 Hospital Ramon y Cajal, Departments of Immunology and Neurology. MS Unit. (IRYCIS), Madrid, Spain,
- 9 MultipleSclerosisUnit, Hospital Clínico San Carlos. Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain,
- 10 ImmunologyDepartment, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico S. Carlos (IdISSC), Madrid, Spain,
- 11 Servicio de Biología Molecular, Hospital Universitario Virgen Macarena, Facultad de Medicina, Sevilla, Spain,

**Keywords:** Multiple Sclerosis (MS); intrathecalIgG/ IgM index; oligoclonal bands (OCBs); immunoglobulin heavy chain (IGHC) locus; association; SNP variant

**Abbreviated version of article title**

Association of intrathecal IgG, IgM index with MS risk variant

**<sup>a</sup>Correspondence to**

Dr. Fuencisla Matesanz

Department of Cell Biology and Immunology,

Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (IPBLN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain.

E-mail: [lindo@ipb.csic.es](mailto:lindo@ipb.csic.es). Telephone: +34 958 181668. Fax: +34 958 181632

## **Abstract**

**Background:** Recent findings have shown a correlation between the intrathecal IgG index and variants at the immunoglobulin heavy chain (*IGHC*) locus in multiple sclerosis (MS) patients.

**Objectives:** The objective of this paper is to analyze the association of the locus with MS susceptibility and its relationship with intrathecal immunoglobulin (Ig) parameters.

**Methods:** We genotyped the rs11621145 variant, located at the *IGHC* locus, in 2,726 MS patients and 2,133 healthy controls. Associations of intrathecal IgG and IgM indexes with rs11621145 were analyzed by linear regression analysis in 538 MS patients.

**Results:** We found that rs11621145 showed statistically significant evidence for association with susceptibility to MS (odds ratio= 0.71,  $P= 7.19E-10$ ), though, it would be desirable validation of this result in additional cohorts. We confirmed the association between the IgG index and the rs11621145 ( $P=1.03e-7$ , Beta= 0.2118). Furthermore, rs11621145 was inversely correlated with IgM index ( $p=0.000381$ , Beta= -0.2782), and therefore marks a decreased likelihood of presenting IgM OCB (odds ratio = 0.38,  $p=2.35E-06$ ).

**Conclusions:** Our results suggest that the polymorphism of the *IGHC* locus could be altering the switching of the Ig isotype in B-cells and it would be interfering with T-dependent and T-independent antibody responses.

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most frequent demyelinating disease of the central nervous system (CNS) with an active inflammatory and immune component [1,2]. MS is widely accepted as an autoimmune disease, but the etiology and pathogenic mechanisms remain unclear. Current knowledge supports that MS develops in genetically susceptible individuals as a result of an autoimmune attack to the myelin sheath activated through environmental factors [3]. In MS, activated CD4+ T cells enter the CNS and trigger an inflammatory cascade that leads to recruitment of other immune cells like B, CD8+ T cells and macrophages and induces the production of cytokines, antibodies and complement factors.

The role of cerebrospinal fluid (CSF) resident B cells seems to be important in CNS inflammation, but their contribution to MS evolution and progression is less clear [4]. Nonetheless antigen-directed affinity maturation and terminal differentiation of B cells contributing to IgG secretion and oligoclonal IgG bands (OCBs) occurs within perivascular infiltrates and meningeal lymphoid-like follicles in the CNS [5,6].

An elevation of intrathecal IgG synthesis and the presence of OCBs, characteristics of MS [7], further suggest the autoimmune origin of lesions in MS. In fact, about 95% of MS patients show IgG-OCBs whereas close to 40% show IgM-OCBs in CSF [8,9]. Moreover, it has been reported that intrathecal IgM synthesis predicts a worse disease course in the first stages of MS [10]. Analysis of IgG index, which is elevated in about 70% of patients, as well as the presence of oligoclonal bands (OCBs) [11,12] have been proposed as complementary data for the diagnosis of MS [13].

Buck et al. [14] have recently reported that genetic variants in the immunoglobulin heavy chain (*IGHC*) locus are associated with the IgG index in MS and that specific haplotypes might affect intrathecal IgG synthesis.

We aimed to study the genetic association as well as exploring the immunoglobulin (Ig) profile and OCBs in a cohort of Spanish MS patients. Part of this cohort was included in a recent GWAS study [15]. Here, we recruited additional patients from the same study site and from two other Spanish centers reaching up to 2,726 MS patients and 2,133 sex- and age-matched controls. In this work, we investigate the association with MS of SNPs within the *IGHC* locus and their relationship with the intrathecal IgG and IgM synthesis, as well as with the presence of OCBs for both Igs. In addition to confirming Buck et al. [14] findings regarding the association of the *IGHC* locus with the IgG index, we observed that the selected variant was associated with both, MS susceptibility and IgM status.

## Patients and Methods

### Patients

Patients with suspicion of MS undergo lumbar puncture as part of the diagnostic procedure. Diagnosis was made by a neurologists based on McDonald criteria [16].

After diagnosis patients were classified as clinically isolated syndrome (CIS), clinically definite MS, or non MS patients. The study cohort from Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla) consisted of 362 MS patients, and 414 patients free of MS or any other inflammatory disease (i.e. suffering mainly from headaches, hydrocephalus, Alzheimer's disease, Parkinson, behavioral changes, and stroke). The cohort from Hospital Ramón y Cajal (Madrid) consisted on 179 MS patients. Main features of the patients are shown in Table 1. Patients provided informed consent for lumbar puncture.

The entire cohort for rs11621145 genotyping study comprised 2,726 MS patients meeting established diagnostic criteria [16] and 2,133 healthy controls (mostly blood donors and staff). All patients and healthy controls had Caucasian origin. Patients and controls were recruited from six different Spanish hospitals: Sevilla cohort consisting of 988 cases and 1,070 controls from Hospital Virgen Macarena, Hospital Virgen de la Nieves and Blood Bank of Andalucía; Málaga cohort consisting of 647 cases and 402 controls from Hospital Carlos Haya; Madrid cohort consisting of 1,091 cases and 661 controls from Hospital Clínico San Carlos and Hospital Ramón y Cajal. Patients provided informed consent for blood extraction. The institutional ethics committees of these centers approved the study.

## **Samples and OCBs Studies**

CSF samples were obtained by lumbar puncture from patients under suspicion of MS. The study of OCBs was performed in laboratories from Hospital Universitario Virgen Macarena (Seville) and Ramón y Cajal (Madrid). The procedure included the two-step detection of OCBs by isoelectric-focusing and incubation with antibodies to either IgG or IgM [17,18]. Ig and albumin concentration in CSF and serum were measured by nephelometry. We quantified intrathecal IgG and IgM synthesis as the Ig index (CSF/serum Ig ratio divided by the CSF/serum albumin ratio) [11]. These determinations are included in the protocol of routine diagnosis for MS in the above-indicated hospitals.

## **SNP Selection and Genotyping**

SNP selection was based on the SNPs described by Buck et al. [14] located at chromosome 14, and associated with IgG index. Linkage disequilibrium and Hardy Weinberg (HW) equilibrium was performed with the 1000 Genome Project data for Caucasian populations [19]. DNA was extracted from peripheral blood cells by standard methods using either the Maxwell Kit (Promega) or a saline precipitation procedure. The SNP rs11621145 was genotyped using Taqman® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's specifications. Genotyping call rates were >95% in each cohort analysed and 10% of the samples were genotyped in duplicate with > 99% concordance.

## Statistical Analysis

Departure from HW equilibrium was tested using an exact test. Genotype data were analyzed to obtain allele and genotype counts using PLINK V.1.07. [20] For each available cohort odds ratios (OR), 95% Confidence Intervals (CI) and p-value were estimated by fitting sex-adjusted logistic regression models with PLINK in order to assess the associations between rs11621145 and: a) the MS risk, b) the presence of IgM OCB and c) the presence of IgG OCB. Both additive and dominant models were explored. In order to assess the association between Ig indexes and rs11621145, both indexes were transformed using natural logarithms as previously done by Buck et al. [14] and as it occurred in their study, untransformed data did not follow a Gaussian distribution, but was right-skewed. Once transformed, we analyzed both IgG and IgM indexes by using the “--linear” command in PLINK that fits a linear regression. Thus, for each available cohort we obtained sex and age of puncture adjusted beta coefficients, 95% CI, and p-values using both additive and dominant models. Estimates across cohorts were obtained by running meta-analyses for each endpoint using the “metan” command in Stata 12 (College Station, TX, USA). Both random and fixed effects models were used and heterogeneity was explored by estimating  $I^2$  index and Q statistic.

## Results

### **IgG index associated variant is a risk factor for MS**

Buck et al. [14] reported 5 SNPs at the Ig locus associated with IgG index in MS patients by GWA analysis. Among these variants, the most associated was rs10136766. These polymorphisms present high linkage disequilibrium (LD) as determined in 379 Caucasian individuals included in the 1000 Genomes Project ( $r^2 > 0.49-0.95$ ). However, this polymorphism is not in HW equilibrium according to the 1000 Genomes Project data. In fact, only the second most associated variant, rs11621145, was found in HW equilibrium and therefore, we selected this SNP as the best candidate to assess the association of this locus with IgG index and MS susceptibility.

As shown in Table 2, rs11621145 was genotyped in three Spanish cohorts whose controls were in HW equilibrium. After logistic regression analyses, we found that the dominant model was the one that best fitted the data. The rs11621145 was associated to MS in all three cohorts, showing a protective effect among G allele carriers. The meta-analysis of these results along with those from Buck et al. [14] for rs11621145 is also indicated (Fig 1).

This locus has not been previously associated with MS in any of the GWAS performed so far, but the coverage of this locus in the chips used is very low.

The G allele frequency of rs11621145 was 0.33 in the Spanish population, which is similar to the one found among Caucasians in the 1000 Genomes Project (0.39) but largely different when compared to other human populations (i.e. 0.97 in the African population).

## **Correlations of rs11621145 with IgG and IgM index**

We analyzed the association between rs11621145\* G and the natural logarithm of the IgG index and IgM index by means of linear regression in the two MS cohorts, adjusting for sex and age at puncture (Table 3). The IgG index was associated with rs11621145 with a beta coefficient somewhat smaller than the one reported by Buck et al. [14] but still statistically significant. The dominant model, as shown for MS susceptibility, seemed to fit better the data. We found that G carriers have higher values of IgG index. Interestingly, we found the exact opposite effect on the IgM index: the G carriers have a lower IgM index. Thus, G allele carriers presented lower MS susceptibility, higher intrathecal IgG index, and lower IgM index values.

In order to determine whether the associations found between IgG and IgM indexes and the rs11621145 genotypes were exclusive of MS patients, we performed correlation analysis using 414 CSF samples from individuals with non-inflammatory diseases. No association was found in these samples (Table 3).

## **Correlations of rs11621145 with oligoclonalIgM bands**

Most MS patients enrolled in the present study are IgG OCB positives (93% and 85% in Sevilla and Madrid cohorts, respectively). We did not observe an association between rs11621145 genotypes and IgG OCB. However, the power of this analysis was limited due to the low number of IgG OCB negative patients, thus we cannot discard this association. On the other hand, we did observe an association between the presence of IgM OCB and the rs11621145 variant in both cohorts available (Sevilla and Madrid) (Table 4). In this case the additive model seemed to fit better the results. The G allele was associated with a lower likelihood of presenting IgM OCBs. The G allele was

associated with protection towards MS, higher IgG Index, lower IgM index and absence of IgM OCBs.

## Discussion

In this work we confirm the previously reported association of the *IGHC* locus with the intrathecal IgG index in MS [14]. In addition, we have found that this association does not only involve the IgG but also the IgM index and IgM OCB. The opposite effects observed in the associations between the IgG and IgM indexes with the SNP under study, along with the localization of this polymorphism in the *IGHC* gene locus point to an alteration of the equilibrium between innate and T-associated immune responses as the functional cause of the association.

In the T-cell mediated immune response, IgM-positive B lymphocytes switch to IgG, IgA, or IgE upon immunization or infection [22]. This process occurs by a recombination within S regions located upstream of each one of the heavy chain constant region ( $C_H$ ) genes resulting in a change from IgM expression to one of the downstream isotypes. The isotype switching is cytokine-directed by inducing transcription from promoters located upstream to each acceptor S region. *Cis*-regulatory elements have been described within the *IGHC* gene locus and participate in the regulation of Ig  $C_H$  gene expression and isotype switch. Different knockout experiments have demonstrated the importance of  $C_H$  gene transcription for efficient isotype switch [23-25]. In fact, a human polymorphism in the regulatory region located at the 3' of the *IGHC* gene locus, 3'RR enhancer, regulates  $C_H$  gene transcription [26]. This polymorphism associates with selective IgA deficiency (IGAD), a common primary immunodeficiency, and with IgM concentration [27]. Variants in the same 3'RR enhancer have been also associated with systemic lupus erythematosus [28]. In innate antibody response, responsible for the production of more than 80% of serum IgM, antibodies are produced against phylogenetically conserved antigens predominantly of

non-protein nature [29]. This antibody response is mainly produced by CD5+ B cells and is responsible for intrathecal IgM synthesis in MS [30].

The polymorphisms associated to IgG index reported by Buck et al. [14] and validated in this work are located in the immunoglobulin gamma heavy chain genes (*IGHG*) region, where four *IGHG* are encoded. However, since we do not know the ultimate causal variant of the Ig index alteration, it is not possible to infer whether the studied variant would be affecting *cis*-regulatory elements located upstream of the heavy chain gene modifying expression or whether it would be interfering with other process during class switching. Further study in this sense must be performed to clarify the underlying mechanism. It is noteworthy that the association between Ig index and rs11621145 occurs exclusively among MS patients and not in patients with non inflammatory diseases. However, in this type of control patients the intrathecal IgG would be originated from the periphery. It would be important to analyze the IgG levels in a group of patients with diseases that go along with intrathecal IgG synthesis to determine if the observed effect of the polymorphism on the Ig levels is specific of MS. The inflammatory environment of the brain in MS patients could be the circumstance that triggers the observed effect. Cytokines produced by T helper and antigen presenting cells determine the isotype to which B cells will switch, by inducing transcription from promoters located upstream to each acceptor S region. The promoters for the four *IGHG* are differentially regulated. They do not respond equally to regulatory stimulus as it has been shown by their differential response to the deletion of the Ikaros transcription factor in an animal model [31]. In fact, there are several works pointing to the production of specific IgG isotypes in CSF of MS patients [32, 33]. The specific cytokine spectrum produced in the brain of the MS patient could induce the switch to mainly one of the *IGHG* and this process could be altered by the polymorphism.

In this work we showed an association of the Ig locus with MS. However, our results were contradictory to previously reported by Buck et al. [14] which have reported a negative association with of the locus with MS. Even though, in the present study we reached a large number of patients and controls from the meta-analysis between Spanish and UK cohorts, we should not forget that the small effects of non-HLA loci associated with MS require very large cohorts to demonstrate the association with the disease. On the other hand, even though all patients and controls were of Caucasian origin from Spain, we cannot totally rule out that residual population stratification could be partially responsible for the disease association observed here. For these reasons, it would be desirable to replicate this association by other groups to reach numbers as the reported in studies such as Immunochip Project [34], to totally discard any doubts about its involvement in MS- susceptibility.

The differences on association observed between cohorts were not unexpected since previous meta-analyses have reported similar situations [34]. However, in this case we found notable differences between Sevilla and the rest of the cohorts. One clear difference of this cohort resides in that almost all patients were IgG OCB positive. We believe this could be one of the possible reasons for the observed differences in MS- association between cohorts.

The homozygote individuals for the mayor allele (A) show an increased MS risk. The A allele is also associated to higher IgM index, higher IgM OCB and lower IgG index. One could think that since A is the major allele, the basal function should be associated with this allele and G carriers might have acquired a higher ratio of class switching. However, when we analyzed the allele frequency of rs11621145 in human populations other than Europeans, we observed that the A allele is almost inexistent in African populations. Since we do not know the ultimate causal variant of the effect, we

cannot establish whether among African populations the rs11621145 polymorphism would not capture the functional variant or that the polymorphism causing the effect in Ig index was acquired later in the human evolution and conserved in non African populations.

The ultimate reason why these effects on the intrathecal Ig index and IgM bands can contribute to MS risk deserves further investigation. However, antibody isotype is important for determining the effector antibodies. The C<sub>H</sub> region is bound by the Fc receptors on many cell types. Different C<sub>H</sub> regions have different affinities for these proteins, thus greatly influencing antibody function and determining whether antibody-antigen complexes will activate cells. Pathological and clinical studies implicate antibody-dependent mechanisms in the immunopathogenesis of MS. Therefore, any effect on the antibody isotype can affect MS susceptibility.

## **Acknowledgments**

We thank patients with multiple sclerosis and control subjects for making this study feasible. We also acknowledge the University Hospital Virgen Macarena Biobank (Andalusian Public Health System Biobank), integrated in the Spanish Biobanks Network (Carlos III Health Institute, Grant n° RD09/0076/00080), for its help and support in the gifts of clinical samples, used in this work.

## **Funding**

Financial support for the study was provided by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS)-Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) [grant numbers RETICS-REEM-RD12/0032/0015-RD12/0032/0005-RD12/0032/0006-RD12/0032/0009, P12/00555, PI10/01616, PI13/01527, PI13/01466, CP10/00526, PI12-00239]; Junta de Andalucía-Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) [grant numbers P07-CVI-02551, P09-CTS-5218].

## **No conflicts of interest**

## References

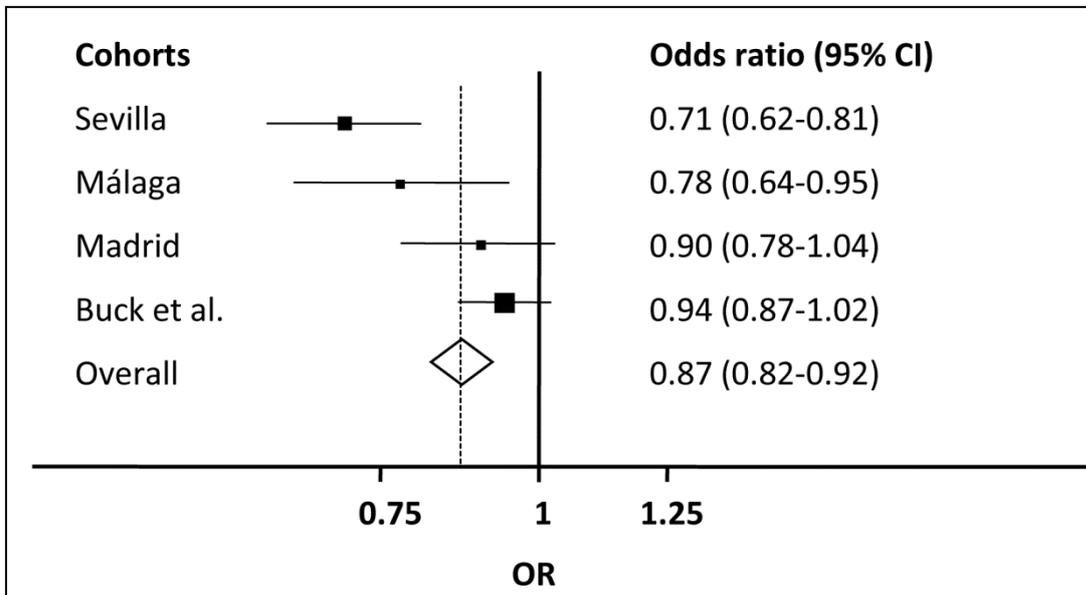
1. McFarland HF and Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8:913-919.
2. Zettl UK, Stüve O and Patejdl R. Immune-mediated CNS diseases: a review on nosological classification and clinical features. *Autoimmun Rev* 2012; 11:167–173.
3. Sospedra M and Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683–747.
4. Kuenz B, Lutterotti A, Ehling R, et al. Cerebrospinal Fluid B Cells Correlate with Early Brain Inflammation in Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* 2008;3:e2559.
5. Prineas JW. Multiple sclerosis: presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. *Science* 1979; 203:1123-1125.
6. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, et al. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2004;14:164-174.
7. Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, et al. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2012;78:823-832.
8. Kostulas VK, Link H and Lefvert AK. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch Neurol* 1987;44:1041–1044.
9. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, et al. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology* 2002;58:824–826.
10. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003;53:222–226.

11. Lefvert AK and Link H. IgG production within the central nervous system: a critical review of proposed formulae. *Ann Neurol* 1985;17:13–20.
12. Cowdrey GN, Tasker PJ, Gould BJ, et al. Isoelectric focusing in an immobilized pH gradient for the detection of intrathecal IgG in cerebrospinal fluid: sensitivity and specificity for the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Clin Biochem* 1993;30:463–468.
13. Petereit HF and Heiss WD. New diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2002;51:533–534.
14. Buck D, Albrecht E, Aslam M, et al. Genetic variants in the immunoglobulin heavy chain locus are associated with the IgG index in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2013;73:86-94.
15. Matesanz F, González-Pérez A, Lucas M, et al. Genome-wide association study of multiple sclerosis confirms a novel locus at 5p13.1. *PloS one* 2012;7:e36140.
16. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
17. Sádaba MC, González Porqué P, Masjuan J, et al. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods* 2004;284:141-145.
18. Villar LM, González-Porqué P, Masjuán J, et al. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J Immunol Methods* 2002;258:151-155.
19. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467:1061-1073.

20. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-575.
21. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-219.
22. Stavnezer J, Guikema JE and Schrader CE. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu Rev Immunol* 2008;26:261-292.
23. Jung S, Rajewsky K and Radbruch A. Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* 1993;259:984-997.
24. Zhang J, Bottaro A, Li S, et al. A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J* 1993;12:3529–3537.
25. Oruc Z, Boumédiène A, Le Bert M, et al. Replacement of Igamma3 germ-line promoter by Igamma1 inhibits class-switch recombination to IgG3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:20484–20489.
26. Hu Y, Pan Q, Pardali E, et al. Regulation of germline promoters by the two human Ig heavy chain 3' alpha enhancers. *J Immunol* 2000;164:6380-6386.
27. Giambra V, Cianci R, Lolli S, et al. Allele \*1 of HS1.2 enhancer associates with selective IgA deficiency and IgM concentration. *J Immunol* 2009;183:8280–8285.
28. Frezza D, Tulusso B, Giambra V, et al. Polymorphisms of the IgH enhancer HS1.2 and risk of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1309–1315.
29. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, et al. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med* 1998;188:2381-2386.

30. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 2005;115:187-194.
31. Sellars M, Reina-San-Martin B, Kastner P, et al. Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2009;206:1073–1087.
32. Salier JP, Goust JM, Pandey JP, et al. Preferential synthesis of the G1m(1) allotype of IgG1 in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *Science* 1981;213:1400-1402.
33. Goust JM and Salier JP. Imbalance in recruitment of IgG (Gm) allotype-producing B-cell subsets from blood to brain in multiple sclerosis. *Cell Immunol* 1984;88:551-557.
34. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2013;45:1353-1360.

## FIGURE LEYENDS



**Figure 1** Forest plots of effect size, additive model, for rs11621145 associated with MS risk in the three cohorts analyzed in the present work and in the cohort from Buck et al. [14]. We estimated the overall effect size using meta-analysis. The black squares represent the effect estimates for the individual cohorts and the horizontal lines represent the 95% CIs of the estimates. The diamond represents the overall estimate under fixed-effect model

**Table 1.** Demographic, Clinical Characteristics and Cerebrospinal Fluid Parameters of the Studied Cohorts

Cohorts	Madrid		Málaga		Sevilla	
	MS	Control	MS	Control	MS	Control
<b>MS association study</b>						
N	1091	661	647	402	988	1070
Age, mean yr	45	48	45	42	42	41
Female (%)	54	66	67.7	67	67	67
PP (%)	4.2		1.4		6.3	
<b>Ig Index study</b>						
N	179				362	
Age, mean yr at puncture (range)	37 (13-69)				35 (12-72)	
Females (%)	70				70	
IgG index, geometric mean (range)	1 (0.28-3.77)				0.96 (0.41-6.63)	
IgM index, geometric mean (range)	0.19 (0.02-2.86)				0.17 (0.01-5.53)	
IgG OCB total / + (%)	151/129 (85)				491/456 (93)	
IgM OCB total / + (%)	182/77 (42)				257/112 (44)	

N, number of patients; PP, primary progressive MS; IgG OCB, oligoclonal IgG bands; IgM OCB, oligoclonal IgM bands

**Table 2.** Association Analysis of rs11621145 in Three Spanish MS Cohorts.

Genotypes	MS N (%)			Controls N (%)			Dominant model					
	GG	AG	AA	GG	AG	AA	OR	P				
<b>Madrid</b>	126 (11.5)	405 (37.1)	560 (51.4)	72 (11)	282 (42.6)	307 (46.4)	0.8114 (0.68-0.99)	0.03 6				
<b>Málaga</b>	51 (8)	253 (39)	343 (53)	36 (9)	188 (44.8)	178 (44.2)	0.6919 (0.54-0.89)	0.00 4				
<b>Sevilla</b>	88 (8.9)	356 (36)	544 (55.1)	133 (12.4)	475 (44.4)	462 (43.2)	0.6218 (0.52-0.74)	9.20 5-8				
							<b>OR<sup>1</sup></b>	<b>OR(R)<sup>2</sup></b>	<b>P<sup>3</sup></b>	<b>P(R)<sup>4</sup></b>	<b>Q<sup>5</sup></b>	<b>I<sup>2</sup></b>
<b>Combined</b>	265 (9.7)	1014 (37.2)	1447 (53.1)	241 (11.3)	945 (44.3)	947 (44.4)	0.6982	0.70	1.05 3-9	3.046 -05	0. 14	49. 82

OR, Odds Ratio; OR<sup>1</sup>, Fixed-effects OR estimate; OR(R)<sup>2</sup>, Random-effects OR

estimate; P<sup>3</sup>, Fixed-effects meta-analysis p-value; P(R)<sup>4</sup>, Random-effects meta-analysis

p-value; Q<sup>5</sup>, p-value for Cochran's Q statistic; I<sup>2</sup>, heterogeneity index (0-100).

**Table 3.** Association Study of the IgG and IgM index from MS and No Inflammatory Disease Patients with the rs11621145 SNP by Linear Regression Analysis.

	Sevilla				Madrid			Meta-Analysis			
		N	BETA	P	N	BETA	P	N	BETA	P	
<b>MS</b>	<b>IgG</b>	ADD	362	0.147	1.42E-04	176	0.101	0.066	538	0.132	2.52E-05
		DOM	362	0.215	2.6E-05	176	0.187	0.014	538	0.207	6.85E-07
	<b>IgM</b>	ADD	292	-0.219	0.007	173	-0.227	0.013	465	-0.223	2.2E-04
		DOM	292	-0.295	0.0063	173	-0.252	0.048	465	-0.277	7.24E-04
<b>No MS</b>	<b>IgG</b>	ADD	414	0.003	0.73						
		DOM	414	0.007	0.57						
	<b>IgM</b>	ADD	414	0.003	0.73						
		DOM	414	0.0064	0.92						

Sevilla corresponds to samples from the Hospital Virgen Macarena; Madrid corresponds to samples from Hospital Ramón y Cajal of Madrid; N, Number of samples; MS, multiple sclerosis samples; No MS samples from no inflammatory diseases; BETA, Regression coefficient; P, Asymptotic p-value for t-statistic; ADD, additive model; DOM, dominant model.

	Dominant Model			Additive Model		
	Allele	N	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
<b>Sevilla</b>	G	255	0.43 (0.26-0.72)	0.0014	0.4937 (0.33-0.75)	0.0008
<b>Madrid</b>	G	179	0.32 (0.17-0.6)	0.00038	0.4102 (0.25-0.67)	0.00033
<b>Meta-Analysis</b>			0.3827	2.35E-06	0.4569	1.08E-06

**Table 4.** Association Between the rs11621145 SNP and the IgM OCB

Sevilla corresponds to samples from Hospital Virgen Macarena; Madrid corresponds to samples from Hospital Ramón y Cajal of Madrid; N, Number of samples; OR, Odds Ratio; P, Asymptotic p-value for t-statistic.

