

# IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE UNA EXTENSA FAMILIA DE ETNIA GITANA (ESTUDIO EMGypsy)

**René Roberto Robles Cedeño**

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/398410>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

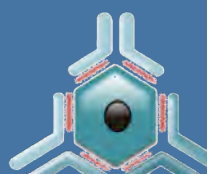


TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD  
EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. DESCRIPCIÓN CLÍNICA  
Y ANÁLISIS GENÉTICO DE UNA EXTENSA FAMILIA  
DE ETNIA GITANA (*ESTUDIO EMGypsy*)**

René Roberto Robles Cedeño

2016







TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD  
EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. DESCRIPCIÓN CLÍNICA  
Y ANÁLISIS GENÉTICO DE UNA EXTENSA FAMILIA  
DE ETNIA GITANA (*ESTUDIO EMGypsy*)**

René Roberto Robles Cedeño

2016

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
EXPERIMENTALES Y SOSTENIBILIDAD

Dirigida por:

Dra. María del Mar Castellanos Rodrigo

Dr. Lluís Ramió i Torrentà

Dr. Jordi Gich Fullà

Tutor:

Dr. Joaquín Serena Leal

Memoria presentada para optar al título de doctor por la Universitat de Girona





La Dra. María del Mar Castellanos Rodrigo, de la Universidad de La Coruña,

DECLARA:

Que el siguiente trabajo titulado, ***IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE UNA EXTENSA FAMILIA DE ETNIA GITANA (ESTUDIO EMGypsy)***, que presenta el Sr. René Roberto Robles Cedeño para la obtención del título de doctor, se ha realizado bajo mi dirección y que cumple los requisitos necesarios para su defensa delante del Tribunal correspondiente.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmo este documento.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'M' followed by a long, horizontal stroke that tapers to a point.

Firma, Dra. María del Mar Castellanos Rodrigo

Girona, 25 de marzo de 2016



El Dr. Lluís Ramió i Torrentà, de la Universitat de Girona,

DECLARA:

Que el siguiente trabajo titulado, **IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE UNA EXTENSA FAMILIA DE ETNIA GITANA (ESTUDIO EMGypsy)**, que presenta el Sr. René Roberto Robles Cedeño para la obtención del título de doctor, se ha realizado bajo mi dirección y que cumple los requisitos necesarios para su defensa delante del Tribunal correspondiente.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmo este documento.

Firma, Dr. Lluís Ramió i Torrentà

Girona, 25 de marzo de 2016



El Dr. Jordi Gich Fullà, de la Universitat de Girona,

DECLARA:

Que el siguiente trabajo titulado, ***IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE UNA EXTENSA FAMILIA DE ETNIA GITANA (ESTUDIO EMGypsy)***, que presenta el Sr. René Roberto Robles Cedeño para la obtención del título de doctor, se ha realizado bajo mi dirección y que cumple los requisitos necesarios para su defensa delante del Tribunal correspondiente.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmo este documento.

Firma, Dr. Jordi Gich Fullà

Girona, 25 de marzo de 2016





Y me gustan las almas errantes que caminan torcido,  
porque luchan contra el tiempo, contra lo conocido.

Porque lo normal resulta tan aburrido,  
porque el caminar chueco solo significa  
dejar de seguir la línea recta.

*Oswaldo Guayasamín*

Todos, en cierto grado, ignoramos muchas cosas.  
Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas.

*Albert Einstein*



## **AGRADECIMIENTOS**

---

Desde que era un niño mi vida siempre ha estado marcada por retos, algunos más fáciles y otros más difíciles, pero siempre llenos de ilusión. No ha sido un camino fácil desde el momento en que decidí dejar mi país y todo lo que ello conlleva para embarcarme en una nueva aventura, un nuevo proyecto, siempre preguntándome a mi mismo ¿qué tienes que hacer cada día para lograr ese sueño?. Pues bien, la respuesta es rodearte de personas que compartan esta misma ilusión y que sean pilares donde apoyarte en los momentos más difíciles. Este trabajo de tesis doctoral no ha sido la excepción, y no habría sido posible llevarlo a término sin el apoyo de una serie de personas.

En primer lugar quisiera agradecer a todos los pacientes, y especialmente a aquellos que sufren esclerosis múltiple, así como a sus familiares. Sin su ayuda (muchas veces inconsciente) no habría sido posible completar este trabajo. Ellos depositan cada día, en todo el equipo, su confianza y esperanza además de ayudarnos a aprender y formarnos mejor.

Desde mis años de Instituto, quisiera hacer una mención a mi querido amigo y maestro Julio Ortiz, aunque “oficialmente” nos enseñaba inglés, “extraoficialmente” me enseñó la pasión por aprender, que sin lugar a dudas ha marcado mi vida para siempre. Estimado Julio, probablemente nunca leas estas líneas pero quiero plasmar sobre el papel mi eterno agradecimiento. Quiero también agradecer a mis grandes amigos, Miguel Ángel Moreira García (aunque las circunstancias de la vida nos han distanciado, la balanza siempre se decanta por las cosas buenas) y como no a “los mellizos” William y Richard Zamora Mero y a toda su familia, mis amigos incondicionales, siempre presentes, siempre recordando los buenos momentos de “Fobia” y siempre una voz amiga disponible para los momentos difíciles. Ya son más de 20 años siendo amigos (es impresionante como pasa el tiempo) y espero sigan siendo muchos más.

También quisiera hacer una especial mención a uno de mis mentores y amigos el Dr. Juan Montalvo Herdoíza, quien no solo confió en mi en su momento, sino que también alimentó constantemente la idea de salir a especializarme. Gracias por todos los conocimientos compartidos, por ayudarme a creer en mis sueños y por enseñarme a ser mejor persona.

Llegar a España desde Ecuador aquella mañana del 09 de febrero de 2006 no fue fácil, recuerdo que hacía -4°C, nunca había viajado en avión y jamás había experimentado una temperatura tan baja. Recuerdo como agujas en mi cara del frío. Visto en perspectiva, ya sé que no era para tanto. Poco a poco todo fue cambiando además del tiempo. Me incorporé al grupo de Neuromuscular del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau con un equipo excepcional y muy profesional. Quisiera realizar una especial mención a Eduard Gallardo, Jordi Díaz, Ricard Rojas y sobre todo a Isabel Illa. Aún recuerdo tus palabras Isabel cuando, haciéndome poner los pies sobre la tierra, me dijiste *"...tienes que sacarte el MIR y hacerte neurólogo, ya después harás algo de investigación si quieres"*. Es así como me puse manos a la obra y robándole horas a las noches o al trayecto de autobús pude, de una forma bastante desestructurada, sacarme el MIR. Si alguna vez he creído en la suerte, ha sido en este periodo de mi vida.

Durante mi formación como neurólogo he ido conociendo pilares fundamentales, no solo para mi carrera profesional sino para mi vida personal. Gracias David, Joaquín, Rosa, Mar, Yolanda, Albert, Lluís, Fabián, Jordi, a mis resis grandes Cecile, María, Saioa y a los pequeños Mikel, Cristina, Olga, Anna, Berta, Karol y Carla. Una especial mención a David Genís, "el gran maestro", sin él este trabajo no habría visto la luz. Fue él quien, con ese "ojo clínico" que ve más allá de lo evidente, pudo identificar a la familia del estudio dándole forma como proyecto. También agradecer de forma especial a Mar, por aceptar el reto inicial de ser mi directora de tesis y por la dedicación y esfuerzo que ha invertido en ayudarme.

Durante mi dedicación a la Esclerosis Múltiple he conocido un grupo de personas excepcionales de quienes he aprendido a cómo trabajar en equipo y sobre todo cómo cuidar y escuchar a los pacientes. Sin Lluís, Pepi, Héctor,

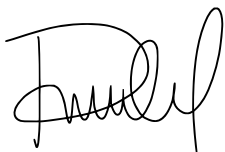
Ester, Jordi, Micky, Laura, Judit, Miguel Ángel, Natalia, Judith, Mireia y más recientemente Olga y Heleni no estaría aquí ni podríamos funcionar como lo que somos, una Unidad. Un agradecimiento especial también para el equipo de CEMCAT: Xavier, Mar, Jaume, Jordi, Carlos, Manolo, Joaquín y Anka por hacerme sentir parte del equipo y transmitirme sus conocimientos y experiencia durante mi rotación y también cada martes por videoconferencia.

Gracias Lluís, no solo porque a nivel personal te considero como mi amigo y hermano mayor, sino también por ser de aquellas personas que ha sabido extraer lo mejor de mi logrando que los pacientes sean la prioridad (ya sabes que he tenido alguna dificultad en este aspecto). Recuerdo aquel día de “reclutamiento” cuando aún era R2 (con toda la anécdota de los restaurantes y las estrellas Michelin!!!) y aquel apretón de manos final diciéndome *“si quieres dedicarte a algo tienes que hacerte imprescindible”*, frase que ya venía heredada pero que en realidad ha servido para mantener nuestro vínculo profesional. Gracias por ser tan “pesado” y no dejar de apretar para que definitivamente acabara la tesis. Espero seguir apoyándote en todos tus proyectos futuros y seguir trabajando juntos. Gracias Pepi “la jefa” por estar siempre pendiente y no dejar que “me aburra”; no sé cómo lo haces pero logras organizar y organizarnos de una manera formidable siempre velando por los pacientes. Gracias Héctor por estar siempre dispuesto a colaborar y por transmitirme esa parte de metódico que a mi me hace falta. Gracias Ester, me gustaría poder dedicar más tiempo a proyectos juntos; sin ti esta tesis no habría sido posible y desde que nos acompañas hemos visto cómo la Unidad ha crecido en todos los sentidos. Gracias Jordi no solo por ser mi co-director de tesis sino también por enseñarme a disfrutar aprendiendo de la cognición y de la vida (sí señor!!!). Gracias Micky por las horas invertidas, por estar siempre disponible, por tener siempre una sonrisa o un chiste durante la guardia o durante una PL (aunque sea de los malos!!!). Gracias Laura por ayudarme a entender aquello que los pacientes muchas veces no pueden expresar. Gracias Judit por ayudarme a ser más eficiente, espero que podamos seguir trabajando aunque sea de forma más indirecta. Gracias Miguel Ángel (Robleeeeees!!!) por tu espíritu investigador y por ser capaz de convertir una idea en realidad. Gracias Judith por ser tan práctica y eficiente a

la hora de ayudarnos a resolver problemas. Gracias Mireia por la implicación y compromiso en la exploración y manejo cognitivo de nuestros pacientes. Asimismo, quisiera agradecer a Xavier, Arnau, Eloy y Sergi de VICOROB por su ayuda en el análisis volumétrico de las imágenes de RM así como a Brigitte del IDI por su ayuda en la valoración de estas imágenes. También extendiendo mi agradecimiento a María del IDIBGI por su ayuda incondicional en el análisis estadístico de los datos.

Siempre he creído que la familia es lo más importante. Refuerza tu espíritu y te proporciona el equilibrio necesario para asumir todos los retos que se presenten. Durante estos últimos años y, gracias al destino, he redescubierto a mi familia volviendo a sentir ese calor de hogar guardado en mis recuerdos de niño y por eso quisiera agradecerles de todo corazón a mis padres Rangel y Olga por hacer un esfuerzo sobrehumano en educarme, muchas veces dejando de lado necesidades básicas. A mis hermanos Boris y Zahira por estar siempre allí en las buenas y en las malas y como no, a mi querida Melina (que grande que estás mi negris!!!). Eres ya toda una mujer. Aún recuerdo ese 24 de agosto de 2002 cuando llegaste a iluminar mi vida. Gracias por existir y siempre tendrás un lugar en el corazón y el pecho de tu papa para cuando lo necesites. Espero seguirte acompañando toda la vida y verte crecer con esa alegría y espontaneidad que te caracteriza.

Pero sobre todo quiero agradecerte a ti Anna por darle la vuelta a mi existencia. Por ayudarme a encontrar paz en aquellos días en que ya no podía más. Por enseñarme lo que es el amor, la entrega y el compromiso. Por entender mis miedos y darme la tranquilidad que necesito. Por creer en mi y convencerme de que yo también lo haga. Por hacerme mejor persona cada día. He estado solo muchos años, pero eso ya es cosa del pasado porque te he encontrado y no pienso perderte. T'estimo molt princesa del meu cor. Gràcies de veritat.



René Robles Cedeño

## ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIAQS	Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BOC-IgG	Bandas oligoclonales de IgG
BOC-IgM	Bandas oligoclonales de IgM
BOC	Bandas oligoclonales
BPF	<i>"Brain parenchymal fraction"</i>
CADASIL	<i>"Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy"</i>
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
cM	Centimorgan
CNV	<i>"Copy Number Variations"</i>
COX	Citocromo C Oxidasa
CpG	Islas de citosina-guanina
dbSNP	base de datos de SNPs
ddNTP	Didesoxinucleótidos
DL	Desequilibrio de ligamiento
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EBNA1	Antígeno nuclear del virus Epstein-Barr tipo 1
EDNRB	<i>"Endothelin Receptor, Type B"</i>
EDSS	Escala ampliada de discapacidad de Kurtzke
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Esclerosis múltiple
EMPP	Esclerosis múltiple primaria progresiva
EMPR	Esclerosis múltiple progresiva-recurrente
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
FAST	<i>"fMRIB's Automated Segmentation Tool"</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral



Gd	Gadolinio
GWAS	<i>"Genome-Wide Association Studies"</i>
HLA	<i>"Human leukocyte antigen"</i>
HV1	Región hipervariable 1 de la región control
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IMSGC	<i>"International Multiple Sclerosis Genetics Consortium"</i>
Indel	Inserción-delección
INF- $\gamma$	Interferón gamma
KIR	<i>"Killer-immunoglobulin-like receptors"</i>
LCR	Líquido ceforraquídeo
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDT	Lesiones desmielinizantes típicas
LES	Lupus eritematoso sistémico
LISB	Lesiones inespecíficas de sustancia blanca
LVS	Lesiones vasculares subcorticales
Mb	Megabase
MAF	<i>"Minor Allele Frequency" o "Global Minor Allele Frequency"</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NK	<i>"Natural Killers"</i>
NOHL	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
OMIM	<i>"Online Mendelian Inheritance in Man"</i>
NO	Óxido nítrico
OR	<i>"Odd ratio"</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	<i>"Restriction Fragment Length Polymorphism"</i>
RM	Resonancia magnética
SB	Sustancia blanca
SCA	Síndrome clínicamente aislado
SG	Sustancia gris

SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNPs	<i>"Single Nucleotide Polymorphism"</i>
SP	<i>"Spin-echo"</i>
SPM	<i>"Statistical Parametric Mapping"</i>
SRA	Síndrome radiológicamente aislado
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocitos T <i>"helper"</i>
TIM	Tratamiento inmunomodulador
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UNIEM	Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosis Múltiple
VCAM-1	Molécula de citoadhesión vascular-1
VEB	Virus de Epstein-Barr

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b>	Prevalencia mundial de la EM distribuida por países.....	5
<b>Figura 2.</b>	Factores de riesgo de EM.....	9
<b>Figura 3.</b>	Esquema de la cascada inmunopatogénica propuesta para la EM.....	13
<b>Figura 4.</b>	Principales síntomas de debut de la EM.....	15
<b>Figura 5.</b>	Formas clínicas de la EM.....	22
<b>Figura 6.</b>	Representación esquemática del curso clínico de la EM.....	24
<b>Figura 7.</b>	Esquema de la historia natural de la EM.....	26
<b>Figura 8.</b>	Algoritmo de tratamiento para la EMRR propuesto por la AIAQS en el 2012.....	29
<b>Figura 9.</b>	Algoritmo de tratamiento para la EMSP propuesto por la AIAQS en el 2012.....	30
<b>Figura 10.</b>	Esquema representativo del genoma y sus principales elementos.....	32
<b>Figura 11.</b>	Representación esquemática de la variabilidad genética entre seres humanos.....	33
<b>Figura 12.</b>	Clasificación de las enfermedades con componente genético.....	34
<b>Figura 13.</b>	Modelos de variabilidad genética.....	36
<b>Figura 14.</b>	Artículo publicado por Eichhorst en 1896.....	37
<b>Figura 15.</b>	Abordaje genético clásico de la EM en base al estudio de los árboles genealógicos.....	39
<b>Figura 16.</b>	Riesgo de padecer EM según parentesco familiar.....	50
<b>Figura 17.</b>	Estudios de ligamiento y asociación.....	54
<b>Figura 18.</b>	Proceso de identificación de genes de susceptibilidad mediante el acotamiento de regiones de riesgo.....	55
<b>Figura 19.</b>	Esquema representativo del uso de RFLP como marcadores genéticos en el genotipado de los miembros de una familia.....	57
<b>Figura 20.</b>	Esquema representativo del uso de microsatélites como marcadores genéticos en el genotipado de individuos.....	58
<b>Figura 21.</b>	Esquema representativo de los SNPs.....	58

<b>Figura 22.</b>	Esquema de los principales tipos de SNPs dependiendo de su localización en el exón y de su función reguladora.....	60
<b>Figura 23.</b>	Esquema que muestra el uso de microarrays en el genotipado de grandes cantidades de SNPs.....	61
<b>Figura 24.</b>	Esquema del proceso de división celular, propio de las células germinales (meiosis) y de las células somáticas (mitosis).....	62
<b>Figura 25.</b>	Esquema representativo del equilibrio de ligamiento.....	64
<b>Figura 26.</b>	Esquema representativo del desequilibrio de ligamiento.....	65
<b>Figura 27.</b>	Desequilibrio de ligamiento según las diferentes poblaciones.....	66
<b>Figura 28.</b>	Esquema general de un estudio de ligamiento.....	67
<b>Figura 29.</b>	Esquema general de un estudio de asociación.....	70
<b>Figura 30.</b>	Esquema representativo de los SNPs y “Tag SNPs” como parte de los estudios de asociación.....	72
<b>Figura 31.</b>	Esquema representativo de los abordajes hipotéticos para la realización de un estudio de asociación.....	73
<b>Figura 32.</b>	Tamaños muestrales requeridos para observar una diferencia estadísticamente significativa en los GWAS según el Teorema de Bayes.....	74
<b>Figura 33.</b>	Diferentes formas de representar los estudios de asociación: “gráfica de Manhattan” horizontal (A) y vertical (B), y la “gráfica Circos” (C).....	75
<b>Figura 34.</b>	La región HLA y los diferentes grupos de genes que la conforman.....	77
<b>Figura 35.</b>	Distribución de las frecuencias mundiales de <i>HLA-DRB1*15:01</i> en los pacientes con EM.....	79
<b>Figura 36.</b>	Distribución de las frecuencias mundiales de <i>HLA-DRB1*03:01</i> y <i>HLA-DRB1*13:03</i> en los pacientes con EM...	80
<b>Figura 37.</b>	Distribución de las frecuencias mundiales de <i>HLA-DRB1*04:05</i> en los pacientes con EM.....	81
<b>Figura 38.</b>	Distribución de las frecuencias mundiales de <i>HLA-DRB1*15:03</i> en los pacientes con EM.....	82
<b>Figura 39.</b>	Fenómenos epistáticos para el locus <i>HLA-DRB1</i> en pacientes con EM.....	84
<b>Figura 40.</b>	Grupos miembros del IMSGC.....	86
<b>Figura 41.</b>	Los dos primeros locus no HLA de susceptibilidad para la EM descritos en el primer GWAS.....	88

<b>Figura 42.</b>	Gráfica de Manhattan que muestra los 57 principales locus no HLA de susceptibilidad para EM.....	116
<b>Figura 43.</b>	Gráfica Circos que muestra los 48 nuevos locus no HLA de susceptibilidad para EM mediante abordaje por Inmunochip.....	122
<b>Figura 44.</b>	Proceso de “ <i>splicing</i> ” durante la maduración del ARNm.....	127
<b>Figura 45.</b>	Esquema representativo del método de secuenciación de Sanger.....	129
<b>Figura 46.</b>	Esquema representativo de la secuenciación genética mediante análisis de exómica.....	131
<b>Figura 47.</b>	Las 4 estrategias de análisis de exómica.....	132
<b>Figura 48.</b>	Esquema representativo del mapeo por homocigosis para familias multiplex.....	134
<b>Figura 49.</b>	Esquema de transmisión del ADN mitocondrial.....	139
<b>Figura 50.</b>	Distribución geográfica de los principales haplogrupos mitocondriales.....	140
<b>Figura 51.</b>	Divisiones y subdivisiones de los haplogrupos mitocondriales.....	140
<b>Figura 52.</b>	La HV1 y su localización dentro del ADN mitocondrial.....	141
<b>Figura 53.</b>	Ruta de migración del pueblo gitano desde la India a Europa.....	145
<b>Figura 54.</b>	Carta de Alfonso V “El Magnánimo” concediendo salvoconducto a Tomás Sabba peregrino a Santiago de Compostela.....	147
<b>Figura 55.</b>	Distribución geográfica y frecuencia de la población gitana en Europa.....	147
<b>Figura 56.</b>	Esquema del programa de amplificación para el análisis del ADN mitocondrial.....	173
<b>Figura 57.</b>	Esquema del programa de amplificación para el genotipado de la región HLA.....	174
<b>Figura 58.</b>	Esquema del programa de hibridación para el genotipado de la región HLA.....	174
<b>Figura 59.</b>	Nomenclatura y ubicación de las variantes observadas en el análisis exómico según la base de datos “ <i>Ensembl</i> ”.....	179
<b>Figura 60.</b>	Árbol genealógico de la familia en estudio.....	186
<b>Figura 61.</b>	Árbol genealógico de la familia en estudio, incluyendo solo los miembros pertenecientes al núcleo familiar principal.....	202

<b>Figura 62.</b>	Representación gráfica de la presencia de haplogrupos (M5, H, J y U3) observados entre los miembros de la familia y los controles.....	206
<b>Figura 63.</b>	Los 12 principales locus de susceptibilidad no HLA asociados a la enfermedad según los principales GWAS hasta el 2010.....	209
<b>Figura 64.</b>	Vías y redes en pacientes con EM según los datos obtenidos a partir de los primeros GWAS.....	221
<b>Figura 65.</b>	Probable ruta de migración de la familia en estudio en base a sus haplogrupos mitocondriales.....	227
<b>Figura 66.</b>	Proteína CD58 y su participación en la adhesión y activación de linfocitos.....	232
<b>Figura 67.</b>	Expresión de <i>ARN-CD58</i> en base a los alelos de rs2300747.....	233
<b>Figura 68.</b>	Funciones del complejo genético KIR.....	239
<b>Figura 69.</b>	Posible mecanismo por el que <i>KIR2DL1</i> mediaría la predisposición a padecer EM y neoplasias en la familia de estudio.....	241

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b>	Diagnóstico diferencial de la EM.....	17
<b>Tabla 2.</b>	Criterios de Allison y Millar <i>–izquierda–</i> y criterios de Poser <i>–derecha–</i> para EM.....	20
<b>Tabla 3.</b>	Criterios diagnósticos revisados de McDonald 2010 para la EM.....	21
<b>Tabla 4.</b>	Criterios de Okuda para el diagnóstico de SRA.....	25
<b>Tabla 5.</b>	Resumen de los datos obtenidos en los diferentes estudios epidemiológicos en familias con EM.....	42
<b>Tabla 6.</b>	Resumen de los datos obtenidos en los diferentes estudios epidemiológicos en gemelos con EM.....	46
<b>Tabla 7.</b>	Riesgo de padecer EM según parentesco familiar.....	50
<b>Tabla 8.</b>	Comparación de los SNPs originales y de los nuevos descritos en el GWAS del 2011 asociados a los principales locus no HLA de susceptibilidad para EM.....	106
<b>Tabla 9.</b>	Los 57 principales locus no HLA de susceptibilidad EM.....	117
<b>Tabla 10.</b>	Los 48 nuevos locus no HLA de susceptibilidad.....	123
<b>Tabla 11.</b>	Resumen de los 15 GWAS publicados hasta ahora en EM.....	126
<b>Tabla 12.</b>	Trastornos mendelianos descritos en población gitana.....	149
<b>Tabla 13.</b>	“Primers” de amplificación de la HV1 del ADN mitocondrial.....	173
<b>Tabla 14.</b>	Locus de susceptibilidad no HLA con asociación a EM en los primeros GWAS.....	175
<b>Tabla 15.</b>	SNPs no HLA con asociación a EM en los primeros GWAS y los “Primers” diseñados para su estudio.....	176
<b>Tabla 16.</b>	Datos relativos al análisis exómico de los sujetos seleccionados.....	178
<b>Tabla 17.</b>	Variables clínicas de los sujetos no afectados y afectados de nuestro estudio (n=30).....	188
<b>Tabla 18.</b>	Variables radiológicas de los sujetos no afectados y afectados de nuestro estudio (n=26).....	189
<b>Tabla 19.</b>	Características clínico-radiológicas del grupo de 7 sujetos afectados por alguna de las formas clínicas de EM.....	196

<b>Tabla 20.</b>	Características clínico-radiológicas del grupo de 3 sujetos afectados de SRA.....	199
<b>Tabla 21.</b>	Distribución de los diferentes haplogrupos observados en los miembros de la familia.....	203
<b>Tabla 22.</b>	Asociación de los haplogrupos y las variantes de la HV1 observados entre los miembros de la familia y los controles.....	205
<b>Tabla 23.</b>	Resultados observados para el gen <i>HLA-DRB1</i> tanto en la familia en estudio como en las cohortes comparativas.....	208
<b>Tabla 24.</b>	Resultados de los 12 principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS.....	210
<b>Tabla 25.</b>	Resultados del análisis de exómica basado en el modelo de herencia autosómico recesivo: 16 genes con variantes que podían afectar la expresión o la función del gen.....	212
<b>Tabla 26.</b>	Resultados del análisis de exómica basado en el modelo de herencia autosómico recesivo: los 3 genes aislados durante el acotamiento en base a su función e implicación en el sistema inmune.....	213
<b>Tabla 27.</b>	Resultados del análisis de exómica basado en el modelo de herencia autosómico dominante: 20 genes cuyas variantes podían producir una alteración “posiblemente” o “probablemente” dañina en la estructura o función de la proteína según la base “ <i>PolyPhen</i> ”.....	214
<b>Tabla 28.</b>	Resultados del análisis de exómica basado en el modelo de herencia autosómico dominante: los 4 genes aislados durante el segundo acotamiento en base a su función e implicación en el sistema inmune.....	215
<b>Tabla 29.</b>	Los 24 SNPs relacionados con el gen <i>CD58</i> y asociados a la EM.....	235
<b>Tabla 30.</b>	Resumen de los alelos KIR implicados hasta ahora en la EM.....	239





## **RESÚMENES**



## RESUMEN

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica del sistema nervioso central, de etiología desconocida y mecanismo autoinmune en la que dos procesos patogénicos, la inflamación y la neurodegeneración, confluyen originando un trastorno de curso progresivo con un alto grado de discapacidad tanto física como cognitiva. Es la causa más frecuente de discapacidad neurológica de origen no traumático en la población adulta joven del mundo occidental. Estudios epidemiológicos y de historia natural demuestran que existe una susceptibilidad genética de base sobre la cual actuarían una serie de factores ambientales que generarían un desequilibrio del sistema inmune que producirá la afectación del sistema nervioso central con la consecuente manifestación de los signos y síntomas característicos de la enfermedad. Sin embargo, hasta ahora no se ha podido demostrar toda la heredabilidad que comporta la esclerosis múltiple lo cual nos indica que probablemente dicha carga genética se encuentra oculta en forma de una variante rara dentro de un clúster familiar o en forma de factores epigenéticos encargados de regular la expresión de los genes determinantes en la aparición de la enfermedad.

Mediante este trabajo de tesis doctoral se ha estudiado, tanto clínicamente como genéticamente, a una extensa familia de etnia gitana con una forma hereditaria de esclerosis múltiple. El elevado número de miembros afectados, la presencia de varias formas clínicas y las características étnicas de la familia (una alta endogamia y, por tanto, una elevada homocigosis dentro de la misma), la convierten en una población aislada excepcional para el estudio de nuevos sustratos genéticos asociados a la enfermedad.

Los resultados de esta tesis han permitido identificar ciertas variantes genéticas, algunas de ellas no descritas previamente, de forma significativamente más elevada entre los sujetos de la familia afectados de esclerosis múltiple en comparación a los no afectados, sugiriendo la existencia de varios genes candidatos implicados en el desarrollo de la enfermedad en esta familia concreta.

## RESUM

L'esclerosi múltiple és una malaltia crònica del sistema nerviós central, d'etiologia desconeguda i mecanisme autoimmune en la qual dos processos patogènics, la inflamació i la neurodegeneració, conflueixen originant un trastorn de curs progressiu amb un alt grau de discapacitat tant física com a cognitiva. És la causa més freqüent de discapacitat neurològica d'origen no traumàtic en la població adulta jove del món occidental. Estudis epidemiològics i d'història natural demostren que existeix una susceptibilitat genètica de base sobre la qual actuarien una sèrie de factors ambientals que generarien un desequilibri del sistema immune que produirà l'afectació del sistema nerviós central amb la consegüent manifestació dels signes i símptomes característics de la malaltia. No obstant això, fins ara no s'ha pogut demostrar tota l'heretabilitat que comporta l'esclerosi múltiple la qual cosa ens indica que probablement aquesta càrrega genètica es troba oculta en forma d'una variant rara dins d'un clúster familiar o en forma de factors epigenètics encarregats de regular l'expressió dels gens determinants en l'aparició de la malaltia.

Mitjançant aquest treball de tesi doctoral s'ha estudiat, tant clínicament com genèticament, una extensa família d'ètnia gitana amb una forma hereditària d'esclerosi múltiple. L'elevat nombre de membres afectats, la presència de diverses formes clíniques i les característiques ètniques de la família (una alta endogàmia i per tant una elevada homozigosi dins de la mateixa), la converteixen en una població aïllada excepcional per l'estudi de nous substrats genètics associats a la malaltia.

Els resultats d'aquesta tesi han permès identificar certes variants genètiques, algunes d'elles no descrites prèviament, de forma significativament més elevada entre els subjectes de la família afectats d'esclerosi múltiple en comparació als no afectats, suggerint l'existència de diversos gens candidats implicats en el desenvolupament de la malaltia en aquesta família concreta.

## **ABSTRACT**

Multiple sclerosis is a chronic disease of the central nervous system which has an unknown aetiology and an autoimmune mechanism. Two pathogenic processes, inflammation and neurodegeneration, converge causing a progressive disorder with a high degree of both physical and cognitive disability. The disease is the most frequent cause of non-traumatic neurological disability in the young adult population in the Western world. Epidemiological and natural history studies show that there is a genetic susceptibility to the disease upon which a number of environmental factors act, generating an imbalance in the immune system that eventually produces a central nervous system attack with the consequent manifestation of the characteristic signs and symptoms of the disease. However, the inherited aspect of the disease has yet to be completely elucidated, suggesting that the genetic burden is probably hidden in the form of a rare variant inside a family cluster or as an epigenetic factor that is responsible for regulating the expression of genes at the disease onset.

In this doctoral thesis a large Romani family with an inherited form of multiple sclerosis has been studied clinically and genetically. The high number of affected members, the presence of several clinical forms and the ethnic characteristics of the family (with considerable inbreeding and a consequently high level of homozygosity) make it an exceptional, isolated population for the study of new genetic substrates associated with the disease.

The results of this doctoral thesis reveal certain genetic variants, some of which have not been previously described, are significantly more frequent in the family members with MS than in unaffected subjects, suggesting that there are several candidate genes involved in the development of the disease in this particular family.



# ÍNDICE GENERAL

---

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	3
1.1.1. Definición.....	3
1.1.2. Epidemiología.....	4
1.1.3. Factores de riesgo.....	6
1.1.3.1. Factores genéticos.....	6
1.1.3.2. Factores ambientales.....	7
1.1.4. Patogenia.....	9
1.1.5. Debut clínico.....	14
1.1.6. Diagnóstico.....	15
1.1.6.1. La orientación clínica.....	15
1.1.6.2. Las pruebas complementarias.....	16
1.1.6.3. Los criterios diagnósticos.....	20
1.1.7. Curso clínico e historia natural.....	22
1.1.8. Tratamiento.....	26
1.2. GENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	31
1.2.1. Las bases genéticas en la expresión de una enfermedad...	31
1.2.2. Abordaje genético clásico de la EM.....	37
1.2.2.1. Estudios en grandes series de familias multiplex.....	38
1.2.2.1.1. La serie canadiense.....	39
1.2.2.1.2. Las series británicas.....	40
1.2.2.1.3. Otras series europeas.....	41
1.2.2.2. Estudios en gemelos.....	43
1.2.2.3. Estudios en adoptados, hermanastros y cónyuges.	47
1.2.2.4. Estudios con RM en familias .....	48
1.2.2.5. Aplicación de los resultados de los estudios en familias.....	49
1.2.3. Abordaje genético molecular de la EM.....	53
1.2.3.1. Hacia el mapeo genético de las enfermedades.....	53



1.2.3.2. Uso de marcadores genéticos en el mapeo de enfermedades.....	55
1.2.3.3. El ligamiento y el desequilibrio de ligamiento.....	62
1.2.3.4. Estudios de ligamiento.....	67
1.2.3.5. Estudios de asociación.....	70
1.2.4. Genes candidatos en EM.....	76
1.2.4.1. El MHC y la región HLA.....	76
1.2.4.1.1. La región HLA y la EM en población caucásica.....	77
1.2.4.1.2. Otros alelos HLA en poblaciones no caucásicas.....	81
1.2.4.1.3. Fenómenos epistáticos en la región HLA.....	83
1.2.4.1.4. Conclusiones referentes a los genes HLA y EM.....	85
1.2.4.2. Genes de susceptibilidad no HLA.....	86
1.2.4.2.1. Resultados de los principales GWAS en EM.....	88
1.2.4.2.2. Conclusiones referentes a los genes no HLA y EM.....	125
1.2.5. El análisis de exómica y la secuenciación de nueva generación.....	126
1.2.5.1. Secuenciación de primera generación y de nueva generación.....	127
1.2.5.2. Estudios de análisis exómico en EM.....	136
1.2.6. El ADN mitocondrial y la EM.....	139
1.2.7. Conclusiones finales referentes a la genética de la EM.....	144
1.3. ESTUDIOS EN POBLACIÓN GITANA.....	145
1.3.1. Los orígenes de la población gitana.....	145
1.3.2. Estudios genéticos en población gitana.....	148
1.3.2.1. La importancia del análisis genético en poblaciones aisladas.....	148
1.3.2.2. Los haplogrupos del ADN mitocondrial en población gitana sana y con EM.....	149
1.3.2.3. La región HLA en población gitana sana y con EM.....	152

<b>2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>155</b>
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	157
2.2. HIPÓTESIS.....	158
2.3. OBJETIVOS.....	159
<b>3. PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>161</b>
3.1. PACIENTES.....	163
3.1.1. Diseño.....	163
3.1.2. Sujetos del estudio.....	163
3.1.2.1. Criterios de inclusión y exclusión de los sujetos del estudio.....	164
3.1.2.2. Grupos de sujetos.....	165
3.1.2.2.1. Sujetos afectados.....	165
3.1.2.2.2. Sujetos no afectados.....	165
3.1.3. Variables del estudio.....	166
3.1.3.1. Variables clínicas.....	166
3.1.3.2. Variables radiológicas.....	167
3.1.3.3. Variables genéticas.....	168
3.2. MÉTODOS.....	169
3.2.1. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y RADIOLÓGICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.....	169
3.2.1.1. Protocolo de inclusión y registro de los sujetos.....	169
3.2.1.2. Protocolo de obtención de las variables clínicas.....	170
3.2.1.3. Protocolo de obtención de las variables radiológicas.....	170
3.2.1.4. Protocolo de asignación de sujetos a los diferentes grupos.....	171
3.2.2. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.....	172
3.2.2.1. Obtención de las muestras de sangre.....	172
3.2.2.2. Obtención de ADN y ARN.....	172

3.2.2.3. Caracterización de los haplogrupos de ADN mitocondrial.....	172
3.2.2.4. Genotipado de la región HLA.....	173
3.2.2.5. Genotipado de los principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS.....	175
3.2.2.6. Análisis de exómica.....	177
3.2.2.6.1. Análisis inicial en un grupo seleccionado de sujetos.....	177
3.2.2.6.2. Validación de las variantes potencialmente patogénicas según el análisis de exómica.....	179
3.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	181
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>183</b>
4.1. ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN DE LA FAMILIA.....	185
4.2. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y RADIOLÓGICAS DE LA FAMILIA.....	187
4.2.1. Descripción del grupo de sujetos afectados.....	190
4.2.1.1. Descripción clínico-radiológica del grupo de sujetos afectados de EM.....	190
4.2.1.2. Descripción clínico-radiológica del grupo de sujetos afectados de SRA o EM presintomática.....	196
4.2.2. Descripción del grupo de sujetos no afectados.....	199
4.3. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS DE LA FAMILIA.....	200
4.3.1. Descripción de los haplogrupos de ADN mitocondrial.....	203
4.3.2. Descripción de los resultados del genotipado de la región HLA.....	206
4.3.3. Descripción de los resultados del genotipado de los principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS.....	209
4.3.4. Descripción de los resultados del análisis de exómica.....	211
4.3.4.1. Acotamiento y validación de las variantes potencialmente patogénicas en base al modelo de herencia autosómico recesivo .....	212

4.3.4.2. Acotamiento y validación de las variantes potencialmente patogénicas en base al modelo de herencia autosómico dominante.....	213
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>217</b>
5.1. LA HEREDABILIDAD PERDIDA DE LA EM.....	219
5.2. ANÁLISIS DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y RADIOLÓGICAS DE LA FAMILIA.....	223
5.2.1. La familia en estudio como población aislada.....	223
5.3. ANÁLISIS DE LOS HAPLOGRUPOS DEL ADN MITOCONDRIAL DE LA FAMILIA.....	226
5.4. ANÁLISIS DE LA REGIÓN HLA Y SUS ALELOS EN LA FAMILIA	228
5.5. ANÁLISIS DEL ACOTAMIENTO GENÉTICO EN BASE A LOS PRINCIPALES GWAS PUBLICADOS HASTA EL 2010.....	231
5.5.1. El locus <i>CD58</i> y la EM.....	231
5.6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EXÓMICA DE LA FAMILIA.....	236
5.6.1. El locus <i>CD207</i> .....	236
5.6.2. El complejo genético KIR y la EM.....	237
5.7. LIMITACIONES.....	243
5.8. PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	245
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>247</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>251</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>325</b>
8.1. ANEXO 1: Escala ampliada de discapacidad de Kurtzke (EDSS)..	327
8.2. ANEXO 2: Criterios de Barkhof.....	332
8.3. ANEXO 3: Consentimiento informado para los sujetos incluidos en el estudio.....	333
8.5. ANEXO 4: Protocolo de realización de la RM.....	337



## **1. *INTRODUCCIÓN***



## 1.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

### 1.1.1. Definición

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica crónica del sistema nervioso central (SNC), de etiología desconocida y mecanismo autoinmune en la que dos procesos patogénicos, la inflamación y la neurodegeneración, confluyen originando un trastorno de curso progresivo con un alto grado de discapacidad tanto física como cognitiva (Compston et al. 2006).

En 1866, Alfred Vulpian, un neurólogo y patólogo del hospital de la *Pitié-Salpêtrière* (París, Francia) fue el primero en utilizar el término “*sclèrose en plaques disseminées*”; más tarde, en 1868, su amigo y colega Jean-Martin Charcot acuñó el término “*sclèrose en plaques*”. Hacia el final del siglo XIX el término “*esclerosis múltiple*” empezó a aparecer en varias publicaciones inglesas por parte de Hammond, Wilks y Osler, pero no fue hasta la clásica publicación de 1955 realizada por McAlpine, Compston y Lumsden (McAlpine et al. 1955) cuando el término adquirió un uso más generalizado (Murray 2009).

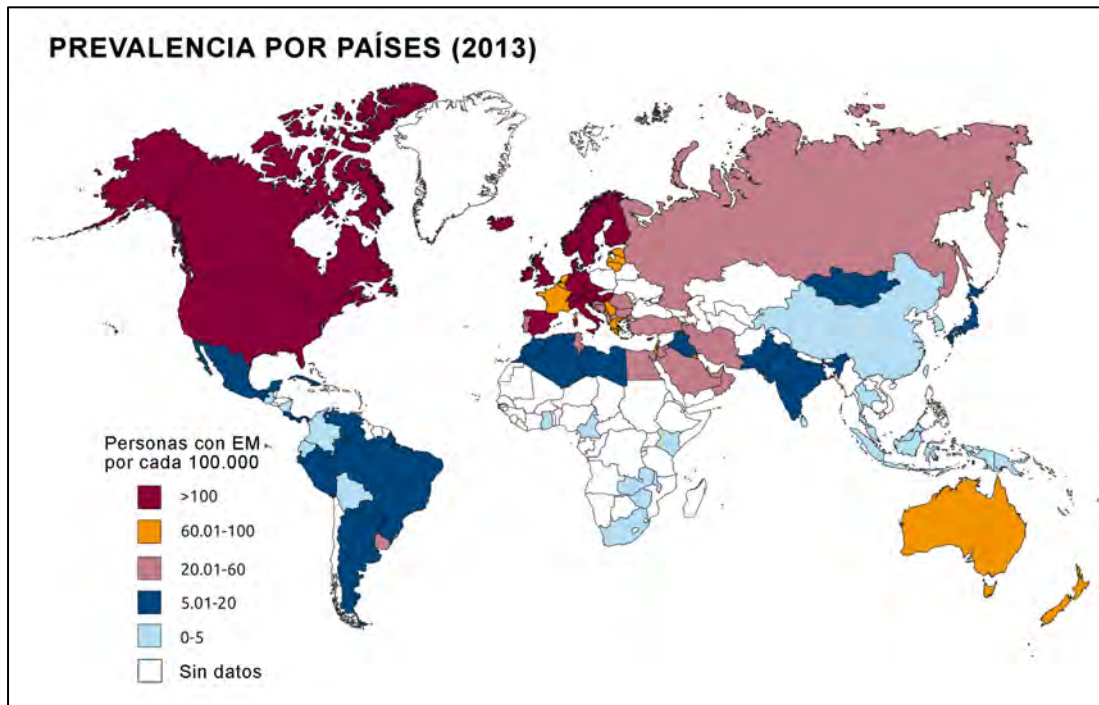
Como consenso general se cree que la enfermedad se desarrolla en individuos genéticamente susceptibles que se exponen a factores ambientales desencadenantes-agravantes y/o a antígenos endógenos que provocan una respuesta descontrolada del sistema inmunitario tanto celular como humoral contra antígenos específicos del SNC como la mielina, el axón, la neurona y la oligodendroglia (Compston et al. 2006). Esto a su vez genera infiltrados inflamatorios, desmielinización y lesión axonal de estructuras básicas como el cerebro, el cerebelo, el tronco encefálico, los nervios ópticos y la médula espinal (Frohman et al. 2006; Hauser & Oksenberg 2006). A nivel clínico estos procesos se traducen en déficits neurológicos focales (los llamados brotes) y un progresivo acúmulo de discapacidad física y cognitiva, que hacen que la EM sea actualmente la causa más frecuente de discapacidad neurológica de origen no traumático en



la población adulta joven del mundo occidental. En efecto, aproximadamente la mitad de los pacientes necesitan algún tipo de asistencia para movilizarse o desarrollan algún grado de deterioro cognitivo en un periodo de entre 15 y 20 años desde el inicio de la enfermedad, con el consiguiente impacto e interferencia en la vida personal, familiar, social y laboral (Compston & Coles 2008).

### **1.1.2. Epidemiología**

Según datos del 2013, se estima que el número total de personas afectadas por EM a nivel mundial es de 2,3 millones, con un incremento global de 40.000 casos por año desde el año 2008 y un aumento de la prevalencia media desde los 30 casos/100.000 habitantes en el año 2008 a los 33 casos/100.000 habitantes en el año 2013 (Multiple Sclerosis International Federation 2013). Este incremento se atribuye, en parte, al mejor abordaje diagnóstico de la enfermedad y a un mayor acceso de la población a los sistemas sanitarios, pero también responde a un incremento real de la incidencia y de la prevalencia de la enfermedad. La distribución de estas cifras es variable según las zonas geográficas analizadas, con un claro gradiente norte-sur. En efecto, la prevalencia más alta de EM se observa en Norteamérica (160 casos/100.000 habitantes) seguida de Europa (108 casos/100.000 habitantes), mientras que la menor prevalencia se observa en África subsahariana y Asia (2 casos/100.000 habitantes) (Multiple Sclerosis International Federation 2013) (Figura 1). Según la teoría propuesta por Poser, este gradiente podría ser explicado, en parte, por mutaciones genéticas producidas durante el primer milenio en la región de Escandinavia propagadas hacia el resto de Europa y el mundo por los vikingos durante sus migraciones e invasiones (Poser 1994). Sin embargo, los factores ambientales relacionados con la enfermedad, fundamentalmente la baja exposición solar y la consiguiente disminución de los niveles de vitamina D en sangre, podría también explicar parte de este gradiente (Simpson et al. 2015). En cuanto a la incidencia global, se puede afirmar la existencia de variaciones a lo largo del tiempo, aunque siempre como parte de estudios metodológicamente muy cuestionados.



**Figura 1.** Prevalencia mundial de la EM distribuida por países (modificada de Multiple Sclerosis International Federation 2013).

En España, se calcula que existen aproximadamente 46.000 personas diagnosticadas de EM, de las cuales 7.000 residen en Cataluña (Fundación Esclerosis Múltiple 2015). Asimismo, se han comunicado tasas de prevalencia variables. Entre 1968 a 1991, las tasas de prevalencia oscilaban entre 5 y 23 casos/100.000 habitantes (Aragonés JM 1968; Sosa Enríquez et al. 1983; Miró et al. 1983; Fernández et al. 1986; Barduzal Angles et al. 1987; Martín et al. 1988; Ruiz-Ezquerro et al. 1988; Garcia et al. 1989; Uria et al. 1991; Antón Aranda et al. 1991) mientras que entre 1994 a 1999, las tasas de prevalencia oscilaban entre 32 y 65 casos/100.000 habitantes (Fernández et al. 1994; Bufill et al. 1995; Sempere et al. 1995; Uria et al. 1997; Modrego Pardo et al. 1997; Pina et al. 1998; Benito-León et al. 1998; Tola et al. 1998; Mallada 1999). Estudios más recientes muestran prevalencias incluso más altas de hasta 78,6 (Otero-Romero et al. 2013), 90,2 (Izquierdo et al. 2015) e incluso 125/100.000 habitantes (Fernández et al. 2012). La incidencia de la enfermedad en nuestro entorno ha sido menos estudiada. No obstante, varios estudios informan de incidencias muy variables que oscilan entre 0,5 y 5,3

nuevos casos/100.000 habitantes/año (Aladro et al. 2005; Izquierdo et al. 2015).

De forma similar a lo que ocurre en la mayoría de enfermedades de base autoinmune, la EM afecta predominantemente al género femenino. Aunque hasta hace pocos años se hablaba de una tasa de afectación mujer-hombre de 2:1 (Compston & Coles 2002), actualmente se considera que la enfermedad es 3 a 4 veces más prevalente en mujeres, siendo diagnosticada en más del 70% de los casos, entre los 20 y 40 años de edad (con una edad media de debut de 32 años) (Compston & Coles 2008).

### **1.1.3. Factores de riesgo**

Datos basados en estudios epidemiológicos y de historia natural de la EM demuestran que existe una susceptibilidad genética de base sobre la cual actuarían una serie de factores ambientales que generarían un desequilibrio del sistema inmune que, a través de diferentes mecanismos patogénicos, producirá la afectación del SNC con la consecuente manifestación de los signos y síntomas característicos de la enfermedad (Figura 2). Sin embargo, los mecanismos específicos que influyen en dicha susceptibilidad genética, aquellos que desencadenan la respuesta inmune y aquellos que intervienen en las interacciones entre ambos son hasta ahora desconocidos para la comunidad científica.

#### **1.1.3.1. Factores genéticos**

La evidencia de un componente genético en la EM está basada en tres elementos fundamentales: la marcada agregación familiar, las altas tasas de concordancia entre gemelos monocigotos y las diferencias de prevalencia en diferentes grupos ancestrales. Partiendo de estos tres factores, derivados a su vez de grandes estudios epidemiológicos, muchos han sido los avances realizados para intentar otorgar a cada uno de ellos una explicación de base genética-molecular.

Sin embargo, desde que Eichhorst describiera una posible influencia familiar en la aparición de la EM hace ya más de 100 años (Eichhorst 1896) hasta ahora, no se ha podido demostrar toda la heredabilidad que comporta la enfermedad lo cual nos indica que probablemente dicha carga genética se encuentra oculta en forma de una variante rara dentro de un clúster familiar (factor que ha motivado la realización de este trabajo de tesis doctoral) o en forma de factores epigenéticos encargados de regular la expresión de los genes determinantes en la aparición de la enfermedad. Posteriormente se profundizará más en la genética de la EM (apartado 1.2.).

### 1.1.3.2. Factores ambientales

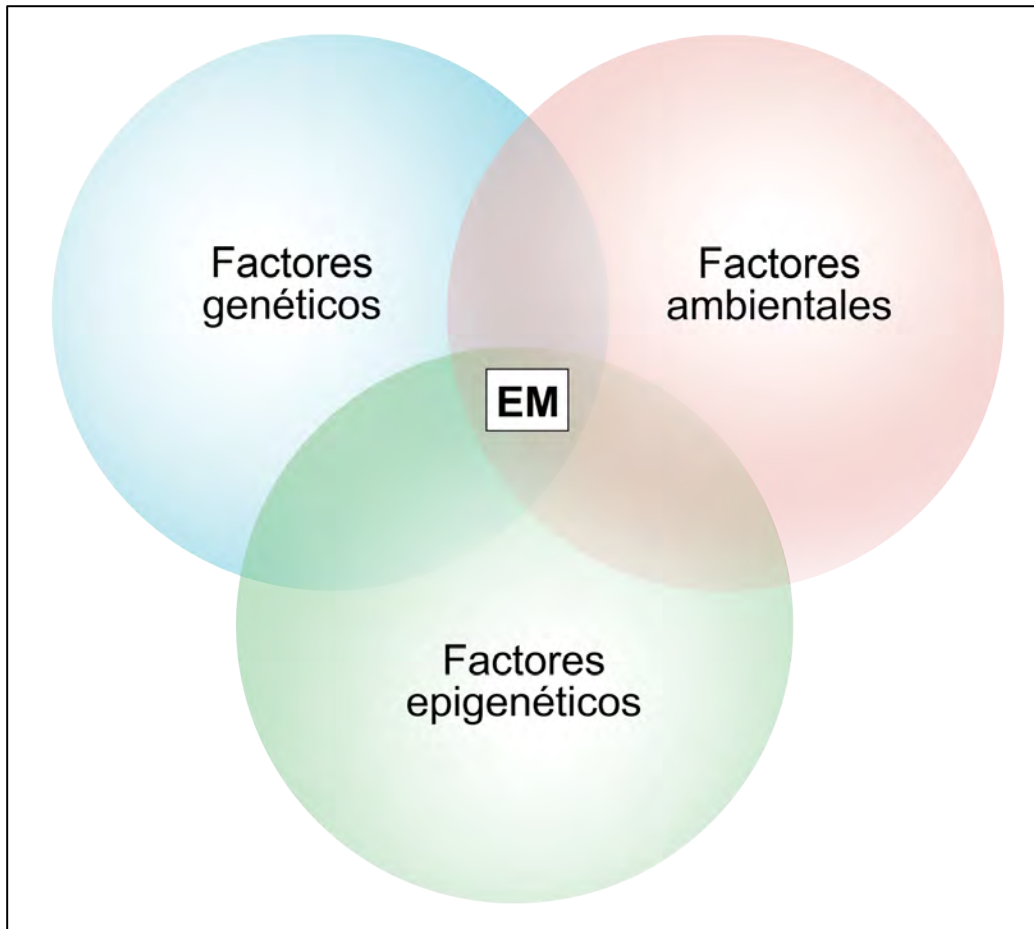
Durante los últimos 25 años, y también en base a los estudios epidemiológicos realizados, se han efectuado importantes avances en la identificación de los posibles factores ambientales implicados en la patogenia de la EM (Compston & Coles 2008). Aunque más de 40 posibles factores de riesgo ambientales han sido estudiados incluyendo infecciones (Bagos et al. 2006), vacunaciones (Farez & Correale 2011), enfermedades comórbidas (Monteiro et al. 2011), cirugías, traumatismos y accidentes (Lunny et al. 2013; Lunny et al. 2014), exposición a agentes tóxicos (Aminzadeh & Etminan 2007; Barragán-Martínez et al. 2012) o marcadores bioquímicos (Zhu et al. 2011; Liu et al. 2012; Huang et al. 2014), solo tres de estos factores han demostrado asociación estadísticamente significativa con la enfermedad: la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB), el consumo de tabaco y los niveles de vitamina D en sangre periférica (Belbasis et al. 2015).

El **VEB** es el único agente viral que se ha asociado de manera consistente con la EM, tanto la infección aguda (mononucleosis infecciosa) como el contacto previo con el agente viral demostrado mediante la presencia de anticuerpos IgG contra el antígeno nuclear del virus (anti-EBNA) (Almohmeed et al. 2013; Belbasis et al. 2015). Sin embargo, si bien es cierto que la seronegatividad se ha asociado a un riesgo muy bajo de desarrollar la enfermedad (Ascherio & Munger 2007), las conclusiones de los estudios llevados a cabo en relación con la asociación de la enfermedad al VEB han

sido, en ocasiones, difíciles de establecer, fundamentalmente debido a que más del 90% de la población general es seropositiva (Cohen 2000).

El **hábito tabáquico** ha sido estudiado como factor de riesgo durante muchos años. Varios son los mecanismos propuestos para explicar los efectos adversos que el tabaco tiene sobre la EM. Entre ellos se ha descrito su acción sobre el sistema inmune, la desmielinización y la rotura de la barrera hematoencefálica (Van-der-Mei et al. 2011; Ascherio et al. 2012). Estudios recientes han demostrado que los fumadores tienen un riesgo de hasta 1,5 veces mayor que los no fumadores de desarrollar la enfermedad (Manouchehrinia et al. 2013; Salzer & Sundström 2013; Belbasis et al. 2015).

La **vitamina D** es una hormona esteroidea que se sintetiza en la piel y cuyos niveles dependen de la ingesta adecuada de sus precursores y de la exposición del individuo a la radiación ultravioleta. Tal como se comentó previamente, algunos autores han sugerido que el gradiente de distribución geográfica observado en la EM se debe a la baja exposición solar en los países con mayor latitud y, por consiguiente, con niveles más bajos de vitamina D en sus habitantes (Simpson et al. 2011; Simpson et al. 2015). El riesgo de desarrollar EM aumenta con los niveles bajos de esta vitamina (Munger et al. 2006; Belbasis et al. 2015), así como la posibilidad de tener nuevos brotes (Simpson et al. 2010), de acumular mayor discapacidad (Smolders et al. 2008) y de presentar mayor actividad radiológica (Mowry et al. 2012). Dado que hasta ahora no está consensuado cuáles son los niveles adecuados o ideales que permitan un correcto funcionamiento del sistema inmune, actualmente se están llevando a cabo varios ensayos clínicos con suplementos de vitamina D como posible tratamiento complementario de la enfermedad (Burton et al. 2010; Theodoratou et al. 2014).



**Figura 2.** Factores de riesgo de EM (adaptada de Oksenberg & Baranzini 2010).

#### 1.1.4. Patogenia

Hoy en día es bien conocido y aceptado que en la EM se superponen dos mecanismos patogénicos principales: la inflamación y la neurodegeneración (Sospedra & Martin 2005; Hauser & Oksenberg 2006). Ambos mecanismos producen afectación tanto de la sustancia blanca como de la sustancia gris (Kutzelnigg et al. 2005) que se ven afectadas por fenómenos inflamatorios agudos y crónicos (Brück 2005), lesión axonal (Trapp et al. 1998) y pérdida neuronal (Dutta & Trapp 2007), mecanismos que son responsables de la progresión de la enfermedad y el desarrollo de discapacidad a largo plazo.

Aunque ambos mecanismos patogénicos aparecen ya desde el inicio de la enfermedad (Trapp et al. 1998; Kuhlmann et al. 2002), de forma habitual los

procesos inflamatorios están más presentes en las primeras fases de la enfermedad mientras que los neurodegenerativos predominan en fases tardías de la misma (Hauser & Oksenberg 2006; Rose & Carlson 2007).

La cascada inmunopatogénica de la enfermedad (Figura 3) se iniciaría con la activación anormal de linfocitos T CD4+ en sangre periférica mediada por las células presentadoras de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). El factor desencadenante de esta activación es desconocido pero probablemente se produzca por fenómenos de mimetismo molecular de epítomos compartidos entre la mielina y posibles antígenos infecciosos, o por activación policlonal a través de superantígenos bacterianos o víricos. En todo caso, dichos linfocitos activados escapan de los procesos de autocontrol y autorregulación específicos del individuo.

Mediante la interacción entre varias proteínas linfocíticas (como las integrinas) y endoteliales (como las selectinas, las moléculas de adhesión intercelular-1 [ICAM-1] y las de citoadhesión vascular-1 [VCAM-1]), los linfocitos activados se adhieren al endotelio, secretan metaloproteasas que degradan la matriz extracelular y posteriormente migran a través de la barrera hematoencefálica dentro del SNC.

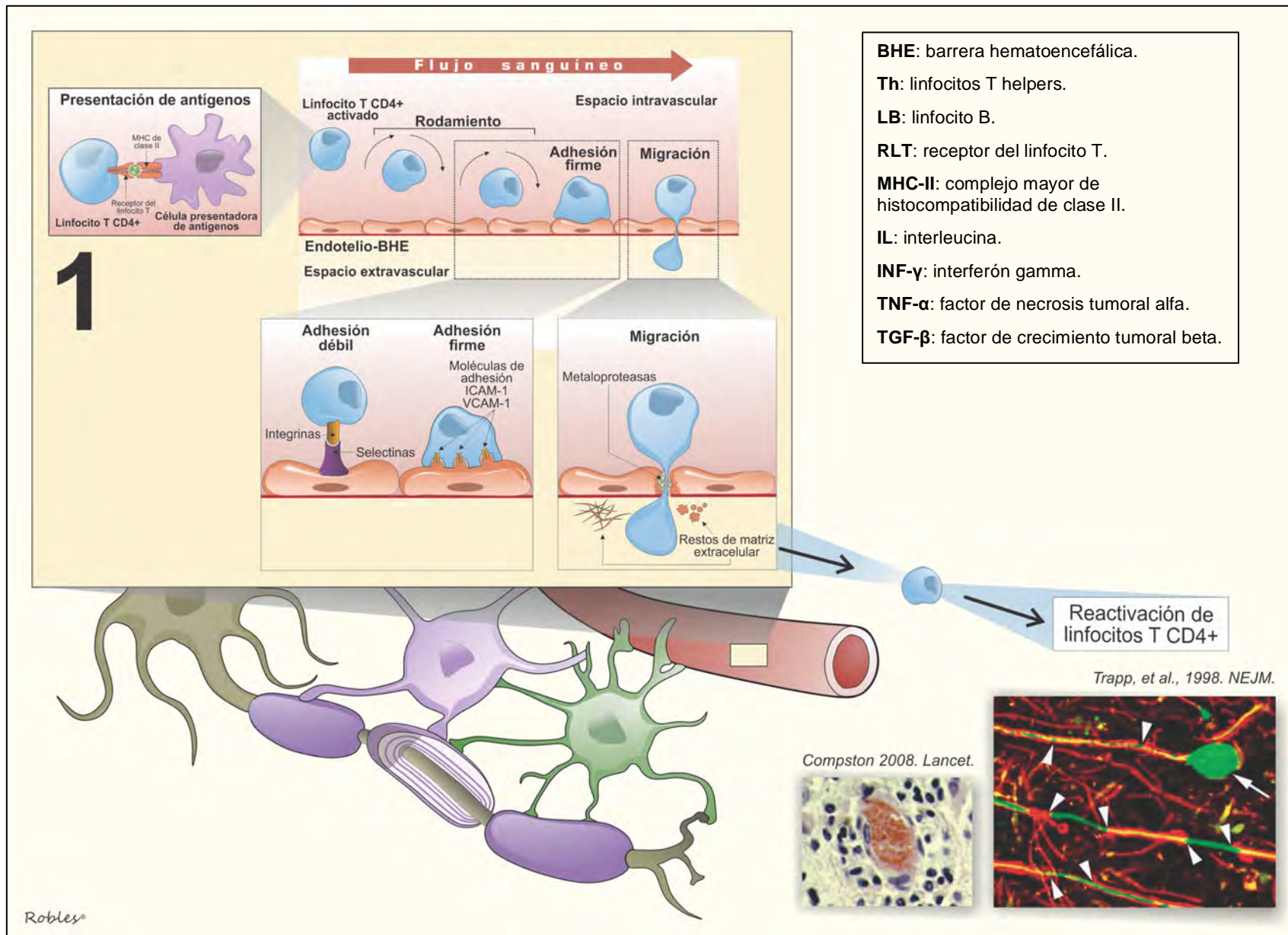
Una vez dentro del SNC, los linfocitos son reactivados por células presentadoras de antígenos innatas (como los astrocitos o las células microgliales) iniciando una respuesta inflamatoria dominada por 3 tipos de linfocitos T de ayuda o “*helpers*” (Th):

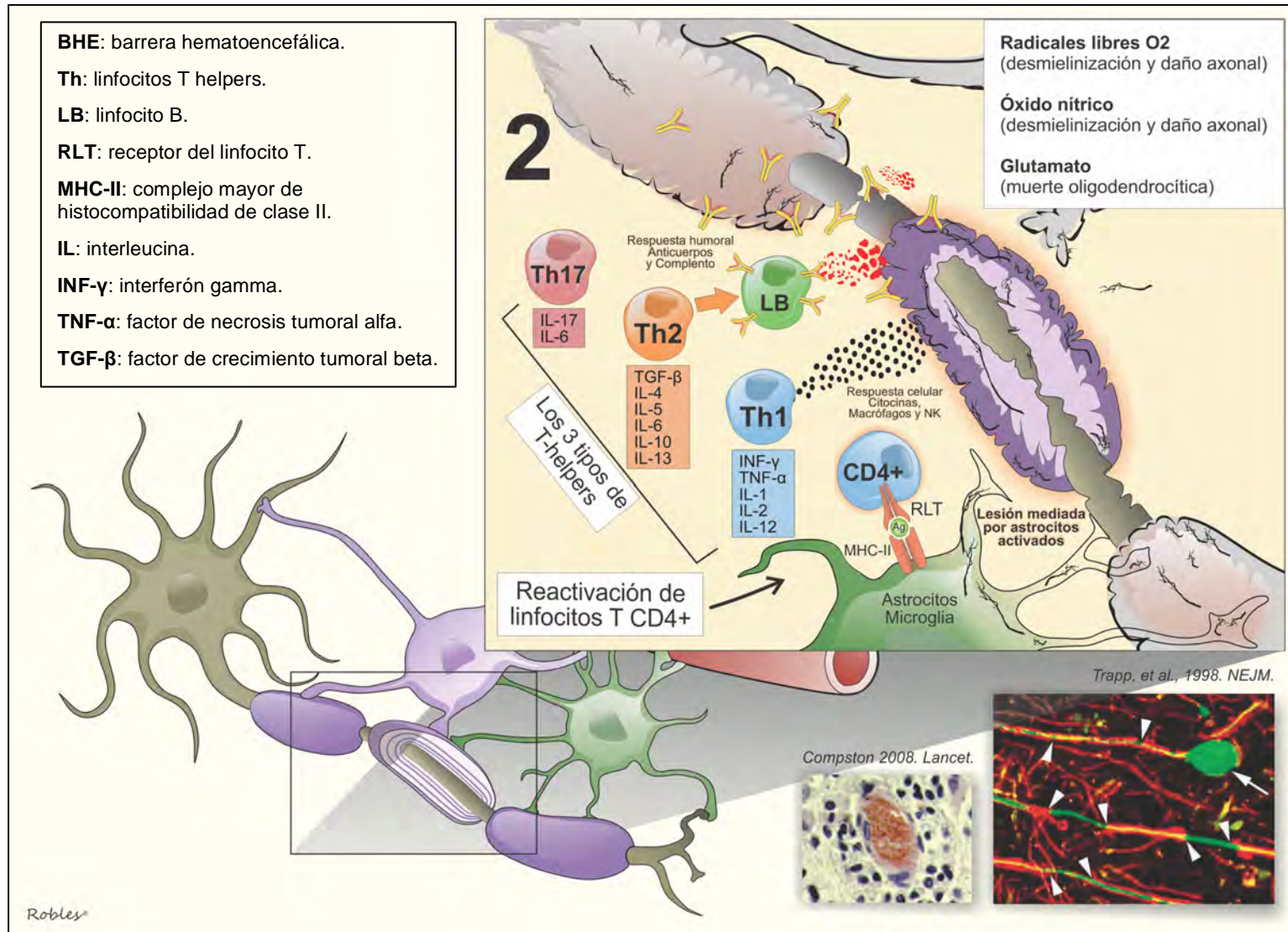
- Los Th1 que liberan interferón gamma (INF- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y varias interleucinas como IL-1, IL-2 e IL-12, lo que a su vez activará a otros linfocitos Th1, macrófagos, linfocitos T CD8+ y astrocitos, que a su vez, mediante la liberación de más TNF- $\alpha$ , radicales libres de oxígeno, óxido nítrico (ON) y glutamato, producirán desmielinización, daño axonal y lesión de oligodendrocitos mediados por células.

- Los Th17 que liberan TNF- $\alpha$  y varias interleucinas como IL-17 e IL-6, y que tendrán efectos tanto pro-inflamatorios como reguladores de la inflamación.
- Los Th2 que liberan factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y varias interleucinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Estos linfocitos, por un lado, promueven la activación de linfocitos B que a su vez producen desmielinización, daño axonal y lesión de oligodendrocitos mediados por anticuerpos y complemento; y por otro, tienen una función antiinflamatoria que limita y modula la respuesta pro-inflamatoria mediada por linfocitos Th1. Además, estimulan la proliferación y remielinización de los oligodendrocitos y aumentan la supervivencia neuronal.

Desde que en 1992 Harding y colaboradores (Harding et al. 1992) describieron la asociación de una enfermedad mitocondrial, la neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL; OMIM: 535000), con síntomas y lesiones compatibles con EM en resonancia magnética (RM), el estudio del papel de la mitocondria en la patogenia de la enfermedad ha sido cada vez mayor (Lu et al. 2000; Dutta et al. 2006; Mahad et al. 2008; Mahad et al. 2009; Mao & Reddy 2010; Campbell et al. 2011). De hecho, se sabe que existe disfunción mitocondrial en las fases iniciales de la enfermedad y que juega un papel fundamental en la desmielinización y en la degeneración axonal mediadas por radicales libres y estrés oxidativo.







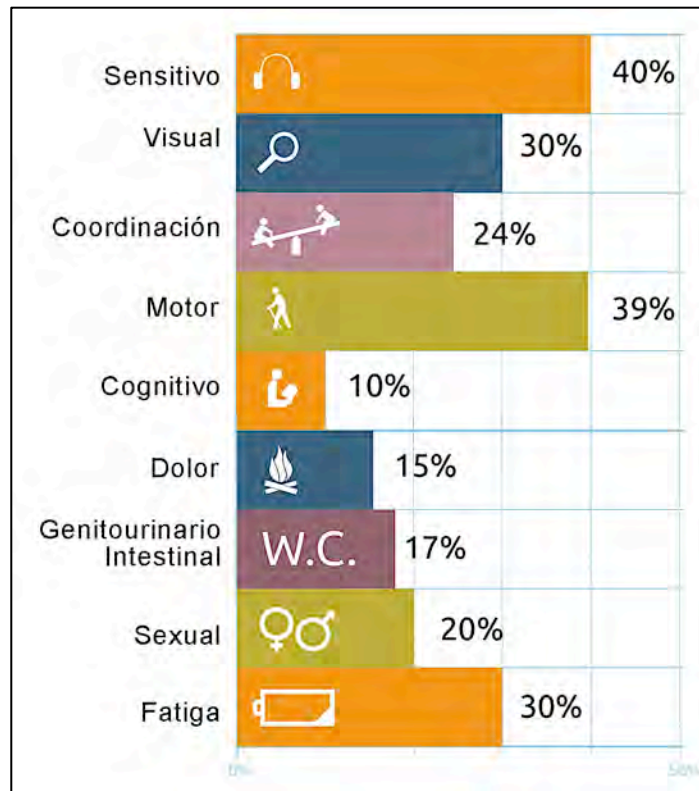
**Figura 3.** Esquema de la cascada inmunopatogénica propuesta para la EM.

### 1.1.5. Debut clínico

En el 85% de los casos, la EM se manifiesta con el llamado **brote**, que consiste en un déficit neurológico focal, que dura al menos 24 horas, que no se acompaña de fiebre, infección o cualquier otro proceso desencadenante, y que suele mejorar espontáneamente en unas cuantas semanas. Cualquier déficit que se presente dentro del plazo de un mes a partir del inicio de los síntomas se considera parte del mismo brote. Los brotes suelen ser el reflejo clínico de la afectación inflamatoria de alguna o varias zonas del SNC (nervio óptico, médula espinal, tronco encefálico, hemisferios cerebrales) y, en función de los síntomas originados, se clasifican en **monofocales**, cuando se manifiestan con un único síntoma; o **multifocales**, cuando se manifiestan con varios síntomas a la vez.

Los síntomas que aparecen durante el brote (ya sea al inicio o durante el curso de la enfermedad), dependerán de qué área o áreas se afecten por los fenómenos de inflamación y neurodegeneración propios de la enfermedad. De mayor a menor frecuencia aparecen: alteraciones sensitivas (40%), alteraciones motoras (39%), alteraciones visuales (30%), fatiga (30%), trastornos de la coordinación (24%), disfunción sexual (20%), alteraciones genitourinarias o intestinales (17%), dolor (15%) y trastornos afectivos o cognitivos (10%) (Figura 4).

En un 15% de los casos, los pacientes debutan clínicamente con un déficit que es progresivo desde el inicio y que se manifiesta habitualmente en forma de alteración en la deambulación debida a afectación motora de las extremidades inferiores. Solo un 5% de estos pacientes presentarán, en algún momento de la evolución de su enfermedad, algún síntoma compatible con un brote; sin embargo, la tendencia será siempre al empeoramiento progresivo con el paso del tiempo. En general, en EM se utiliza el término “progresión” cuando se produce un incremento de al menos 1 punto en la escala utilizada para valorar clínicamente el grado de discapacidad de los pacientes afectados, la llamada escala ampliada de discapacidad de Kurtzke (EDSS), durante un periodo de al menos 1 año (Anexo 1).



**Figura 4.** Principales síntomas de debut de la EM (modificada de Multiple Sclerosis International Federation 2013).

## 1.1.6. Diagnóstico

### 1.1.6.1. La orientación clínica

El principio básico para el diagnóstico de la EM consiste en establecer que la actividad de la enfermedad ha afectado a más de una zona del SNC y que lo ha hecho en más de una ocasión. Este último concepto engloba los dos requisitos claves para un diagnóstico preciso y precoz de la enfermedad: la diseminación en espacio (presencia clínica de dos brotes o en la RM de varias lesiones desmielinizantes que afecten al menos 2 zonas diferentes del SNC) y la diseminación en tiempo (aparición de un nuevo brote clínico o de lesiones desmielinizantes en la RM en diferentes momentos temporales) (Compston & Coles 2008).

Un aspecto primordial para el diagnóstico es descartar que los signos y síntomas que presenta un paciente no puedan ser explicados por otro

proceso patológico, por lo cual un buen diagnóstico diferencial tanto clínico como radiológico es fundamental (Miller et al. 2008; Katz Sand & Lublin 2013) (Tabla 1).

#### 1.1.6.2. Las pruebas complementarias

Como se comentó en el apartado anterior, un aspecto fundamental en el manejo de los pacientes con EM, es realizar un correcto diagnóstico diferencial sabiendo identificar los posibles signos y síntomas atípicos que nos hagan pensar que el proceso patológico sea otro diferente (Miller et al. 2008). Y aunque la clínica siempre ha sido y será el pilar fundamental para guiarnos en este respecto, en los pacientes con EM nos valemos también de algunas pruebas complementarias que respaldan o contradicen nuestros hallazgos.

La **RM** se ha convertido, sin duda, en la prueba complementaria con mayor rendimiento en el diagnóstico de la enfermedad y la más utilizada a la hora de confirmar dicho diagnóstico. De hecho, es la principal exploración complementaria incluida en los criterios diagnósticos revisados de McDonald 2010 para demostrar la diseminación en espacio y en tiempo. Incluso se puede hacer el diagnóstico de EM con una sola RM si se demuestran lesiones inflamatorias en diferentes estadios temporales (algunas lesiones que captan y otras que no captan contraste) (Polman et al. 2011) (Tabla 3). Las secuencias más utilizadas para la valoración de la enfermedad son las potenciadas en T1, T2, FLAIR y T1 con Gadolinio (Gd), contraste endovenoso que altera las propiedades magnéticas de las moléculas de agua cercanas. En el caso de producirse rotura de la barrera hematoencefálica, como ocurre cuando existen lesiones con inflamación aguda en el parénquima cerebral, el Gd entra en el SNC produciéndose captación del mismo.

**Tabla 1.** Diagnóstico diferencial de la EM (Miller et al. 2008).

Diagnóstico diferencial clínico	Diagnóstico diferencial en RM
Enfermedad de Behçet	Enfermedad de Behçet
Síndrome de Sjögren	Síndrome de Sjögren
Vasculitis	Vasculitis
Lupus eritematoso sistémico	Lupus eritematoso sistémico
Panarteritis nodosa	Panarteritis nodosa
Angeítis granulomatosa primaria	Angeítis granulomatosa primaria
Síndrome antifosfolípido	Síndromes antifosfolípido
Sarcoidosis	Sarcoidosis
Enfermedad de Leber	Neuropatía óptica isquémica
Encefalopatías mitocondriales (MELAS)	Enfermedad cerebrovascular isquémica
Enfermedades lisosomales	Enfermedad cerebrovascular hipertensiva
Adrenoleucodistrofia	CADASIL
Enfermedad de Wilson	Migraña
Enfermedad de Whipple	Leucodistrofias
Mielinólisis central pontina	Leucoencefalopatía post-quimioterapia
Malformación de Arnold Chiari	Leucoencefalopatía post-radioterapia
Siringomielia	Infecciones (VIH, HTLV, lúes, Borrelia)
Quiste aracnoideo	Déficit de vitamina B12
Espondilosis cervical	Encefalomiелitis aguda diseminada
Esclerosis lateral amiotrófica	Cambios relacionados con la edad
Ataxias y paraplejías hereditarias	
Lesiones espinales compresivas	
Déficit de ácido fólico, vitamina B12 o E	
Malformación vascular en tronco cerebral	
Enfermedad cerebrovascular isquémica	
CADASIL	
Sífilis meningovascular	
Enfermedad de Lyme	
Paraparesia espástica tropical	
Leucoencefalopatía multifocal progresiva	
Encefalomiелitis aguda diseminada	
Tumor intracraneal	
Linfoma primario del SNC	
Síndromes paraneoplásicos del SNC	
Trastorno de conversión	

**CADASIL:** Arteriopatía Cerebral Autosómica Dominante con Infartos Subcorticales y Leucoencefalopatía; **MELAS:** encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un ictus; **VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana; **HTLV:** virus linfocítico T humano; **RM:** resonancia magnética; **SNC:** sistema nervioso central

La RM también se utiliza como biomarcador pronóstico de la enfermedad. Así, la presencia de nuevas lesiones en T2 o de lesiones captantes de Gd se ha asociado a una mayor probabilidad de aparición de brotes (Tintoré et al. 2006; Tintore et al. 2015), a un peor pronóstico a largo plazo por acúmulo de discapacidad (Rudick et al. 2006; Fisniku et al. 2008), a una mayor probabilidad de desarrollar una forma secundaria progresiva (Fisniku et al. 2008) y a un mayor grado de deterioro cognitivo (Rudick et al. 2006). Por estos motivos, es una herramienta clave en la monitorización de la actividad de la enfermedad y en su respuesta al tratamiento, tanto en la práctica diaria como en los ensayos clínicos (Sormani et al. 2011). En los últimos años se ha demostrado también, que el valor pronóstico de la RM puede verse incrementado al combinarlo con la información clínica (número de brotes e incremento de la discapacidad medida mediante la escala EDSS) en aquellos pacientes que han recibido al menos un año de tratamiento con interferón beta. Es lo que se conoce como “*Río-Score*” y nos permite diferenciar de forma precoz los pacientes no respondedores de aquellos respondedores al tratamiento (Río et al. 2006; Río, Castelló, et al. 2009; Río, Comabella, et al. 2009; Sormani & De Stefano 2013; Sormani et al. 2013; Hyun et al. 2015; Romeo et al. 2015).

Un **estudio sanguíneo** completo incluyendo los principales marcadores de autoinmunidad así como serologías específicas, nos puede ayudar a descartar muchas de las etiologías mencionadas en la Tabla 1.

El **estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR)** en el que se determina la presencia de bandas oligoclonales de inmunoglobulina G (BOC-IgG) y el llamado índice de IgG, coeficiente entre la inmunoglobulina G (IgG) del LCR y del suero sanguíneo, que se considera patológico si el valor es  $\geq 0,7$  son también pruebas rutinarias en el diagnóstico de EM. La presencia de BOC-IgG en el LCR pero no en el suero sanguíneo es indicativa de una síntesis intratecal exagerada de IgG originada por un número limitado de clones de células plasmáticas como respuesta a antígenos lipídicos asociados a la mielina (Villar et al. 2005; Compston et al. 2006; Link & Huang 2006). Aunque la presencia de BOC-IgG tiene una sensibilidad  $\geq 95\%$ , se trata de una prueba

poco específica ya que pueden estar presentes en otras enfermedades neurológicas de contexto autoinmune entre las que se encuentran enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso periférico (SNP), infecciones agudas o crónicas del SNC, enfermedades de la motoneurona, enfermedades inflamatorias sistémicas (sarcoidosis, enfermedad de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Behçet, síndrome antifosfolípido), síndromes paraneoplásicos, linfomas y otras neoplasias del SNC, o enfermedades neurodegenerativas (Petzold 2013; Stangel et al. 2013).

Si bien en los últimos criterios diagnósticos revisados de McDonald 2010 (Polman et al. 2011) la determinación de las BOC-IgG y/o el índice de IgG solo se incluyen como criterios para diagnosticar la forma progresiva de la EM (Tabla 3), varios son los autores que sugieren que dicha determinación es importante para realizar un buen diagnóstico diferencial de la enfermedad (Álvarez-Cermeño & Villar 2013) y tienen utilidad como biomarcador pronóstico a largo plazo (Tintore et al. 2007; Comabella & Montalban 2014; Kuhle et al. 2015; Tintore et al. 2015), además de aportar información sobre el “contexto inflamatorio primario” del proceso evitando así un diagnóstico erróneo (Lin et al. 2012; Petzold 2013; Stangel et al. 2013). Por estos motivos su determinación podría ser especialmente útil en las siguientes situaciones:

- En pacientes con un primer brote o sospecha de EM pero con RM normal o con muy pocas lesiones que no cumplen los criterios de Barkhof para diseminación en espacio (Anexo 2) o tiempo.
- En pacientes con otras enfermedades neurológicas que causan lesiones de sustancia blanca en la RM difíciles de diferenciar de la EM (como lesiones isquémicas de pequeño vaso o migraña).
- En pacientes con clínica inespecífica pero con una RM que cumple criterios de Barkhof para diseminación en espacio o tiempo.
- En pacientes en los que nos replanteamos el diagnóstico de EM por historia clínica dudosa y/o evolución atípica.



### 1.1.6.3. Los criterios diagnósticos

A lo largo de los años, se han ido proponiendo diferentes criterios para el diagnóstico de EM basados en aspectos clínicos y diferentes pruebas complementarias como por ejemplo la determinación de las BOC-IgG en LCR, los potenciales evocados y, por su puesto, la RM. Desde los primeros criterios diagnósticos propuestos por Allison y Millar en 1954 (Allison & Millar 1954), pasando por los más ampliamente utilizados propuestos por Poser en 1983 (Poser et al. 1983) (Tabla 2), varias han sido las revisiones y modificaciones con el objetivo de crear unos criterios que fueran aplicables en todo el mundo, a todas las formas de presentación clínica de la enfermedad y con el máximo de sensibilidad y especificidad posibles, que permitan realizar el diagnóstico lo más pronto posible. Los últimos criterios diagnósticos propuestos, y que están vigentes en la actualidad, son los revisados de McDonald 2010 (Polman et al. 2011), en los que la RM tiene un papel fundamental pudiendo incluso hacer el diagnóstico de EM después de un primer episodio clínico sugestivo de la enfermedad, a partir de una única exploración radiológica si se demuestra la necesaria diseminación en tiempo y espacio (Tabla 3).

**Tabla 2.** Criterios de Allison y Millar *–izquierda–* (Allison & Millar 1954) y criterios de Poser *–derecha–* para EM (Poser et al. 1983).

<p><b>A. Esclerosis diseminada precoz</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Síntomas comúnmente asociados a la enfermedad.</li> </ol> <p><b>B. Esclerosis diseminada probable</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Síntomas comúnmente asociados a la enfermedad.</li> <li>Déficit focal que remita en el tiempo.</li> <li>Signos físicos explicables solo por la esclerosis diseminada.</li> </ol> <p><b>C. Esclerosis diseminada posible</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Casos sugestivos de esclerosis diseminada.</li> </ol>	<p><b>A. EM clínicamente definida</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Dos brotes con evidencia clínica de 2 lesiones separadas.</li> <li>Dos brotes con evidencia clínica de 1, y evidencia paraclínica de otra lesión separada.</li> </ol> <p><b>B. EM definida por laboratorio</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Dos brotes y ya sea evidencia clínica o paraclínica de 1 lesión, además de BOC+ o índice elevado de IgG.</li> <li>Un brote y evidencia clínica de 2 lesiones separadas, además de BOC+ o índice elevado de IgG.</li> <li>Un brote, evidencia clínica de 1 lesión, y evidencia paraclínica de otra lesión separada, además de BOC+ o índice elevado de IgG.</li> </ol> <p><b>C. EM clínicamente probable</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Dos brotes y evidencia clínica de 1 lesión.</li> <li>Un brote y evidencia clínica de 2 lesiones separadas.</li> <li>Un brote, evidencia clínica de 1 lesión, y evidencia paraclínica de otra lesión separada.</li> </ol> <p><b>D. EM probable por laboratorio</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Dos brotes y BOC+ o índice elevado de IgG.</li> </ol>
<p><b>Paraclínica:</b> potenciales evocados, TAC o RM; <b>BOC+:</b> bandas oligoclonales positivas (al menos 2 en líquido cefalorraquídeo y ninguna en suero)</p>	

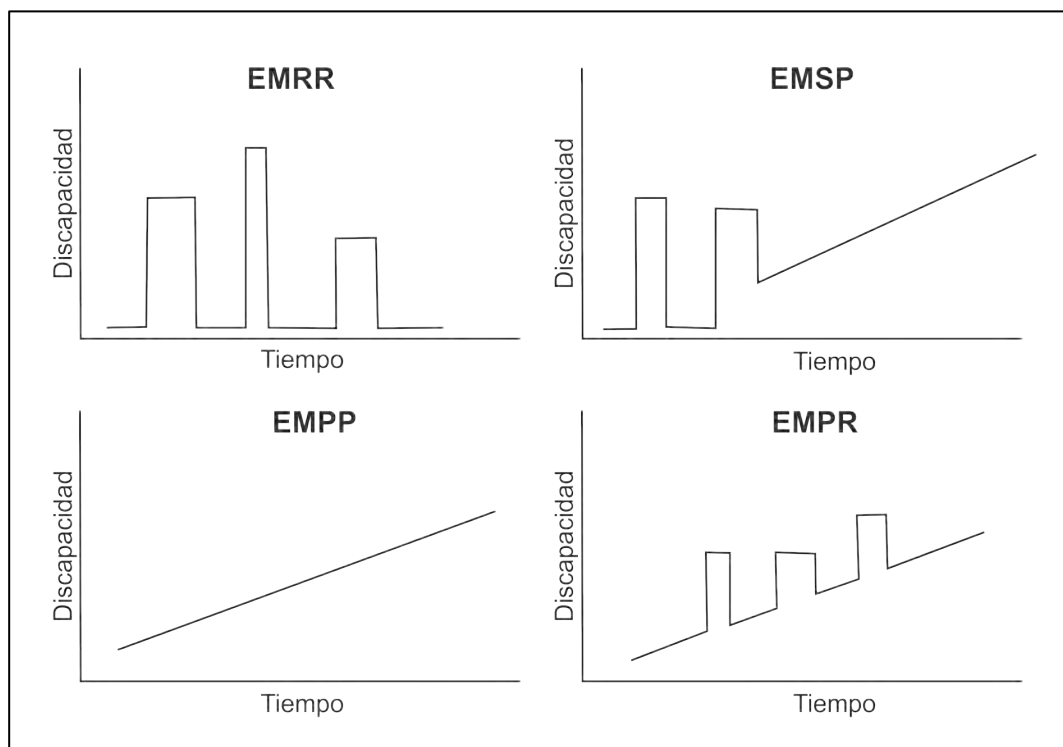
**Tabla 3.** Criterios diagnósticos revisados de McDonald 2010 para la EM (Polman et al. 2011).

Presentación clínica	Datos adicionales para el diagnóstico
≥2 brotes; evidencia clínica objetiva de ≥2 lesiones o evidencia clínica objetiva de 1 lesión con evidencia histórica razonable de 1 brote previo	Ninguno
≥2 brotes; evidencia clínica objetiva de 1 lesión	DE demostrada por ≥1 lesión en T2 en como mínimo 2 de 4 localizaciones del SNC características de EM (periventricular, yuxtacortical, infratentorial, medular); o esperar por un nuevo brote clínico en una localización diferente del SNC
1 brote; evidencia clínica objetiva de ≥2 lesiones	DT demostrada por presencia simultánea de lesiones asintomáticas captantes y no captantes de Gd en cualquier momento; o nueva lesión en T2 y/o ≥1 lesión captante de Gd en una RM de seguimiento; o esperar por un nuevo brote clínico
1 brote; evidencia clínica objetiva de 1 lesión (SCA)	DE y DT, demostrados por:  DE: ≥1 lesión en T2 en como mínimo 2 de 4 localizaciones del SNC características de EM (periventricular, yuxtacortical, infratentorial, medular); o esperar por un nuevo brote clínico en una localización diferente del SNC  DT: presencia simultánea de lesiones asintomáticas captantes y no captantes de Gd en cualquier momento; o nueva lesión en T2 y/o ≥1 lesión captante de Gd en una RM de seguimiento; o esperar por un nuevo brote clínico
Progresión neurológica sugestiva de EM (EM primaria progresiva)	1 año de progresión retrospectiva o prospectiva de la enfermedad y 2 de los 3 criterios siguientes:  1- Evidencia per DE por ≥1 lesión en localizaciones del SNC características de EM (periventricular, yuxtacortical o infratentorial) 2- ≥2 lesiones en la médula 3- BOC positivas en LCR mediante IEF y/o índice IgG elevado

DE: diseminación en espacio; DT: diseminación en tiempo; SNC: sistema nervioso central; SCA: síndrome clínicamente aislado; Gd: Gadolinio; EM: esclerosis múltiple; BOC: bandas oligoclonales; LCR: líquido cefalorraquídeo; IEF: inmunoelectroforesis; IgG: inmunoglobulina G

### 1.1.7. Curso clínico e historia natural

La EM se ha clasificado tradicionalmente desde un punto de vista clínico en: remitente-recurrente (EMRR), secundaria progresiva (EMSP), primaria progresiva (EMPP) y progresiva-recurrente (EMPR) (Lublin & Reingold 1996) (Figura 5).



**Figura 5.** Formas clínicas de la EM (adaptada de Lublin & Reingold 1996).

Recientemente, el mismo Lublin junto con un grupo de colaboradores (Lublin et al. 2014) han propuesto una nueva definición de las formas clínicas clásicas (síndrome clínicamente aislado – SCA –, EMRR y EM progresiva) en base a la actividad y a la progresión tanto clínica como radiológica con el objetivo de categorizar mejor la enfermedad.

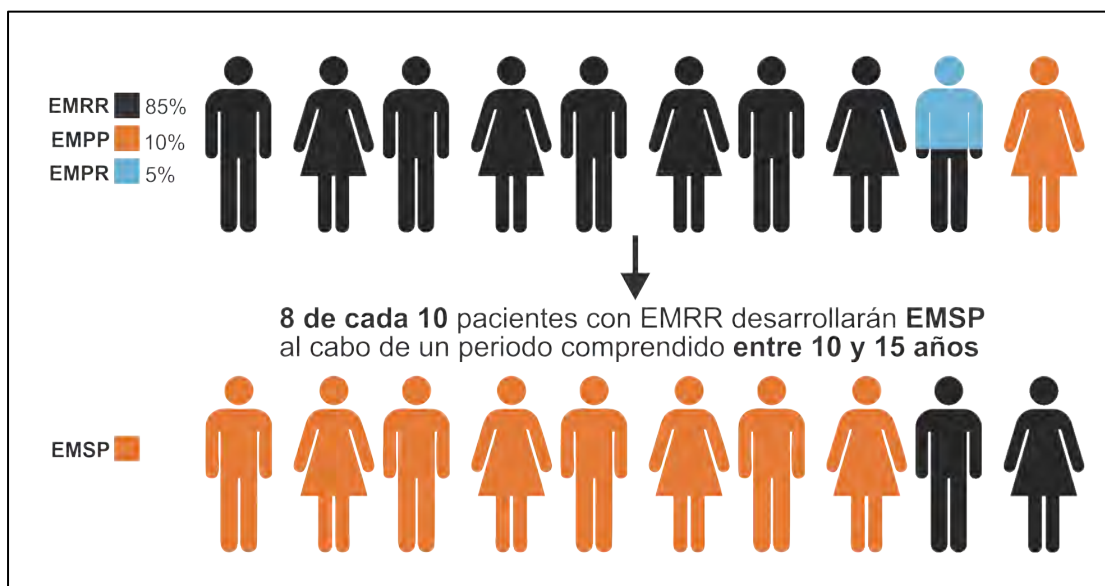
Como se mencionó anteriormente, el 85% de los pacientes con EM presentan un brote como primera manifestación de la enfermedad en lo que se conoce como SCA. Además de los síntomas típicos antes mencionados, una premisa

esencial a la hora de pensar en un SCA es la ausencia de cualquier antecedente neurológico. La probabilidad de que se produzca un nuevo brote dependerá de varios factores como la edad de inicio, la presencia de BOC-IgG en el LCR, el inicio de tratamiento inmunomodulador (TIM) y, especialmente, del número de lesiones desmielinizantes en la RM inicial (Tintore et al. 2015). Aunque por historia natural suelen ocurrir entre 1 y 2 brotes durante el primer año de evolución de la enfermedad, esta cifra desciende a 0,3-0,5 brotes por año transcurridos los 10 primeros años de evolución (Scalfari et al. 2010).

Cuando un paciente presenta nuevos brotes sin progresión clínica entre ellos, estamos ante una EMRR, siendo ésta la forma clínica más frecuente de la enfermedad. Sin embargo, 8 de cada 10 pacientes con esta forma clínica dejarán de presentar brotes (o los harán con una frecuencia muy baja) e iniciarán un empeoramiento progresivo al cabo de 10 a 15 años de evolución (forma EMSP) (Pittock et al. 2004; Confavreux & Vukusic 2006) (Figura 6).

Como se comentó previamente, un 15% de pacientes debutan clínicamente con un cuadro de déficit progresivo que se mantendrá a lo largo de la evolución de la enfermedad (forma EMPP). De estos, un 5% pueden desarrollar síntomas compatibles con un brote (forma EMPR) (Figura 5).

Aunque no se considera actualmente como una forma clínica de la enfermedad, a medida que pasan los años y debido especialmente al uso más generalizado de la RM a nivel mundial, se están identificando sujetos con lesiones de características desmielinizantes tipo EM pero que no han presentado en ningún momento síntomas compatibles con un brote. Es lo que se conoce como síndrome radiológicamente aislado (SRA).



**Figura 6.** Representación esquemática del curso clínico de la EM (modificada de Multiple Sclerosis International Federation 2013).

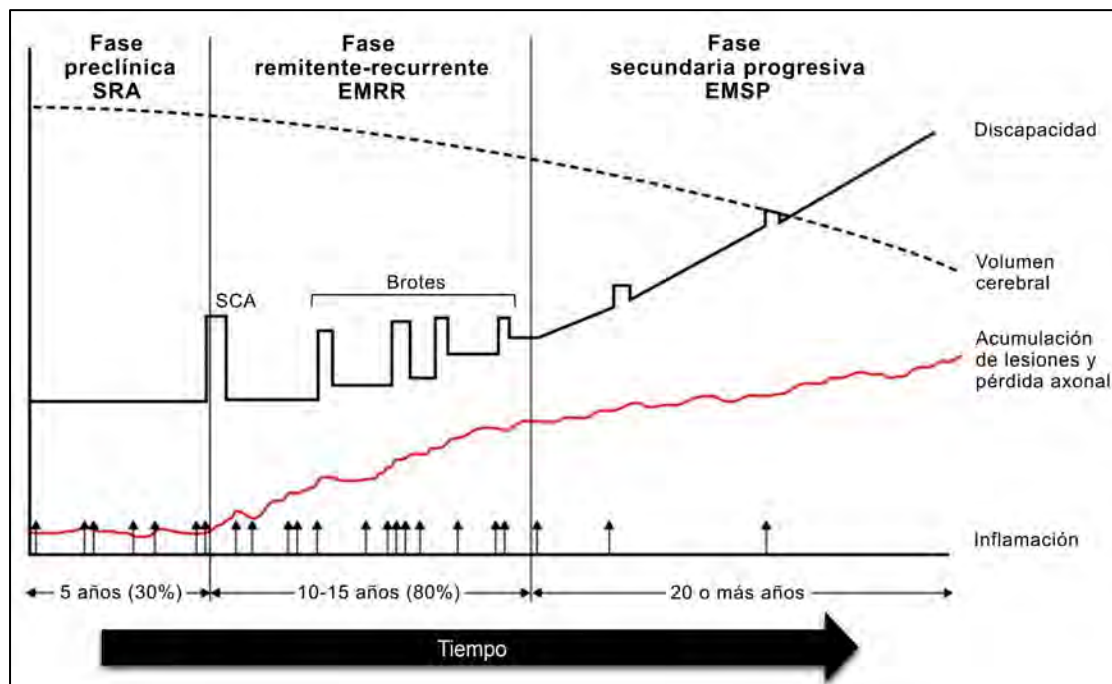
En la gran mayoría de sujetos en quienes se diagnostica un SRA, el motivo por el cual se realiza la RM es la cefalea, seguido de otras causas como el traumatismo craneoencefálico (Granberg et al. 2013). Este grupo de sujetos fue inicialmente categorizado por Okuda y colaboradores en el 2009 (Okuda et al. 2009). Estos autores propusieron también unos criterios diagnósticos basados en las características de las lesiones y en el cumplimiento de  $\geq 3$  de los criterios de Barkhof para diseminación en espacio (Tabla 4). Aunque no se tienen datos precisos sobre la prevalencia e incidencia de esta forma preclínica de la enfermedad debido a su baja frecuencia, hay datos que sugieren que aproximadamente un 30% de los sujetos tendrán un primer brote (SCA) en un periodo de 5 años, dependiendo de varios factores de riesgo demográficos, clínicos y radiológicos, entre los cuales destacan: una edad precoz de identificación de las lesiones (fundamentalmente  $<37$  años), el género masculino y la presencia de lesiones medulares o de lesiones captantes de Gd en la RM (Okuda et al. 2014).

**Tabla 4.** Criterios de Okuda para el diagnóstico de SRA (Okuda et al. 2009).

- 
- A. RM con evidencia de lesiones incidentales de sustancia blanca que cumplan los siguientes criterios:
    - 1. Lesiones ovoides, bien circunscritas y homogéneas. Con o sin afectación del cuerpo caloso.
    - 2. Lesiones hiperintensas en T2 con un diámetro >3 mm y que cumplan 3 ó 4 de los criterios de Barkhof para diseminación en espacio.
    - 3. Las lesiones no deben tener un patrón vascular.
  - B. No historia clínica previa de brotes.
  - C. Las lesiones de la RM no justifican otra sintomatología que comprometa el desempeño social, ocupacional o general del sujeto.
  - D. Las lesiones no se justifican por el uso de drogas, sustancias tóxicas o alguna condición médica.
  - E. Se excluirán los individuos con una RM sugestiva de leucoaraiosis o afectación extensa de la sustancia blanca sin afectación del cuerpo caloso.
  - F. Las lesiones de la RM no se pueden justificar por otro proceso.
- 

La evolución de la enfermedad por historia natural es hacia la cronicidad y la acumulación de discapacidad tanto física como cognitiva debido al proceso neurodegenerativo subyacente, al acúmulo de lesiones en la RM, a la lesión axonal y a la pérdida de volumen cerebral (Figura 7). Esto produce un impacto socioeconómico muy elevado no solo para los pacientes sino para la sociedad en general (Andlin-Sobocki et al. 2005). Así, se sabe que a los 15 años del diagnóstico, aproximadamente 2/3 de los pacientes han dejado de trabajar a causa de la enfermedad y no tienen ningún trabajo remunerado (Rao et al. 1991). Además, la limitación en las relaciones personales, sociales y familiares afecta de forma directa a la calidad de vida de los pacientes y a la de sus familiares (Izquierdo 2014).

Según un estudio reciente, en España el coste total de la enfermedad es de unos 1.200 millones de euros al año, de los cuales un 16-18% corresponden al tratamiento, siendo la mayoría debido a costes directos derivados de la atención sanitaria incluyendo el proceso diagnóstico, y a los costes indirectos como la pérdida de productividad laboral a largo plazo (Izquierdo 2014).



**Figura 7.** Esquema de la historia natural de la EM (adaptada de Compston et al. 2006).

Los pacientes con EM presentan una disminución de la esperanza de vida de entre 5 y 10 años respecto a la población general (Brønnum-Hansen et al. 2004). Dicha mortalidad está relacionada fundamentalmente con el grado de discapacidad y la aparición de complicaciones infecciosas, principalmente de la piel, los pulmones y la vejiga urinaria (Compston & Coles 2008).

### 1.1.8. Tratamiento

Actualmente no existe ningún tratamiento curativo para la EM. El objetivo principal del manejo farmacológico de base es el de disminuir la actividad inflamatoria de la enfermedad e intentar retrasar la aparición de la fase progresiva de la misma. Para ello, disponemos de una serie de fármacos que nos permiten “modular” el sistema inmunitario y mejorar la actividad inflamatoria tanto a nivel clínico como radiológico. Sin embargo, la gran asignatura pendiente en cuanto al tratamiento de la EM es la de actuar sobre el proceso neurodegenerativo con el objetivo de intentar frenar la progresión de la enfermedad y la discapacidad.

Los primeros ensayos clínicos con fármacos para la EM surgieron en los años 90 y desde entonces la investigación ha ido en aumento. Muchos de estos fármacos han demostrado diversos grados de eficacia que generalmente van ligados a un determinado perfil de efectos adversos y de seguridad por lo que actualmente se utilizan dependiendo de las características clínicas y radiológicas de los pacientes, de forma que cada vez se es más capaz de seleccionar al paciente más adecuado para un fármaco concreto, a la dosis más adecuada y en el momento más oportuno de su enfermedad. Es lo que se conoce como medicina personalizada.

Actualmente disponemos de 9 fármacos diferentes aprobados por las autoridades sanitarias de nuestro entorno como TIM para pacientes con EM: interferón- $\beta$  (Betaferon®, Extavia®, Rebif®, Avonex®, Plegridy®), acetato de glatirámico (Copaxone®), natalizumab (Tysabri®), fingolimod (Gilenya®), teriflunomida (Aubagio®), dimetilfumarato (Tecfidera®), alemtuzumab (Lemtrada®), mitoxantrona (Novantrone®) y azatioprina (Imurel®). Además, muchos otros fármacos se están valorando en ensayos clínicos de fase II y III como potenciales nuevos tratamientos futuros para la enfermedad.

Todos estos fármacos están indicados en formas en brote de la enfermedad y solamente Betaferon®, Extavia® y Rebif® en formas EMSP con evidencia de actividad inflamatoria. Tysabri®, Gilenya® y Lemtrada® están indicados en formas muy activas de la enfermedad. Novantrone® e Imurel® prácticamente no se utilizan en la actualidad.

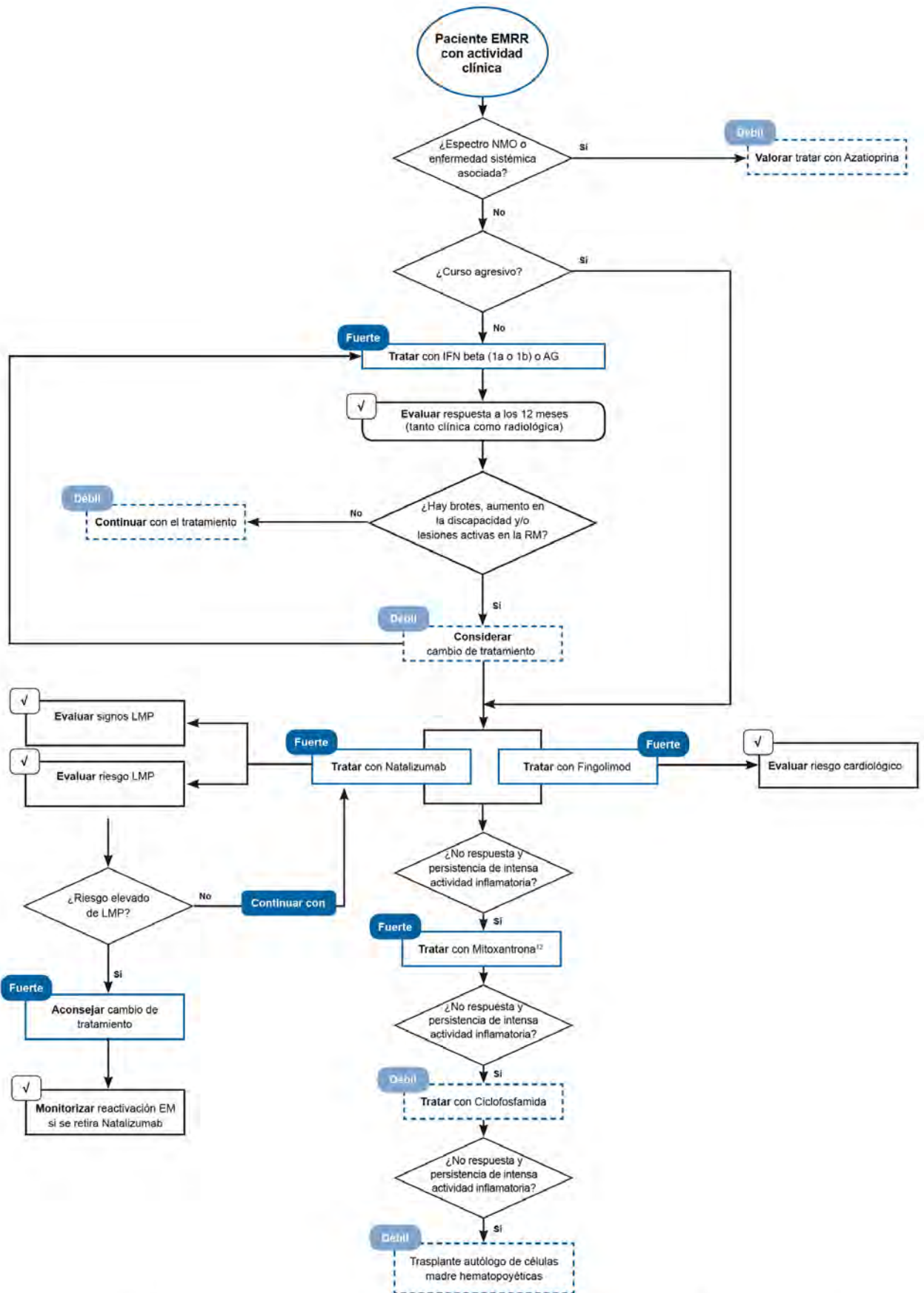
Estos fármacos tienen un perfil de eficacia variable que se refleja sobre todo en la reducción de la tasa anual de brotes y en la reducción de la actividad radiológica de la enfermedad. Refiriéndonos solo a aquellos fármacos de uso habitual en la práctica clínica, dicha eficacia es de  $\approx 30\%$  para el interferón- $\beta$ , el acetato de glatirámico y la teriflunomida, de  $\approx 60-70\%$  para el natalizumab y el fingolimod, y de  $\approx 80\%$  para el alemtuzumab. Como se comentó previamente, este grado de eficacia suele ser directamente proporcional al perfil de efectos adversos siendo leves o moderados pero relativamente frecuentes e incómodos para el caso de los fármacos con una eficacia menor: síntomas pseudo-gripales (interferón- $\beta$ ), síntomas post-puncionales de



duración breve en forma de taquicardia, disnea y enrojecimiento (acetato de glatirámero), efectos locales producto de las repetidas inyecciones subcutáneas (interferón- $\beta$  y acetato de glatirámero), efectos que requieren monitorización periódica como la leucopenia y la hepatotoxicidad (interferón- $\beta$  y teriflunomida), “*flushing*” y dolor abdominal (dimetilfumarato); o pudiendo ser potencialmente más graves aunque menos frecuentes para el caso de los fármacos con una eficacia mayor: efectos sobre la conducción cardiaca, el riesgo de infecciones oportunistas y el riesgo de edema macular (fingolimod), riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva (natalizumab, fingolimod y dimetilfumarato), alteraciones tiroideas, púrpura trombocitopénica idiopática y nefropatías autoinmunes (alemtuzumab).

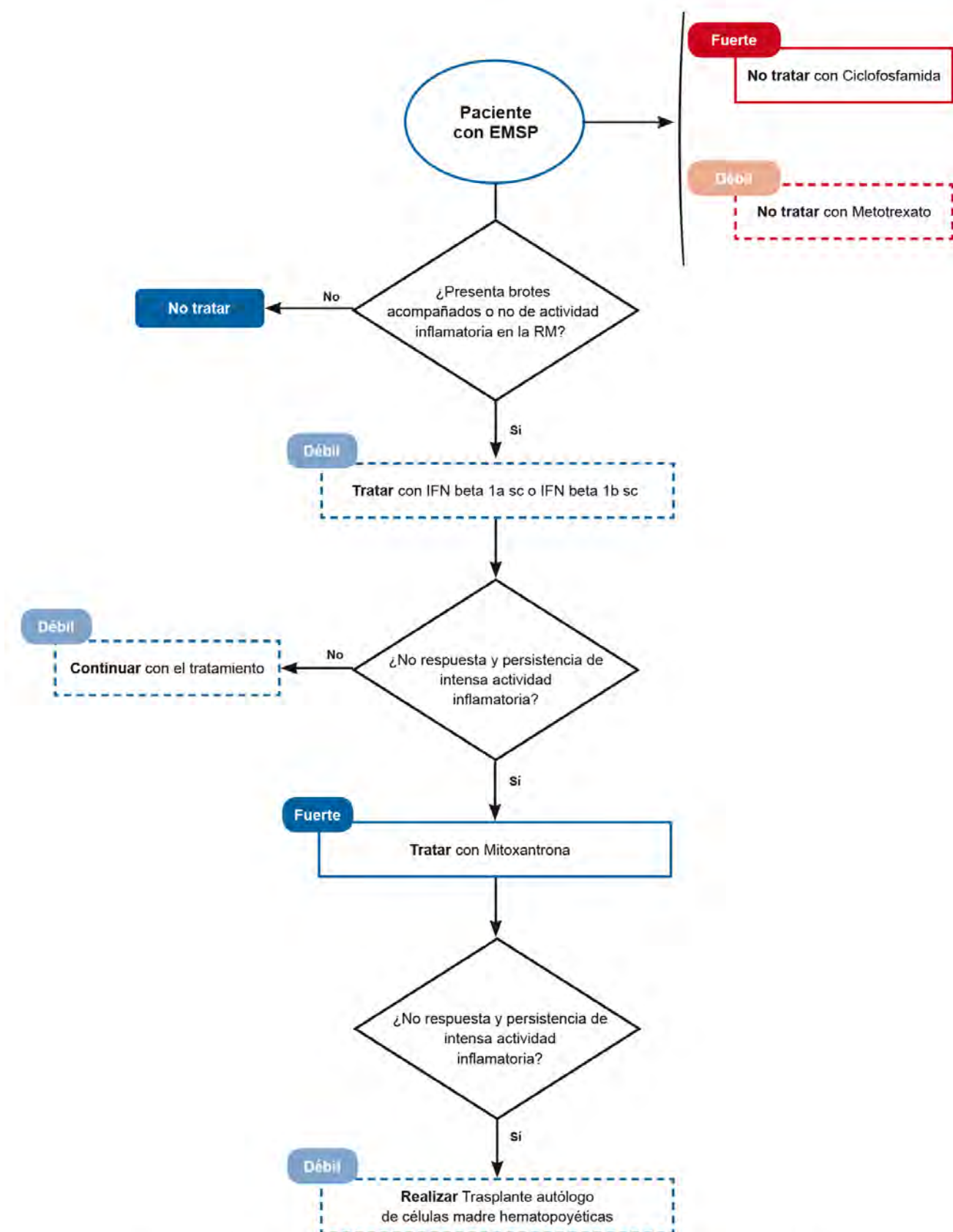
A pesar de que se dispone de un amplio arsenal farmacológico para el tratamiento de base de la EM, muchos pacientes responden de forma subóptima y continúan presentando brotes y aumento de la discapacidad. En los últimos años se están realizando grandes esfuerzos en identificar qué factores (genéticos, moleculares, ambientales) justifican esta mala respuesta y qué indicadores clínico-radiológicos nos permiten reconocer de forma precoz a los pacientes que tendrán dicha respuesta subóptima a los diferentes tratamientos con el fin de poner en práctica y validar la llamada medicina personalizada.

De la misma forma, diferentes sociedades científicas, a causa de las diversas y múltiples alternativas terapéuticas con diferente eficacia en cada forma clínica de la enfermedad y con un perfil riesgo/beneficio propio, han propuesto algoritmos que son útiles para ayudar a tomar decisiones terapéuticas en la práctica clínica diaria (AIAQS 2012) (Figuras 8 y 9).



AG: Acetato de glatirámico; EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente; IFN: Interferón beta; LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva; NMO: Neuromielitis óptica; RM: Resonancia magnética.

**Figura 8.** Algoritmo de tratamiento para la EMRR propuesto por l'Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut (AIAQS) en el 2012 (AIAQS 2012).



EMSP: Esclerosis múltiple secundariamente progresiva; IFN: Interferón beta; RM: Resonancia magnética; sc: subcutáneo.

**Figura 9.** Algoritmo de tratamiento para la EMSP propuesto por la AIAQS en el 2012 (AIAQS 2012).

## 1.2. GENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

### 1.2.1. Las bases genéticas en la expresión de una enfermedad

La secuencia completa del ácido desoxirribonucleico (ADN) humano se conoce como **genoma** y se encuentra distribuido en 46 cromosomas: 23 de ellos provenientes de un progenitor y 23 del otro.

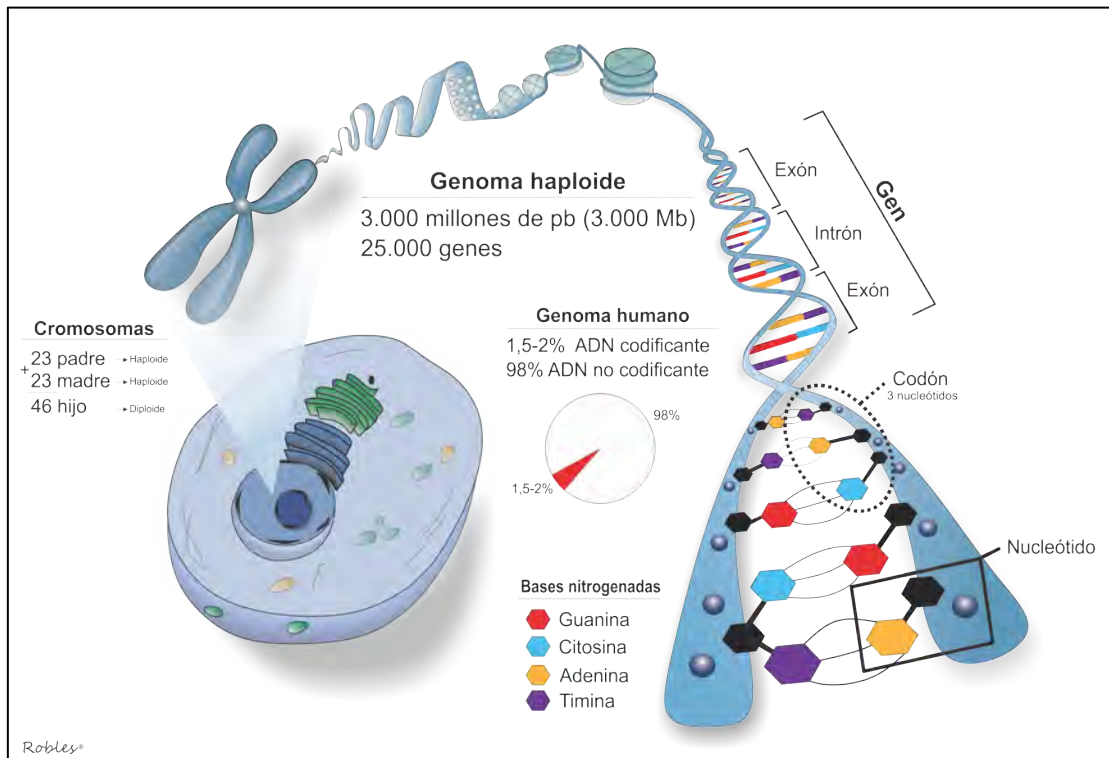
El conjunto completo se conoce como genoma diploide mientras que la información proveniente de cada progenitor se conoce como genoma haploide.

El genoma haploide contiene aproximadamente 3.000 millones de pares de bases (3.000 Mb) que codifican alrededor de 25.000 genes repartidos entre los 23 cromosomas (Burton et al. 2005). Un par de bases consiste en dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN unidos mediante puentes de hidrógeno. En el ADN los cuatro nucleótidos existentes son la adenina, la timina, la guanina y la citosina.

Por otro lado, un **gen** se define como una secuencia de nucleótidos que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, habitualmente proteínas.

Sin embargo, un gen está compuesto tanto de material genético codificante, es decir aquel que posee la información necesaria para la síntesis proteica (**exones**), así como de ADN no codificante (**intrones**). Durante el proceso de síntesis, pequeñas regiones exónicas compuestas por tripletes de nucleótidos (**codones**) son traducidas en aminoácidos específicos que conformarán una determinada proteína.

Se estima que un 98% del genoma humano corresponde a ADN no codificante, mientras que solo un 1,5-2% corresponde a ADN codificante (Passarge 2007). (Figura 10).

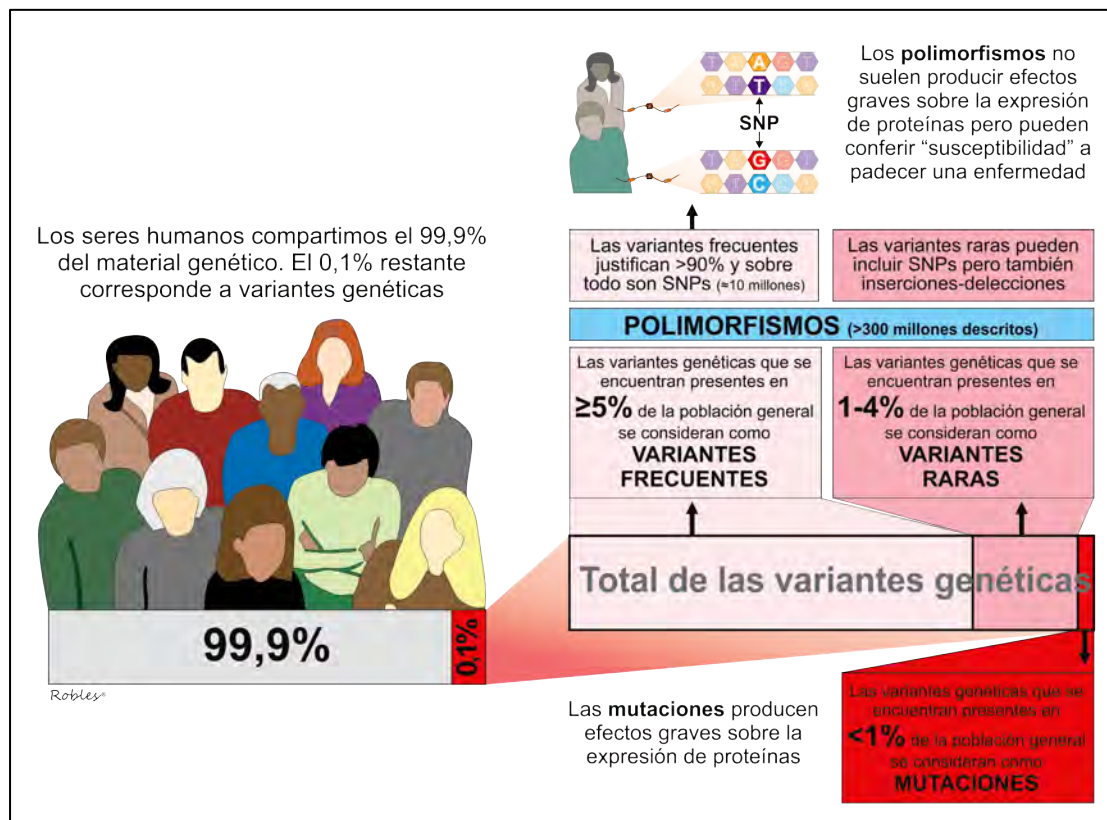


**Figura 10.** Esquema representativo del genoma y sus principales elementos.

La variabilidad genética humana es el conjunto de variaciones que distinguen unos individuos de otros o poblaciones enteras de otras y que son primordiales para la evolución de la especie, ya que según el teorema fundamental de la selección natural, en términos generales, cuanto más variabilidad genética exista en una población, mayor será el ritmo de su evolución (Fisher 1930). Al comparar el genoma de dos individuos no relacionados entre sí, veremos que el 99,9% de su material genético será similar; mientras que el 0,1% restante representará dicha variabilidad genética (Figura 11).

Una gran cantidad de dichas variaciones genéticas no tienen consecuencias patológicas para los individuos o simplemente justifican una mayor predisposición a padecer una determinada enfermedad o una mayor respuesta a un fármaco; son los llamados **polimorfismos** y se encuentran en  $\geq 1\%$  de la población general. Dentro de los polimorfismos, hablamos de variantes raras cuando se encuentran entre el 1 y 4 % de la población y variantes frecuentes cuando se encuentran en  $\geq 5\%$ . Se sabe que  $>90\%$  de

los polimorfismos corresponden a variantes frecuentes (Figura 11) (The International HapMap Consortium 2003). Por otro lado, cuando las variaciones genéticas se encuentran presentes en <1% de la población general, causando efectos deletéreos importantes en los individuos afectados, se llaman **mutaciones** (Passarge 2007). Este porcentaje tiene su explicación debido a que las mutaciones producen efectos graves sobre la expresión de proteínas reduciendo drásticamente la probabilidad de reproducción de los individuos afectados, y por tanto de poder ser heredadas a lo largo del tiempo (Mullen et al. 2009) (Figura 11).

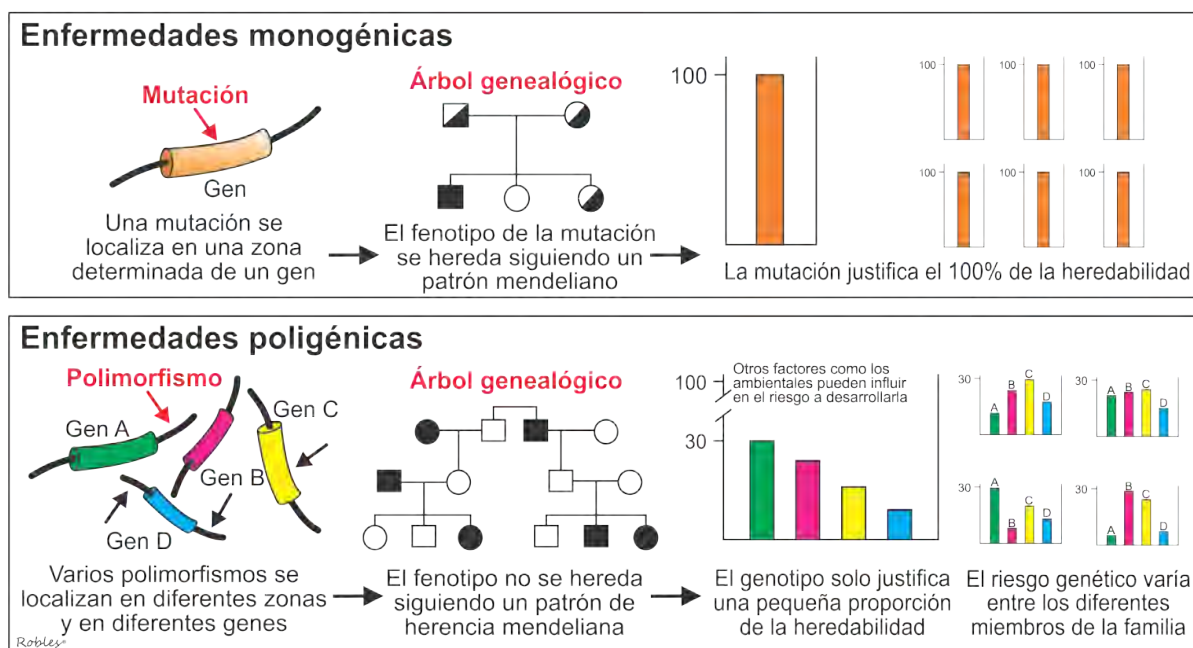


**Figura 11.** Representación esquemática de la variabilidad genética entre seres humanos.

Ante una determinada enfermedad, y pensando en términos genéticos, siempre nos preguntamos si cabe la posibilidad de que los signos y síntomas observados en un paciente (**fenotipo**) se justifiquen por una variación

genética específica (**genotipo**). O por el contrario, si es que un conjunto de variaciones genéticas con un poder patogénico menor al considerarlas de forma aislada están ejerciendo un efecto sumatorio confiriendo al individuo cierta “susceptibilidad genética” a padecer una enfermedad. Un abordaje ideal para identificar dichas variaciones sería secuenciar y comparar el genoma completo de afectados y no afectados. Sin embargo, actualmente y a pesar de los progresos tecnológicos, este abordaje, aunque posible, no se considera práctico por la inversión excesivamente alta de tiempo y recursos económicos que se requerirían.

Partiendo del hecho de que solo en unas cuantas enfermedades sabemos con certeza que una o varias mutaciones explican plenamente los rasgos fenotípicos observados; mientras que en otras no es este el caso, las enfermedades con componente genético se clasifican en: a) **enfermedades con rasgos mendelianos o monogénicas** y b) **enfermedades genéticamente complejas o poligénicas** (Passarge 2007) (Figura 12).

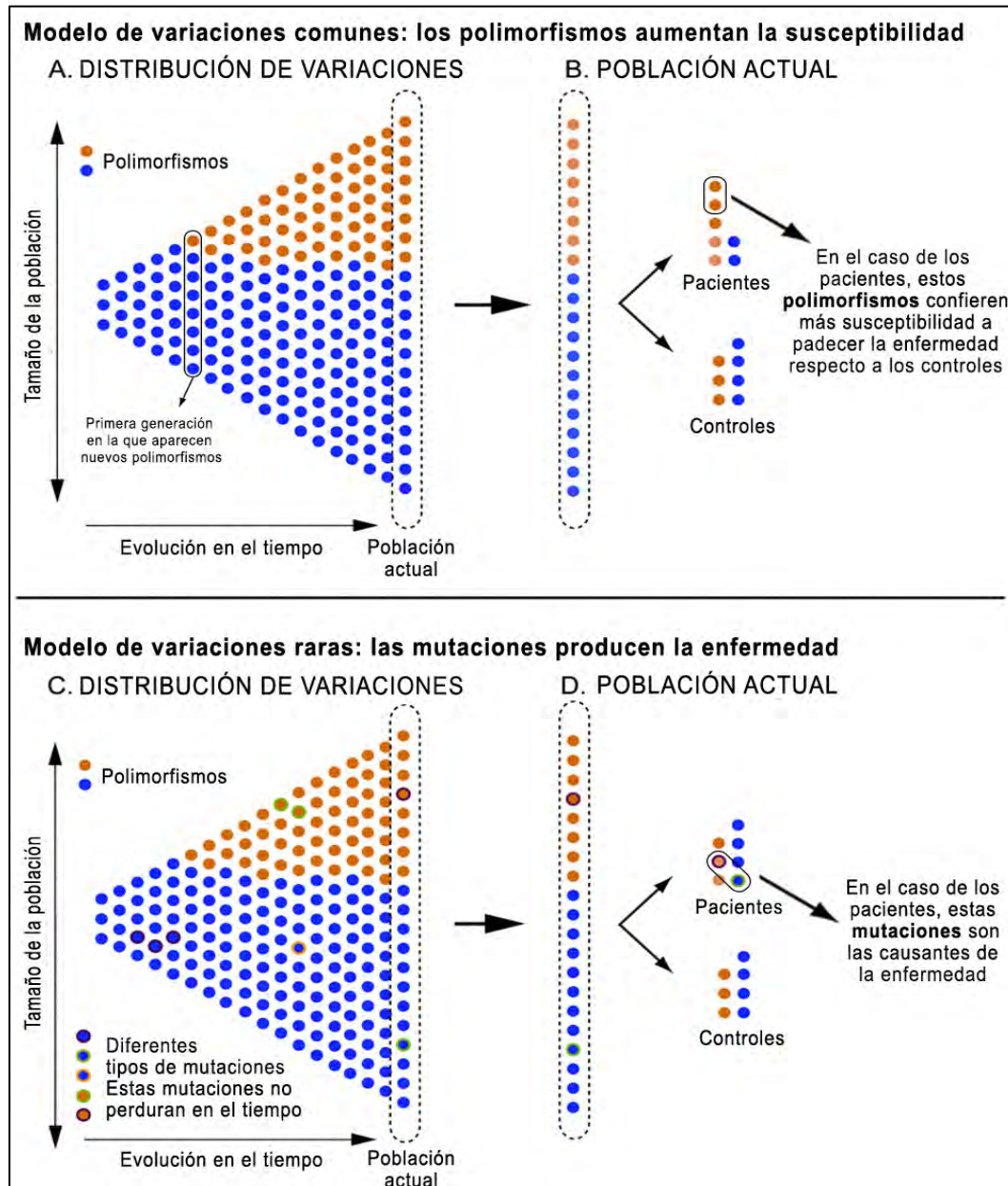


**Figura 12.** Clasificación de las enfermedades con componente genético.

En las enfermedades monogénicas, el principal objeto de estudio es el individuo afectado y sus familiares más cercanos. En este tipo de enfermedades se observa un determinado fenotipo que segrega a través de los miembros de la familia en un patrón claramente discernible y que sigue las leyes mendelianas (Mendel 1866). En estas condiciones, las variantes responsables de la enfermedad son esenciales para el desarrollo de la misma, confiriendo un riesgo elevado cuando son heredadas (es decir tienen una alta penetrancia). Remitiéndonos a la Figura 13, este tipo de enfermedades correspondería al “modelo de variaciones raras” (Figura 13, C y D). De esta forma, el fenotipo de cualquier individuo ya sea afectado o no afectado puede predecir de forma importante su genotipo subyacente y se utiliza como “marcador” para el abordaje genético de la enfermedad. Algunos ejemplos de enfermedades monogénicas son la anemia de células falciformes (OMIM: 603903), la fibrosis quística (OMIM: 219700), la fenilcetonuria (OMIM: 261600), la hemocromatosis (OMIM: 235200) y la enfermedad de Huntington (OMIM: 143100), entre otras.

En el caso de las enfermedades genéticamente complejas, no se puede demostrar la influencia de un único gen como el causante de la enfermedad sino que la enfermedad es resultante de la participación de una serie de genes que pueden interactuar entre sí y junto a otros factores como los ambientales, confirieren en todo caso “susceptibilidad” a padecerla. A diferencia de las enfermedades monogénicas, los genes responsables probablemente no sean mutaciones que codifiquen un producto aberrante de un gen, sino más bien polimorfismos frecuentes que ejercen sólo un efecto relativamente menor sobre la función de la proteína. Remitiéndonos a la Figura 13, este tipo de enfermedades correspondería al “modelo de variaciones comunes” (Figura 13, A y B). Algunos ejemplos de enfermedades poligénicas son la hipertensión arterial (OMIM: 145500), la diabetes mellitus (OMIM: 125853), el asma (OMIM: 600807), la retinitis pigmentaria (OMIM: 268000) y el cáncer (OMIM: dependiendo del tipo de cáncer), entre otras.





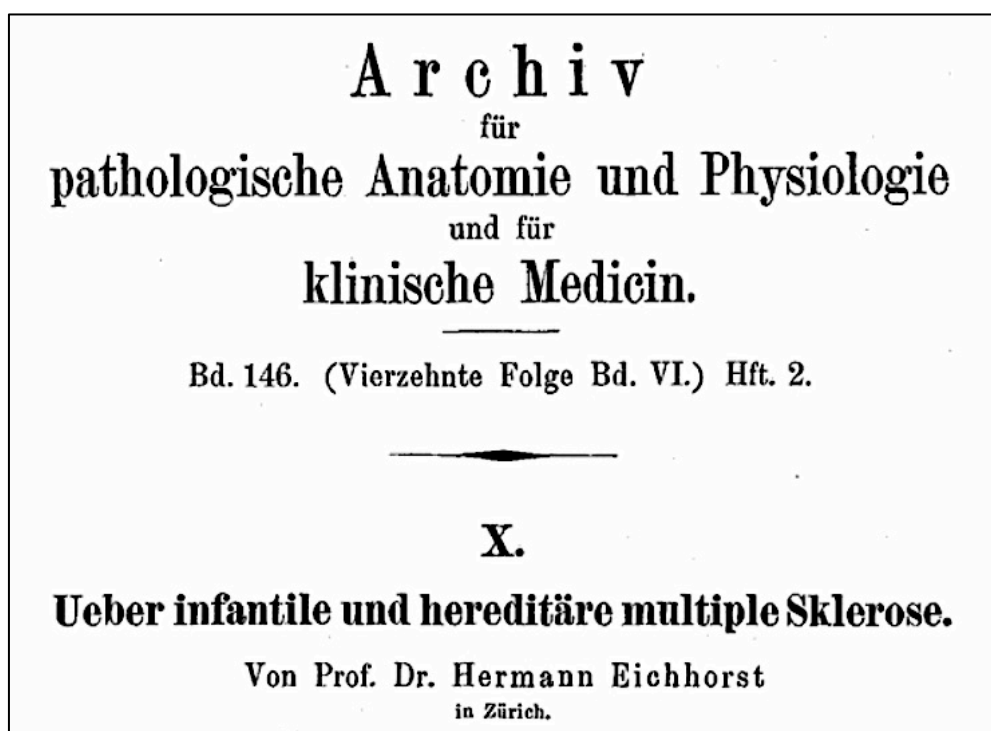
**Figura 13.** Modelos de variabilidad genética (modificada de Mullen et al. 2009).

Esquema que muestra los modelos de variabilidad genética. **A:** Inicialmente no existían cambios genéticos intergeneracionales (puntos azules) hasta la aparición de variaciones sin efectos graves en la expresión proteica (polimorfismos) que se extendieron a lo largo de las generaciones (>1%). **B:** Dichos polimorfismos justifican, por ejemplo, la mayor predisposición a padecer ciertas enfermedades. **C:** Cuando aparecían variaciones con un gran efecto sobre la expresión proteica (mutaciones), la probabilidad de reproducción del individuo era muy baja por lo que tendían a desaparecer a lo largo del tiempo (<1%). **D:** Dichas mutaciones son en gran parte las causantes de la enfermedad.

La EM (OMIM: 126200) se considera una enfermedad genéticamente compleja o poligénica (Roberts et al. 1979), sin un patrón de herencia claramente definido, en donde factores genéticos y ambientales han demostrado algún tipo de asociación patogénica sin que se conozca, hasta ahora, el mecanismo específico que desencadena la enfermedad (Oksenberg & Baranzini 2010) (Figura 2).

### 1.2.2. Abordaje genético clásico de la EM

El primer registro histórico que se tiene sobre la posible influencia familiar en el desarrollo de la EM fue descrito por Eichhorst en 1896 (Eichhorst 1896) (Figura 14).



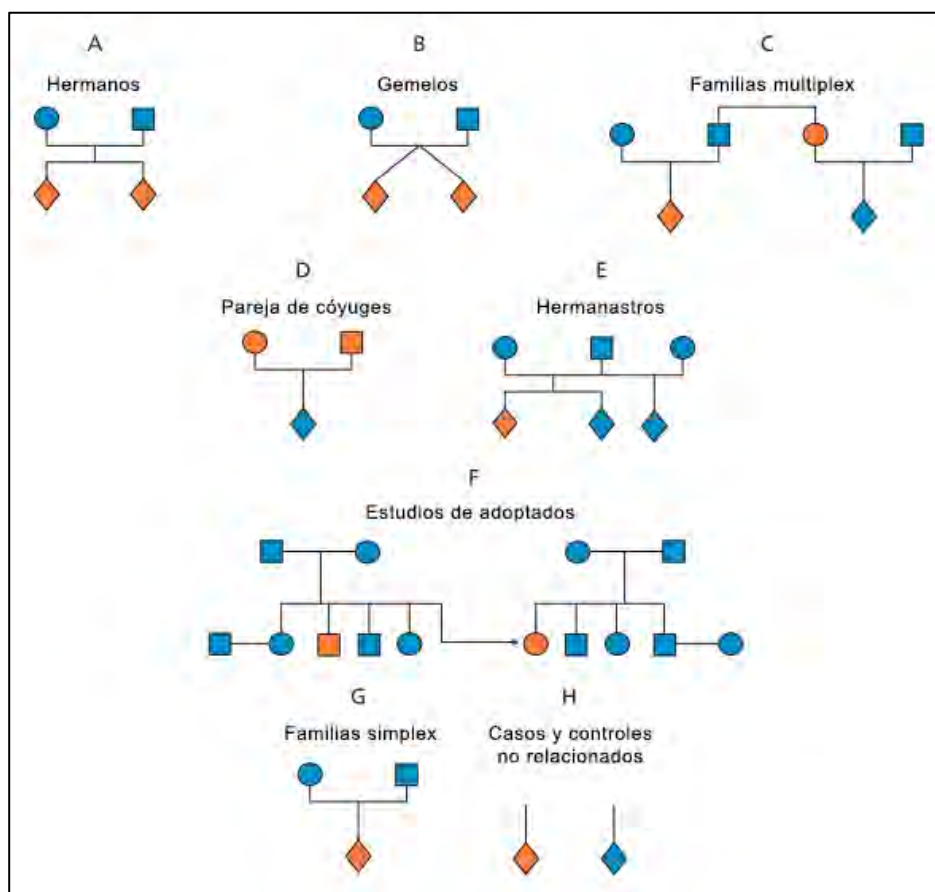
**Figura 14.** Artículo publicado por Eichhorst en 1896 (Eichhorst 1896).

Inicialmente el abordaje del conocimiento genético de la EM se basaba en las características epidemiológicas, ya que no se disponía de estudios moleculares. De esta forma, estudiando el parentesco en familias afectadas (familias multiplex –*familias con más de un miembro afectado*–, gemelos monocigotos y dicigotos, hermanastros, pacientes adoptados, cónyuges, familias simplex –*familias con solo un miembro afectado*–) y las diferencias observadas en el género, etnia y raza, ya a inicios de los años 20 se postuló que dichas diferencias podrían ser explicadas por la influencia genética (Davenport 1922). Al mismo tiempo, estos estudios pusieron en evidencia que la EM no presentaba un patrón de herencia monogénico o mendeliano, dejando entrever no solo la posible influencia de otros factores como los ambientales en su desarrollo sino también las futuras dificultades que surgirían en el análisis genético de la misma.

#### **1.2.2.1. Estudios en grandes series de familias multiplex**

El reconocimiento de que la EM ocurre más frecuentemente en los familiares de pacientes afectados es un hecho que ya se observó en los primeros estudios epidemiológicos (Pratt et al. 1951). Efectivamente, entre un 15-20% de pacientes (cifra significativamente más alta que la esperada por el azar) refieren antecedentes familiares de la enfermedad (Compston & Coles 2002). Estos datos epidemiológicos rápidamente promovieron el registro sistemático de familias con más de un miembro afectado (familias multiplex) con el objetivo de analizar y determinar un posible patrón de herencia. Así, antes del advenimiento de la genética molecular tal y como la conocemos actualmente, el estudio de la susceptibilidad genética para la EM se realizaba sobre todo en base al análisis de los árboles genealógicos de familias multiplex (Compston et al. 2006) (Figura 15).

A continuación, se describirá, de forma breve, los principales registros de familias multiplex a nivel mundial, junto a diferentes series poblacionales recogidas entre los años 1986 y 2002.



**Figura 15.** Abordaje genético clásico de la EM en base al estudio de los árboles genealógicos (modificada de Compston et al. 2006).

### 1.2.2.1.1. La serie canadiense

En 1986, Sweeney y colaboradores (Sweeney et al. 1986) analizaron más de 239.000 registros neurológicos en la provincia de Columbia Británica identificando un total de 4.620 casos de EM. El análisis demostró una historia familiar de EM en el 20% de los familiares de primero, segundo y tercer grado. En esta serie, el riesgo más elevado de padecer EM fue observado en las hermanas de las mujeres afectadas (5,6%), seguido de los hermanos de un familiar afectado (4%), hijos (2,5%) y familiares de segundo y tercer grado (1,5%) (Sadovnick 1994; Sadovnick et al. 1988; Sadovnick & Baird 1988).

Los datos analizados a lo largo de los años mostraron un riesgo global de padecer EM del 0,2% para la población general, un 3% para los familiares de primer grado y un 1% para los de segundo grado. Esto representaba un

riesgo relativo de 20 para los familiares de primer grado y 5,5 para los de segundo grado.

#### **1.2.2.1.2. Las series británicas**

En 1982, Roberts y Bates (Roberts & Bates 1982) analizaron 206 pacientes con EM y sus familias en el noreste de Inglaterra. Con posterioridad, Robertson y colaboradores (Robertson et al. 1995) analizaron de forma similar a 563 pacientes con EM en la Anglia oriental. En estas series el riesgo más elevado de padecer EM fue observado en las hermanas (4,4%) y hermanos (3,2%) de los afectados, seguido de los padres (2,1%), hijos (1,8%) y sobrinos (1,3%). En concreto, el riesgo relativo de padecer EM fue de 9,2 para los familiares de primer grado, 3,4 para los de segundo grado y 2,9 para los de tercer grado.

Dos estudios adicionales son de especial interés por las características de la población en cuestión. En el primero de ellos Roberts y colaboradores (Roberts et al. 1979; Roberts 1991) describieron 51 pacientes con EM comparados con controles originarios de las islas Orkney en el norte de Escocia. En esta serie se observó un coeficiente de consanguinidad aumentado tanto para pacientes como para controles sin observarse diferencias entre los coeficientes de parentesco. El riesgo de padecer EM en los familiares de los pacientes afectados fue menor que el observado en las otras series (1,6% para hermanos/hermanas, 1,5% para los padres y 1,2% para familiares de segundo y tercer grado). En el segundo estudio, también Roberts y colaboradores (Roberts et al. 1983) describieron 31 pacientes con EM comparados con controles originarios de las islas Shetland en el noreste de las islas Orkney. En esta serie, los pacientes con EM no diferían de la población general, excepto en tener una frecuencia ligeramente más elevada de familiares con EM. Los hallazgos observados en estos dos artículos en núcleos poblacionales aislados, permitieron concluir a Roberts y colaboradores que la susceptibilidad genética para la EM solo podía ser explicada mediante un modelo poligénico con una contribución significativa de los factores ambientales. Fue la primera vez que se hablaba de este tipo de modelo así como del probable sustrato multifactorial de la enfermedad.

### 1.2.2.1.3. Otras series europeas

En 1994, Wikstrom (Wikstrom 1994) estudió una pequeña área rural del oeste de Finlandia donde el 29% de 51 pacientes tenían historia familiar de EM con un riesgo de recurrencia entre hermanos del 2,5%. Aunque este estudio es pequeño podría ser de especial interés ya que recoge información de familias del sur de Ostrobotnia, región donde se ha implicado al gen de la proteína básica de la mielina en la aparición de la enfermedad (Pihlaja et al. 2003).

El mismo año, Binzer y colaboradores (Binzer et al. 1994) comunicaron una alta frecuencia de EM en un pequeño distrito rural del norte de Suecia en el que el 67% de 33 pacientes tenía algún tipo de parentesco entre ellos. Sin embargo, aunque se observó una tasa de endogamia elevada, la prevalencia de la enfermedad en esta área no fue significativamente más alta que la de otras comunidades aisladas.

Ese mismo año, Roth y colaboradores (Roth et al. 1994) estudiaron 7.802 familiares de pacientes franceses con EM de los cuales 170 tenían alguno de sus padres afectados y que se distribuían de la siguiente manera: 72 pares de madre-hija, 48 pares de padre-hijo, 37 pares de padre-hija y 13 pares de madre-hijo.

Posteriormente, en 1997, Carton y colaboradores (Carton et al. 1997) comunicaron el riesgo de recurrencia para EM en 22.351 familiares de 674 pacientes provenientes de la región belga de Flandes. La frecuencia de historia familiar en la EM fue del 15%. En esta serie, 85 de 104 pacientes provenientes de familias multiplex tenían un familiar afectado, 14 de 104 tenían dos y 5 de 104 tenían tres familiares afectados. El 20% de familias no aceptó participar en el estudio. El riesgo de recurrencia para los padres fue de 1,6%, para hermanos de 2,1% y para tíos/tías del 0,7%. Con ello, el riesgo relativo era 10-12 veces mayor para los familiares de primer grado y del triple para los de segundo grado.

En el 2002, Montomoli y colaboradores (Montomoli et al. 2002) comunicaron un alto riesgo de recurrencia (4,7%) para los hermanos del caso índice en una región de Cerdeña genéticamente homogénea y con una alta prevalencia de EM, con un riesgo relativo de 31 comparado con la población general. La recurrencia más alta se observó en hermanos de pacientes con edad de inicio temprana de la enfermedad. En una evaluación más detallada de 2.971 hermanos de 901 pacientes con EM provenientes de Cerdeña, Marrosu y colaboradores (Marrosu et al. 2002), identificaron a 59 hermanos afectados (2%) correlacionando el riesgo de recurrencia con la edad joven al inicio (riesgo relativo de 2,3) y la presencia de otro familiar afectado (riesgo relativo de 2,9). En uno de los municipios analizados, se observó un efecto fundador, en el que 11 casos fueron descendientes de 3 antecesores comunes.

Un resumen de los resultados observados en estas series puede consultarse en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Resumen de los datos obtenidos en los diferentes estudios epidemiológicos en familias con EM.

<b>Series de pacientes</b>	<b>Número de Pacientes</b>	<b>Riesgo global EM en 1º (RR)</b>	<b>Riesgo global EM en 2º (RR)</b>	<b>Referencias</b>
Canadiense	4.620	3% (20)	1% (5,5)	Sweeney et al. 1986
Británicas	769	3,2-4,4% (9,2)	1,3% (3,4)	Roberts & Bates 1982; Robertson et al. 1995
Islas Orkney	51	1,6% (-)	1,2% (-)	Roberts et al. 1979; Roberts 1991; Roberts et al. 1983
Finlandesa	51	2,5% (-)	-	Wikstrom 1994
Sueca	33	2,5% (-)	-	Binzer et al. 1994
Belga	674	2,1% (10)	0,7% (3)	Carton et al. 1997
Italiana (Cerdeña)	901	2% (31)	-	Montomoli et al. 2002; Marrosu et al. 2002

EM: esclerosis múltiple; 1º: familiar de primer grado; 2º: familiar de segundo grado; RR: riesgo relativo

### 1.2.2.2. Estudios en gemelos

Una de las características interesantes en el estudio de familias con enfermedades genéticamente complejas incluyendo la EM, es el estudio de concordancia en gemelos (Tajiri et al. 2010; Ramanujam et al. 2011; Mirea et al. 2013; Neuhaus et al. 2015). En términos fenotípicos, cuando estudiamos gemelos nos referimos a “concordantes” cuando comparten la enfermedad y “no concordantes” cuando no lo hacen. En este grupo de pacientes esperaríamos que la concordancia clínica fuera más elevada que en otros familiares o que en la población general, dado el sustrato genético que comparten, y aunque en el caso de gemelos dicigotos la influencia genética no es muy diferente a la observada en hermanos no gemelos, ellos se expondrían a factores ambientales muy similares tanto antes como después del nacimiento que llevarían en último caso a aumentar dicha concordancia.

En 1951, Thums (Thums 1951) identificó 96 pacientes con EM que tenían un gemelo vivo. Analizando un total de 13 gemelos monocigotos y 30 dicigotos observó que solo una pareja de gemelos monocigotos fue concordante, mientras que todos los gemelos dicigotos fueron no concordantes.

En 1958, Mackay y Myriantopoulos (Mackay & Myriantopoulos 1958) analizaron a 39 gemelos monocigotos y 29 dicigotos en los que no observaron diferencias en los porcentajes de concordancia (23% para monocigotos y 21% para dicigotos). Sin embargo, y tal como reconocieron los mismos autores en un trabajo de 1966 (Mackay & Myriantopoulos 1966), dicha muestra se encontraba claramente sesgada ya que existía un mayor número de gemelos monocigotos. Un dato interesante obtenido de este trabajo es que el 67% de las familias con gemelos concordantes tenían casos adicionales de EM dentro de la misma familia, en comparación con solo un 10% de las familias con gemelos no concordantes. Los autores propusieron un modelo genético recesivo para explicar estos hallazgos sin considerar una posible herencia poligénica tal como lo consideró Roberts en su trabajo de 1979 (Roberts et al. 1979).



En 1968, Cendrowski (Cendrowski 1968) observó concordancia en 3 parejas de gemelos dicigotos identificados a partir de un estudio epidemiológico de 30 pacientes. También analizó 13 estudios previos y observó concordancia en el 15% de gemelos dicigotos. Posteriormente, en 1969 el mismo autor junto a otros colaboradores (Cendrowski et al. 1969) reportó una concordancia significativamente más alta (27%) en gemelos monocigotos que en dicigotos (13%).

En 1980, Williams y colaboradores (Williams et al. 1980) analizaron 12 parejas de gemelos monocigotos y 12 de dicigotos que presentaban una concordancia del 50% y del 17%, respectivamente. Este estudio fue el primero en usar marcadores de laboratorio como índice de enfermedad subclínica, y observaron que aquellos gemelos con la enfermedad más reciente, tenían un mayor nivel de IgM que de IgG en el LCR. Además, los autores remarcaban que la mayoría de gemelos monocigotos concordantes tenían una edad mayor de 50 años.

En 1984, Xu y McFarlin (Xu & McFarlin 1984) demostraron la presencia de BOC-IgG en 4 de los hermanos no afectados pertenecientes a 4 parejas de gemelos monocigotos y en 8 pertenecientes a gemelos dicigotos. Esta misma cohorte fue usada posteriormente en 1993 por Utz y colaboradores (Utz et al. 1993) para llevar a cabo estudios genéticos comparativos relacionados con la respuesta inmunológica, en los que observaron que los gemelos concordantes activaban los mismos receptores de células T, mientras que los gemelos no concordantes activaban otros diferentes dentro del mismo receptor.

En cuanto a estudios basados en poblaciones de gemelos, Bobowick y colaboradores en 1978 (Bobowick et al. 1978) estimaron la frecuencia de EM en 16.000 parejas masculinas de gemelos registrados a través del servicio militar. Solo se observó concordancia en una pareja de gemelos monocigotos sin poderse demostrar concordancia en parejas de dicigotos. En 1982, Sadovnick y colaboradores (Sadovnick et al. 1982) utilizando el registro danés de EM y gemelos identificaron 47 parejas de gemelos, observando concordancia en el 21% de los monocigotos y solo en el 4% de los dicigotos.

Kinnunen y colaboradores en 1988 (Kinnunen et al. 1988) analizaron 13.064 parejas de gemelos a partir de un registro escandinavo. Se identificaron 11 parejas de gemelos monocigotos pero solo 7 pudieron ser estudiadas. Asimismo, se identificaron 10 parejas de gemelos dicigotos de las que solo pudieron ser estudiadas 6 parejas. Finalmente se observó concordancia en 2 parejas de gemelos monocigotos y en ninguna de las parejas de dicigotos. En el 2001, Bergkvist y Sandberg-Wollheim (Bergkvist & Sandberg-Wollheim 2001) estudiaron los títulos de anticuerpos virales en 3 parejas de gemelos monocigotos no concordantes sin observar diferencias claras. En 1986, Ebers y colaboradores (Ebers et al. 1986) estudiaron 27 parejas de gemelos monocigotos y 43 de dicigotos identificados a partir de 5.463 pacientes con EM provenientes del registro canadiense. Los porcentajes de concordancia para gemelos monocigotos y dicigotos fue de 26% y 2,3%, respectivamente. Posteriormente, esta misma serie fue actualizada por Sadovnick y colaboradores en 1993 (Sadovnick et al. 1993) observando un porcentaje de concordancia de 31% para gemelos monocigotos y 5% para dicigotos. En este trabajo, 2 de 14 gemelos monocigotos y 1 de 7 dicigotos presentaban alteraciones radiológicas compatibles con EM. La actualización más reciente de esta misma serie realizada por Willer y colaboradores en el 2003 (Willer et al. 2003) incluyó 370 parejas de gemelos, observándose un porcentaje de concordancia de 25% en gemelos monocigotos y 5% en dicigotos. En un registro británico realizado durante 2 años, Mumford y colaboradores (Mumford et al. 1994) identificaron 146 parejas de gemelos, observando un porcentaje de concordancia del 25% para gemelos monocigotos y 3% para dicigotos. En esta serie, 55 gemelos asintomáticos pudieron ser estudiados mediante RM detectándose lesiones compatibles con desmielinización en el 40% de los gemelos monocigotos y en el 50% de los dicigotos, comparados con el 20% de controles sanos. En éstos últimos, todas las lesiones detectadas fueron pequeñas y no cumplían criterios para EM tal como fue demostrado por Thorpe y Mumford en 1994 (Thorpe & Mumford 1994). En Francia, el Grupo de Investigación Francés de EM identificó 170 parejas de gemelos a partir de un registro de 7.942 pacientes con EM, observando un porcentaje de concordancia del 7% para gemelos monocigotos y 2,5% para dicigotos (French Research Group on Multiple Sclerosis 1992). En Italia, Stazi

y colaboradores (Stazi et al. 2002) identificaron 216 parejas de gemelos entre 34.549 pacientes con EM registrados como parte de una cohorte de 1,3 millones de registros de gemelos italianos, observando un porcentaje de concordancia del 8,4% para gemelos monocigotos y del 1,9% para dicigotos.

Un resumen de los resultados observados en estas series puede consultarse en la tabla 6.

**Tabla 6.** Resumen de los datos obtenidos en los diferentes estudios epidemiológicos en gemelos con EM.

<b>Estudios-referencia</b>	<b>% gMC</b>	<b>% gDC</b>
Thums 1951	7,7	0
Mackay & Myrianthopoulos 1958	23	21
Cendrowski 1968	-	10
Cendrowski et al. 1969	27	13
Bobowick et al. 1978	0,006	0
Williams et al. 1980	50	17
Sadovnick et al. 1982	21	4
Ebers et al. 1986	26	2,3
Kinnunen et al. 1988	28	0
Sadovnick et al. 1993	31	5
French Research Group 1992	7	2,5
Mumford et al. 1994	25	3
Stazi et al. 2002	8,4	1,9
Willer et al. 2003	25	5

**gMC:** gemelos monocigotos; **gDC:** gemelos dicigotos

En conclusión, hoy en día sabemos que la tasa promedio de concordancia de EM para gemelos monocigotos es de  $\approx 25\%$  y de  $\approx 5\%$  para gemelos dicigotos (Willer et al. 2003). Dos hechos llaman la atención de estos datos: por un lado, la evidente mayor concordancia en gemelos monocigotos que en dicigotos o hermanos no gemelos (4% según los diferentes estudios); y por otro lado, la proporción significativa de gemelos monocigotos que no son concordantes (entre un 50 y 93% según los diferentes estudios), lo que sugiere que los factores genéticos por sí solos no son suficientes para desarrollar la enfermedad sino que incrementan la susceptibilidad a la misma, pero solo en el contexto de unos “apropiados” factores ambientales.

### 1.2.2.3. Estudios en adoptados, hermanastros y cónyuges

Desde un punto de vista epidemiológico, el estudio de la EM entre individuos que forman parte de una misma familia pero que no comparten carga genética es científicamente interesante, ya que podría aportar información sobre los posibles factores ambientales a los cuales dichos individuos están expuestos.

En 1995, Ebers y colaboradores (Ebers et al. 1995) compararon la frecuencia de EM en parientes no biológicos de 238 pacientes con EM, sin observar diferencias respecto a lo descrito en la serie canadiense de 1986 (Sweeney et al. 1986).

En 1996, Sadovnick y colaboradores (Sadovnick et al. 1996), a partir de una base de datos de 16.000 pacientes con EM, estudiaron 939 casos índices que tenían entre ellos 1.839 hermanastros y 1.395 hermanos, observando un riesgo significativamente menor en los primeros (1,5%) que en los segundos (3,5%). Este riesgo no se modificaba si los hermanastros lo eran por parte de madre o de padre.

En cuanto a EM en cónyuges de pacientes con EM, inicialmente solo unos cuantos casos descritos de forma aislada (Fredrikson et al. 1992; Koch-Henriksen & Hyllested 1988; Schapira et al. 1963) aportaban poca información al respecto. La aparente rareza de la EM en los cónyuges de pacientes con EM ha sido usada como argumento en contra de una infección como principal factor etiológico de la enfermedad. Aunque estos casos aislados proporcionaban poca información, Finelli en 1991 (Finelli 1991) y Fredrickson y colaboradores en 1992 (Fredrikson et al. 1992), publicaron similitudes en el curso de la enfermedad. Solo dos series con un número mayor de pacientes se han descrito a este respecto: la primera por Robertson y colaboradores en 1997 (Robertson et al. 1997), quienes no encontraron concordancia entre los pacientes con EM y sus respectivos cónyuges para el grado de discapacidad y el modo de presentación; y la segunda por Ebers y colaboradores en el 2000 (Ebers et al. 2000), quienes concluyeron que un

contacto estrecho entre dos personas genéticamente no relacionadas no incrementa el riesgo a padecer la enfermedad.

En conclusión, los parientes de una misma familia que no comparten carga genética entre ellos (hijos adoptados, hermanastros, cónyuges) pero están expuestos a similares factores ambientales, no tienen mayor susceptibilidad a la enfermedad.

#### **1.2.2.4. Estudios con RM en familias**

La RM craneal se ha utilizado en la valoración de familiares de pacientes con EM no afectados clínicamente, aunque son muy pocos los trabajos publicados al respecto. Entre ellos, Lynch y colaboradores (Lynch et al. 1990) demostraron alteraciones radiológicas en 4 familiares menores de 40 años de edad y en 6 familiares mayores de 50 años, de un total de 76 pacientes con EM. Tienari y colaboradores (Tienari et al. 1992) demostraron que en hermanos clínicamente asintomáticos de pacientes con EM, el 38% de los menores de 50 años y el 78% de los mayores de 50 años presentaban RM craneales anormales. Sin embargo, un análisis más detallado demostró que solo el 11% mostraban lesiones compatibles con un proceso desmielinizante. Sadovnick y colaboradores (Sadovnick et al. 1993) en su análisis de gemelos, observaron que 2 de 14 gemelos monocigotos y 1 de 7 gemelos dicigotos, presentaban alteraciones radiológicas compatibles con EM. Mumford y colaboradores (Mumford et al. 1994), en el registro británico realizado durante 2 años en gemelos, identificaron 55 gemelos asintomáticos y detectaron lesiones en la RM compatibles con desmielinización en el 40% de los gemelos monocigotos y en el 50% de los gemelos dicigotos, comparados con el 20% de controles sanos. Fulton y colaboradores (Fulton et al. 1999) también realizaron RM en familiares no afectados de 3 familias con EM incluida una con hermanos gemelos homocigotos y añadiendo análisis volumétrico de las lesiones. Ellos demostraron que los dos sujetos asintomáticos tenían lesiones compatibles con EM, aunque el volumen de las lesiones era significativamente menor a aquel observado en los familiares sintomáticos. Shrem (Shrem 2003) estudió 14 familiares no afectados pertenecientes a 12 familias con EM y observó lesiones de sustancia blanca

en 10 de los 14 sujetos, pero solo en 5 de ellos las lesiones eran compatibles con un proceso desmielinizante.

Por lo tanto, aunque la prevalencia de lesiones de sustancia blanca en familiares de pacientes con EM parece ser mayor que en la población general, solo un pequeño porcentaje de estos sujetos muestran lesiones compatibles con una enfermedad desmielinizante.

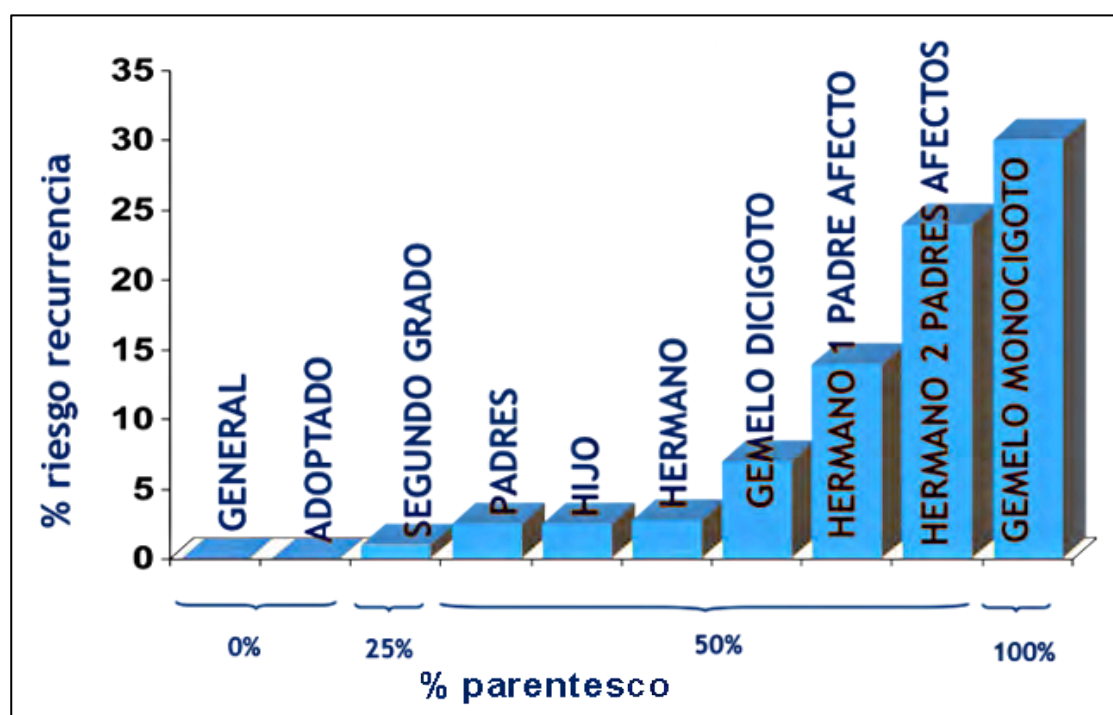
#### 1.2.2.5. Aplicación de los resultados de los estudios en familias

Uno de los marcadores estadísticos de susceptibilidad usado en el estudio de familias y que ha sido extraído gracias al análisis de las grandes series antes descritas, es el **riesgo de recurrencia**, el cual se expresa usando el símbolo griego  $\lambda$  (lambda). Corresponde al riesgo relativo de padecer la enfermedad en una determinada generación familiar (padres, hermanos/hermanas, hijos/hijas, sobrinos/sobrinas, etc.) con respecto a la población general (Risch 1990a; Risch 1990b; Hauser & Goodin 2011) (Tabla 7). Debido a que en la mayoría de las series se ha observado un mayor riesgo relativo en los hermanos y hermanas de los pacientes afectados, se usa esta categoría para el análisis de este riesgo y se representa como  $\lambda_s$  (donde la “s” corresponde a la palabra inglesa “*sibling*”, de hermano). Hoy en día sabemos que en la EM el valor de  $\lambda_s$  es de aproximadamente 15 y refleja el efecto combinado tanto de la influencia genética como de la ambiental (Sawcer 2006) (Tabla 7 y Figura 16). Según un modelo teórico, si quisiéramos saber solo la influencia genética, serían necesarios 100 pares de hermanos ó 300 familias simplex para detectar un gen que confiera un  $\lambda_s$  de solo 1,5 (Risch & Merikangas 1996), lo que pone de manifiesto el carácter complejo de la enfermedad.

**Tabla 7.** Riesgo de padecer EM según parentesco familiar (adaptada de Hauser & Goodin 2011).

Parentesco familiar	Riesgo de desarrollar EM
Si gemelo monocigoto con EM	1 en 3
Si gemelo dicigoto con EM	1 en 15
Si hermano (a) con EM	1 en 25
Si alguno de los padres con EM	1 en 50
Si primo 1ª generación con EM	1 en 100
Si esposo (a) con EM	1 en 1000
Si ninguno en la familia tiene EM	1 en 1000

EM: esclerosis múltiple



**Figura 16.** Riesgo de padecer EM según parentesco familiar (adaptada de Risch 1990a; Risch 1990b).

Otro de los frentes de investigación generados a partir de estos primeros estudios epidemiológicos fue el de intentar establecer un modelo de herencia para la EM.

En el análisis de los árboles genealógicos de la serie canadiense (Sweeney et al. 1986), se descartó la posibilidad de un único gen con herencia mendeliana (ya sea dominante o recesiva), considerándose también poco probable la posibilidad de una herencia dominante o recesiva ligada al cromosoma X, o una transmisión relacionada a la herencia mitocondrial (Sadovnick & Baird 1988). El análisis de las series británicas (Roberts & Bates 1982; Robertson et al. 1995), excluyó todas las posibilidades de herencia excepto la denominada poligénica, donde los factores genéticos influirían en el riesgo de recurrencia pero siempre bajo los efectos de factores ambientales. Otros como Lord y colaboradores en 1990 (Lord et al. 1990) concluyeron que la EM ocurre en individuos que son homocigotos para un gen recesivo y a su vez portadores de un gen dominante en el cromosoma X que muestra una penetrancia reducida, tal y como fue sugerido también por Pratt y colaboradores en 1951 (Pratt et al. 1951).

En el 2002, Dymont y colaboradores (Dymont et al. 2002) describieron una extensa familia con 15 miembros afectados a lo largo de 4 generaciones sugiriendo una herencia autosómica dominante con penetrancia reducida. No se observaron diferencias respecto a la población general con EM al comparar varias características clínicas (género, edad de inicio, síntomas, características radiológicas y curso clínico). Sin embargo, esta familia en concreto es de gran interés no solo por la gran cantidad de pacientes identificados, sino también porque hasta la fecha, los autores han realizado un seguimiento continuo de sus miembros durante aproximadamente 20 años, empleando varios abordajes genéticos durante dicho seguimiento, como se describirá más adelante.

En el mismo año, Montomoli y colaboradores (Montomoli et al. 2002) propusieron el efecto de un único gen dominante con una penetrancia extremadamente baja, como la base para el alto riesgo de recurrencia observado entre hermanos de la población de Cerdeña.



En el 2003, Modin y colaboradores (Modin et al. 2003) publicaron datos de una familia en la cual 5 individuos (el caso índice, tres de sus hermanos y su hija) fueron diagnosticados de EM sin evidenciarse tampoco un patrón de herencia discernible.

En el 2014, Granström y colaboradores (Granström et al. 2014) describen una paciente pediátrica que junto con su madre y su abuela estaban afectadas por la enfermedad de Hirschsprung (OMIM: 142623), un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen *EDNRB* –“*Endothelin Receptor, Type B*”– (OMIM: 131244) que produce una ausencia de células ganglionares en el colon provocando ausencia de movimiento y obstrucción intestinal. Además de la enfermedad de base, tanto su madre como su abuela presentaban características clínicas y radiológicas compatibles con EM. Los autores describen una nueva mutación (c.C397T,p.R133X; refNM\_000115) localizada en el gen *EDNRB* que, además de justificar el desarrollo de la enfermedad de Hirschsprung, podría estar en relación también con la susceptibilidad a la EM.

En un estudio reciente, Boullerne y colaboradores (Boullerne et al. 2015) describen una familia con 5 hermanos afectados de EM. Un análisis exhaustivo de la rama materna reveló la presencia de varios tipos de cáncer en 6 de los familiares ascendientes (hepático, de ovario, de mama, colorectal y otros), características que acompañan al síndrome de Peutz Jeghers (OMIM: 175200), un raro trastorno de herencia autosómica dominante causado por mutaciones en el gen *STK11* –“*Serine/Threonine Protein Kinase 11*”– (OMIM: 602216) caracterizado por pólipos gastrointestinales, manchas mucocutáneas y riesgo incrementado de varios tipos de cáncer como los observados en la familia (Launonen 2005). Los autores descubren una variante (rs9282860\*C; OR: 1,45 [IC no especificado]) asociada al gen antes mencionado. Posteriormente validan sus resultados en un grupo de 750 pacientes con EM y 650 controles donde encuentran que la variante se expresaba más frecuentemente en pacientes (10,4%) que en controles (7,4%) con una tendencia a la significación estadística ( $p=0,058$ ). En este caso, también un trastorno mendeliano con una variante ligada a un gen

específico, se asoció con un cuadro clínico compatible con EM. Dicha asociación podría servirnos como marcador y darnos pistas sobre los genes a los cuales deberíamos prestar mayor atención y analizar con mayor detalle.

En conclusión, aunque han sido arduos los esfuerzos, el análisis de las diferentes series familiares con EM no ha podido demostrar hasta ahora una forma de herencia monogénica o mendeliana de la enfermedad, apuntando por tanto, hacia una herencia poligénica con efectos epistáticos y multiplicativos en la aparición de la EM.

### **1.2.3. Abordaje genético molecular de la EM**

#### **1.2.3.1. Hacia el mapeo genético de las enfermedades**

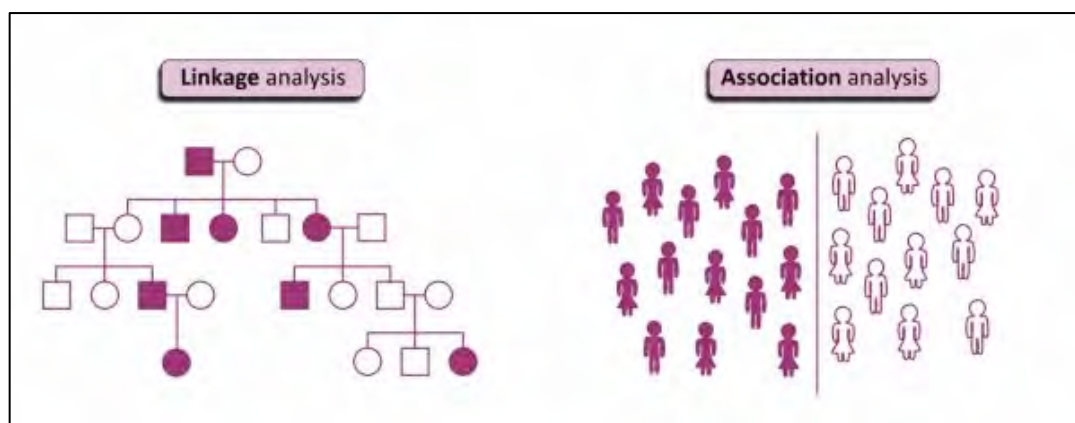
Una vez revisado el abordaje genético clásico de la EM basado en el estudio de las características epidemiológicas de una población (en general, registros de familias) se revisa, a continuación, el abordaje genético molecular. Este abordaje ofrece la posibilidad de identificar genes que confieren susceptibilidad a una enfermedad compleja como la que nos concierne, incluso en ausencia de cualquier conocimiento previo sobre el número o naturaleza de dichos genes.

Tal como se ha comentado previamente, el abordaje ideal para identificar dichos genes de susceptibilidad sería secuenciar y comparar el genoma completo de afectados y no afectados. Sin embargo, esta estrategia en la actualidad es poco práctica, ya que supone una inversión excesivamente alta de tiempo y recursos económicos dada la gran cantidad de material genético que se requiere analizar.

En su lugar, cuando se analiza el sustrato genético de una enfermedad, se realiza el llamado **acotamiento de regiones de riesgo**; es decir, se centra el estudio en una zona concreta del genoma que se va analizando de forma cada vez más detallada. Estas zonas de riesgo vendrán determinadas por

“pequeños fragmentos” de ADN llamados **marcadores genéticos** que se distribuyen a lo largo del genoma y que, dependiendo de si varían o no respecto a una secuencia de referencia, indican sobre qué área se tendrá que realizar un análisis más exhaustivo. Este abordaje se está utilizando desde hace más de 30 años y ha servido para el descubrimiento de un elevado número de polimorfismos y mutaciones asociados a enfermedades tanto monogénicas como complejas. En los últimos 10 años, se han producido muchos avances y se han utilizado múltiples recursos para la “secuenciación de nueva generación” (“*next generation sequencing*”) que están cada vez más disponibles y accesibles para la comunidad científica.

Las dos estrategias que utilizan un abordaje mediante marcadores genéticos y que han sido más utilizadas a lo largo de los últimos años son los **estudios de ligamiento** y los **estudios de asociación** (Mullen et al. 2009) (Figura 17).

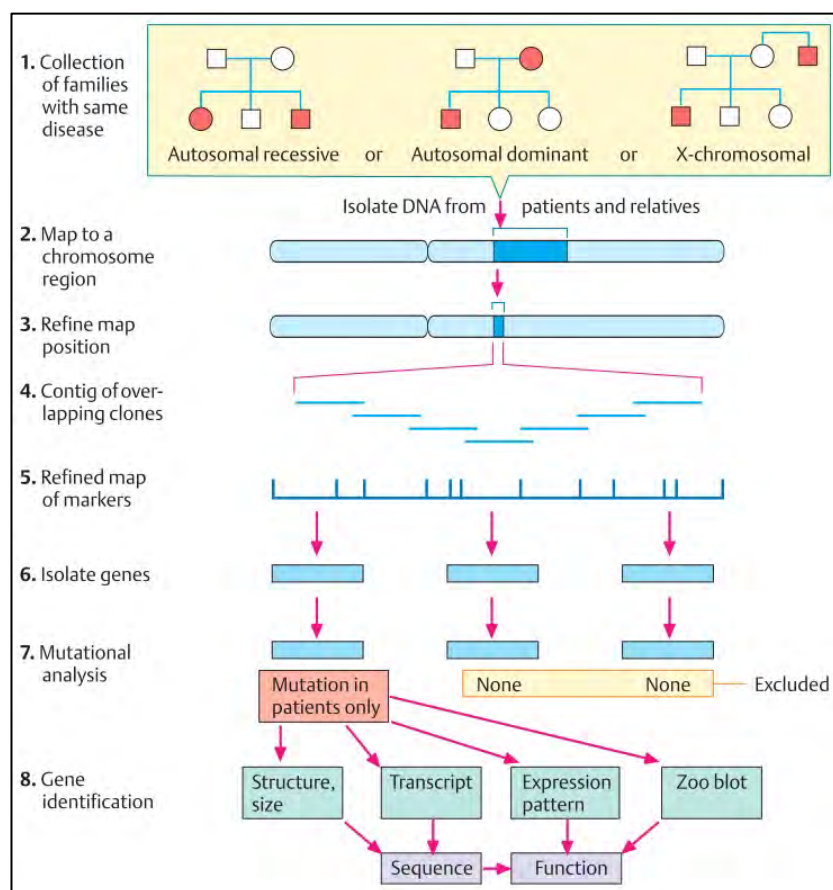


**Figura 17.** Estudios de ligamiento y asociación (Mullen et al. 2009).

De forma general, en los estudios de ligamiento el objetivo es identificar marcadores heredados entre miembros de una misma familia, de forma similar a como se heredaría la enfermedad; mientras que en los estudios de asociación dichos marcadores genéticos son comparados entre un grupo de pacientes y otro de controles sanos con el objetivo de identificar diferencias entre los dos grupos.

### 1.2.3.2. Uso de marcadores genéticos en el mapeo de enfermedades

Los marcadores genéticos, que se utilizan dentro del proceso de identificación de genes de susceptibilidad mediante el acotamiento de regiones de riesgo, juegan un papel fundamental en definir dichas regiones ya que representan un segmento de ADN con un locus identificable en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear al comparar su presencia o ausencia en varias generaciones de una misma familia (estudios de ligamiento) o entre pacientes y controles no emparentados (estudios de asociación). De esta forma podemos realizar un primer abordaje superficial o “*screening*” para posteriormente pasar a un mapeo más fino o a la secuenciación directa de los genes involucrados (Passarge 2007) (Figura 18).



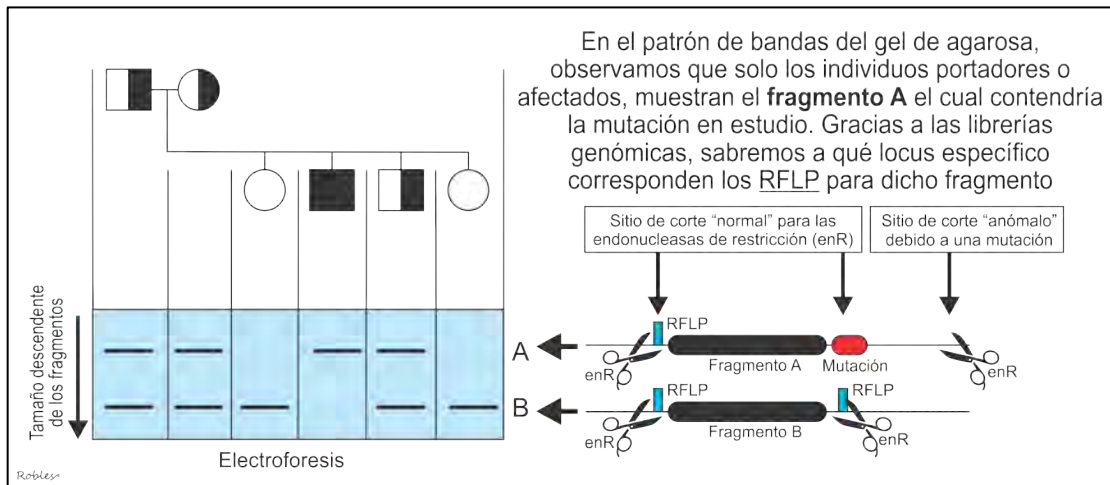
**Figura 18.** Proceso de identificación de genes de susceptibilidad mediante el acotamiento de regiones de riesgo (Passarge 2007).

Existen hasta 8 tipos de marcadores que se utilizan para los estudios genéticos. A continuación se hará referencia a aquellos que hayan demostrado ser más “rentables” a la hora de generar información y que se hayan utilizado en algún momento para el abordaje genético de la EM.

En esta enfermedad, el primer estudio con este tipo de marcadores fue llevado a cabo en 1984 por Cohen y colaboradores (Cohen et al. 1984), quienes utilizaron **polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción** (RFLP, por sus siglas en inglés de “*Restriction Fragment Length Polymorphism*”).

Estos marcadores consisten en secuencias específicas de ADN no codificante que son reconocidas y cortadas por endonucleasas de restricción (enzimas que reconocen una secuencia característica de nucleótidos dentro del ADN y lo cortan en ese punto específico). Posteriormente estos fragmentos son separados mediante electroforesis en un gel de agarosa con el método denominado “*Southern blot*”, y se comparan entre pacientes y familiares sanos o entre pacientes y controles no emparentados. Los geles proporcionan un patrón de bandas de ADN que es único para un individuo en particular y que depende del peso molecular del fragmento de ADN generado por las endonucleasas de restricción (a mayor peso molecular menor capacidad de migración a través de la agarosa).

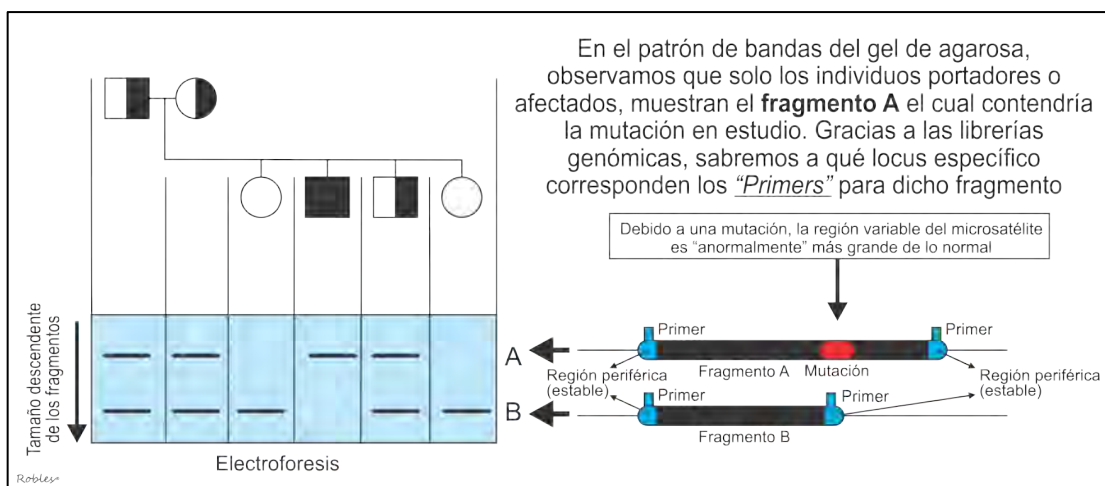
De este forma, en el caso de existir un polimorfismo o una mutación, las endonucleasas de restricción no detectarán el sitio de corte o lo harán en un locus diferente al esperado. Esto generará un fragmento de ADN nuevo cuyo peso molecular será diferente al observado en un individuo sano, lo cual se reflejará como un patrón de bandas diferente en el gel de agarosa de estos individuos (Figura 19).



**Figura 19.** Esquema representativo del uso de RFLP como marcadores genéticos en el genotipado de los miembros de una familia.

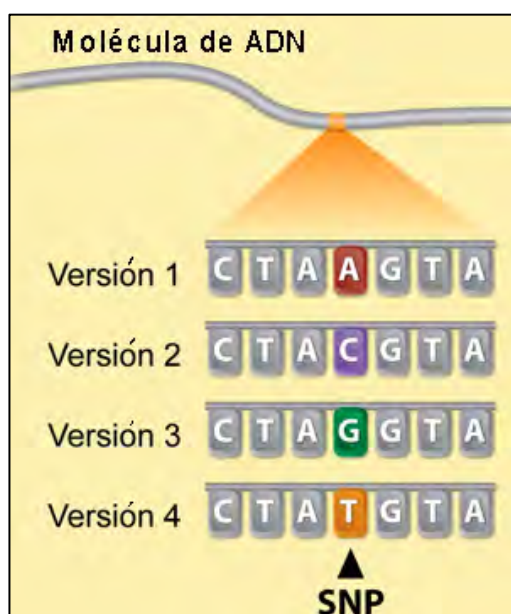
Otro de los marcadores que se ha usado en el mapeo genético de la EM, especialmente en estudios de ligamiento, son los **microsatélites**. Consisten en secuencias de ADN no codificante ubicados aproximadamente uno cada 100 pares de bases (pb) a lo largo del genoma. En este caso la secuencia se compone de dos porciones: un núcleo de entre 1 y 6 pb que tienen un patrón de repetición diferente entre individuos y una región periférica con secuencias muy estables, es decir, que no varían entre individuos.

Esta característica permite crear secuencias complementarias a las zonas flanqueantes (cebadores o "*Primers*") que permiten amplificar los microsatélites mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para posteriormente separarlos por electroforesis en un gel de agarosa y compararlos entre pacientes y familiares sanos o entre pacientes y controles no emparentados. De este forma, en el caso de existir un polimorfismo o una mutación, el núcleo del microsatélite contendrá un número de repeticiones diferente de las que debería tener, por lo que al realizar la amplificación por PCR se generará un fragmento de ADN cuyo peso molecular será distinto al observado en un individuo sano, lo que se reflejará como un patrón de bandas diferente en el gel de agarosa (Figura 20).



**Figura 20.** Esquema representativo del uso de microsatélites como marcadores genéticos en el genotipado de individuos.

Finalmente, la más reciente generación de marcadores genéticos utilizados en el estudio de la EM son los **polimorfismos de nucleótido único** o **SNPs** (por sus siglas en inglés "Single Nucleotide Polymorphisms"). En este caso nos referimos a una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de la secuencia del genoma (Passarge 2007) (Figura 21).

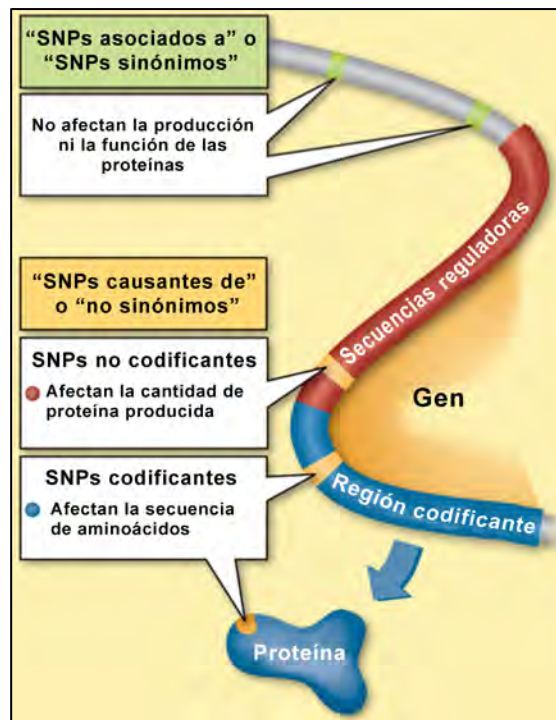


**Figura 21.** Esquema representativo de los SNPs (adaptada Passarge 2007).

Los SNPs tienen una serie de características que los hacen muy atractivos como marcadores genéticos:

- Constituyen el 90% de todas las variaciones genómicas humanas por lo que justifican la mayor parte de las diferencias genéticas entre un individuo y otro (estas diferencias corresponden al 0,1% del genoma) (Figura 11). A lo largo de los años y en diferentes poblaciones de sujetos sanos (africana, asiática, europea y americana), dichas variaciones se han ido determinando y registrando con el objetivo de disponer de bases de datos de referencia a nivel mundial. Actualmente existen principalmente 3 catálogos online que recogen la mayoría de variantes genéticas humanas son: el **“dbSNP”** (base de datos de SNPs, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) (Sherry et al. 1999), el **“HapMap Project”** (el cual recoge fundamentalmente las variantes comunes [ $\geq 5\%$ ], <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) (The International HapMap Consortium 2003) y el **“1000 Genomes Project”** (el cual recoge fundamentalmente las variantes raras [1-4%], <http://www.1000genomes.org/>) (Durbin et al. 2010).
- Se calcula que existe 1 SNP por cada 1.200 pb, por lo que existirían unos 10 millones en todo el genoma humano.
- Los SNPs se encuentran dentro del genoma codificante (exones) y, por tanto, son más susceptibles de producir cambios clínicamente relevantes. Dependiendo de la localización del SNP en el exón y de su función reguladora, los SNPs se clasifican en **“SNPs asociados a”** o **“SNPs sinónimos”** que no afectan la producción ni la función de las proteínas pero que, en cambio, pueden asociarse, por ejemplo, a una mayor susceptibilidad genética para el desarrollo de una enfermedad o a la respuesta individual a fármacos; y los **“SNPs causantes de”** o **“SNPs no sinónimos”**, que afectan la producción o función proteica, siendo los principales causantes de una determinada enfermedad (Passarge 2007) (Figura 22).

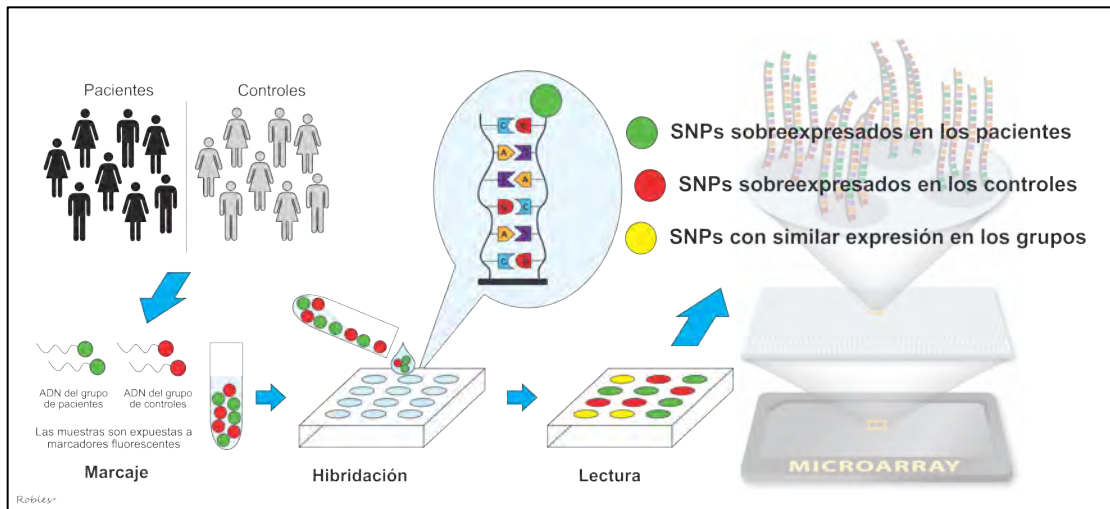




**Figura 22.** Esquema de los principales tipos de SNPs dependiendo de su localización en el exón y de su función reguladora (adaptada de Passarge 2007).

El análisis de los SNPs también se puede hacer mediante “*Primers*” con la subsecuente amplificación por PCR y separación mediante electroforesis en gel de agarosa de la misma forma que para los microsatélites (ver Figura 20). Sin embargo, la técnica más utilizada y con más rendimiento en la actualidad es la de los **microarrays** o **chips de ADN** que consisten en unas pequeñas placas (de vidrio, plástico o silicio) provistas de una gran cantidad de pocillos diminutos donde se encuentra una secuencia complementaria de ADN o sonda que al unirse al SNP complementario (hibridación) genera una determinada fluorescencia que se detecta y analiza mediante un ordenador. El nivel de hibridación medido mediante fluorescencia refleja también el nivel de expresión del gen (Figura 23).

Mediante este método, utilizado inicialmente en 1995 con un total de solo 48 sondas (Schen et al. 1995), se puede analizar una gran cantidad de material genético en poco tiempo, existiendo actualmente en el mercado microarrays provistos de entre 250.000 hasta 1.000.000 de sondas.



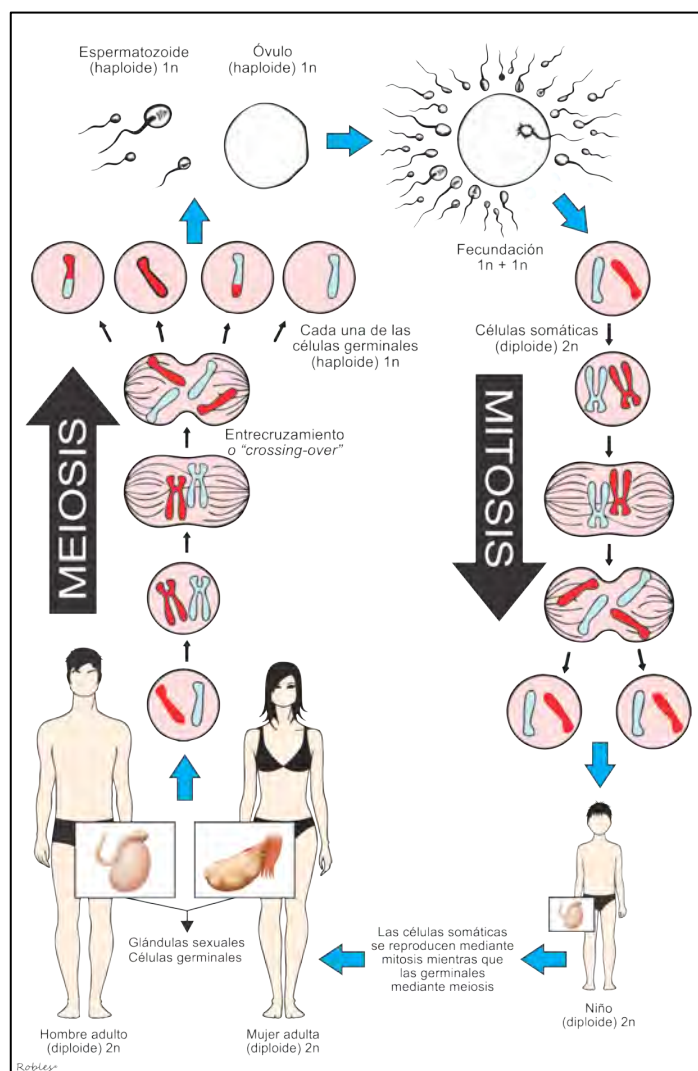
**Figura 23.** Esquema que muestra el uso de microarrays en el genotipado de grandes cantidades de SNPs.

La nomenclatura utilizada en las publicaciones científicas relacionadas con SNPs se basa en el número de referencia proporcionado por la dbSNP. Dicha nomenclatura incluye las letras minúsculas “rs” (reference snp) seguidas por la posición en el genoma, un asterisco, corchete o guión bajo, y finalmente el nucleótido de riesgo observado en la población afectada por la enfermedad (alelo de riesgo). Un ejemplo sería rs703842\*A. Evidentemente a lo largo de los años se puede describir más de un SNP relacionado con el mismo locus o gen (debido a que existen zonas con un alto desequilibrio de ligamiento) por lo que generalmente se hace referencia a aquel SNP que haya mostrado la mayor fuerza de asociación.

En conclusión, son varios los marcadores genéticos que se han utilizado a lo largo del tiempo en el mapeo de enfermedades tanto monogénicas como poligénicas (Compston et al. 2006), siendo actualmente los SNPs los más ampliamente utilizados y validados especialmente en enfermedades genéticamente complejas como la EM (**SNPs asociados a la susceptibilidad de padecer EM**). Su utilidad se basa en que ofrecen un primer abordaje o “screening” de la región de riesgo, indicando dónde se tendría que realizar un mapeo más fino en caso de encontrarse un cambio significativo entre parientes afectados y no afectados de una misma familia o entre pacientes y controles de una determinada población.

### 1.2.3.3. El ligamiento y el desequilibrio de ligamiento

Antes de pasar a analizar con mayor detalle los principales tipos de abordaje genético molecular para el estudio de la EM, se definirán algunos conceptos básicos que se consideran importantes. Durante el proceso de reproducción en las células germinales o sexuales (meiosis) se producen una serie de divisiones celulares que darán como resultado final la reducción del material genético a la mitad. Es decir, una célula diploide con 46 cromosomas se divide en dos células haploides con 23 cromosomas cada una. Esta división reduccional es la responsable del mantenimiento del número cromosómico característico de cada especie (Figura 24).



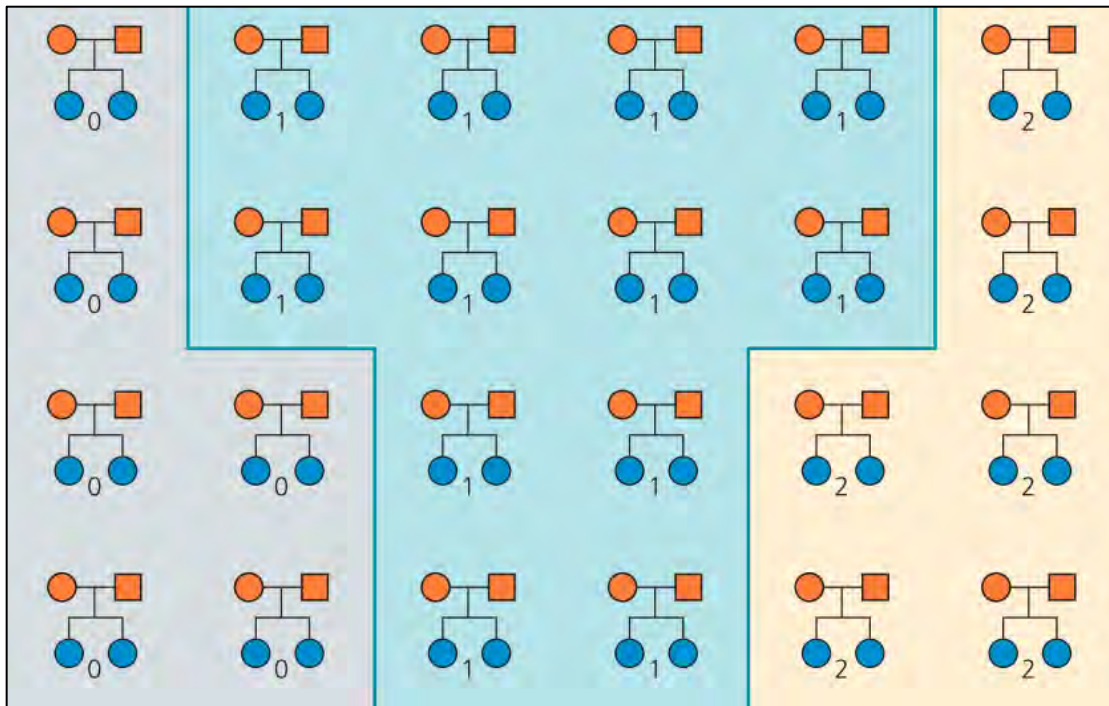
**Figura 24.** Esquema del proceso de división celular, propio de las células germinales (meiosis) y de las células somáticas (mitosis).

Durante este proceso se produce uno de los fenómenos fundamentales para la variabilidad genética y, por tanto, para la evolución de las especies: el llamado **entrecruzamiento** cromosómico o “**crossing-over**”.

En él, el intercambio de material genético materno y paterno da como resultado cromosomas recombinantes con una distribución de genes totalmente distinta a la de sus progenitores, disminuyendo así la probabilidad de acumular de forma irreversible mutaciones perjudiciales a lo largo de las sucesivas generaciones (Figura 13 C y D).

Evidentemente no todo el material genético sufre entrecruzamiento. Existen regiones que se heredan como bloques enteros a la siguiente generación. Esto dependerá de la distancia que separe a dos alelos, genes o marcadores genéticos entre sí. Así, cuanto más próximos o “ligados” estén, mayor la probabilidad de que se hereden juntos. El centimorgan (cM) es la unidad que se utiliza para medir esta distancia de separación y equivale aproximadamente a un millón de pb (o al 1% de probabilidad de que un alelo, gen o marcador en un cromosoma esté separado de un segundo alelo, gen o marcador sobre el mismo cromosoma debido al fenómeno de entrecruzamiento).

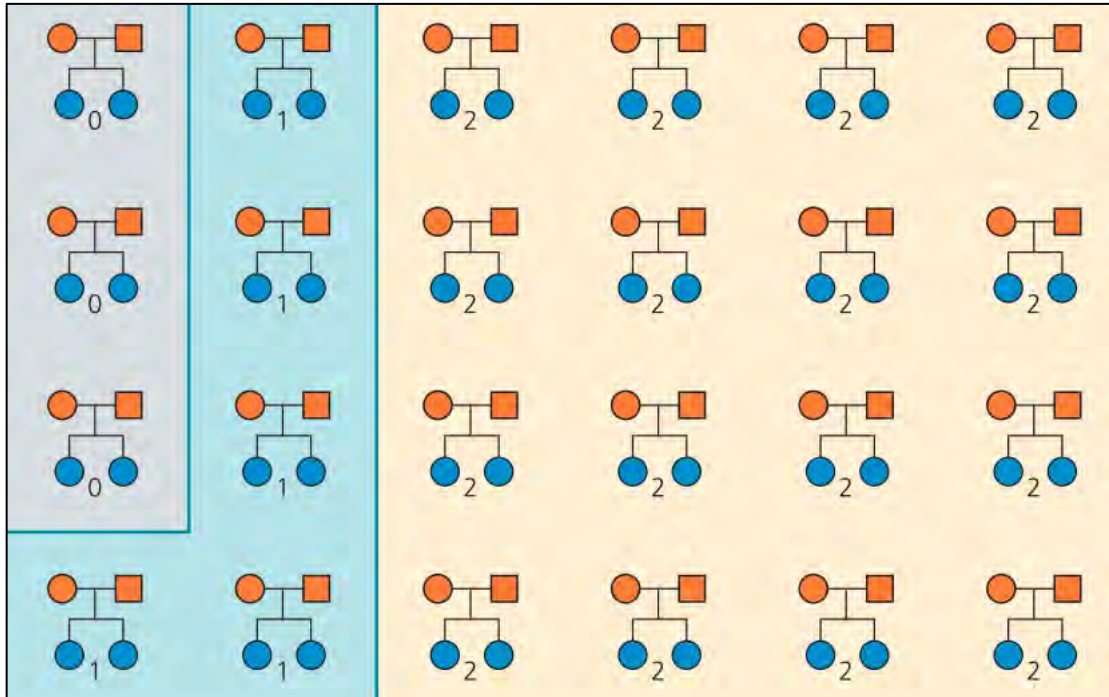
Decimos que una población está en **equilibrio de ligamiento** cuando el grado de entrecruzamiento de sus alelos es igual al esperado para la población general según las leyes de Mendel. Un ejemplo de ello lo observamos en la Figura 25, donde una pareja de hermanos tiene el 50% de probabilidades de heredar un único alelo de su descendiente (ya sea paterno o materno), el 25% de heredar ambos alelos y el 25% restante, de no heredar ningún alelo. Cualquier desviación de esta distribución se denomina **desequilibrio de ligamento**.



**Figura 25.** Esquema representativo del equilibrio de ligamiento (modificada de Compston et al. 2006).

En este esquema, se representan 24 parejas de hermanos. Decimos que están en **equilibrio de ligamiento** porque, en base a lo esperado para la población general según las leyes de Mendel, la probabilidad de heredar un alelo al azar es del 50% (12/24 en el recuadro **azul**), la de heredar ambos es del 25% (6/24 en el recuadro **amarillo**) y la de no heredar ninguno es del 25% restante (6/24 en el recuadro **gris**).

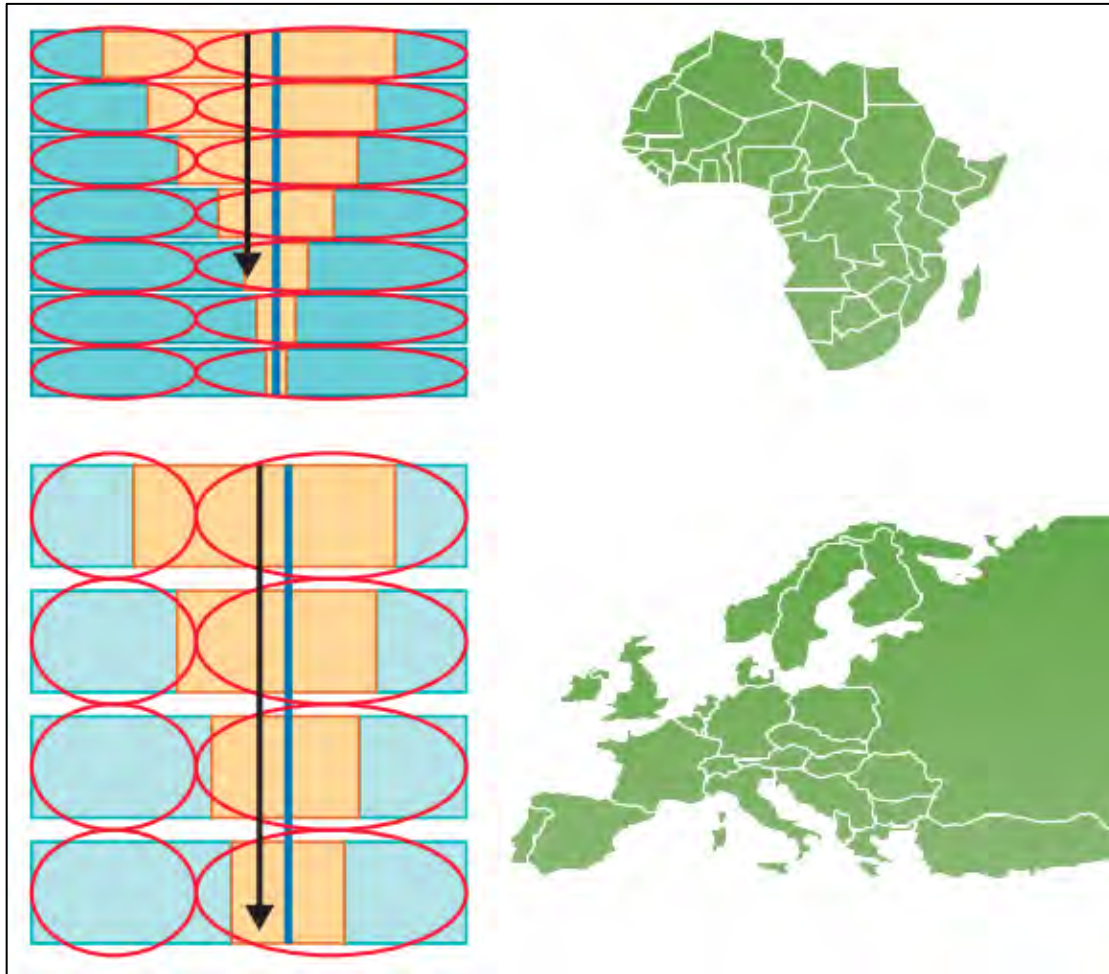
Analicémoslo con un ejemplo gráfico: imaginemos dos alelos (A y a) que se encuentran muy juntos en un mismo cromosoma (con un alto ligamiento). Al producirse el entrecruzamiento, la probabilidad de que estos alelos se hereden juntos a la siguiente generación será muy elevada, más alta que la esperada para la población general según las leyes de Mendel (que correspondería a un 25% según el esquema de la Figura 25); entonces nos referimos a que dichos alelos se encuentran en **desequilibrio de ligamiento** (Figura 26).



**Figura 26.** Esquema representativo del desequilibrio de ligamiento (modificada de Compston et al. 2006).

En este esquema, se representan 24 parejas de hermanos. Decimos que están en **desequilibrio de ligamiento** porque la distribución de alelos no concuerda con lo esperado para la población general según las leyes de Mendel (Figura 25). En este ejemplo, la probabilidad de heredar un alelo al azar es del 20,8% (5/24 en el recuadro **azul**) cuando debería ser del 50%, la de heredar ambos alelos es del 66,7% (16/24 en el recuadro **amarillo**) cuando debería ser del 25% y la de no heredar ningún alelo es del 12,5% restante (3/24 en el recuadro **gris**) cuando debería ser del 25%.

En definitiva, cuanto más juntos o ligados se encuentren dos alelos, mayor será su desequilibrio de ligamiento y, por consiguiente, mayor será la probabilidad de que se hereden juntos. Esta probabilidad depende también del tipo de población que se está estudiando, ya que en poblaciones más “ancestrales” como la africana, el desequilibrio de ligamiento es menor que en poblaciones más “jóvenes” como la europea. Esto es debido a que el mayor número de generaciones previas hace que la fracción de recombinación sea más alta por lo que eventualmente un alelo quedaría “aislado” y se heredaría de forma individual (Figura 27).



**Figura 27.** Desequilibrio de ligamiento según las diferentes poblaciones (modificada de Compston et al. 2006).

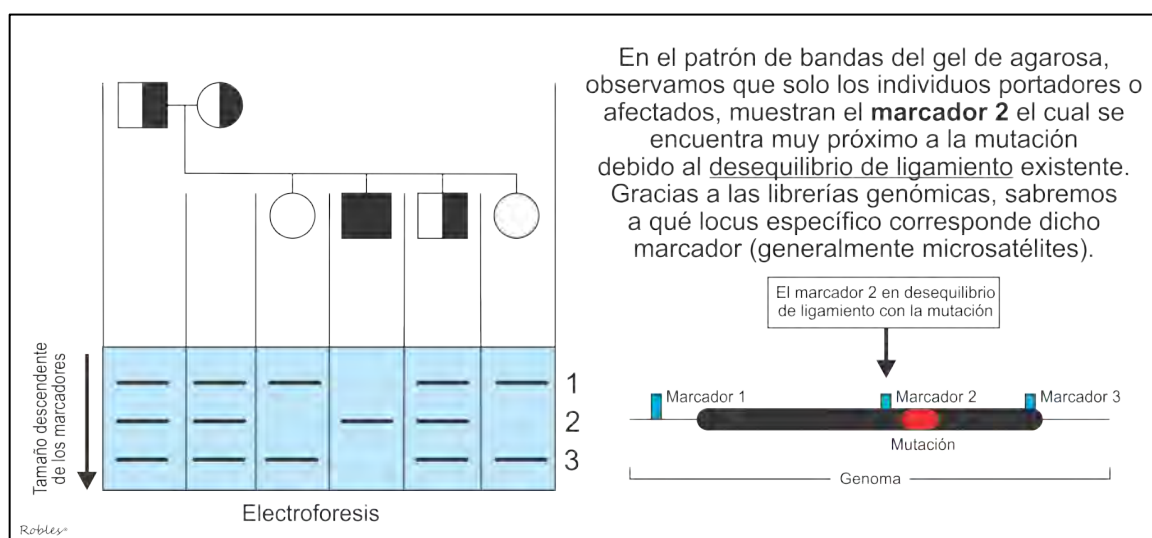
En este esquema, se representa la diferencia en el desequilibrio de ligamiento entre diferentes poblaciones. La línea azul corresponde a un alelo al azar, rodeado de una zona naranja que representa un bloque de genoma que se tiende a heredar unido al alelo en estudio (debido al desequilibrio de ligamiento). La flecha representa las sucesivas generaciones.

Tal y como se observa en la parte superior de la figura, en poblaciones más ancestrales como la africana, el mayor número de generaciones y, por tanto, de fenómenos de entrecruzamiento, hace que se produzca el “fraccionamiento” progresivo del bloque de genoma por lo que el alelo en estudio queda “aislado” de dicho bloque. Esto hace que sea más fácil identificar y aislar dicho alelo.

Por otro lado, si observamos la parte inferior de la figura, en poblaciones más jóvenes como la europea, el menor número de fenómenos de entrecruzamiento hace más difícil identificar y aislar el alelo en estudio ya que tiende a heredarse junto al resto del bloque de genoma debido al desequilibrio de ligamiento existente entre los dos.

### 1.2.3.4. Estudios de ligamiento

Denominamos ligamiento a aquella situación en la que dos o más familiares afectados por una misma enfermedad comparten genes de susceptibilidad para el desarrollo de la misma. Además de compartir estos genes, también comparten ciertos marcadores genéticos lindantes que nos servirán para identificar la región en el genoma responsable de dicha susceptibilidad gracias al desequilibrio de ligamiento existente entre ellos (Figura 28).



**Figura 28.** Esquema general de un estudio de ligamiento.

En este esquema se observa un árbol genealógico en el que dos hermanos han heredado la mutación (uno de ellos está afectado mientras que el otro es un portador). Al realizar el análisis genético mediante el rastreo de marcadores distribuidos por todo el genoma (generalmente microsatélites), observamos que el marcador 2 se expresa solo en el paciente afectado y en los portadores (en este caso su hermano y sus padres).

Decimos entonces que el marcador ha segregado con la enfermedad. Generalmente en los estudios de ligamiento el panel de marcadores utilizado tiene una cobertura de aproximadamente 1 marcador por cada 10-20 cM. Debido al desequilibrio de ligamiento y gracias a las amplias librerías genómicas de las que disponemos actualmente, sabremos a qué región del genoma corresponde dicho marcador por lo que podremos analizar la región en busca de la mutación específica causante del trastorno.



En la EM, los marcadores genéticos usados con más frecuencia en los estudios de ligamiento son los **microsatélites**. Se considera que cuantos más microsatélites se utilicen, mayor será la información extraída del estudio. Sin embargo esta relación no es lineal y el exceso de microsatélites puede perjudicar los resultados. Por ello, se ha calculado que, serían adecuados, entre 300 y 400 microsatélites para cubrir todo el genoma y para obtener un balance óptimo de información (Hauser et al. 1996).

El análisis de ligamiento se basa en el estudio de familias afectadas en las que a priori tenemos información clínica sobre el posible patrón de herencia de la enfermedad subyacente. En el análisis es fundamental que la elaboración de los árboles genealógicos sea correcta, que la probabilidad de compartir genes de susceptibilidad entre dos o más familiares sea elevada y que el grado de proximidad (desequilibrio de ligamiento) entre los marcadores genéticos analizados y los genes de susceptibilidad sea alto. Esta probabilidad de ligamiento suele expresarse en términos de “*LOD score*”, que compara la probabilidad de que dos locus estén ligados, a la probabilidad de que no lo estén y se encuentren unidos por pura casualidad. En los análisis de ligamiento tradicionales un “*LOD score*” de 3 o más proporciona fuerte evidencia a favor de ligamiento (Lander & Kruglyak 1995).

Aunque los estudios de ligamiento tienen un menor poder estadístico que los de asociación, han sido particularmente exitosos identificando genes responsables de enfermedades monogénicas como la anemia de células falciformes (OMIM: 603903), la fibrosis quística (OMIM: 219700) o la fenilcetonuria (OMIM: 261600). En estas condiciones, las variantes responsables son esenciales para el desarrollo de la enfermedad, confiriendo un riesgo elevado a padecerla cuando son heredadas (alta penetrancia). Sin embargo, para la mayoría de enfermedades más comunes incluida la EM, con variantes que tienen una baja penetrancia, los estudios de ligamiento sólo han tenido un éxito limitado y los genes descubiertos sólo explican una pequeña fracción de la susceptibilidad genética para la enfermedad. De hecho, con esta aproximación, las familias descritas afectadas con EM raramente incluyen más de 3 ó 4 miembros y, en caso de tenerlos,

generalmente se distribuyen solo en una determinada generación más que en diferentes generaciones (Willer et al. 2007; Modin et al. 2003; Haghighi et al. 2006; Dymont et al. 2002; Dymont et al. 2008).

A pesar de estas limitaciones, el abordaje genético mediante estudios de ligamiento permitió descubrir en el año 1972 (Naito et al. 1972; Jersild et al. 1972) lo que ha sido hasta ahora la mayor asociación causal entre la EM y un grupo de genes, los correspondientes al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y, específicamente, a los genes de la región HLA de clase II (del inglés "*Human Leukocyte Antigen*"), en el brazo corto del cromosoma 6.

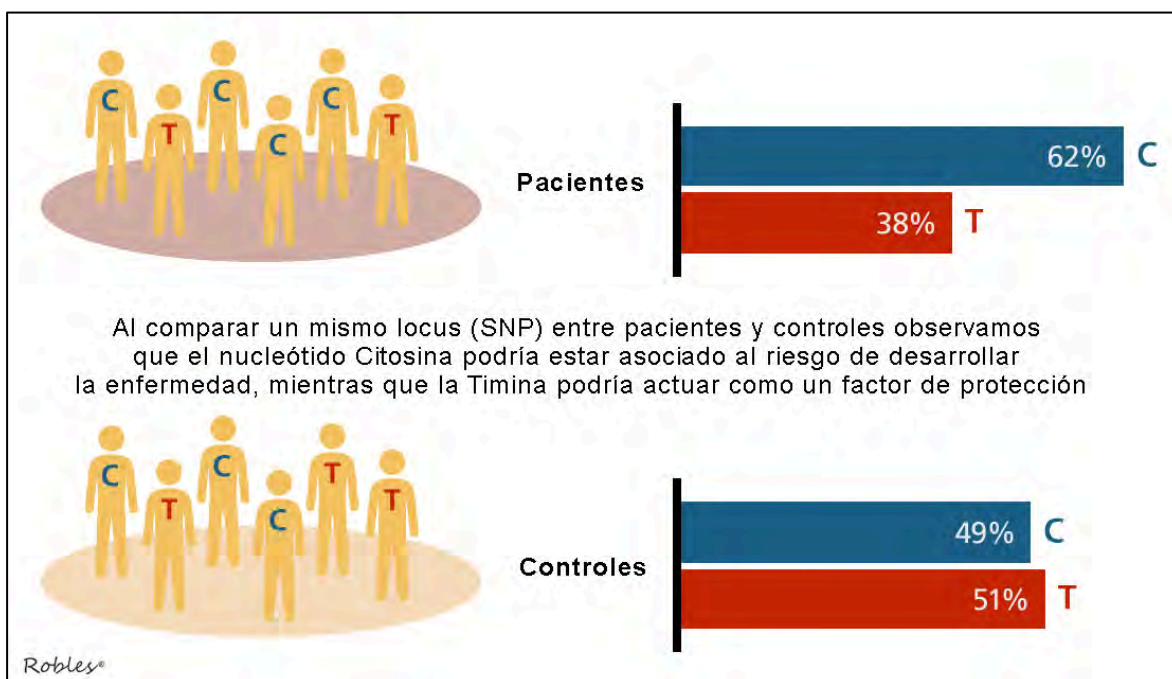
Posteriormente, un total de 11 estudios de ligamiento del genoma completo basados en microsatélites han sido llevados a cabo en pacientes con EM (Sawcer et al. 1996; Haines et al. 1996; Ebers et al. 1996; Kuokkanen et al. 1997; Broadley et al. 2001; Corradu et al. 2001; Akesson et al. 2002; Ban et al. 2002; Eraksoy et al. 2003; Hensiek et al. 2003; Kenealy et al. 2004). Estos estudios se han realizado en diferentes poblaciones (norteamericana, australiana, británica, canadiense, finlandesa, italiana, sarda, escandinava y turca), aplicando métodos estadísticos para valorar la asociación pero sin poderse demostrar un ligamiento inequívoco en términos de "*LOD score*". Un metaanálisis de todos estos estudios llevado a cabo en un total de 719 familias (GAMES and the TMSGC 2003) demostró ligamiento estadísticamente significativo para la región HLA en el cromosoma 6 (6p21) con un "*LOD score*" de 4, que apenas superaba el nivel de significación estadística antes mencionado (3 o más). Esto demuestra el limitado poder de los estudios de ligamiento con abordaje basado en microsatélites para las enfermedades complejas como la EM.

No fue hasta inicios del año 2004, cuando investigadores del Reino Unido, Estados Unidos, Escandinavia y Australia, como parte del Consorcio Genético Internacional para la Esclerosis Múltiple (IMSGC, por sus siglas en inglés de "*International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*") pusieron en común sus conocimientos y muestras provenientes de un total de 730 familias multiplex para llevar a cabo el que se considera como el "estudio de

ligamiento definitivo en EM” (IMSGC 2005). Para el abordaje genético se usaron microsatélites de alta densidad y, por primera vez, se utilizaron SNPs como marcadores genéticos en un estudio de ligamiento para EM (en total 4.506 SNPs). El “*LOD score*” alcanzado mediante este abordaje por SNPs en la región HLA (6p21) fue de 11,7 (casi el triple del observado en abordajes mediante microsatélites), poniendo de manifiesto el importante incremento del poder estadístico mediante este tipo de marcadores. Desafortunadamente, una vez más, ninguna otra región fuera de la región HLA mostró ligamiento estadísticamente significativo.

### 1.2.3.5. Estudios de asociación

Este tipo de aproximación consiste en comparar variaciones genéticas entre un grupo de pacientes y un grupo de controles sanos no emparentados pero del mismo grupo étnico (Figura 29).



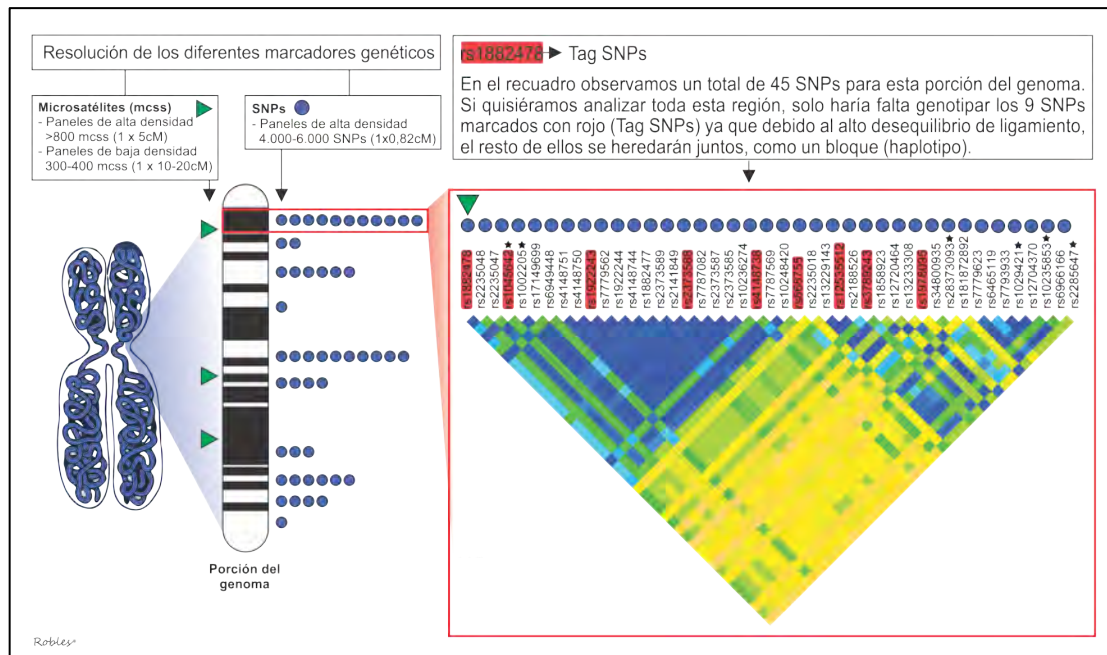
**Figura 29.** Esquema general de un estudio de asociación.

De esta forma, si ciertas variaciones son más frecuentes en los pacientes se dice que están “asociadas” con la enfermedad. Así, dichas variaciones pueden usarse como marcadores genéticos para localizar la región del genoma donde probablemente esté la causa de la enfermedad.

En el caso de los estudios de asociación, los marcadores genéticos utilizados son los SNPs, dadas las particulares ventajas de su análisis tal como ya se ha descrito previamente. Sin embargo, en la actualidad, por motivos técnicos y económicos es difícil y poco práctico genotipar los  $\approx 10$  millones de SNPs que representan la mayor parte de las variantes frecuentes observadas en el ser humano (Hirschhorn & Daly 2005) (Figura 11), por lo que el abordaje más adecuado es con los llamados “SNPs etiqueta” o “*Tag SNPs*” que son específicos y representativos de una zona con alto desequilibrio de ligamiento en que un grupo de SNPs se heredan siempre como un bloque o haplotipo de SNPs (Figura 30). De esta forma, el número de SNPs necesarios para capturar la mayor información genética se reduce a entre 250.000 y 1.000.000 (Sawcer 2006). Este catálogo de haplotipos constituye la base del “*HapMap Project*” (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) (The International HapMap Consortium 2003).

A diferencia de los estudios de ligamiento, los estudios de asociación tienen un mayor poder estadístico, una mayor resolución en sus resultados y no necesitan conocimiento previo sobre genes candidatos, por lo que pueden analizar amplias zonas del genoma sin necesidad de partir de una hipótesis previa o de un patrón de herencia conocido a priori.

Cuando estos estudios se aplican a gran escala, en diferentes poblaciones a nivel mundial y utilizando una batería de SNPs que proporciona cobertura a todo el genoma y no solo una región específica, se les llama **estudios de asociación del genoma completo** o GWAS (por sus siglas en inglés de “*Genome-Wide Association Studies*”).



**Figura 30.** Esquema representativo de los SNPs y “Tag SNPs” como parte de los estudios de asociación.

En este esquema observamos la distribución y cobertura de los SNPs. A diferencia de los microsatélites, los SNPs ofrecen una mayor cobertura del genoma y, por tanto, una mayor resolución a la hora de analizar una región de riesgo. Además, existen muchos SNPs que se tienden a heredar juntos debido al elevado desequilibrio de ligamiento existente entre ellos, en lo que se conoce como *haplotipo de SNPs*. Dentro de estos haplotipos existen SNPs representativos o “Tag SNPs” cuyo análisis agiliza mucho el abordaje mediante estudios de asociación, ya que reduce drásticamente el número de variantes a analizar.

Existen tres abordajes hipotéticos cuando se inicia un estudio de asociación (Figuras 13 y 31). El primero es la llamada hipótesis de la “**enfermedad común-variantes comunes**” donde variantes con una frecuencia alélica  $\geq 5\%$ , ejercerían solo un efecto leve en la susceptibilidad genética total (baja penetrancia) (Reich & Lander 2001; Pritchard & Cox 2002). El segundo es la llamada hipótesis de “**las múltiples variantes raras**” donde variantes con una frecuencia alélica  $< 5\%$ , ejercerían un importante efecto en la susceptibilidad a padecer la enfermedad (alta penetrancia) (Smith & Lusk 2002). Y por último, la hipótesis “**del gen candidato**” donde deducimos cuál sería el gen implicado en la patogénesis de la enfermedad en base a la información previa publicada, por lo que analizamos solo aquellas variantes en desequilibrio de ligamiento con dicho gen.

Estudios de asociación

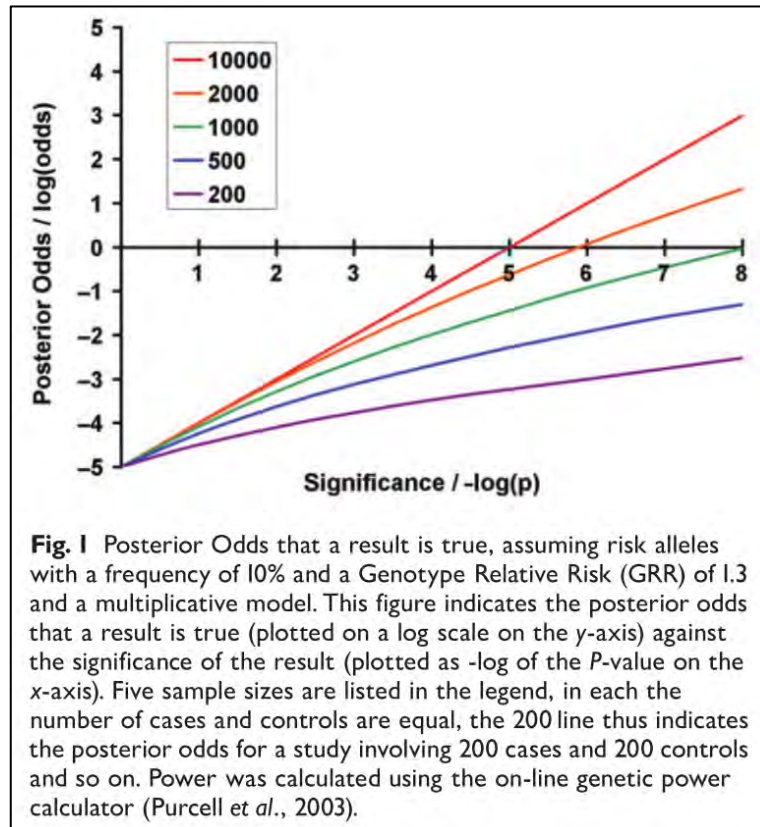
Hipótesis	Enfermedad común-variantes comunes	De las múltiples variantes raras	Del gen candidato
<b>Significado</b>	Muchas variantes con un efecto reducido por separado, producen cambios importantes cuando se juntan	Solo unas cuantas variantes raras producen cambios importantes	Variantes involucradas en la función de un gen, el cual se cree está involucrado en la patogénesis
<b>Poder</b>	Para explicar la heredabilidad se tendrían que identificar entre 20 y 100 variantes comunes con una OR de 1,2-1,5 c/u	???	Escogiendo un solo gen al azar, la probabilidad es extremadamente baja. Suelen ser resultados falsos positivos
<b>Muestra</b>	Unos 2.000 casos y 2.000 controles	Necesitan mayor cantidad de casos y controles	???
<b>Abordaje</b>	GWAS	Análisis de exómica Secuenciación genoma completo	Análisis de exómica Secuenciación genoma completo

*Robles*

**Figura 31.** Esquema representativo de los abordajes hipotéticos para la realización de un estudio de asociación.

Refiriéndonos a la EM, dadas las características de la población objeto de estudio (casos y controles), a las técnicas de genotipado actual (asociación mediante SNPs que incluyen variantes frecuentes y que son incapaces de detectar variantes con frecuencias alélicas bajas), a nuestro conocimiento incompleto sobre la patogénesis de la enfermedad que nos impide proponer genes candidatos y a los requerimientos estadísticos necesarios para llevar a cabo un estudio de asociación, la hipótesis de la “enfermedad común-variantes comunes” es la que ha sido, desde un principio, la base racional para el desarrollo de los GWAS. Tomando en cuenta esta hipótesis y aplicando el llamado Teorema de Bayes (Bayes & Price 1763) se ha estimado que, para explicar la prevalencia y la heredabilidad de la EM, se necesita identificar al menos entre 20 y 100 variantes comunes, cada una de ellas confiriendo un riesgo relativo de entre 1,2 y 1,5 (Risch & Merikangas 1996; Purcell et al. 2003; WTCCC 2007; Sawcer 2008).

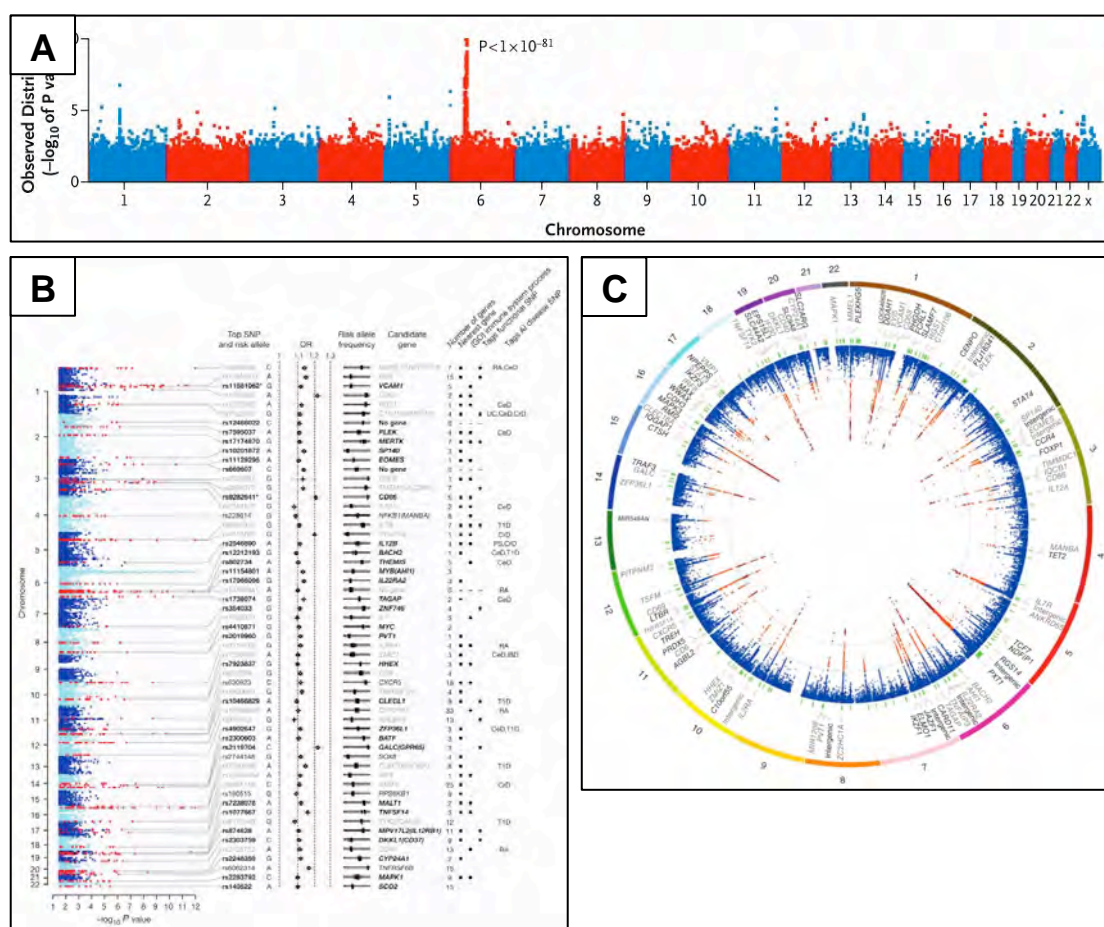
Por lo tanto, según este cálculo, para observar diferencias estadísticamente significativas, un GWAS necesita como mínimo 2.000 pacientes y 2.000 controles (Purcell et al. 2003) (Figura 32).



**Figura 32.** Tamaños muestrales requeridos para observar una diferencia estadísticamente significativa en los GWAS según el Teorema de Bayes (Sawcer 2008).

Para representar los resultados de este tipo de estudios, se utiliza una gráfica de dispersión llamada “gráfica de Manhattan” donde cada punto representa un SNP aislado distribuido a lo largo de los cromosomas y cuyo alelo de riesgo se encuentra en mayor proporción en los pacientes que en los controles. La fuerza de asociación se expresa mediante el logaritmo negativo del valor de  $P$ . Cuanto más alto se ubique el punto o SNP, mayor será su fuerza de asociación, que debe ser menor de  $5 \times 10^{-7}$  para asegurar que el valor observado sea real (WTCCC 2007). El riesgo relativo de desarrollar la enfermedad se expresa como una odd ratio (OR) seguida de su respectivo intervalo de confianza al 95%. La representación de la gráfica de Manhattan

puede ser horizontal (con los cromosomas distribuidos en el eje de las X y la fuerza de asociación en el eje de las Y) o vertical (con los cromosomas distribuidos en el eje de las Y y la fuerza de asociación en el eje de las X). Otra forma de representar la información es mediante la llamada “gráfica Circos” que consiste en una distribución circular de los SNPs, donde los cromosomas se disponen en la región más periférica de la gráfica y los SNPs con su fuerza de asociación hacia el interior de la misma (Figura 33).



**Figura 33.** Diferentes formas de representar los estudios de asociación: “gráfica de Manhattan” horizontal (A) y vertical (B), y la “gráfica Circos” (C).

A pesar de la utilidad anteriormente mencionada, los GWAS presentan dos inconvenientes principales: la necesidad de un gran tamaño muestral para poder detectar variantes con un suficiente poder estadístico y la baja sensibilidad a la hora de detectar variantes raras (aquellas con una frecuencia alélica <5%).



## 1.2.4. Genes candidatos en EM

### 1.2.4.1. El MHC y la región HLA

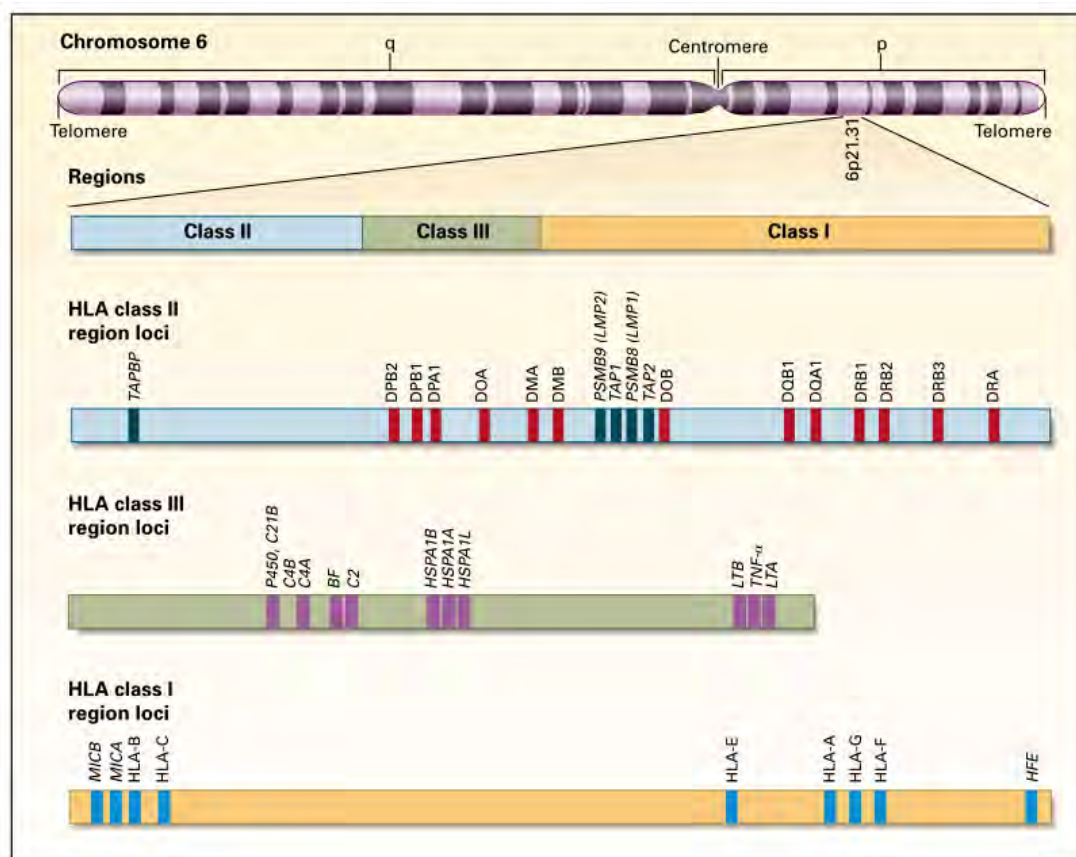
El MHC consiste en un denso grupo de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21) encargados de codificar numerosas proteínas de superficie fundamentalmente de las células responsables de la regulación del sistema inmune en los humanos.

El MHC fue completamente secuenciado en 1999 (The MHC sequencing consortium 1999) y está compuesto por 224 genes, de los que un 40% expresan moléculas relacionadas con la función inmune.

Un conjunto de estos genes corresponden a la **región HLA** (“*Human Leukocyte Antigen*”), una zona altamente polimórfica con más de 10.000 alelos y cuya función fue inicialmente atribuida a la respuesta inmune involucrada en el rechazo de trasplantes, pero que ahora se sabe que está relacionada con más de 100 enfermedades, incluidas infecciones, enfermedades autoinmunes y cáncer (Hollenbach & Oksenberg 2015).

Según la función de los genes que codifica, la región HLA se divide en:

- a) **HLA de clase I**, que comprende 3 grandes grupos de genes: *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*, que a su vez codifican proteínas que intervienen en la presentación de antígenos intracelulares a los linfocitos T CD8+.
- b) **HLA de clase II**, que comprende 6 grandes grupos de genes: *HLA-DP*, *HLA-DM*, *HLA-DOA*, *HLA-DOB*, *HLA-DQ* y *HLA-DR*, que a su vez codifican proteínas que intervienen en la presentación de antígenos extracelulares a los linfocitos T CD4+.
- c) **HLA de clase III**, que contiene genes encargados de codificar el sistema de complemento y el factor de necrosis tumoral. A diferencia de las moléculas de clase I y II, éstas no intervienen en la presentación de antígenos (Klein & Sato 2000) (Figura 34).



**Figura 34.** La región HLA y los diferentes grupos de genes que la conforman (Klein & Sato 2000).

Existen dos características que, a nivel genético, diferencian la región HLA del resto del genoma: 1) la presencia de una gran cantidad de polimorfismos con hasta >10.000 alelos diferentes (Horton et al. 2004) y 2) un altísimo desequilibrio de ligamiento (Klein & Sato 2000) que hace que dichos alelos tiendan a heredarse juntos o en bloques (haplotipos), debido a la baja tasa de recombinación que depende de la población estudiada (Figura 27). Estas dos características hacen de la región HLA una diana genéticamente muy compleja y, por tanto, muy difícil de analizar en busca de genes de susceptibilidad.

#### 1.2.4.1.1. La región HLA y la EM en población caucásica

Las primeras asociaciones entre la región HLA y la EM fueron descritas en 1972 por Naito y colaboradores (Naito et al. 1972) quienes observaron asociación para *HLA-A3* (un alelo HLA de clase I) y por Jersild y

colaboradores (Jersild et al. 1972) quienes observaron asociación para *HLA-B7* (también alelo HLA de clase I). Estos estudios se basaron en análisis serológicos usando la técnica de microlinfocitotoxicidad descrita por Terasaki y Rich (Terasaki & Rich 1964).

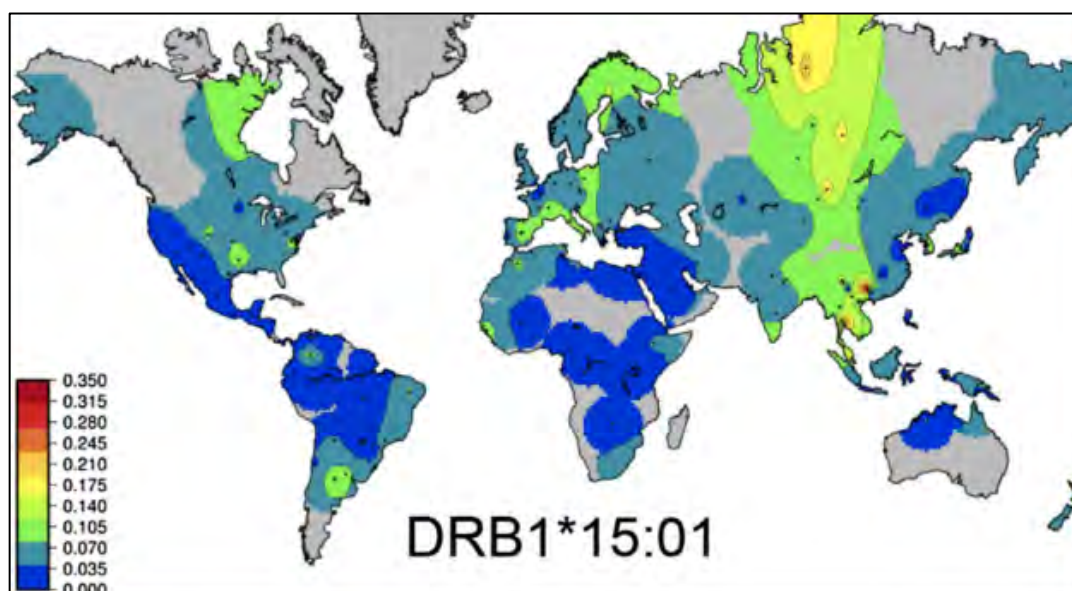
Posteriormente a estos primeros estudios serológicos, en 1984 Cohen y colaboradores (Cohen et al. 1984) usaron RFLP para llevar a cabo el que está considerado como primer estudio genético-molecular en pacientes con EM describiendo asociación para *HLA-DR2* (un alelo HLA de clase II).

La aparente incongruencia en cuanto a las asociaciones descritas (alelos HLA de clase I y II) fue posteriormente resuelta al demostrarse que estos resultados estaban relacionados entre sí ya que los alelos implicados se heredaban como parte de un solo bloque o haplotipo, debido al alto desequilibrio de ligamiento de la región. Así, la asociación con *HLA-A3* observada por Naito en 1972 era secundaria a *HLA-B7*, descrita por Jersild en el mismo año. Este último a su vez formaba parte de dos alelos de clase II: el *HLA-DR2* (Cohen et al. 1984) y el *HLA-DQw6* (Heard et al. 1989; Olerup et al. 1987; Vartdal et al. 1989). De este modo, en 1976 tanto Compston (Compston et al. 1976) como Terasaki (Terasaki & Mickey 1976) establecieron que la asociación observada era en realidad producto de alelos codificados por la región HLA de clase II.

Durante los años siguientes se realizó una reclasificación de la nomenclatura, según la cual *HLA-DR2* pasó a denominarse *HLA-DR15* (Olerup & Hillert 1991). Asimismo se refinaron los estudios genéticos intentando analizar con más detalle la región HLA con el objetivo de confirmar el alelo de riesgo o buscar nuevas asociaciones. No obstante, se trataba de estudios con pocos individuos y con un poder estadístico relativamente bajo (Hillert & Olerup 1993).

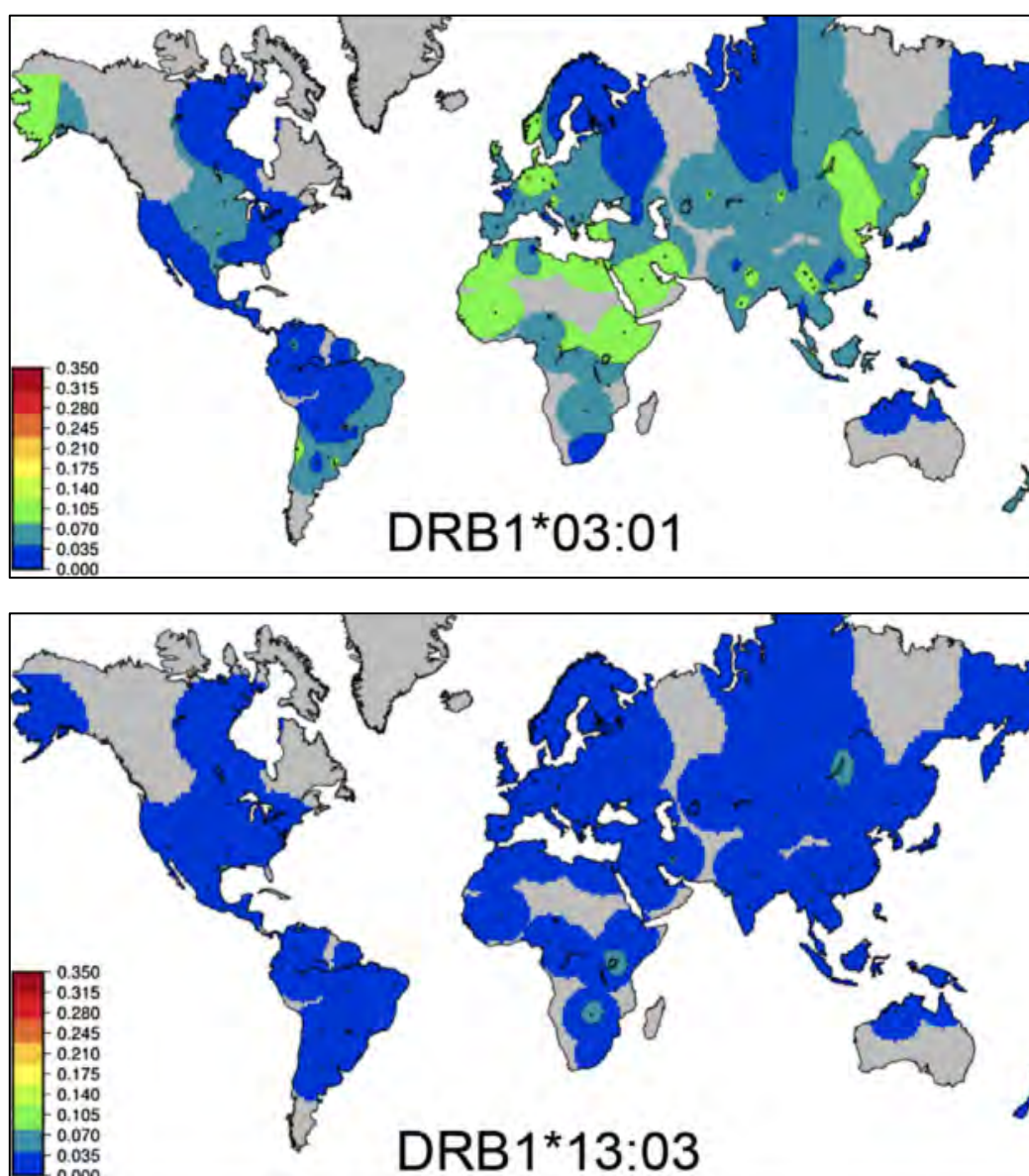
No fue hasta 1996 cuando se publican tres grandes estudios sistemáticos de ligamiento genético (Ebers et al. 1996; Haines et al. 1996; Sawcer et al. 1996) con un gran número de familias multiplex y usando microsatélites como marcadores genéticos. Estos estudios concluyeron que el alelo *HLA-DR15*,

en el brazo corto del cromosoma 6, era el locus con mayor asociación genética a la enfermedad (Haines et al. 1998). A su vez, dentro de esta misma región, el haplotipo *DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02* resultó ser el más frecuentemente observado en poblaciones caucásicas europeas y norteamericanas con EM (Olerup & Hillert 1991). Sin embargo, el gran desequilibrio de ligamiento dentro del haplotipo hacía muy difícil discernir cuál de los alelos (*DRB1\*15:01*, *DQA1\*01:02* o *DQB1\*06:02*) era el responsable de la asociación observada. Fue entonces cuando en el 2004, Oksenberg y colaboradores (Oksenberg et al. 2004), estudiando una amplia cohorte de pacientes afroamericanos en quienes el menor desequilibrio de ligamiento incrementa la probabilidad de encontrar diferencias significativas, proporcionaron la primera evidencia convincente de que la asociación primaria era para el alelo ***HLA-DRB1\*15:01*** y que la asociación observada con los otros dos alelos de este haplotipo era en realidad secundaria al desequilibrio de ligamiento con *DRB1\*15:01* (IMSGC & WTCCC2 2011; Patsopoulos et al. 2013). Este hallazgo se ha confirmado en posteriores estudios de grandes cohortes de origen europeo (Yeo et al. 2007) y en prácticamente todas las poblaciones analizadas (Compston 2006) (Figura 35).



**Figura 35.** Distribución de las frecuencias mundiales de *HLA-DRB1\*15:01* en los pacientes con EM (Hollenbach & Oksenberg 2015).

Otros análisis condicionales en población caucásica (Yeo et al. 2007; Marrosu et al. 2001; Dymont et al. 2005; Barcellos et al. 2006; Lincoln et al. 2009; Field et al. 2010; IMSGC & WTCCC2 2011; Patsopoulos et al. 2013; Hollenbach & Oksenberg 2015; IMSGC 2015) también han confirmado la relevancia de los alelos ***HLA-DRB1\*03:01***, que fue inicialmente descrito en una cohorte de Cerdeña (Marrosu et al. 1997) y ***HLA-DRB1\*13:03***, inicialmente descrito en población judía (Kwon et al. 1999; Karni et al. 1999) (Figura 36).

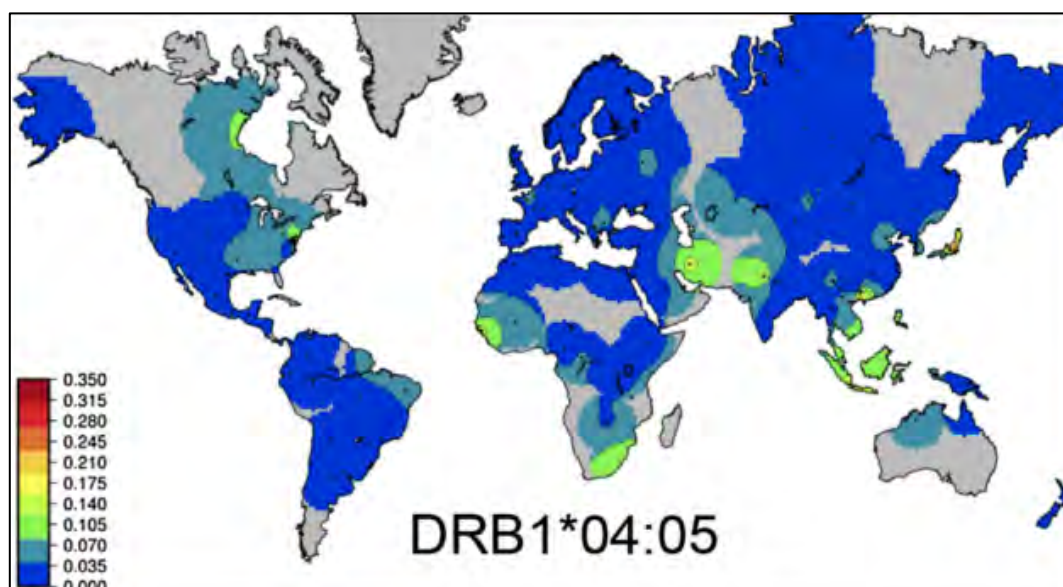


**Figura 36.** Distribución de las frecuencias mundiales de *HLA-DRB1\*03:01* y *HLA-DRB1\*13:03* en los pacientes con EM (Hollenbach & Oksenberg 2015).

#### 1.2.4.1.2. Otros alelos HLA en poblaciones no caucásicas

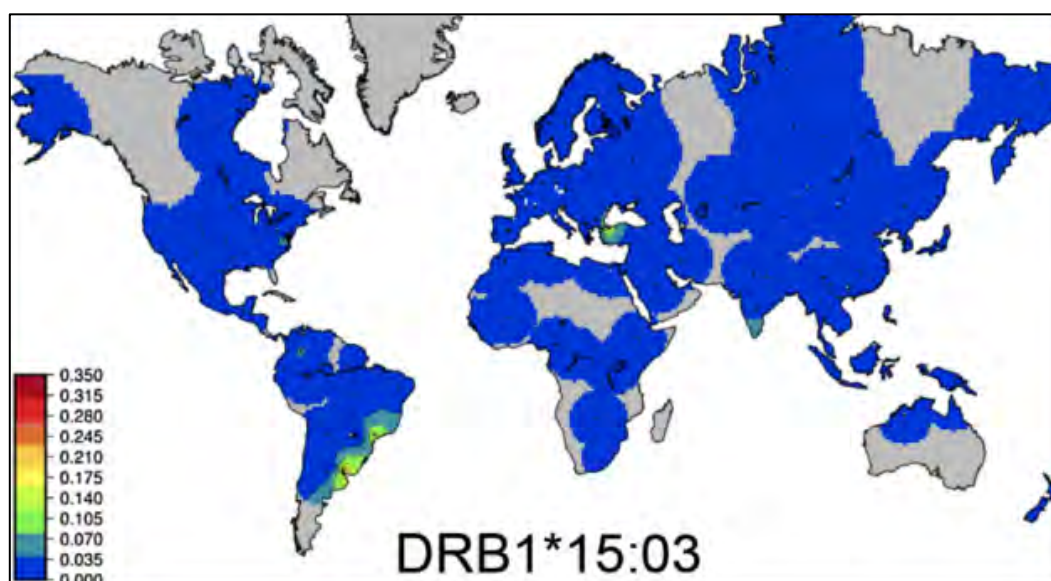
Aunque *HLA-DRB1\*15:01* es el alelo de riesgo más frecuentemente observado en población de origen caucásico, este mismo hallazgo no se observa en otras poblaciones donde se han descrito otros alelos HLA (Alcina et al. 2012; Hollenbach & Oksenberg 2015). A continuación, se realiza una breve descripción de estos otros alelos de riesgo.

El alelo ***HLA-DRB1\*04:05*** se ha asociado a un aumento de riesgo de desarrollar EM en Japón, especialmente de las formas clínicas opticoespinales (Yoshimura et al. 2012), en Cerdeña (Marrosu et al. 1992; Marrosu et al. 1998; Marrosu et al. 2001; Brassat et al. 2005), en Sicilia (Brassat et al. 2005) y en población afroamericana (Isobe et al. 2013) (Figura 37).



**Figura 37.** Distribución de las frecuencias mundiales de *HLA-DRB1\*04:05* en los pacientes con EM (Hollenbach & Oksenberg 2015).

El alelo **HLA-DRB1\*15:03** se ha asociado a un aumento de riesgo de desarrollar EM especialmente en población afroamericana (Oksenberg et al. 2004), pero también en cohortes descritas en Irán (Amirzargar et al. 1998), Brasil (Brum et al. 2007) y la isla de Martinica (Quelvennec et al. 2003) (Figura 38).



**Figura 38.** Distribución de las frecuencias mundiales de **HLA-DRB1\*15:03** en los pacientes con EM (Hollenbach & Oksenberg 2015).

Otras asociaciones descritas a nivel mundial pero con menor poder estadístico han sido **HLA-DQB1\*06:02** en pacientes afrobrasileños (Caballero et al. 1999), **HLA-B12** en pacientes hindúes (Wadia et al. 1980), **HLA-DR4** en pacientes jordanos (Kurdi et al. 1977), japoneses (Naito et al. 1978) y mexicanos (Gorodezky et al. 1986), y **HLA-Dw3** en poblaciones sicilianas y maltesas (Elian et al. 1987).

En España, Uria (Uria 2000) observó asociación con el haplotipo **HLA-DR15/DQ6** en una cohorte de pacientes con EM. Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2004) llevaron a cabo un estudio en una cohorte de

pacientes con EM provenientes de la provincia de Málaga y observaron una asociación significativa para el desarrollo de EM con el alelo ***HLA-DQB1\*06:02***, sin observarse asociación con *HLA-DR4*. Posteriormente, el mismo autor y colaboradores (Fernández et al. 2008) llevaron a cabo un estudio en una cohorte de pacientes con EM de origen gitano observando una asociación significativa con el haplotipo ***HLA-DRB1\*15:01-DQB1\*06:02*** que dependía fundamentalmente del alelo ***HLA-DQB1\*06:02***, tal como lo habían demostrado en los pacientes con EM de la misma región en el año 2004 (Fernández et al. 2004). En el año 2009, este mismo autor y colaboradores (Fernández et al. 2009) analizaron la región HLA de clase II en una cohorte de pacientes con EM provenientes de la provincia de Vizcaya (País Vasco) y observaron una asociación significativa para desarrollar EM con tres haplotipos distintos: ***DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02***, ***DRB1\*04:02-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*** y ***HLA-DRB1\*013-DQA1\*05-DQB1\*03:01***. Por último, Romero-Pinel y colaboradores (Romero-Pinel et al. 2010) describieron fenómenos epistáticos relacionados con una mayor severidad de la enfermedad en una cohorte de pacientes españoles. Dichas interacciones se daban en el haplotipo *HLA-DRB1*, especialmente con el alelo ***HLA-DRB1\*08***.

#### 1.2.4.1.3. Fenómenos epistáticos en la región HLA

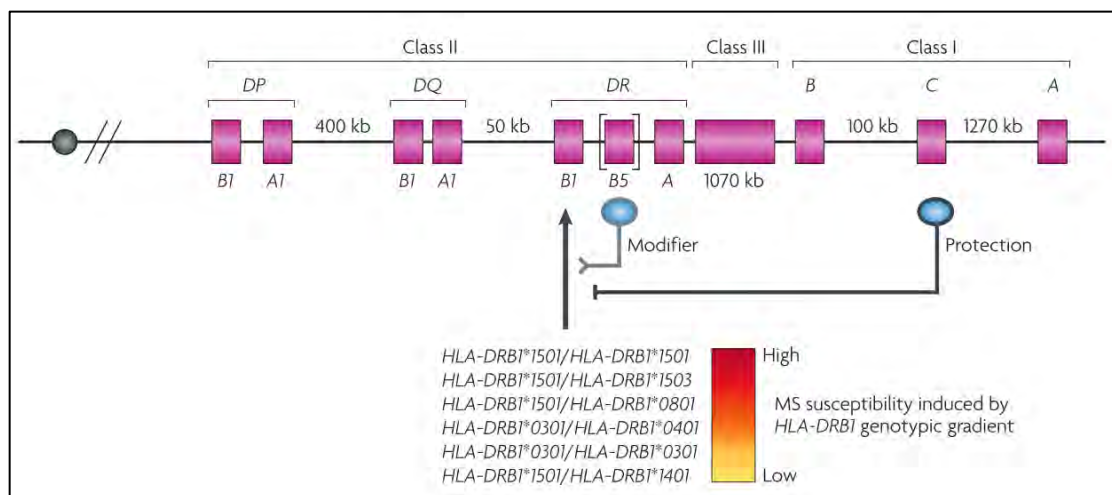
La expresión fenotípica de ciertas enfermedades puede estar regulada por dos o más genes, de tal manera que la interacción con unos puede aumentar el riesgo a padecerla mientras que la interacción con otros puede actuar como factor protector para su desarrollo, es lo que se conoce como ***fenómenos epistáticos*** o ***interacciones gen-gen*** y su papel en la EM es un hecho conocido desde hace años (Marrosu et al. 1998).

Dentro de la región HLA en pacientes con EM, se propone que existirían tres tipos de interacciones: **1) *Epistasia dominante negativa***, efecto protector importante de unos alelos HLA sobre otros que aumentan la susceptibilidad; **2) *Epistasia sinérgica***, un alelo por sí solo produce un efecto menor sobre la susceptibilidad que se incrementa considerablemente cuando se expresa conjuntamente con otros; y **3) *Epistasia modificadora del fenotipo***, algunos



alelos HLA pueden reducir el número de células T CD4+ reduciendo la severidad de la reacción inmune (Dyment et al. 2005; Ramagopalan & Ebers 2009).

De esta forma, se sabe que el riesgo asociado a *HLA-DRB1\*15:01* puede variar dependiendo de si el paciente es portador o no en heterocigosis de éste y otros alelos (Dyment et al. 2005; Barcellos et al. 2006; Ramagopalan, Morris, et al. 2007) pudiendo establecerse un gradiente de riesgo para el locus *HLA-DRB1*. Así, la mayor susceptibilidad sería para aquellos pacientes homocigotos para *HLA-DRB1\*15:01*, mientras que la menor sería para aquellos que, aún siendo heterocigotos para este alelo, son portadores en heterocigosis de *HLA-DRB1\*14:01* (Oksenberg et al. 2008) (Figura 39).



**Figura 39.** Fenómenos epistáticos para el locus *HLA-DRB1* en pacientes con EM (Oksenberg et al. 2008).

Por otro lado, si nos referimos a **alelos protectores**, solo dos han demostrado clara asociación estadística en grandes estudios. El alelo de clase II antes mencionado, ***HLA-DRB1\*14:01*** (Dyment et al. 2005; Barcellos et al. 2006; Ramagopalan, Anderson, et al. 2007; Oksenberg et al. 2008) y el alelo de clase I, ***HLA-A\*02:01*** (Rubio et al. 2002; Harbo et al. 2004; Yeo et al. 2007; De Jager, Jia, et al. 2009; IMSGC & WTCCC2 2011; Patsopoulos et al. 2013). Sin embargo, otros alelos HLA tanto de clase II como *HLA-DRB1\*11*

(Kaimen-Maciel et al. 2009; Ramagopalan, Morris, et al. 2007) y *HLA-DRB1\*13* (Laaksonen et al. 2002; Lincoln et al. 2009), como de clase I como *HLA-B\*44* (Rioux et al. 2009; Harbo et al. 2013) y *HLA-C\*05* (Yeo et al. 2007) también han demostrado, en estudios aislados, un efecto protector contra la enfermedad.

#### 1.2.4.1.4. Conclusiones referentes a los genes HLA y EM

En relación a la región HLA con la EM, a modo de síntesis, se puede concluir que:

- En población caucásica europea, el alelo con mayor asociación genética a EM es ***HLA-DRB1\*15:01*** (OR: 3,1) dentro del MHC en el brazo corto del cromosoma 6. Es una zona altamente polimórfica y con un elevado desequilibrio de ligamiento. A pesar de los grandes esfuerzos realizados hasta ahora, ha sido extremadamente difícil establecer la presencia de un nuevo locus de susceptibilidad adicional con suficiente significación estadística. No obstante, ***HLA-DRB1\*03:01*** (OR: 1,26) y ***HLA-DRB1\*13:03*** (OR: 2,4) también se han establecido como alelos de riesgo para este grupo poblacional, aunque se han visto expresados predominantemente en población sarda y judía.
- El alelo ***HLA-DRB1\*15:01*** justifica un 10,5% de toda la heredabilidad de la enfermedad.
- El alelo ***HLA-DRB1\*15:01*** se encuentra presente en el 70% de los pacientes con EM y en el 40% de sujetos sin la enfermedad.
- Los únicos dos alelos que han demostrado comportarse de forma significativa como protectores para el desarrollo de la enfermedad son ***HLA-DRB1\*14:01*** y ***HLA-A\*02:01***.
- Aunque en población española los resultados no son concluyentes debido a los pocos estudios publicados hasta la fecha, la mayor asociación se ha descrito para el alelo ***HLA-DQB1\*0602*** y para los haplotipos ***DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02***, ***DRB1\*04:02-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*** y ***HLA-DRB1\*013-DQA1\*05-DQB1\*03:01***.

### 1.2.4.2. Genes de susceptibilidad no HLA

Tras la publicación en el 2003 del gran metaanálisis que incluyó todos los estudios de ligamiento realizados hasta ese momento con un total de 719 familias (GAMES and the TMSGC 2003) se forma el IMSGC con investigadores provenientes del Reino Unido, Estados Unidos, Escandinavia y Australia. Actualmente, este consorcio está compuesto por más de 20 grupos estratégicos de investigación alrededor del mundo (Figura 40) y su principal objetivo es encontrar nuevas variantes genéticas no descritas hasta el momento que confieran susceptibilidad a padecer la enfermedad. Para ello se recogen un gran número de muestras de ADN (generalmente más de 500 por grupo) que permitan facilitar la realización de estudios genéticos a gran escala, específicamente GWAS. Hasta el momento, este consorcio se ha convertido en la principal fuente de conocimiento científico referente a grandes estudios de asociación en EM. ([http://eaglep.case.edu/imsgc\\_web/](http://eaglep.case.edu/imsgc_web/)).



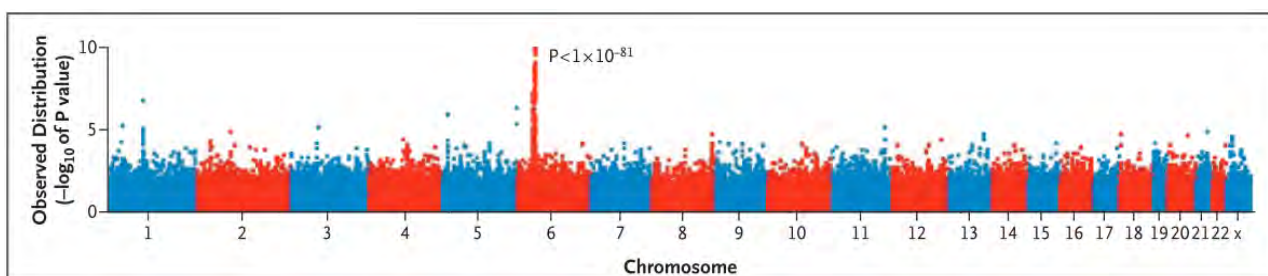
**Figura 40.** Grupos miembros del IMSGC.

Inicialmente, teniendo en cuenta todos los datos disponibles de los estudios de ligamiento realizados hasta ese momento, el consorcio identificó una serie de factores que podrían disminuir el poder de detección de variantes genéticas de riesgo (IMSGC 2004). Así, por ejemplo, en uno de los estudios sistemáticos de ligamiento llevados a cabo en 1996 en el Reino Unido (Sawcer et al. 1996), el marcador D3S11 se mapeó en el cromosoma 3, cuando actualmente se sabe que este marcador en realidad yace en el cromosoma 2. Se ha calculado que una tasa de errores de este tipo, tan baja como del 1%, puede suponer una reducción en el “*LOD score*” de hasta un 50% (Abecasis et al. 2001). En un intento por corregir estas carencias, este mismo grupo volvió a analizar el genoma de 5 de las familias inicialmente incluidas en el estudio de 1996 (Sawcer et al. 1996) con un total de 20 individuos, esta vez usando un panel de alta densidad de microsatélites (811 microsatélites distribuidos 1 por cada 5 cM) comparados con dos paneles de genotipado por SNPs de diferentes casas comerciales uno con 4.937 SNPs (Illumina®) y otro con 11.560 SNPs (Affymetrix®). Los resultados demostraron que el análisis con paneles de alta densidad de marcadores con SNPs mejoraba considerablemente la adquisición de resultados (IMSGC 2004).

Aplicando estos conocimientos, el mismo grupo en el 2005 (IMSGC 2005) realizó el que se considera como el “estudio de ligamiento definitivo en EM” alcanzando un “*LOD score*” para la región HLA de casi el triple (11,7) al observado en abordajes mediante microsatélites, poniendo de manifiesto el importante incremento del poder estadístico mediante este tipo de marcadores (Figura 30). Este trabajo puso de manifiesto que los estudios de ligamiento en EM carecen del suficiente poder estadístico para detectar variantes de susceptibilidad fuera de la región HLA, por lo que se hacía necesario el uso de paneles con marcadores más sensibles y distribuidos de forma más densa a lo largo del genoma. Asimismo, se propuso por primera vez un cambio de perspectiva hacia el abordaje genético de la enfermedad basado en métodos de asociación donde grandes cohortes de pacientes sean comparadas con grandes cohortes de controles esta vez no emparentados. Así nacieron los GWAS.

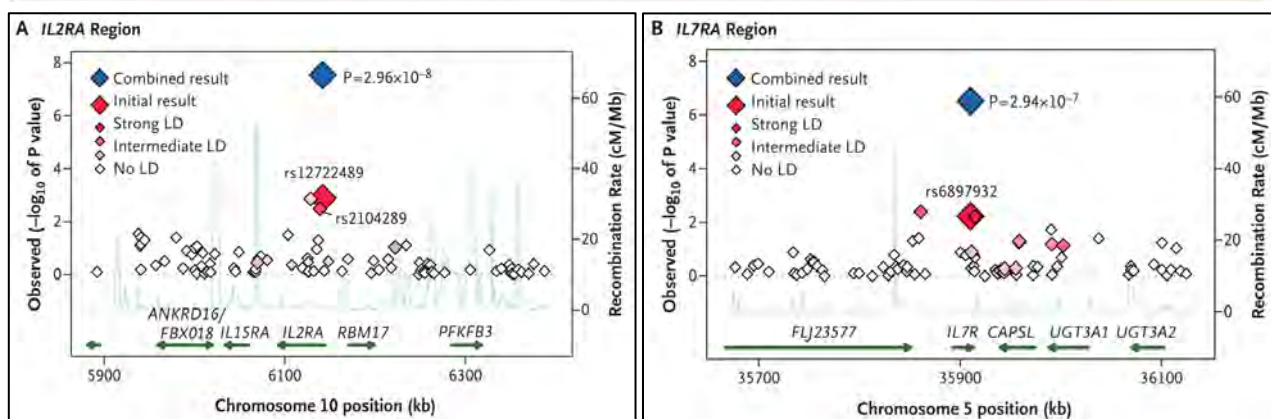
### 1.2.4.2.1. Resultados de los principales GWAS en EM

El primer GWAS en EM fue publicado en el 2007 por el IMSGC (IMSGC 2007). En este estudio se compararon 931 tríos familiares; es decir 931 casos y sus dos padres como controles con un total de 334.923 SNPs analizados. Los resultados de este estudio confirmaron la mayor fuerza de asociación para el locus **HLA-DR** (rs3135388\*A; OR: 1,99 [1,84-2,15]) localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21), pero además por primera vez en la historia, se identifican 2 nuevos locus no HLA de susceptibilidad que alcanzaban la significación estadística (Figura 41).



**Figure 2.** Overview of the Primary Genomewide Association Scan Involving 931 Family Trios.

P values (shown as  $-\log_{10}$  values) for results of transmission disequilibrium testing are plotted across the genome. The classic HLA-DR risk locus on chromosome 6p21 stands out with strong statistical significance ( $P < 1 \times 10^{-81}$ ).



**Figura 41.** Los dos primeros locus no HLA de susceptibilidad para la EM descritos en el primer GWAS (IMSGC 2007).

El primer locus (rs2104286\*T; OR: 1,19 [1,11-1,26]) se relacionaba con el gen **IL2RA** –“Interleukin 2 Receptor-Alpha”– (OMIM: 147730) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 10 (10p15) y que codifica la cadena alfa del receptor de la interleucina-2 (conocida también como CD25). Dicha molécula

se expresa en la superficie de membrana de los linfocitos T, linfocitos B, células “*natural killer*” (NK), monocitos y macrófagos (Okamura et al. 2009). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la diabetes mellitus tipo 1 (Vella et al. 2005), la enfermedad de Graves (Brand et al. 2007), la artritis reumatoide (Michels-van Amelsfort et al. 2011; Knevel et al. 2013; Ruysse-Witrand et al. 2014) y la enfermedad inflamatoria intestinal (IMSGC 2013a). Además, el daclizumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD25, ha demostrado, en ensayos clínicos, su eficacia en el tratamiento de pacientes con EMRR (Rose et al. 2004; Bielekova et al. 2004; Craddock & Markovic-Plese 2015).

El segundo locus (rs6897932\*C; OR: 1,18 [1,11-1,26]) se relacionaba con el gen ***IL7RA*** –“*Interleukin 7 Receptor-Alpha*”– (OMIM: 146661) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 5 (5p13) y que codifica el dominio transmembrana de la cadena alfa del receptor de la interleucina-7 (conocido también como CD127). Dicha molécula se expresa en la superficie de membrana de los linfocitos T, linfocitos pre-B y células dendríticas (McElroy et al. 2009). Su papel podría ser el de regular la homeostasis de las células T de memoria y también jugar un papel en la generación de células T autoreactivas en pacientes con EM (Bielekova et al. 1999). Además, la interleucina-7 es crucial para el desarrollo de las células T gamma y delta (He & Malek 1996) que son unas de las primeras células T observadas en las lesiones inflamatorias de pacientes con EM (Wucherpfennig et al. 1992). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la diabetes mellitus tipo 1 (Santiago et al. 2008; Evangelou et al. 2014; Lee et al. 2015) y para la cirrosis biliar primaria (IMSGC 2013a).

La asociación tanto de *IL2RA* como de *IL7RA* con la EM también ha sido observada y confirmada en otros estudios posteriores (Lundmark, Duvefelt, Iacobaeus, et al. 2007; Gregory et al. 2007; Weber et al. 2008; Rubio et al. 2008; IMSGC 2013a; Hartmann et al. 2014; Traboulsee et al. 2014; Čierny et al. 2015).

En este primer GMAS también fueron descritos, aunque sin llegar a alcanzar la suficiente significación estadística, otros 3 locus no HLA de susceptibilidad

asociados a la enfermedad. El primero (rs2300747\*A; OR: 0,82 [0,75-0,89]) se relacionaba con el gen **CD58** –“*CD58 Molecule*”– (OMIM: 153420) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p13) y que codifica una proteína miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Dicha proteína actúa como ligando de la proteína CD2 del linfocito T y su función está relacionada con la adhesión y activación de dichos linfocitos (Ikemizu et al. 1999). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (Rubio et al. 2008; De Jager, Baecher-Allan, et al. 2009; Hoppenbrouwers et al. 2009; IMSGC 2013a; Torbati et al. 2015; Hecker et al. 2015). El segundo (rs10735781\*G; OR: 1,11 [1,05-1,18]) se relacionaba con el gen **EVI5** –“*Ecotropic Viral Integration Site 5*”– (OMIM: 602942) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p22). Su función se ha relacionado con la regulación del ciclo celular por medio de la estabilización de la proteína FBXO5 (proteína que actúa inhibiendo la anafase) y promoviendo la acumulación de ciclina-A (proteína fundamental para el progreso de la fase S) durante la interfase (Faitar et al. 2005). Este gen se ha relacionado con la susceptibilidad a padecer neuroblastoma (OMIM: 256700) (Roberts et al. 1998). De la misma forma, la asociación de este locus con la EM también ha sido replicada y confirmada en otros estudios (Hoppenbrouwers et al. 2008; ANZgene 2009; Alcina, Fernández, et al. 2010; Mowry et al. 2013; IMSGC & WTCCC2 2011; IMSGC 2013a). El tercero (rs2587156\*G; OR: 0,81 [0,75-0,89]) se relacionaba con el gen **IL7** –“*Interleukin 7*”– (OMIM: 146660) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 8 (8q21) y que codifica la citosina del mismo nombre, que es fundamental para el desarrollo de linfocitos T CD8+ (O'Connor et al. 2010). En caso de unirse al factor de crecimiento del hepatocito, actúa como un factor de estimulación del crecimiento de los linfocitos pre-pro-B (Lai & Goldschneider 2001). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios posteriores (Lundmark, Duvefelt & Hillert 2007; IMSGC 2013a; Ghavimi et al. 2014; Zuvich et al. 2010).

Durante el mismo año 2007, el “*Wellcome Trust Case Control Consortium*” (WTCCC por sus siglas del inglés) (WTCCC 2007) publica los resultados de su GWAS realizado en 975 pacientes no emparentados con EM y 1.466 controles con un total de 12.374 SNPs analizados (solo utilizó SNPs no

sinónimos para su análisis). Los resultados de este estudio referentes a genes no-HLA, corroboraban la implicación del gen *IL7RA* en la susceptibilidad para la enfermedad pero también la de dos nuevos locus no HLA de susceptibilidad. El primero (rs34536443\*G; OR: 1,32 [1,17-1,47]) se relacionaba con el gen **TYK2** –“Tyrosine Kinase 2”– (OMIM: 176941) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13) y que probablemente esté involucrado en la transducción de señales intracelulares interviniendo en la inmunidad antiviral (Firmbach-Kraft et al. 1990). Posteriormente estos resultados fueron validados en otros estudios (Ban et al. 2009; Couturier et al. 2011; Dymant et al. 2012; IMSGC 2013a; Mero et al. 2010). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la diabetes mellitus tipo 1 (Marroqui et al. 2015; Izumi et al. 2015), la cirrosis biliar primaria, la psoriasis y la artritis reumatoide (IMSGC 2013a). El segundo (rs12708716\*A; OR: 1,19 [0,97-1,45]) se relacionaba con el gen **KIAA0350** o **CLEC16A** –“C-Type Lectin Domain Family 16, Member A”– (OMIM: 611303) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13) y que probablemente actúe regulando la mitofagia, un proceso mediante el cual las mitocondrias son removidas antes de la muerte celular (Nakajima et al. 2002). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (Rubio et al. 2008; Zoledziwska et al. 2009; Hoppenbrouwers et al. 2009; Berge et al. 2013; IMSGC 2013a; Van-Luijn et al. 2015; Leikfoss et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la diabetes mellitus tipo 1 (Todd et al. 2007; IMSGC 2009; Soleimanpour et al. 2014) y la cirrosis biliar primaria (IMSGC 2013a).

Comabella y colaboradores (Comabella et al. 2008) publicaron, en 2008, los resultados de su GWAS llevado a cabo en 242 pacientes no emparentados y 242 controles con un total de 428.867 SNPs analizados. Los resultados de este estudio referente a genes HLA, confirmaron la mayor fuerza de asociación para el locus **HLA-DR** (rs3129934\*T; OR: 3,0 [1,8-5,0] en el cromosoma 6 pero además se identificó un nuevo locus no HLA de susceptibilidad (rs1327328\*T; OR: 1,9 [1,3-2,9]) en el brazo largo del cromosoma 13 (13q31) sin poderse identificar el gen asociado, dado el alto grado de desequilibrio de ligamiento en la región. Este nuevo locus no se ha incluido posteriormente dentro del análisis de las principales variantes de



susceptibilidad asociadas a la enfermedad (IMSGC & WTCCC2 2011) dado el bajo número de pacientes incluidos.

Durante el mismo año 2008, Aulchenko y colaboradores (Aulchenko et al. 2008) publicaron los resultados de su GWAS realizado en 45 pacientes no emparentados con EM y 195 controles con un total de 250.000 SNPs analizados. Los resultados de este estudio referente a genes no HLA, identificaron un nuevo locus de susceptibilidad (rs10492972\*C; OR: 3,12 [1,66-5,86]) relacionado con el gen **KIF1B** –“*Kinesin Family Member 1B*”– (OMIM: 605995) localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36) y que codifica una proteína motora que media el transporte intracelular de los precursores de la vesícula sináptica desde la mitocondria a través de los microtúbulos. Las mutaciones en este gen producen la neuropatía hereditaria axonal de Charcot-Marie-Tooth 2A1 (OMIM: 118210) (Zhao et al. 2001). Esta variante relacionada a **KIF1B** ha sido replicada y confirmada en otros estudios (Goris et al. 2010; IMSGC 2010a). Sin embargo, este nuevo locus no se ha incluido posteriormente dentro del análisis de las principales variantes de susceptibilidad asociadas a la enfermedad (IMSGC & WTCCC2 2011) dado el bajo número de pacientes incluidos.

Baranzini y colaboradores (Baranzini et al. 2009) publicaron, en 2009, los resultados de su GWAS llevado a cabo en 978 pacientes no emparentados y 883 controles con un total de 551.642 SNPs analizados. Identificaron trece nuevos locus de susceptibilidad no HLA. La mayor asociación fue observada para un locus (rs9523762\*A: OR: 1,36 [IC no especificado]) relacionado con el gen **GPC5** –“*Glypican 5*”– (OMIM: 602446) localizado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q32) y que codifica un proteoglicano heparan-sulfato que parece tener un papel en la EM mediando la respuesta farmacogenómica al interferón beta (Byun et al. 2008). Sin embargo, este locus no se ha podido replicar en estudios posteriores por lo que no se ha incluido dentro del análisis de las principales variantes de susceptibilidad asociadas a la enfermedad (IMSGC & WTCCC2 2011).

En el mismo año, Hafler y colaboradores (Hafler et al. 2009) publicaron los resultados de su estudio llevado a cabo en 3.462 pacientes con EM

incluyendo 1.275 tríos familiares, 2.187 pacientes no emparentados y 9.972 controles. En base a un GWAS previamente publicado por ellos mismos donde encontraban una clara asociación del gen *CD226* con la diabetes mellitus tipo 1 (Todd et al. 2007), realizaron el análisis de un grupo de 10 SNPs relacionados con dicho gen en su cohorte de pacientes con el objetivo de encontrar una posible vía común para estas dos enfermedades. Los resultados identificaron un nuevo locus de susceptibilidad no HLA (rs763361\*C; OR: 1,14 [0,99-1,31]) relacionado con **CD226**. El gen **CD226** – “*CD226 Antigen*”– (OMIM: 605397) se localiza en el brazo largo del cromosoma 18 (18q22) y codifica una molécula de adhesión que se expresa en la superficie de las células NK, plaquetas, monocitos, linfocitos T y un subgrupo de linfocitos B mediando no solo la adhesión sino también la co-estimulación de linfocitos T (Shibuya et al. 1996). En el modelo animal de EM (EAE), un anticuerpo monoclonal anti-CD226 demostró retrasar el desarrollo de la enfermedad y reducir su severidad (Dardalhon et al. 2005). La asociación de este gen con la EM también ha sido replicada y validada por otros estudios posteriores (IMSGC 2009; Wieczorek et al. 2009; Alcina, Vandebroek, et al. 2010; Pandit et al. 2011; Z. X. Qiu et al. 2013; Piédavent-Salomon et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la diabetes mellitus tipo 1 (Todd et al. 2007) y para la artritis reumatoide (Hafler et al. 2009; Z. X. Qiu et al. 2013).

De Jager y colaboradores (De Jager, Jia, et al. 2009) realizaron, en 2009, un metaanálisis de los estudios previamente publicados por el IMSGC (IMSGC 2007) y por Baranzini y colaboradores (Baranzini et al. 2009) junto a una cohorte no publicada de 860 pacientes. En total se estudiaron 2.624 pacientes no emparentados con EM y 7.220 controles con un total de 709.690 SNPs analizados. Los resultados validaron los locus de riesgo previamente descritos para los genes no HLA *CLEC16A*, *IL2RA* y *IL7RA* pero además identificaron tres nuevos locus no HLA de susceptibilidad con significación estadística.

El primero (rs17824933\*G; OR: 1,18 [1,07-1,30]) relacionado con el gen **CD6** – “*CD6 Antigen*”– (OMIM: 186720) que se localiza en el brazo largo del

cromosoma 11 (11q12) y que codifica una molécula de adhesión para los linfocitos activados situada en la superficie de las células inflamatorias. De esta manera, su función podría estar relacionada con la activación y proliferación de dichos linfocitos en el contexto de una enfermedad inflamatoria (Hassan et al. 2006; Castro et al. 2007). En esta línea, en 1986 se desarrolló un anticuerpo monoclonal anti-CD6, llamado itolizumab, para tratar pacientes con EM y se realizó un ensayo clínico que resultó negativo (Hafler et al. 1986). Posteriormente este fármaco se ha testado en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Rodriguez et al. 2012), el síndrome de Sjögren (Le Dantec et al. 2013) y, más recientemente, en psoriasis (Aira et al. 2014) con buenos resultados (Dogra et al. 2015). La asociación de este gen a la EM también ha sido replicada y validada por otros estudios (Swaminathan et al. 2010; IMSGC 2011; Kofler et al. 2011; Park et al. 2013; Swaminathan et al. 2013; IMSGC 2013a; Wagner, Bilinska, et al. 2014; Jurewicz et al. 2014).

El segundo (rs17445836\*G; OR: 0,80 [0,72-0,89]) se relacionaba con el gen **IRF8** –“*Interferon Regulatory Factor 8*”– (OMIM: 601565) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 16 (16q24) y que codifica un factor de transcripción que regula la respuesta a los interferones tipo 1 (tanto alfa como beta). Su función podría estar relacionada con el desarrollo de centros germinales de células B así como con las funciones del macrófago (Pedchenko et al. 2005; Lee et al. 2006). Su asociación a la EM también ha sido replicada en otros estudios (IMSGC 2011; IMSGC 2013a; Park et al. 2013; Chrabot et al. 2013; Yoshida et al. 2014). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la tiroiditis autoinmune (J. D. Lin et al. 2015), el lupus eritematoso sistémico (Cunninghame Graham et al. 2011; Lessard et al. 2012; Baccala et al. 2013; Chrabot et al. 2013; Li et al. 2014; Sheng et al. 2015) y la cirrosis biliar primaria (IMSGC 2013a).

El tercero (rs1800693\*G; OR: 1,20 [1,10-1,31]) se relacionaba con el gen **TNFRSF1A** –“*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A*”– (OMIM: 191190) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13) y que codifica una de las proteínas de mayor tamaño que actúan como

receptoras del factor de necrosis tumoral alfa. A su vez, también actúa como regulador de la inflamación mediante la activación de la apoptosis (Fuchs et al. 1992). Dado este papel aparentemente tan importante en el sistema inmune, este gen ha sido ampliamente replicado tanto a nivel clínico como experimental en varias cohortes de pacientes con EM (Kümpfel & Hohlfeld 2009; Swaminathan et al. 2010; IMSGC 2011; Goris et al. 2011; Park et al. 2013; Weinshenker & Tienari 2013; Comabella et al. 2013; Ottoboni et al. 2013; Tienari & Hohlfeld 2013; IMSGC 2013a; Williams et al. 2014; Hoffjan et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la cirrosis biliar primaria (IMSGC 2013a).

Este mismo grupo describió, aunque sin llegar a alcanzar la suficiente significación estadística, otros 7 locus no HLA de susceptibilidad que posteriormente, mediante estudios de replicación, han demostrado estar asociados a la enfermedad.

El primero (rs2760524\*G; OR: 0,87 [0,77-0,97]) relacionado con el gen **RGS1** –“Regulator of G Protein Signaling 1”– (OMIM: 600323) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (1q31) y que codifica una proteína que inhibe la actividad de la proteína G incrementando su actividad GTPasa. De esta forma, inhibe la transducción de señales celulares, y regula la activación y proliferación de las células B (Druey et al. 1996). Su asociación a la EM también ha sido replicada en posteriores estudios (IMSGC 2010b; IMSGC 2013a). Este gen también se ha relacionado a un probable mecanismo de acción del interferón beta 1-b ya que su expresión se ve incrementada por este tratamiento inmunomodulador (Tran et al. 2010). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad celiaca (Gibbons et al. 2011; Izzo et al. 2011; IMSGC 2013a).

El segundo (rs4680534\*C; OR: 1,12 [1,02-1,22]) se relacionaba con el gen **IL12A** –“Interleukin 12A”– (OMIM: 161560) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 (3q25) y que codifica la subunidad alfa de la interleucina-12 que puede actuar como un factor de crecimiento para los linfocitos T activados y células NK activadas incrementando su actividad lítica celular y estimulando la producción de interferón gamma (Chen et al. 2012). Su

asociación a la EM también ha sido replicada en sucesivos estudios (IMSGC 2010b; IMSGC 2013a; Jana et al. 2014). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad celiaca (Plaza-Izurieta et al. 2011; Izzo et al. 2011), la cirrosis biliar primaria (Hirschfield et al. 2009) y la estomatitis aftosa (Bazrafshani et al. 2003; Sun et al. 2013).

El tercero (rs744166\*G; OR: no proporcionada) se relacionaba con el gen **STAT3** –“Signal Transducer and Activator of Transcription 3”– (OMIM: 102582) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21) y que codifica una familia de proteínas que, en respuesta a citosinas y factores de crecimiento, entran en el núcleo celular y actúan como activadoras de la transcripción (Gerhartz et al. 1996). Su asociación a la EM también ha sido replicada en otros estudios (Jakkula et al. 2010; Cénit et al. 2010; Camporeale & Poli 2012; W. Qiu et al. 2013; Lu et al. 2013; IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad de Crohn (IMSGC 2013a; Z. Wang et al. 2014; Ryan et al. 2014; Hong et al. 2015).

El cuarto (rs1250540\*G; OR: 1,12 [1,02-1,22]) se relacionaba con el gen **ZMIZ1** –“Zinc Finger Miz-Domain Containing 1”– (OMIM: 607159) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (10q22) y que codifica una familia de proteínas que se encargan de regular la actividad de varios factores de transcripción, fundamentalmente de la inhibición de *STAT* (Sharma et al. 2003). Estas proteínas también están implicadas en el proceso de SUMOilación que consiste en una modificación postraduccional mediante la cual algunas de las proteínas celulares son covalentemente modificadas mediante la adición de otra pequeña proteína llamada SUMO, del inglés “*Small Ubiquitin-Related Modifier*” (Peng et al. 2010). Su asociación a la EM también ha sido replicada en otros estudios (Patsopoulos et al. 2011; IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad celiaca (Dubois et al. 2010; Cho & Brant 2011; Senapati et al. 2015), las enfermedades inflamatorias intestinales (Cho & Brant 2011; Ellinghaus et al. 2012; Yang et al. 2015) y la psoriasis (IMSGC 2013a).

El quinto (rs6896969\*C; OR: 0,91 [0,83-0,99]) se relacionaba con el gen **PTGER4** –“Prostaglandin E Receptor 4, EP4 Subtype”– (OMIM: 601586) que

se localiza en el brazo corto del cromosoma 5 (5p13) y que codifica una de las proteínas receptoras de la prostaglandina E. Su papel se ha relacionado con la activación de linfocitos y con el proceso de relajación del músculo liso (Sugimoto & Narumiya 2007). Su asociación a la EM también ha sido replicada en otros estudios (Pigard et al. 2009; IMSGC 2013a; Schiffmann et al. 2014; Perga et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad de Crohn (Libioulle et al. 2007; Glas, Seiderer, Czamara, et al. 2012; IMSGC 2013a; Prager et al. 2014).

El sexto (rs9321619\*A; OR: 0,89 [0,81-0,96]) se relacionaba con el gen **OLIG3** –“*Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 3*”– (OMIM: 609323) localizado en el brazo largo del cromosoma 6 (6q23) y que interviene en el desarrollo del sistema nervioso (Filippi et al. 2005). Este gen se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el gen **TNFAIP3** –“*Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Protein 3*”– (OMIM: 191163) que actúa como regulador negativo del factor nuclear- $\kappa$ B, un factor de transcripción que regula la respuesta pro-inflamatoria del TNF. Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (IMSGC 2010b; Lindén et al. 2013; IMSGC 2013a; Hoffjan et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad de Crohn (Barrett et al. 2008), la enfermedad celiaca (Trynka et al. 2009) y el lupus eritematoso sistémico (Musone et al. 2008).

Por último, el séptimo locus (rs1790100\*G; OR: 1,11 [1,00-1,22]) se relacionaba con el gen **MPHOSPH9** –“*M-Phase Phosphoprotein 9*”– (OMIM: 605501) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q24) y que interviene en el desacoplamiento de las estructuras de la interfase del ciclo celular, permitiendo que la célula entre en la fase M (Matsumoto-Taniura et al. 1996). Aunque su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (IMSGC 2010b; Habek et al. 2010; IMSGC 2013a), se considera que no es el causante de la susceptibilidad sino que lo es otro locus (rs949143\*G; OR: 1,08 [1,04-1,12]) en desequilibrio de ligamiento con el gen **ARL6IP4** –“*ADP-Ribosylation-Like Factor 6-Interacting Protein 4*”– (OMIM: 607668) cuya función sería la inhibición del pre-ARNm en caso de infección por el virus del herpes simple (Sasahara et al. 2000; Ouyang 2009).

Sin embargo, en un estudio reciente, Mowry y colaboradores (Mowry et al. 2013) describen la asociación de *MPHOSPH9* a una mayor severidad de los brotes, por lo que es una variante a seguir investigando.

El ANZgene, del inglés “*Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium*” (ANZgene 2009) publicaron en 2009 los resultados de su GWAS realizado en 1.618 pacientes no emparentados con EM y 3.413 controles con un total de 302.098 SNPs analizados. Los resultados de este estudio corroboraban la implicación de genes no HLA previamente descritos como *CD58*, *EVI5*, *IL2RA*, *CLEC16A*, *IL7RA*, *TYK2*, pero también describieron tres nuevos locus no HLA de susceptibilidad que posteriormente se han incluido dentro de las variantes principales asociadas a la EM.

El primero (rs6074022\*G; OR: 1,19 [1,17-1,48]) se relacionaba con el gen **CD40** –“*CD40 Antigen*”– (OMIM: 109535) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 20 (20q13) y que codifica una proteína que actúa como receptor en las células presentadoras de antígenos siendo esencial en varios procesos inmunes incluyendo cambios inmunoglobulina-dependientes en los linfocitos T (Schönbeck & Libby 2001), desarrollo de linfocitos B de memoria y formación de los centros germinales (Kawabe et al. 1994). Esta citosina también se ha relacionado con la activación de la microglia inducida por el beta-amiloide por lo que se considera un evento inicial en la enfermedad de Alzheimer (Bitting et al. 1996; Suo et al. 1998; Giunta et al. 2010; Michels et al. 2015). Su asociación a la EM también ha sido replicada en sucesivos estudios (Sokolova et al. 2013; IMSGC 2013a; Wagner, Wisniewski, et al. 2014; Field et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la artritis reumatoide (Liao et al. 2012; X. Zhang et al. 2013) y la enfermedad inflamatoria intestinal (IMSGC 2013a).

El segundo (rs703842\*A; OR: 0,82 [IC no especificado]) se relacionaba con el gen **CYP27B1** –“*Cytochrome P450, Subfamily XXVIIIB, Polypeptide 1*”– (OMIM: 609506) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q14) y que codifica una proteína de la membrana interna de la mitocondria que se encarga de hidroxilar la 25-dihidroxitamina-D transformándola en su forma activa la 1,25-dihidroxitamina-D jugando un papel fundamental en la

homeostasis del calcio (Akiba et al. 1980; Kawashima & Kurokawa 1983). Las mutaciones en este gen también están asociadas al raquitismo tipo 1 dependiente de vitamina-D (OMIM: 264700) (Fraser et al. 1973). Aunque su asociación a la EM ha sido replicada en sucesivos estudios (Sundqvist et al. 2010; IMSGC 2013a; Ross et al. 2014; Shahijanjan et al. 2014; Zhuang et al. 2015) y existe abundante evidencia científica que implica a los niveles bajos de vitamina D con la probabilidad de desarrollar EM (Duan et al. 2014), este locus también ha sido objeto de discusión debido a disponer de estudios contradictorios respecto a su asociación con la enfermedad (Torkildsen et al. 2008; Ramagopalan et al. 2011; Alcina et al. 2013; Ban et al. 2013; Barizzone et al. 2013; Reinthaler et al. 2014). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la artritis reumatoide (Cutolo et al. 2011).

El tercero (rs228614\*G; OR: 1,09 [1,05-1,13]) se relacionaba con el gen **NFKB1** o **MANBA** –“Nuclear Factor Kappa-B, Subunit 1”– (OMIM: 16401) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 4 (4q24) y que codifica una proteína que se ha detectado en numerosos tipos celulares que expresan citosinas, quimiocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión. Dicha proteína se activa por una amplia variedad de estímulos incluyendo citosinas, radicales libres, partículas inhaladas, radiación ultravioleta y productos bacterianos y virales. Su función se ha relacionado con la cascada inflamatoria asociada a artritis autoinmune, asma, shock séptico, fibrosis pulmonar, glomerulonefritis, arterioesclerosis y SIDA. En cambio, su inactivación se asocia a apoptosis, desarrollo inadecuado del sistema inmune y retardo del crecimiento celular (Baldwin 1996; Chen et al. 1999). Su asociación a la EM también ha sido replicada en posteriores estudios (IMSGC & WTCCC2 2011; IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la cirrosis biliar primaria (IMSGC 2013a).

En el año 2010, Sanna y colaboradores (Sanna et al. 2010) publicaron los resultados de su GWAS realizado en 882 pacientes no emparentados con EM y 872 controles con un total de 555.335 SNPs analizados. Los resultados de este estudio corroboraban la implicación de genes no HLA previamente descritos como *CD58*, *IL2RA*, *EVI5*, *CD40*, *IRF8* y *CLEC16A* pero también



describen un nuevo locus no HLA de susceptibilidad que posteriormente se ha incluido dentro de las variantes principales asociadas a la EM. Este locus (rs9657904\*A; OR: 1,40 [1,27-1,57]) se relacionaba con el gen **CBLB** –“*CAS-BR-M Murine Ecotropic Retroviral Transforming Sequence B*”– (OMIM: 604491) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 (3q13) y que funciona como regulador clave para la tolerancia inmune, limitando la activación y expansión de linfocitos T (Chiang et al. 2000; Bachmaier et al. 2000). Su asociación a la EM también ha sido replicada posteriormente (Corrado et al. 2011; Varadé et al. 2012; Sellebjerg et al. 2012; IMSGC 2013a; Stürner et al. 2014).

En el mismo año, el IMSGC (IMSGC 2010a) en un análisis “*post hoc*” más detallado de los resultados publicados en el primer GWAS (IMSGC 2007), describe dos locus no HLA de susceptibilidad que previamente no habían sido considerados.

El primero (rs12122721\*G; OR: 1,22 [1,15-1,28]) se relacionaba con el gen **KIF21B (C1orf106)** –“*Kinesin Family Member 21B*”– (OMIM: 608322) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32) y que codifica una proteína perteneciente a la familia de las quinesinas, proteínas motoras encargadas de transportar componentes celulares esenciales a través de los microtúbulos axonales y dendríticos (Marszalek et al. 1999). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (Goris et al. 2010; IMSGC 2013a; Kreft et al. 2014). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la colitis ulcerativa, la enfermedad de Crohn, la enfermedad celiaca y la espondilitis anquilosante (Danoy et al. 2010; IMSGC 2013a; Yang et al. 2014).

El segundo (rs1132200\*C; OR: [1,24 1,18-1,28]) se relacionaba con el gen **TMEM39A** –“*Transmembrane Protein 39A*”– (OMIM: 126200) localizado en el brazo largo del cromosoma 3 (3q13). No se conoce exactamente su función pero se sabe que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el gen **CD80** que codifica el receptor transmembrana CD80 que se activa por la unión de CD28 o CTLA-4 (antígeno-4 del linfocito T citotóxico). Una vez activado, induce la proliferación de linfocitos T y la producción de citosinas

(Reeves et al. 1997). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (Varadé et al. 2012; IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para el lupus eritematoso sistémico (Lessard et al. 2012; Zhang et al. 2014; You et al. 2015; Sheng et al. 2015) y para la cirrosis biliar primaria (IMSGC 2013a).

Nischwitz y colaboradores (Nischwitz et al. 2010), también en 2010, publican los resultados de su GWAS llevado a cabo en 590 pacientes no emparentados y 825 controles con un total de 300.000 SNPs analizados. Los resultados de este estudio corroboraban la implicación de genes no HLA previamente descritos como *IL7RA* y *TNFRSF1A* pero también describen dos nuevos locus no HLA de susceptibilidad.

El primero (rs3780792\*C; OR: 1,59 [1,32-1,92]) se relacionaba con el gen **VAV2** –“*VAV2 Oncogene*”– (OMIM: 600428) que se expresa exclusivamente en las células hematopoyéticas realizando funciones importantes en la señalización celular a este nivel (Henske et al. 1995).

El segundo locus (rs3745672\*C; OR: 0,13 [0,06-0,30]) se relacionaba con el gen **ZNF433** –“*Zinc Finger Protein 433*”– (OMIM: 163059) cuya función no está del todo aclarada. Estos nuevos locus no han podido ser replicados en otros estudios por lo que no se han incluido dentro del análisis de las principales variantes de susceptibilidad asociadas a la enfermedad (IMSGC & WTCCC2 2011; IMSGC 2013a).

Jakkula y colaboradores (Jakkula et al. 2010) publicaron los resultados de su GWAS llevado a cabo en 62 pacientes no emparentados y 136 controles con un total de 297.343 SNPs analizados. Los resultados de este estudio corroboraban la implicación de genes no HLA previamente descritos como *IL2RA*, *IL7RA*, *CD58*, *CLEC16A*, *IRF8*, *TNFRSF1A*, *TYK2* y *STAT3*. En el caso de este último gen, los autores validaron los datos obtenidos por De Jager y colaboradores en el 2009 (De Jager, Jia, et al. 2009) pero también describen un nuevo SNP relacionado con este gen (rs744166\*G; OR: 0,87 [0,83-0,91]) que posteriormente no se ha podido validar.

Ban y colaboradores (Ban et al. 2010), mediante un estudio de replicación de la cohorte publicada en el 2007 por el WTCCC (WTCCC 2007), identificaron un nuevo locus no HLA de susceptibilidad (rs3748816\*T; OR: 1,16 [1,09-1,24]) que se relacionaba con el gen **MMEL1** –“*Membrane Metallo-Endopeptidase-Like 1*”– (OMIM: 79258) localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36) que codifica una proteína que juega un importante papel en la percepción del dolor, la regulación de la presión arterial, el metabolismo del fosfato y la homeostasis (Ouimet et al. 2000; Gregory et al. 2006), y que se la ha relacionado a la degradación de la proteína beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Huang et al. 2008). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (IMSGC & WTCCC2 2011; IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la artritis reumatoide (Raychaudhuri et al. 2008; Danoy et al. 2011; Kurreeman et al. 2012), la enfermedad celiaca (Coenen et al. 2009), la cirrosis biliar primaria, la tiroiditis autoinmune y la enfermedad inflamatoria intestinal (IMSGC 2013a).

Como dato importante no relacionado con los GWAS pero sí con la genética de la EM, en 2010, Dickson y colaboradores (Dickson et al. 2010) publicaron un trabajo en el que, mediante un modelo de simulación por ordenador, analizaron datos provenientes de GWAS en otras enfermedades no EM y plantearon que las variantes raras pueden crear señales de asociación de largo alcance (de hasta 10 Mb), lo que, a su vez, puede ser interpretado de forma errónea como una variante común por los estudios de asociación. Esta hipótesis puso en tela de juicio la forma en como se analizaban los estudios de asociación hasta ese momento.

Con el objetivo de valorar dicha hipótesis, Baranzini y colaboradores (Baranzini et al. 2010) secuenciaron, por primera vez, el genoma completo de dos mujeres gemelas monocigotas no concordantes para EM. Obtuvieron ≈3,6 millones de SNPs, ≈200.000 polimorfismos indel (**inserción-delección**), 27 CNVs (del inglés “*Copy Number Variations*”) y 1,1 millones de dinucleótidos CpG metilados. Tras analizar toda esta información, únicamente se encontraron diferencias en la metilación de dos residuos de citosina entre las

gemelas, sin detectarse ninguna otra diferencia significativa a nivel genético, epigenético ni transcriptómico, por lo que, en este estudio, la hipótesis propuesta por Dickson y colaboradores (Dickson et al. 2010) no podía ser confirmada.

El ANZgene (ANZgene 2011), en 2011, llevó a cabo un análisis “*post hoc*” más detallado de los resultados publicados en el primer GWAS (ANZgene 2009), y describieron un nuevo locus no HLA de susceptibilidad que previamente no se había considerado. Este locus (rs17174870\*G; OR: 1,1 [1,06-1,15]) se relacionaba con el gen **MERTK** –“*MER Tyrosine Kinase Protooncogene*”– (OMIM: 604705) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 (2q13) y que codifica uno de los tres tipos de receptores tirosina quinasa de la familia TAM (**TYRO3**, **AXL** y **MERTK**) que han sido implicados en la proliferación celular, la regulación inmune y la fagocitosis de células apoptóticas (Rothlin et al. 2007). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (IMSGC 2013a; Pierce & Keating 2014; Hoppmann et al. 2015). Este gen se ha descrito en pacientes con retinitis pigmentaria tipo-38 (OMIM: 613862) (Gal et al. 2000).

Patsopoulos y colaboradores (Patsopoulos et al. 2011) publicaron los resultados de su GWAS realizado en 1.453 pacientes no emparentados con EM y 2.176 controles con un total de 906.600 SNPs analizados, y también realizaron un metaanálisis de la información proveniente de los GWAS publicados por De Jager y colaboradores (De Jager, Jia, et al. 2009) y por ANZgene (ANZgene 2009). Los resultados de este estudio corroboraban la implicación de genes no HLA previamente descritos como *IL7RA*, *IL2RA*, *IL12A*, *CD58*, *CD6*, *IRF8*, *CLEC16A*, *TNFRSF1A*, *STAT3*, *KIF21B*, *CBLB*, *RGS1*, entre otros, y también describen 5 nuevos locus no HLA de susceptibilidad que posteriormente se han incluido dentro de las variantes principales asociadas a la EM.

El primero (rs11129295\*A; OR: 1,11 [1,07-1,16]) relacionado con el gen **EOMES** –“*Eomesodermin, Xenopus, Homolog of*”– (OMIM: 604615) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 (3p24) y que codifica un factor de transcripción que es crucial para el desarrollo embrionario del mesodermo y

del SNC en vertebrados (Yi et al. 1999). Este factor de transcripción también parece ser necesario para la diferenciación de los linfocitos T CD8+ (Pearce et al. 2003). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (IMSGC 2013a; Parnell et al. 2014; Glenn et al. 2014).

El segundo (rs2546890\*A; OR: 1,1 [1,06-1,14]) se relacionaba con el gen **IL12B** –“Interleukin 12B”– (OMIM: 161561) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (5q33) y que codifica la subunidad beta de la interleucina-12, una citosina que actúa sobre los linfocitos T y las células NK. Esta interleucina se expresa en los macrófagos activados y, por tanto, en el desarrollo de linfocitos Th1 (Brightbill et al. 1999). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (Varadé et al. 2012; Leone et al. 2013; IMSGC 2013a; J. Huang, Yang, Zhou, et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la psoriasis (Cabaleiro et al. 2013; Eirís et al. 2014; Popadic et al. 2015; Zuo et al. 2015) y la enfermedad de Crohn (Glas, Seiderer, Wagner, et al. 2012; Dubinsky et al. 2013; Dalton et al. 2014; Wang et al. 2015).

El tercero (rs7595037\*A; OR: 1,1 [1,06-1,14]) se relacionaba con el gen **PLEK** –“Pleckstrin”– (OMIM: 173570) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 (3p24) y que codifica una proteína fundamental en la hemostasia dependiente de las plaquetas (Tyers et al. 1988). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (IMSGC 2013a; Akkad et al. 2015; Hoppmann et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad celiaca (IMSGC 2013a).

El cuarto (rs1738074\*G; OR: 1,13 [1,09-1,17]) se relacionaba con el gen **TAGAP** –“T-Cell Activation GTPase-Activating Protein”– (OMIM: 609667) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 (6q25) y que codifica un miembro de la superfamilia de proteínas activadoras de linfocitos T RhoGTPasa dependiente (Mao et al. 2004). Su asociación a la EM también ha sido observada en posteriores estudios (Ottoboni et al. 2013; IMSGC 2013a; Akkad et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad celiaca (Hunt et al. 2008; Izzo et al. 2011; Plaza-Izurieta

et al. 2011; IMSGC 2013a), la enfermedad de Crohn (Festen et al. 2011; IMSGC 2013a) y la artritis reumatoide (Chen et al. 2011; IMSGC 2013a).

El quinto (rs2150702\*G; OR: 1,16 [1,10-1,22]) se relacionaba con el gen **MLANA** –“MELAN”– (OMIM: 605513) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 9 (9p24) y que codifica una proteína que juega un papel crucial regulando la pigmentación de los mamíferos mediante la melanogénesis (Hoashi et al. 2005). Su asociación a la EM también ha sido observada en otro estudio (IMSGC 2013a).

El IMSGC junto al WTCCC (IMSGC & WTCCC2 2011) divulgan, en 2011, los resultados de uno de los mayores GWAS publicado hasta la fecha incluyendo 9.772 pacientes no emparentados con EM y 17.376 controles con un total de 475.806 SNPs analizados. Tanto los pacientes como los controles provenían de varias poblaciones incluyendo Finlandia, Suecia, Noruega Dinamarca, Australia, Nueva Zelanda, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Polonia, Irlanda, Estados Unidos, Francia, España e Italia.

Los resultados de este estudio no solo corroboraban la implicación de genes no HLA previamente descritos como *IL2RA*, *IL7RA*, *CD58*, *EVI5*, *IL7*, *TYK2*, *CLEC16A*, *CD6*, *IRF8*, *TNFRSF1A*, *RGS1*, *IL12A*, *STAT3*, *ZMIZ1*, *PTGER4*, *OLIG3*, *MPHOSPH9/ARL6IP4*, *CD40*, *CYP27B1*, *CBLB*, *KIF21B*, *TMEM39A*, *MMEL1*, sino que también se describen nuevos SNPs en relación a estos mismos genes que hasta entonces no habían mostrado asociación estadísticamente significativa (Tabla 8).

**Tabla 8.** Comparación de los SNPs originales y de los nuevos descritos en el GWAS del 2011 (IMSGC & WTCCC2 2011) asociados a los principales locus no HLA de susceptibilidad para EM.

SNP original <sup>a</sup>	SNP nuevo <sup>b</sup>	Gen (es) candidato (s)
rs2104286*T	rs3118470*G	<i>IL2RA</i>
rs6897932*C	rs6897932*C	<i>IL7RA</i>
rs2300747*A	rs1335532*A	<i>CD58</i>
rs10735781*G	rs11810217*A	<i>EVI5</i>
rs2587156*G	rs1520333*G	<i>IL7</i>
rs34536443*G	rs8112449*G	<i>TYK2</i>
rs12708716_A	rs7200786*A	<i>CLEC16A(KIAA0350)</i>
rs17824933*G	rs650258*G	<i>CD6</i>
rs17445836*G	rs13333054*A	<i>IRF8</i>
rs1800693*G	rs1800693*G	<i>TNFRSF1A</i>
rs2760524*G	rs1323292*A	<i>RGS1</i>
rs4680534*C	rs2243123*G	<i>IL12A</i>
rs744166*G	rs9891119*C	<i>STAT3</i>
rs1250540*G	rs1250550*A	<i>ZMIZ1</i>
rs6896969*C	rs4613763*G	<i>PTGER4</i>
rs9321619*A	rs13192841*A	<i>OLIG3</i>
rs1790100*G	rs949143*G	<i>MPHOSPH9, ARL6IP4</i>
rs6074022*G	rs2425752*A	<i>CD40</i>
rs703842*A	rs12368653*A	<i>CYP27B1</i>
rs9657904*A	rs2028597*G	<i>CBLB</i>
rs12122721*G	rs7522462*G	<i>KIF21B (C1orf106)</i>
rs1132200*C	rs2293370*G	<i>TMEM39A, CD80</i>
rs3748816*T	rs4648356*C	<i>MMEL1</i>

<sup>a</sup>SNP descrito en la publicación original (ver texto para referencias)

<sup>b</sup>SNP nuevo descrito en el GWAS del 2011 (IMSGC & WTCCC2 2011)

Asimismo, se describen 29 nuevos locus no HLA de susceptibilidad que posteriormente se han incluido dentro de las variantes principales asociadas a la EM.

El primero (rs11581062\*G; OR: 1,13 [1,09-1,18]) se relacionaba con el gen **VCAM1** –“*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*”– (OMIM: 192225) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p21) y que codifica una glicoproteína de superficie expresada por las células endoteliales activas y que media la adhesión de monocitos y linfocitos (Cybulsky et al. 1991). Su asociación a la EM también ha sido observada en otro estudio llevado a cabo

por el mismo grupo (IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la artritis reumatoide (Navarro-Hernández et al. 2009).

El segundo (rs10201872\*A; OR: 1,13 [1,08-1,19]) se relacionaba con el gen **SP140** –“*Nuclear Body Protein SP140*”– (OMIM: 608602) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 (2q37) y codifica un factor de transcripción específico para secuencias de ADN (Bloch et al. 1996). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (IMSGC 2013a; Matesanz et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad de Crohn (IMSGC 2013a).

El tercero (rs9282641\*G; OR: 1,21 [1,14-1,29]) se relacionaba con el gen **CD86** –“*CD86 Antigen*”– (OMIM: 601020) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 (3q13) y codifica una proteína de membrana tipo-1 que es miembro de la superfamilia de la inmunoglobulinas. Esta proteína se expresa en las células presentadoras de antígeno y es el ligando de CD28, produciendo la activación de linfocitos T, y de la proteína-4 asociada al linfocito T citotóxico, que produce en cambio la inhibición de la activación de los linfocitos disminuyendo, por tanto, la respuesta inmune (Freeman et al. 1993). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (IMSGC 2013a; Menezes et al. 2014).

El cuarto (rs12212193\*G; OR: 1,09 [1,05-1,13]) se relacionaba con el gen **BACH2** –“*BTB And CNC Homology 2*”– (OMIM: 605394) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 (6q15) y que codifica un factor que actúa activando o inhibiendo la transcripción mediante la proteína MAFK. Está implicado, entre otros, con la vía de señalización en los linfocitos (Oyake et al. 1996). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (Roychoudhuri et al. 2013; IMSGC 2013a; Hoppmann et al. 2015; Perga et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad celiaca (Dubois et al. 2010; E. H. Kim et al. 2014), la diabetes mellitus tipo 1 (Marroqui et al. 2014; Wegner et al. 2015) y la tiroiditis autoinmune (IMSGC 2013a).



El quinto (rs802734\*A; OR: 1,1 [1,06-1,14]) se relacionaba con el gen **THEMIS** “*Thymocyte-Expressed Molecule Involved In Selection*” (OMIM: 613607) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 (6q22) y que codifica una proteína que cumple funciones reguladoras en la transición de linfocitos T negativos y positivos durante el desarrollo tardío del timocito (Kakugawa et al. 2009). Su asociación a la EM también ha sido observada en otro estudio (IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad celiaca (Dubois et al. 2010; IMSGC 2013a).

El sexto (rs11154801\*A; OR: 1,15 [1,1-1,19]) se relacionaba con el gen **MYB** –“*V-MYB Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog*”– (OMIM: 189990) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 (6q23) y codifica un factor de transcripción el cual juega un papel esencial en la regulación de la hematopoyesis y posiblemente también de la tumorigénesis (Westin et al. 1982). Las mutaciones de este gen se han relacionado con la leucemia linfoblástica aguda de células T (Barletta et al. 1987). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (IMSGC 2013a; X. Lin et al. 2015). Este gen se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el gen **AHL1** –“*Abelson Helper Integration Site 1*”– (OMIM: 608894) que codifica una proteína crucial para el desarrollo cortical y cerebeloso en los humanos (Chih et al. 2012). Mutaciones en este gen se han relacionado con el síndrome de Joubert (OMIM: 608629) (Ferland et al. 2004), un trastorno autosómico recesivo que produce una afectación severa en el desarrollo de las estructuras cerebrales.

El séptimo (rs17066096\*G; OR: 1,14 [1,09-1,18]) se relacionaba con el gen **IL22RA2** –“*Interleukin 22 Receptor, Alpha-2*”– (OMIM: 606648) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 (6q23) y que codifica una proteína miembro de las citosinas de clase 2 que específicamente se une a la interleucina-22 y bloquea su actividad (Huber et al. 2012). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (Vandenbroeck et al. 2012; IMSGC 2013a; Lill et al. 2014; Laaksonen et al. 2014).

El octavo (rs354033\*G; OR: 1,1 [1,06-1,15]) se relacionaba con el gen **ZNF746** –“*Zinc Finger Protein 746*”– (OMIM: 613914) que se localiza en el

brazo largo del cromosoma 7 (7q36) y cuya función no es del todo conocida aunque se cree interviene en la patogenia de la enfermedad de Parkinson (Shin et al. 2011; Khoo 2011; Kang & Shin 2014). La asociación de este locus con la EM no ha podido ser replicada en otros estudios sucesivos.

El noveno (rs4410871\*G; OR: 1,11 [1,07-1,16]) se relacionaba con el gen **MYC** –“V-MYC Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog”– (OMIM: 190080) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 8 (8q24) y que codifica una proteína que actúa a nivel nuclear en la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la transformación celular (Dominguez-Sola et al. 2007). Mutaciones en este gen se han asociado también al linfoma de Burkitt (OMIM: 113970) (Komano et al. 1999). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (IMSGC 2013a; Huynh et al. 2014).

El décimo (rs2019960\*G; OR: 1,1 [1,05-1,15]) se relacionaba con el gen **PVT1** –“PVT1 Oncogene”– (OMIM: 165140) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 8 (8q24) y que se considera un gen ARN, es decir, un gen cuya secuencia de ADN no codifica ninguna proteína (Graham & Adams 1986). Se ha visto implicado en el mal pronóstico de varios tipos de cáncer (Tseng et al. 2014; Liu et al. 2015; Zhang et al. 2015; C. Huang et al. 2015; Bawa et al. 2015; Kong et al. 2015). Su asociación a la EM ha sido observada solo en otro estudio sucesivo (IMSGC 2013a).

El undécimo (rs7923837\*G; OR: 1,1 [1,06-1,14]) se relacionaba con el gen **HHEX** –“Hematopoietically Expressed Homeobox”– (OMIM: 604420) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (10q23) y que codifica un factor de transcripción relacionado con los procesos de desarrollo celular (Tanaka et al. 1999). Su expresión dentro de las células hematopoyéticas sugiere que esta proteína puede jugar un papel en la diferenciación de las células hemáticas. Su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio (IMSGC 2013a).

El duodécimo (rs630923\*C; OR: 1,11 [1,06-1,17]) se relacionaba con el gen **CXCR5** –“Chemokine, CXC Motif, Receptor 5”– (OMIM: 601613) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q23) y que codifica una

proteína que se expresa en los linfocitos B maduros y en el linfoma de Burkitt, interviniendo en la migración de linfocitos B dentro de los folículos linfoides del bazo (Reif et al. 2002). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (IMSGC 2013a; IMSGC 2013b).

El decimotercero (rs10466829\*A; OR: 1,09 [1,05-1,13]) se relacionaba con el gen **CLECL1** –“*Dendritic Cell-Associated Lectin 1*”– (OMIM: 607467) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13) y que codifica una proteína transmembrana tipo 2 que es altamente expresada en las células dendríticas y en los linfocitos B. Puede actuar como una co-estimuladora de linfocitos T a través de la interleucina-4 y, por tanto, puede regular la respuesta inmune (Ryan et al. 2002). Su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio posterior (IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la diabetes mellitus tipo 1 (Wallace et al. 2012).

El decimocuarto (rs4902647\*G; OR: 1,11 [1,07-1,15]) se relacionaba con el gen **ZFP36L1** –“*Zinc Finger Protein 36-Like 1*”– (OMIM: 601064) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 (14q24) y codifica una proteína encargada de regular la respuesta frente a factores de crecimiento (Bustin et al. 1994). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (IMSGC 2013a; Perga et al. 2015). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad celiaca y la diabetes mellitus tipo 1 (Dudziak et al. 2008).

El decimoquinto (rs2300603\*A; OR: 1,11 [1,07-1,16]) se relacionaba con el gen **BATF** –“*Basic Leucine Zipper Transcription Factor, ATF-Like*”– (OMIM: 612476) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 (14q24) y codifica un factor de transcripción que inhibe los procesos transcripcionales AP-1/ATF, que consisten fundamentalmente en la diferenciación del linaje de las células del sistema inmune, específicamente la diferenciación en células B de linfocitos Th17, células Th foliculares, linfocitos T CD8+ y células dendríticas (Dorsey et al. 1995). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (Miao et al. 2013; IMSGC 2013a; Akkad et al. 2015).

El decimosexto (rs2119704\*C; OR: 1,26 [1,17-1,36]) se relacionaba con el gen **GALC** –“Galactosilceramidase”– (OMIM: 606890) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 (14q31) y codifica una proteína lisosomal que hidroliza la galactosilceramida (un lípido fundamental de la mielina) a nivel cerebral, renal y en células epiteliales del intestino delgado y del colon (Chen et al. 1993), y cuya mutación se asocia a la enfermedad de Krabbe (OMIM: 245200) (Wenger et al. 2000). Su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio (IMSGC 2013a). Este gen se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el gen **GPR65** –“G Protein-Coupled Receptor 65”– (OMIM: 604620) y su función podría ser la de actuar como receptor de glicoesfingolípidos además de activar la muerte celular y la diferenciación de linfocitos T (Wang et al. 2004). Su asociación a la EM no ha podido ser replicada en estudios sucesivos.

El decimoséptimo (rs2744148\*G; OR: 1,12 [1,07-1,17]) se relacionaba con el gen **SOX8** –“SRY-Box 8”– (OMIM: 605923) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13) y que codifica un factor de transcripción que interviene en el desarrollo embrionario y en la determinación del destino de las células. Su función también se ha relacionado con el desarrollo cerebral (Pfeifer et al. 2000). Su asociación a la EM también ha sido observada en posteriores estudios (IMSGC 2013a; IMSGC 2013b).

El decimooctavo (rs180515\*G; OR: 1,11 [1,07-1,15]) se relacionaba con el gen **RPS6KB1** –“Ribosomal Protein S6 Kinase, 70-Kd, 1”– (OMIM: 608938) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23) y que codifica una proteína encargada de promover la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y la proliferación celular mediante su promotor mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) (Grove et al. 1991). Además, este gen ha sido asociado con diferentes tipos de cáncer (Y. Zhang et al. 2013; Tao et al. 2014; Lacle et al. 2015; Cai et al. 2015). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (IMSGC 2013a; IMSGC 2013b). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la enfermedad inflamatoria intestinal (IMSGC 2013a).

El decimonoveno (rs7238078\*A; OR: 1,11 [1,06-1,16]) se relacionaba con el gen **MALT1** –“*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Gene 1*”– (OMIM: 604860) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 18 (18q21) y que codifica una proteína que regula la activación de NF-kappaB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), complejo proteico que controla la transcripción del ADN y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como estrés, citoquinas, radiación ultravioleta, LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales, por lo que juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune frente a infecciones (Uren et al. 2000). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios especialmente en EAE (Brüstle et al. 2012; Mc Guire et al. 2013; IMSGC 2013a; Mc Guire et al. 2014). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la artritis reumatoide (X. Wang et al. 2014).

El vigésimo (rs1077667\*G; OR: 1,16 [1,11-1,21]) se relaciona con el gen **TNFSF14** –“*Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, Member 14*”– (OMIM: 604520), también llamado “*LIGHT*”, que se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13) y que codifica una proteína que es conocida como mediadora en la entrada de herpes virus en las células. Además se ha demostrado su función en la proliferación de linfocitos T, en el inicio de la apoptosis de varias células tumorales y en la inhibición de la apoptosis mediada por TNF- $\alpha$  en los hepatocitos primarios (Mauri et al. 1998; Yu et al. 1999; Rooney et al. 2000). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios especialmente a nivel de regulación genética, estudios serológicos y experimentos en EAE (Malmeström et al. 2013; Jernås et al. 2013; Maña et al. 2013; IMSGC 2013a).

El vigesimoprimer (rs874628\*A; OR: 1,12 [1,08-1,17]) se relacionaba con el gen **MPV17L2** –“*MPV17- Like Protein 2*”– (OMIM: 616133) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13) y es necesario para el ensamblaje y estabilidad del ribosoma mitocondrial (Dalla Rosa et al. 2014). Su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio (IMSGC 2013a). Este gen se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el gen *IL12RB1* –

*“Interleukin 12 Receptor, Beta-1”*– (OMIM: 601604) que codifica la subunidad beta-1 del receptor de interleucina-12. Las mutaciones en este gen producen una alteración en el desarrollo de linfocitos T dependientes de interleucina-17 resultando en una susceptibilidad incrementada a las infecciones por micobacterias y salmonella (Van-de-Vosse et al. 2013). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios especialmente como marcador de respuesta al tratamiento (Baranzini et al. 2015).

El vigesimosegundo (rs2303759\*C; OR: 1,11 [1,07-1,15]) se relacionaba con el gen ***DKKL1*** –*“Dickkopf-Like-1”*– (OMIM: 605418) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13) y que codifica una proteína involucrada en las vías de señalización WNT (acrónimo producto de la fusión de las palabras inglesas *“wingless”* e *“integrated”*), que son un grupo de vías de transducción de señales desde el exterior de una célula hasta su interior a través de la superficie receptora de dicha célula (Krupnik et al. 1999). Su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio sucesivo (IMSGC 2013a). Este gen se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el gen ***CD37*** –*“Leukocyte Surface Antigen CD37”*– (OMIM: 151523) y que codifica una proteína de membrana que juega un papel en las interacciones entre linfocitos T y B (Virtaneva et al. 1993). Su asociación a la EM no ha podido ser posteriormente replicada.

El vigesimotercero (rs2248359\*G; OR: 1,12 [1,08-1,16]) se relacionaba con el gen ***CYP24A1*** –*“Cytochrome P450, Family 24, Subfamily A, Polypeptide 1”*– (OMIM: 126065) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 20 (20q13) y que codifica una proteína que inicia la degradación de la 1,25 dihidroxivitamina-D, por lo que juega un papel en la regulación de los niveles de dicha vitamina y, por tanto, en la homeostasis del calcio y del sistema endocrino (Liu et al. 2006). Asimismo, las mutaciones en este gen se han asociado a la hipercalcemia infantil (OMIM: 143880) (Schlingmann et al. 2011). Su asociación a la EM también ha sido observada en sucesivos estudios (IMSGC 2013a; Ramasamy et al. 2014).

El vigesimocuarto (rs6062314\*A; OR: 1,17 [1,1-1,25]) se relacionaba con el gen ***TNFRSF6B*** –*“Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member*

6B”– (OMIM: 603361) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 20 (20q13) y que codifica una proteína que se ha postulado juega un papel regulador en suprimir la muerte celular mediante su interacción con *TNFSF14*. Además, la sobreexpresión de este gen se ha relacionado con la presencia de tumores del tracto gastrointestinal (Pitti et al. 1998). Su asociación a la EM también ha sido observada en otros estudios (Blanco-Kelly et al. 2011; IMSGC 2013a). Este locus se ha asociado con SNPs de riesgo para la artritis reumatoide (Perdigones et al. 2010).

El vigesimoquinto (rs2283792\*C; OR: 1,09 [1,05-1,13]) se relacionaba con el gen **MAPK1** –“Mitogen-Activated Protein Kinase 1”– (OMIM: 176948) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11) y que codifica una proteína perteneciente a la familia de las quinasas señal-dependientes (ERKs, por su siglas en inglés de “*signal-regulated kinases*”) cuya función es la de integración de señales bioquímicas involucradas en múltiples procesos celulares como proliferación, diferenciación, transcripción y desarrollo (Boulton et al. 1991). Su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio (IMSGC 2013a).

El vigesimosexto (rs140522\*A; OR: 1,09 [1,05-1,14]) se relacionaba con el gen **SCO2** –“SCO2 Cytochrome C Oxidase Assembly Protein”– (OMIM: 604272) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 (22q13) y que codifica la proteína del mismo nombre. La COX es clave en el mantenimiento del gradiente de protones en la membrana interna mitocondrial que es necesario para la producción de ATP (Papadopoulou et al. 1999). Las mutaciones en este gen se asocian a la encefalocardiomiopatía fatal infantil (OMIM: 604377) (Papadopoulou et al. 1999) y a la miopía tipo-6 (OMIM: 608908) (Tran-Viet et al. 2013). Su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio (IMSGC 2013a).

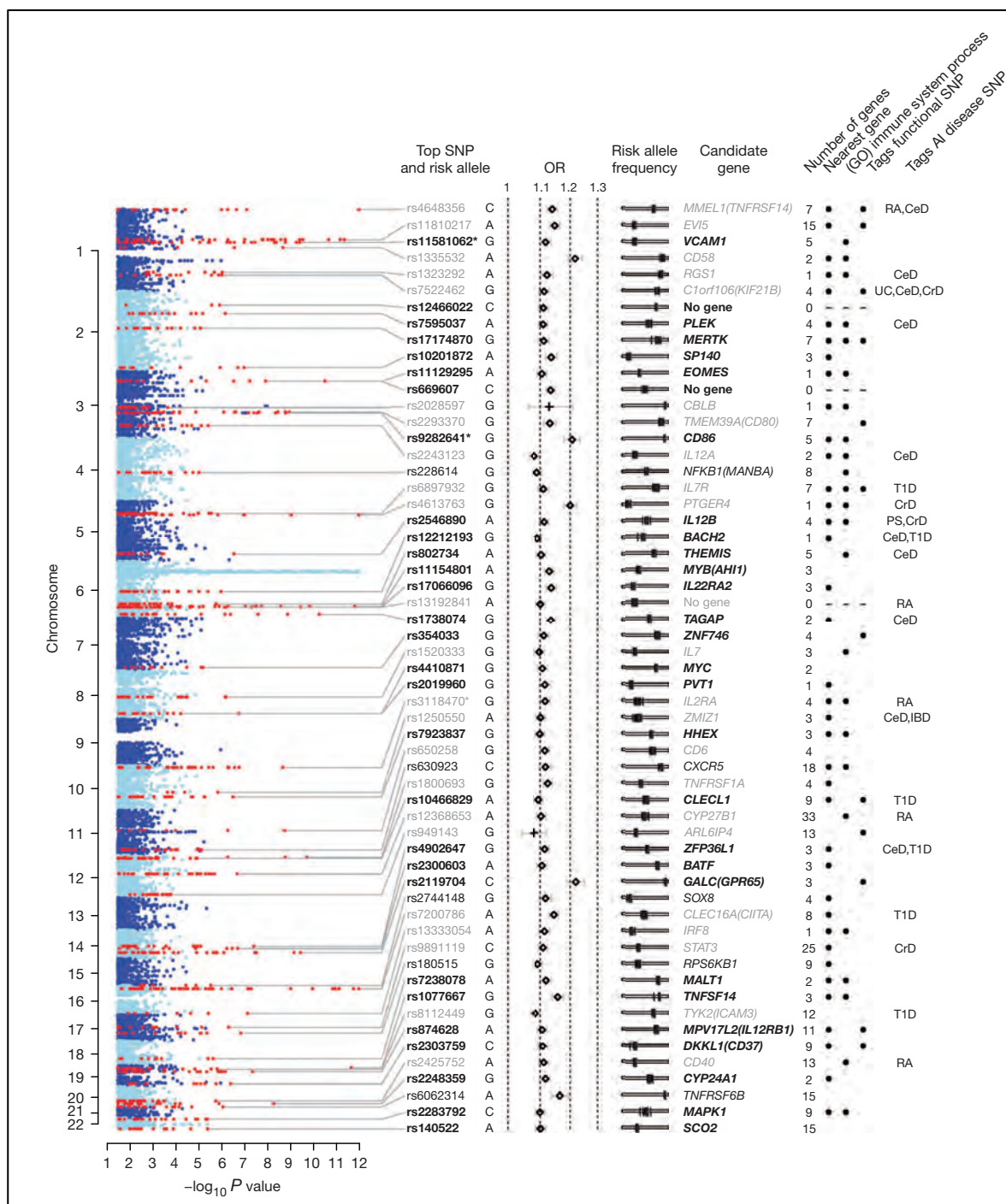
El vigesimoséptimo (rs354033\*G; OR: 1,03 [1,00-1,07]) se relacionaba con el gen **ZNF767** –“Zinc Finger Family Member 767, Pseudogene”– (OMIM: 79970) que se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q36) y codifica un pseudogen (secuencia nucleótida similar a un gen normal pero que no

expresa un producto funcional) (Hillier et al. 2003). Su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio (IMSGC 2013a).

El vigesimooctavo (rs12466022\*C; OR: 1,1) localizado en el cromosoma 2, y el vigesimonoveno (rs689607\*C; OR: 1,13) localizado en el cromosoma 3, no se han relacionado de momento a ningún gen específico.

Por lo tanto, este GWAS describe un total de **57 locus no HLA de susceptibilidad** (entre previos y nuevos identificados) asociados a la enfermedad, siendo este, el estudio que mayor cantidad de locus había descrito hasta ese momento y el que hasta ahora se considera como el mayor GWAS con datos validados en EM (Figura 42 y Tabla 9). Dentro de estos 57 locus, 5 de ellos (*NFKB1*, *CXCR5*, *SOX8*, *RPS6KB1*, *TNFRSF6B*) mostraron una fuerte evidencia de asociación para el SNP descrito (Tabla 9). Una versión interactiva y muy didáctica de la Figura 42 se encuentra disponible en <http://www.well.ox.ac.uk/wtccc2/ms/>.





**Figura 42.** Gráfica de Manhattan que muestra los 57 principales locus no HLA de susceptibilidad para EM (IMSGC & WTCCC2 2011).

**Tabla 9.** Los 57 principales locus no HLA de susceptibilidad para EM (adaptada de IMSGC & WTCCC2 2011).

Cr	#dbSNP <sup>a</sup>	A-R	OR (95% IC) <sup>b</sup>	Gen(es) candidato(s)	OEA	OEnA	Publicación original
1	rs1335532	A	1,18 (1,12-1,24)	<i>CD58</i>			IMSGC 2007
1	rs11810217	A	1,15 (1,11-1,20)	<i>EVI5</i>		Nbl (OMIM: 256700)	IMSGC 2007
1	rs1323292	A	1,12 (1,07-1,18)	<i>RGS1</i>	EC*		De Jager, et al. 2009
1	rs7522462	G	1,11 (1,06-1,15)	<i>KIF21B (C1orf106)<sup>o</sup></i>	EII*, EC*, EsA		IMSGC 2007
1	rs4648356	C	1,16 (1,12-1,21)	<i>MMEL1</i>	AR, EC, CBP*, TA*, EII*		WTCCC 2007
1	rs11581062	G	1,13 (1,09-1,18)	<i>VCAM1</i>	AR		IMSGC & WTCCC2 2011
2	rs17174870	G	1,10 (1,06-1,15)	<i>MERTK<sup>o</sup></i>		RePg-38 (OMIM: 613862)	ANZgene 2009
2	rs10201872	A	1,13 (1,08-1,19)	<i>SP140</i>	EII*		IMSGC & WTCCC2 2011
3	rs2243123	G	1,09 (1,05-1,14)	<i>IL12A</i>	EC, CBP, EA		De Jager, et al. 2009
3	rs2028597	G	1,13 (1,06-1,21)	<i>CBLB</i>			Sanna et al. 2010
3	rs2293370	G	1,16 (1,11-1,22)	<i>TMEM39A<sup>o</sup>, CD80</i>	LES, CBP*		IMSGC 2007
3	rs11129295	A	1,11 (1,07-1,16)	<i>EOMES</i>			Patsopoulos et al. 2011
3	rs7595037	A	1,10 (1,06-1,14)	<i>PLEK</i>	EC*		Patsopoulos et al. 2011
3	rs9282641	G	1,21 (1,14-1,29)	<i>CD86</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
4	rs228614	G	1,09 (1,05-1,13)	<i>NFKB1 (MANBA)**</i>	CBP*		ANZgene 2009
5	rs6897932	C	1,11 (1,06-1,16)	<i>IL7RA</i>	DM1, CBP*		IMSGC 2007
5	rs4613763	G	1,21 (1,15-1,28)	<i>PTGER4</i>	EII*		De Jager, et al. 2009
5	rs2546890	A	1,10 (1,06-1,14)	<i>IL12B</i>	PS, EII		Patsopoulos et al. 2011
6	rs13192841	A	1,10 (1,06-1,15)	<i>OLIG3</i>	EII, EC, LES		De Jager, et al. 2009
6	rs1738074	G	1,13 (1,09-1,17)	<i>TAGAP</i>	EC*, EII*, AR*		Patsopoulos et al. 2011
6	rs12212193	G	1,09 (1,05-1,13)	<i>BACH2</i>	EC, DM1, TA*		IMSGC & WTCCC2 2011
6	rs802734	A	1,10 (1,06-1,14)	<i>THEMIS</i>	EC*		IMSGC & WTCCC2 2011
6	rs11154801	A	1,15 (1,10-1,19)	<i>MYB, AHI1</i>		LLAT (OMIM: s/n), SdJ (OMIM: 613862)	IMSGC & WTCCC2 2011
6	rs17066096	G	1,14 (1,09-1,18)	<i>IL22RA2</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
7	rs354033	G	1,10 (1,06-1,15)	<i>ZNF746</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
7	rs354033	G	1,03 (1,00-1,07)	<i>ZNF767</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
8	rs1520333	G	1,11 (1,06-1,15)	<i>IL7</i>			IMSGC 2007
8	rs4410871	G	1,11 (1,07-1,16)	<i>MYC</i>		LnBk (OMIM: 613862)	IMSGC & WTCCC2 2011
8	rs2019960	G	1,10 (1,05-1,15)	<i>PVT1</i>		RsCa	IMSGC & WTCCC2 2011
9	rs2150702	G	1,16 (1,10-1,22)	<i>MLANA</i>			Patsopoulos et al. 2011
10	rs3118470	G	1,12 (1,08-1,17)	<i>IL2RA</i>	DM1, TA, AR, EII*		IMSGC 2007
10	rs1250550	A	1,10 (1,06-1,14)	<i>ZMIZ1</i>	EC, EII, PS*		De Jager, et al. 2009
10	rs7923837	G	1,10 (1,06-1,14)	<i>HHEX</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
11	rs650258	G	1,12 (1,08-1,16)	<i>CD6</i>			De Jager, et al. 2009
11	rs630923	C	1,11 (1,06-1,17)	<i>CXCR5**</i>			IMSGC & WTCCC2 2011

Continúa en la página siguiente...

12	rs1800693	G	1,12 (1,08-1,16)	<i>TNFRSF1A</i>	CBP*		De Jager, et al. 2009
12	rs949143	G	1,08 (1,04-1,12)	<i>MPHOSPH9, ARL6IP4</i>			De Jager, et al. 2009
12	rs10466829	A	1,09 (1,05-1,13)	<i>CLECL1</i>	DM1		IMSGC & WTCCC2 2011
12	rs12368653	A	1,11 (1,06-1,15)	<i>CYP27B1</i>	AR		ANZgene 2009
14	rs4902647	G	1,11 (1,07-1,15)	<i>ZFP36L1</i>	EC, DM1		IMSGC & WTCCC2 2011
14	rs2300603	A	1,11 (1,07-1,16)	<i>BATF</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
14	rs2119704	C	1,26 (1,17-1,36)	<i>GALC, GPR65</i>		Ekr (OMIM: 245200)	IMSGC & WTCCC2 2011
16	rs7200786	A	1,15 (1,11-1,20)	<i>CLEC16A(KIAA0350)</i>	DM1, CBP*		WTCCC 2007
16	rs13333054	A	1,12 (1,08-1,17)	<i>IRF8</i>	TA, LES, CBP*		De Jager, et al, 2009
16	rs2744148	G	1,12 (1,07-1,17)	<i>SOX8**</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
17	rs9891119	C	1,10 (1,06-1,14)	<i>STAT3</i>	EII*		De Jager, et al. 2009
17	rs180515	G	1,11 (1,07-1,15)	<i>RPS6KB1**</i>	EII*	RsCa	IMSGC & WTCCC2 2011
18	rs7238078	A	1,11 (1,06-1,16)	<i>MALT1</i>	AR		IMSGC & WTCCC2 2011
19	rs8112449	G	1,10 (1,06-1,14)	<i>TYK2</i>	DM1, CBP*, PS*, AR*		WTCCC 2007
19	rs1077667	G	1,16 (1,11-1,21)	<i>TNFSF14</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
19	rs874628	A	1,12 (1,08-1,17)	<i>MPV17L2, IL12RB1</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
19	rs2303759	C	1,11 (1,07-1,15)	<i>DKKL1, CD37</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
20	rs2425752	A	1,10 (1,06-1,14)	<i>CD40</i>	AR, EII*		ANZgene 2009
20	rs2248359	G	1,12 (1,08-1,16)	<i>CYP24A1</i>		HCaln (OMIM: 143880)	IMSGC & WTCCC2 2011
20	rs6062314	A	1,17 (1,10-1,25)	<i>TNFRSF6B**</i>	AR	RsCalnt	IMSGC & WTCCC2 2011
22	rs2283792	C	1,09 (1,05-1,13)	<i>MAPK1</i>			IMSGC & WTCCC2 2011
22	rs140522	A	1,09 (1,05-1,14)	<i>SCO2</i>		ECMFI (OMIM: 604377), Mp-6 (OMIM: 608908)	IMSGC & WTCCC2 2011

Cr: cromosoma, #dbSNP: número según la dbSNP, A-R: alelo de riesgo

OEA: Otras enfermedades autoinmunes; TA: Tiroiditis autoinmune, EII: Enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), EC: Enfermedad celiaca, CBP: Cirrosis biliar primaria, PS: Psoriasis, AR: Artritis reumatoide, DM1: Diabetes mellitus tipo 1, LES: Lupus eritematoso sistémico, EA: Estomatitis aftosa, EsA: Espondilitis anquilosante

OEnA: Otras enfermedades no autoinmunes; Nbl: Neuroblastoma, RePg-38: Retinitis pigmentaria tipo-38, LLAT: Leucemia linfoblástica aguda de células T, SdJ: Síndrome de Joubert, LnBk: Linfoma de Burkitt, Ekr: Enfermedad de Krabbe, HCaln: Hipercalcemia infantil, ECMFI: Encefalocardiomiopatía fatal infantil, Mp-6: Miopía tipo-6, RsCa: Riesgo aumentado de cáncer, RsCalnt: Riesgo aumentado cáncer gastrointestinal

\*La asociación a OEA se han observado también en el abordaje mediante inmunochip. IMSGC. Nat Genet 2013;45(11):1353-60

<sup>a</sup>Los SNPs detallados provienen del hasta ahora mayor GWAS con datos validados que existe. IMSGC & WTCCC2. Nature 2011;476(7359):214-9

<sup>b</sup>Hace referencia a la OR descrita en la publicación original

<sup>o</sup>Hace referencia a genes descritos en los primeros GWAS que no alcanzaron significación estadística pero que posteriormente han sido validados en GWAS más grandes

\*\*Hace referencia a una fuerte evidencia de asociación con el gen señalado

Posteriormente, Alloza y colaboradores (Alloza et al. 2012) publicaron los resultados de un estudio de asociación llevado a cabo en 2.895 pacientes no emparentados de origen español y 2.942 controles usando una plataforma de genotipado mediante el iPLEX Sequenom MassARRAY (CEGEN, Santiago de Compostela). Los resultados de este estudio revelaron un nuevo locus no HLA de susceptibilidad (rs6859219\*C; OR: 1,26) con una OR inusualmente elevada para las variantes hasta entonces descritas que se relacionaba con el gen **ANKRD55** –“Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein 55”– (OMIM: 615189) localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q11) y cuya función hasta ahora se desconoce. Sin embargo se sabe que se expresa en ovarios, testículos, endometrio y probablemente en células del sistema inmune (Alloza et al. 2012). Por otro lado, se sabe que las repeticiones de anquirina están relacionadas con cáncer (Yang et al. 1995) y CADASIL (Joutel & Tournier-Lasserre 1998). Este gen ya había sido descrito en un metaanálisis previo de GWAS en artritis reumatoide (Stahl et al. 2010) y su asociación a la EM solo ha podido ser replicada en otro estudio posterior (IMSGC 2013a).

Matesanz y colaboradores (Matesanz et al. 2012) publicaron, en el mismo año, los resultados de su GWAS realizado en 296 pacientes no emparentados con EM y 801 controles con un total de 130.903 SNPs analizados. Los resultados de este estudio corroboraban la implicación de genes no HLA previamente descritos como *IL2RA*, pero también describieron un nuevo locus no HLA de susceptibilidad (rs9292777\*C; OR: 0,92) que se localizaba en el brazo corto del cromosoma 5 (5p13). Aunque no se pudo asociar de forma clara un gen a este locus, los autores propusieron que probablemente estuviera en relación con el gen **PTGER4** que previamente se había descrito por De Jager y colaboradores (De Jager, Jia, et al. 2009).

Martinelli-Boneschi y colaboradores (Martinelli-Boneschi et al. 2012) publicaron también los resultados de su GWAS realizado en 197 pacientes no emparentados con EM y 234 controles con un total de 277.866 SNPs analizados. Una particularidad de este GWAS es que, por primera vez, solo se incluyeron pacientes con formas progresivas de la enfermedad en un intento por asociar variantes de riesgo con el curso de la EM. Los resultados

de este estudio confirmaron la mayor fuerza de asociación para la región *HLA-DR* en el cromosoma 6. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los locus no HLA. Aún así, los autores describieron la lista de los 20 SNPs con mayor significación estadística, pero éstos no han podido ser replicados en estudios posteriores.

Hasta aquel momento, los GWAS habían aportado una gran cantidad de información referente a la genética de la EM, permitiendo observar asociaciones que posteriormente eran replicadas por otros grupos y confirmadas mediante mapeo fino. Este es el abordaje que se ha realizado durante los últimos 5-7 años en referencia a estudios de asociación para la EM. Sin embargo, dichas asociaciones dependen del desequilibrio de ligamiento de la zona, no solo en lo que respecta a SNPs de riesgo (que en ciertas regiones puede llegar a más de 15 SNPs asociados a la misma región, como ocurre, por ejemplo, para el gen *MANBA*), sino también para los genes implicados (que en ciertas regiones puede reunir hasta más de 30 genes asociados al mismo SNP, como ocurre, por ejemplo, para el SNP rs12368653 asociado sobre todo al gen *CYP27B1* pero también a otros 33 genes).

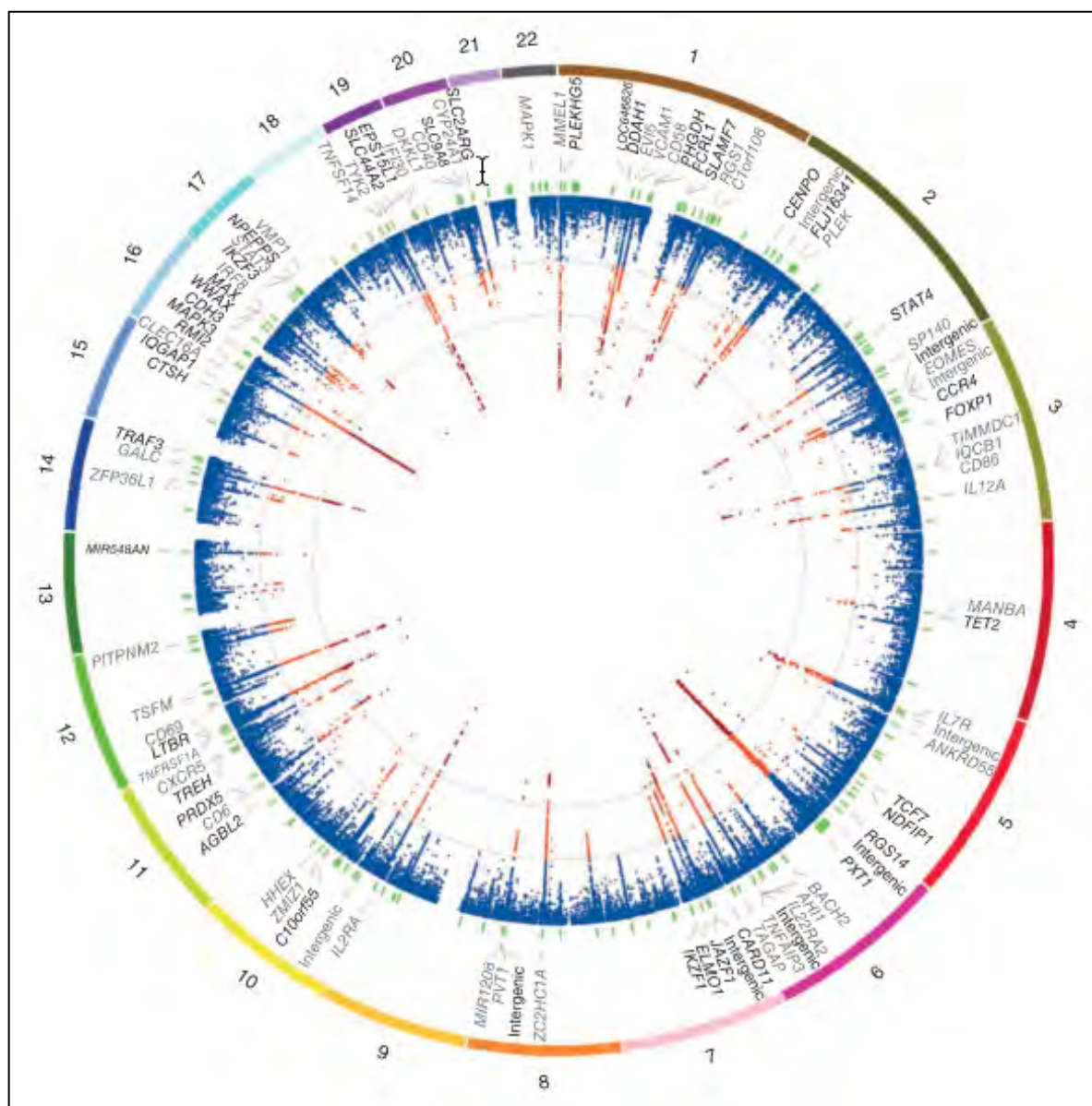
Esto significa que el desequilibrio de ligamiento puede actuar a favor cuando una variante se encuentra muy cerca de un posible gen causante de la enfermedad, pero, por otro lado, puede actuar en contra cuando al existir tantas variantes o genes juntos exista la posibilidad de que las asociaciones observadas se traten de falsos positivos. Esto es un problema inherente a los GWAS. Afortunadamente, y gracias a los extensos estudios de asociación llevados a cabo en otras enfermedades autoinmunes, ha sido posible comparar y contrastar aquellas variantes que necesitan replicación provenientes de los múltiples GWAS y las variantes que necesitan mapeo fino provenientes de los estudios de replicación. Toda esta información ha permitido diseñar baterías específicas de SNPs para diversas enfermedades como es el “Metabochip” (diseñado para el estudio de enfermedades metabólicas) o el “Inmunochip” (diseñado para las enfermedades autoinmunes incluyendo artritis reumatoide, espondilitis anquilosante,

diabetes mellitus tipo 1, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, enfermedad celiaca, EM, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y psoriasis) (Cortes & Brown 2011). Este “Inmunochip” fue inicialmente desarrollado por el WTCCC (WTCCC 2007) y no solo ha permitido realizar un abordaje genético más global de las enfermedades inmunomediadas, sino también abaratar de forma importante los costes de estos estudios genéticos.

Es así como en el año 2013, el IMSGC (IMSGC 2013a) divulga los resultados de lo que se considera el GWAS con mayor número de pacientes y controles publicado hasta la fecha en EM. Para ello, se utilizó como abordaje genético el “Inmunochip” incluyéndose un total de 14.498 pacientes no emparentados con EM y 24.091 controles, con un total de 161.311 SNPs analizados. Los autores examinaron los 57 locus no HLA de riesgo descritos en el estudio del 2011 (IMSGC & WTCCC2 2011) en un intento de replicar dichos hallazgos e incorporar los nuevos locus que se habían descrito posteriormente. Los autores lograron replicar 49 de los más de 60 locus no HLA previamente descritos asociados a sus respectivos SNPs de riesgo (como por ejemplo: *MMEL1*, *EVI5*, *VCAM1*, *CD58*, *RGS1*, *KIF21B*, *PLEK*, *SP140*, *EOMES*, *CD86*, *IL12A*, *NFKB1-MANBA*, *IL7R*, *ANKRD55*, *BACH2*, *IL22RA2*, *TAGAP*, *IL2RA*, *ZMIZ1*, *HHEX*, *CD6*, *TNFRSF1A*, *CLECL1*, *CYP27B1*, *MPHOSPH9*, *ZFP36L1*, *GALC*, *CLEC16A*, *IRF8*, *STAT3*, *TNFSF14*, *TYK2*, *DKKL1*, *CD40*, *CYP24A1*, entre otros) pero también describieron 48 nuevos locus no HLA de susceptibilidad con significación estadística (Figura 43 y Tabla 10) y 13 nuevos locus sugestivos, dando un total general de 110 locus no HLA asociados a la EM. Posteriormente realizaron también un mapeo fino de los 68 locus con mayor asociación.

De forma general, de los 110 locus, 15 se consideraron como “no sinónimos” y 35 se encontraban en desequilibrio de ligamiento con estos últimos. De estos 50 locus, solo 14 podrían producir cambios “*missense*” y, de estos, solo 7 podrían ser potencialmente dañinos (Sawcer et al. 2014). Los nuevos locus descritos en este GWAS actualmente se encuentran en proceso de replicación y validación (Liu & Zhang 2014; Gyllenberg et al. 2014; Paraboschi et al. 2014; Chiang et al. 2000; Nischwitz et al. 2015) en

diferentes poblaciones como la de judíos Askenazis (Khankhanian et al. 2015), población afroamericana (Isobe et al. 2015) y población iraní (Naghbalhossaini et al. 2015). También se están validando mediante su asociación a ciertas características típicas de la enfermedad, como por ejemplo la presencia o no de BOC en el LCR (Goris et al. 2015).



**Figura 43.** Gráfica Circos que muestra los 48 nuevos locus no HLA de susceptibilidad para EM mediante abordaje por Inmunochip (IMSGC 2013a).

**Tabla 10.** Los 48 nuevos locus no HLA de susceptibilidad (IMSGC 2013a).

Cr	#dbSNP	#Inmunochip	A-R	OR (95% IC)	Gen (es) candidato (s)	OEA
1	rs3007421	rs3007421	A	1,12 (1,07-1,18)	<i>PLEKHG5</i>	
1	rs12087340	rs12087340	A	1,22 (1,15-1,29)	<i>BCL10, DDAH1</i>	
1	rs11587876	rs11587876	A	1,12 (1,07-1,17)	<i>DDAH1</i>	
1	rs666930	rs666930	G	1,09 (1,06-1,13)	<i>PHGDH</i>	
1	rs2050568	rs2050568	G	1,08 (1,05-1,12)	<i>FCRL1</i>	TA
1	rs35967351	imm_1_158978428	A	1,09 (1,05-1,13)	<i>SLAMF7</i>	
2	rs4665719	rs4665719	G	1,09 (1,05-1,13)	<i>CENPO</i>	
2	rs842639	imm_2_60948749	A	1,11 (1,08-1,15)	<i>FLJ16341</i>	
2	rs9967792	imm_2_191682680	G	1,11 (1,07-1,15)	<i>STAT4</i>	
3	rs11719975	1kg_3_18760589	C	1,09 (1,05-1,13)	<i>SATB1, KCNH8</i>	
3	rs4679081	imm_3_32988487	G	1,08 (1,04-1,11)	<i>CCR4, GLB1</i>	
3	rs9828629	rs9828629	G	1,08 (1,05-1,12)	<i>FOXP1</i>	
4	rs2726518	rs2726518	C	1,09 (1,05-1,13)	<i>TET2</i>	
5	rs756699	rs756699	A	1,12 (1,07-1,18)	<i>VDAC1, TCF7</i>	
5	Ninguno	imm_5_141486748	C	1,07 (1,04-1,11)	<i>NDFIP1</i>	EII
5	rs4976646	rs4976646	G	1,13 (1,09-1,17)	<i>RGS14</i>	EII
6	rs17119	rs17119	A	1,11 (1,06-1,15)	<i>CD83, JARID2</i>	EII
6	rs941816	rs941816	G	1,13 (1,08-1,18)	<i>PXT1</i>	
6	rs7769192	imm_6_138004348	G	1,08 (1,04-1,12)	<i>OLIG3, TNFAIP3</i>	
7	rs1843938	rs1843938	A	1,08 (1,05-1,12)	<i>CARD11, SDK1</i>	
7	rs706015	imm_7_26981513	C	1,14 (1,09-1,19)	<i>SKAP2, HOXA1</i>	
7	rs917116	imm_7_28139264	C	1,12 (1,07-1,16)	<i>JAZF1</i>	
7	rs60600003	1kg_7_37348990	C	1,16 (1,10-1,22)	<i>ELMO1</i>	EC
7	rs201847125	imm_7_50296113	G	1,11 (1,07-1,15)	<i>C7orf72, IKZF1</i>	
8	rs2456449	rs2456449	G	1,10 (1,06-1,14)	<i>PCAT1, POU5F1B</i>	
10	rs793108	rs793108	A	1,09 (1,06-1,13)	<i>ZNF438, ZEB1-AS1</i>	
10	rs2688608	rs2688608	A	1,07 (1,03-1,10)	<i>CAMK2G, C10orf55</i>	
11	rs7120737	rs7120737	G	1,13 (1,08-1,18)	<i>AGBL2</i>	
11	rs694739	rs694739	A	1,08 (1,04-1,11)	<i>PRDX5, CCDC88B</i>	CBP, PS
11	rs533646	imm_11_118071956	G	1,10 (1,06-1,14)	<i>TREH, DDX6</i>	
11	rs9736016	imm_11_118230104	T	1,10 (1,07-1,14)	<i>DDX6, CXCR5</i>	
12	rs12296430	ccc-12-6373761-G-C	C	1,14 (1,09-1,18)	<i>LTBR, CD27-AS1</i>	
13	rs4772201	1kg_13_98884260	A	1,12 (1,07-1,17)	<i>MIR548AN, TM9SF2</i>	
14	rs12148050	rs12148050	A	1,08 (1,04-1,11)	<i>TRAF3</i>	CBP
15	rs59772922	imm_15_76994521	A	1,11 (1,06-1,15)	<i>MORF4L1, CTSH</i>	
15	rs8042861	rs8042861	A	1,08 (1,05-1,12)	<i>IQGAP1</i>	
16	rs4780346	imm_16_11196307	A	1,09 (1,05-1,13)	<i>CLEC16A, SOCS1</i>	
16	rs6498184	imm_16_11343491	G	1,15 (1,10-1,21)	<i>PRM1, RMI2</i>	EII, PS
16	rs7204270	rs7204270	G	1,09 (1,06-1,13)	<i>MAPK3, CORO1A</i>	
16	rs1886700	imm_16_67243406	A	1,11 (1,06-1,16)	<i>CDH3</i>	
16	rs12149527	rs12149527	A	1,08 (1,05-1,12)	<i>WWOX</i>	
16	rs7196953	rs7196953	A	1,08 (1,04-1,12)	<i>MAF, DYNLRB2</i>	
17	rs12946510	imm_17_35165903	A	1,08 (1,04-1,11)	<i>GRB7, IKZF3</i>	EII, CBP, AR
17	rs4794058	rs4794058	A	1,07 (1,04-1,11)	<i>MRPL45P2, NPEPPS</i>	
19	rs2288904	rs2288904	G	1,14 (1,09-1,19)	<i>SLC44A2</i>	
19	rs1870071	rs1870071	G	1,12 (1,08-1,16)	<i>EPS15L1</i>	
20	rs17785991	imm_20_47872168	A	1,09 (1,05-1,13)	<i>SLC9A8</i>	
20	rs2256814	imm_20_61844427	A	1,11 (1,07-1,16)	<i>SLC2A4RG</i>	

Cr: cromosoma, #dbSNP: número según la dbSNP, A-R: alelo de riesgo

OEA: Otras enfermedades autoinmunes; TA: Tiroiditis autoinmune, EII: Enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), EC: Enfermedad celiaca, CBP: Cirrosis biliar primaria, PS: Psoriasis, AR: Artritis reumatoide



Por último, un gen que también ha sido ampliamente estudiado y debatido, debido a su progresiva evidencia científica referente a su asociación con la EM, es el **VDR** –“*Vitamin D (1,25- Dihydroxyvitamin D3) Receptor*”– (OMIM: 601769) localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q13), que codifica la proteína receptora del núcleo de la 1,25 dihidroxivitamina-D (Baker et al. 1988) y cuya mutación da como resultado el desarrollo del raquitismo tipo 2A dependiente de vitamina D (OMIM: 277440) (Hughes et al. 1988). Los polimorfismos de este gen toman el nombre de las 4 endonucleasas de restricción que los reconocen: *Apal*, *Bsml*, *FokI* y *TaqI* (Miyamoto et al. 1997). La relación de estos polimorfismos con la EM se ha descrito desde ya hace varios años y en diferentes poblaciones, tanto como factor de riesgo (Fukazawa et al. 1999; Steckley et al. 2000; Tajouri et al. 2005; Smolders et al. 2009; Huang & Xie 2012; Narooie-Nejad, Moossavi, Torkamanzahi & Moghtaderi 2015; Narooie-Nejad, Moossavi, Torkamanzahi, Moghtaderi, et al. 2015; Ben-Selma et al. 2015) como de protección (Mamutse et al. 2008; García-Martín et al. 2013; Kálmán & Toldy 2014). Sin embargo, en los principales GWAS descritos hasta ahora, donde se han incluido una gran cantidad de pacientes, no ha sido posible replicar estos resultados, motivo por el cual, este gen no se ha incluido dentro del análisis de las principales variantes de susceptibilidad asociadas a la enfermedad (IMSGC & WTCCC2 2011). De hecho, en una revisión sistemática y metaanálisis realizados recientemente por Tizaoui y colaboradores (Tizaoui et al. 2015), los polimorfismos *Bsml* y *TaqI* no se relacionaron de forma estadísticamente significativa con el riesgo de desarrollar la enfermedad mientras que sí lo hacían los polimorfismos *Apal* y *FokI*.

Finalmente, nuevos locus de susceptibilidad se están describiendo de forma aislada a la espera de futuras replicaciones y validaciones, como es el caso de *CXCL16A181A* (Stojković et al. 2014), *IL23* (Liu et al. 2014), *KIR2DL2* (Ben Fredj et al. 2014), *KIR2DS1* (Bettencourt et al. 2014), *IL18* (Karakas Celik et al. 2014), *IL6* (Hu et al. 2014), *CD24* (Tan et al. 2015; Braliou et al. 2015; J. Huang, Yang, Liang, et al. 2015), *FCRL3* (Yuan et al. 2015), *LILRA3* (Ortiz et al. 2015) y *IL21* (Gharibi et al. 2015).

#### 1.2.4.2.2. Conclusiones referentes a los genes no HLA y EM

En relación a los genes de susceptibilidad no HLA con la EM, a modo de síntesis, se puede concluir que:

- Hasta la actualidad, se han descrito un total de 15 GWAS en EM (Tabla 11), siendo los dos estudios con mayor número de muestras analizadas (IMSGC & WTCCC2 2011; IMSGC 2013a) los que más variantes de riesgo nuevas han aportado al conocimiento genético no HLA de la enfermedad: un total de 110 locus según el último GWAS con abordaje mediante “Inmunochip” (IMSGC 2013a).
- A pesar de la identificación de estos nuevos locus, en conjunto solo justifican aproximadamente un 20% (18-24%) de la heredabilidad en la EM (es decir, cada uno de ellos no explicaría ni el 0,2% de la heredabilidad total), mientras que, como se comentó previamente, el alelo *HLA-DRB1\*15:01* justifica el 10,5%.
- Todos los GWAS llevados a cabo hasta ahora han confirmado como principal locus de susceptibilidad la región *HLA-DRB* ubicada en el brazo corto del cromosoma 6.
- El éxito de estos estudios está en relación directa con el número de muestras analizadas. De hecho, en estudios con  $\leq 800$  muestras no se encontraron nuevas variantes de susceptibilidad.
- Muchos de estos nuevos locus no han podido aún ser replicados y, por tanto, validados en posteriores estudios.
- Afortunadamente herramientas como el “Inmunochip”, mejoran cada vez más tanto la resolución como el precio de los abordajes genéticos de las enfermedades genéticamente complejas entre las cuales se encuentra la EM.

**Tabla 11.** Resumen de los 15 GWAS publicados hasta ahora en EM.

Autor (es)	#Casos	#Controles	#SNPs
IMSGC 2007	931	tríos familiares*	334.923
WTCCC 2007	975	1466	12.374 <sup>a</sup>
Comabella y col. 2008	242	242	428.867
Aulchenko y col. 2008	45	195	250.000
Baranzini y col. 2009	978	883	551.642
De Jager y col. 2009 <sup>b</sup>	2.624	7220	709.690
ANZgene 2009	1.618	3413	302.098
Sanna y col. 2010	882	872	555.335
Nischwitz y col. 2010	590	825	300.000
Jakkula y col. 2010	68	136	297.343
Patsopoulos y col. 2011 <sup>c</sup>	1.453	2176	906.600
IMSGC & WTCCC2 2011 <sup>d</sup>	9.772	17376	475.806
Matesanz y col. 2012	296	801	130.903
Martinelli-Boneschi y col. 2012 <sup>e</sup>	197	234	277.866
IMSGC 2013 <sup>f</sup>	14.498	24.091	161.311

IMSGC: "International Multiple Sclerosis Genetics Consortium"

WTCCC: "Wellcome Trust Case Control Consortium"

ANZgene: "Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium"

\*Tríos familiares: se compararon los 931 casos con sus dos padres como controles

<sup>a</sup>Los SNPs utilizados eran no sinónimos, es decir, SNPs que se asocian a la interrupción en la producción o función proteica siendo, por tanto, causantes de enfermedad

<sup>b</sup>Metaanálisis de los estudios previamente publicados por el IMSGC (2007) y por Baranzini y col. (2009) junto a una cohorte no publicada de 860 pacientes

<sup>c</sup>Metaanálisis de los estudios previamente publicados por De Jager y ANZgene (2009)

<sup>d</sup>Este GWAS se considera, hasta ahora, el mayor estudio con datos validados que existe

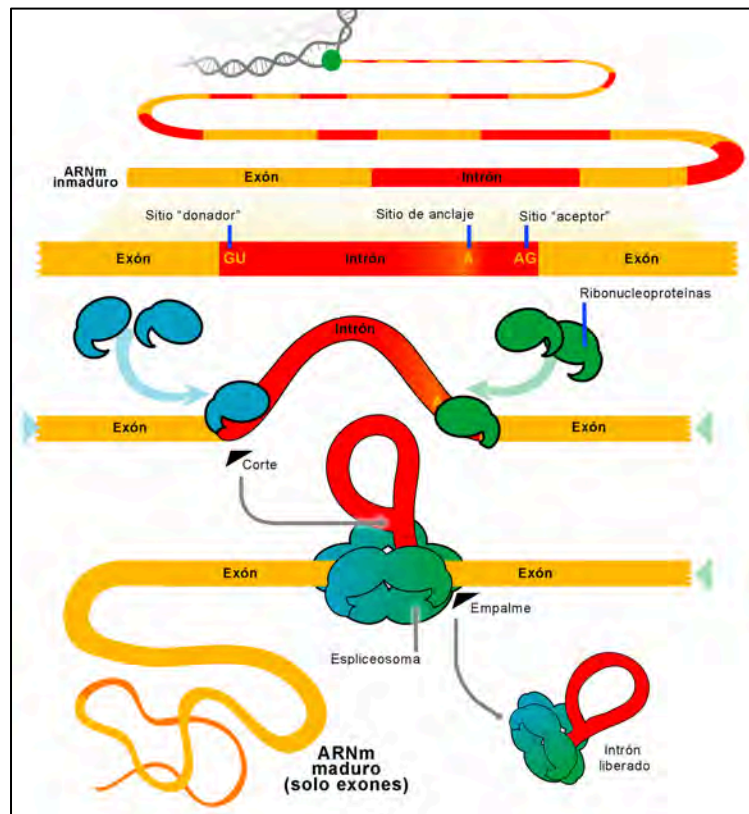
<sup>e</sup>En este GWAS se incluyeron, por primera vez, solo pacientes con formas progresivas de la enfermedad

<sup>f</sup>GWAS con mayor número de pacientes y controles publicado hasta la fecha en EM. El abordaje genético se realizó mediante "Inmunochip" y sus resultados están pendientes de validación

### 1.2.5. El análisis de exómica y la secuenciación de nueva generación

Durante el proceso de transcripción del ADN, se genera ARN mensajero (ARNm) que está compuesto por una secuencia de nucleótidos codificantes, es decir, necesaria para la síntesis de proteínas en los ribosomas. Este ARNm inicialmente contendrá la secuencia complementaria completa del ADN genómico (tanto exones como intrones) pero posteriormente sufre un proceso de maduración mediante el cual, a través de una serie de cortes y acoplamientos ("*splicing*" por su traducción en inglés) de la secuencia inicial, se eliminan los intrones obteniendo solamente la secuencia codificante, es decir, los exones (Figura 44). El conjunto de exones se conoce como exoma

y comprende solo alrededor del 1,5% de todo el genoma humano. Sin embargo, esta pequeña proporción contiene aproximadamente el 85% de todas las variantes conocidas que determinan las enfermedades con base genética. Esto lo convierte en un material genético altamente atractivo y eficiente a la hora de estudiar las bases genéticas de un determinado trastorno.



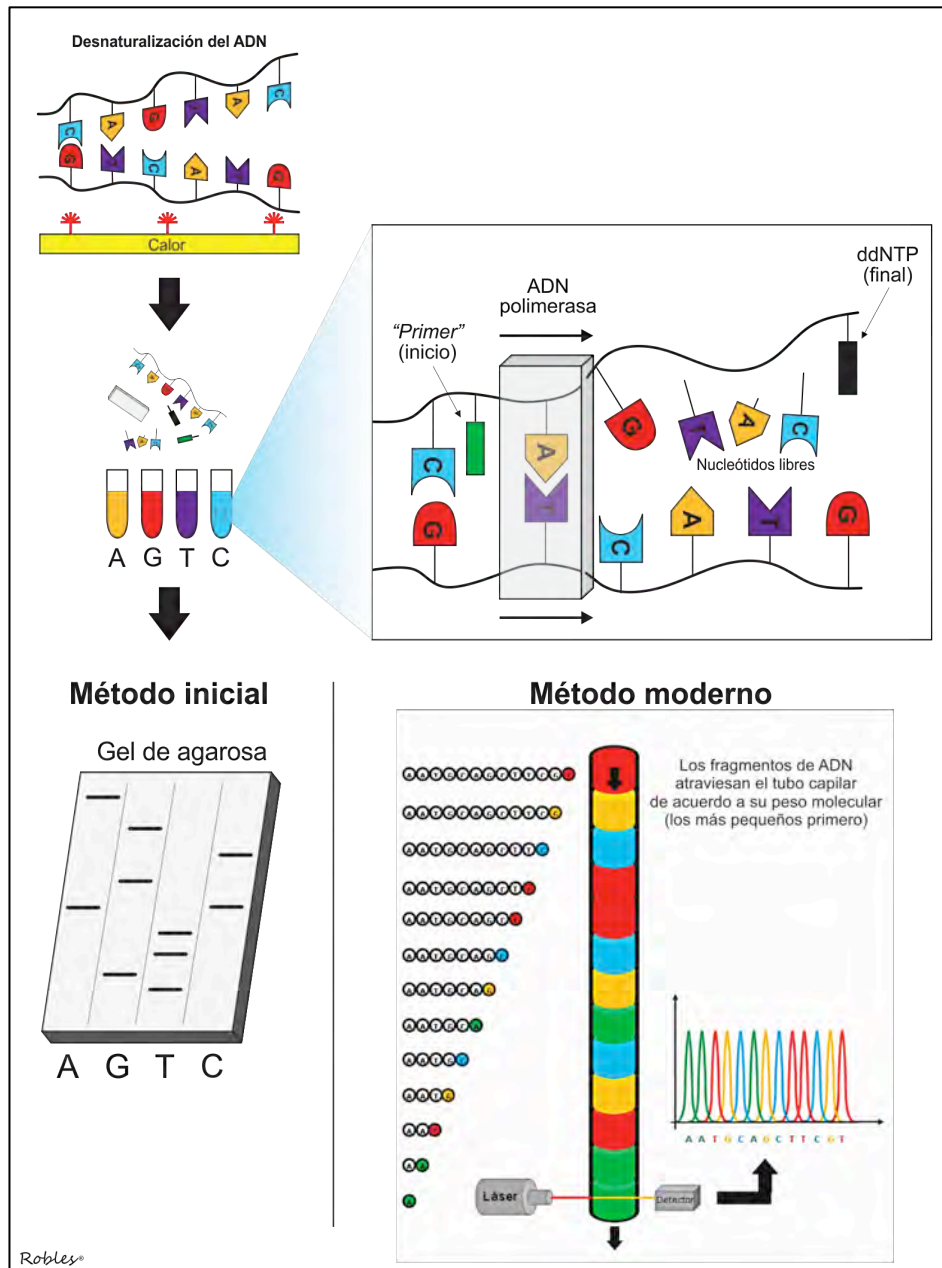
**Figura 44.** Proceso de "splicing" durante la maduración del ARNm (adaptada de Passarge 2007).

### 1.2.5.1. Secuenciación de primera generación y de nueva generación

En términos generales, para conocer la secuencia específica de un fragmento de ADN, se utiliza, desde hace varias décadas, el denominado **método Sanger** que fue descrito por Frederick Sanger en 1975 (Sanger & Coulson 1975). Este método consiste en la desnaturalización del ADN mediante calor con el fin de separar sus dos hebras complementarias. Posteriormente, se coloca una cantidad de este ADN en 4 tubos diferentes (uno para cada tipo

de base nitrogenada) junto a ADN polimerasa, un “*Primer*” específico y complementario a la zona que queremos estudiar y una serie de nucleótidos libres. La ADN polimerasa reconoce la secuencia del “*Primer*” como el inicio de la reacción y comienza a añadir nucleótidos complementarios a la hebra de ADN. Posteriormente, la reacción es interrumpida a nivel de la base nitrogenada que nos interese (adenina, guanina, citosina o timina) mediante la incorporación de nucleótidos químicamente modificados (didesoxinucleótidos, abreviados como ddNTP) que impiden que se produzca el enlace con el siguiente nucleótido. A continuación, el contenido de cada tubo se separa en un gel de agarosa mediante un gradiente eléctrico (electroforesis). De esta manera, si existe algún problema en la lectura de nucleótidos (como en el caso de una mutación), el fragmento generado será anormalmente más grande o más pequeño, por lo que veremos una banda en diferente posición en los pacientes afectados comparado a los controles. En la actualidad, este método se ha automatizado y los ddNTP son marcados por fluorescencia con un color específico para cada base. Dichos ddNTP son analizados mediante un láser en un tubo capilar, por lo que en este caso, los fragmentos más pequeños pasarán antes por el capilar que aquellos fragmentos más grandes, de forma que no solo sabremos el tipo de base (por el color) sino también su peso molecular (por la rapidez con que pasa por el capilar del láser) (Figura 45).

El método Sanger es, hasta ahora, un recurso muy utilizado para secuenciar la zona específica donde se podría encontrar una mutación. Por otro lado, sus principales desventajas son la complejidad del procedimiento, el coste elevado (se calcula que el precio por cada 2.500 pb es de aproximadamente 1 euro), el tiempo que se tarda en obtener una determinada secuencia y la limitación en cuanto a la extensión del fragmento a secuenciar, ya que solo permite analizar fragmentos relativamente pequeños de ADN (entre 100 y 1.000 pb). Por estos motivos, el método Sanger es una opción poco conveniente para realizar un primer abordaje genético, dada la necesidad, cada vez mayor, de secuenciar grandes fragmentos de ADN o incluso el genoma completo.

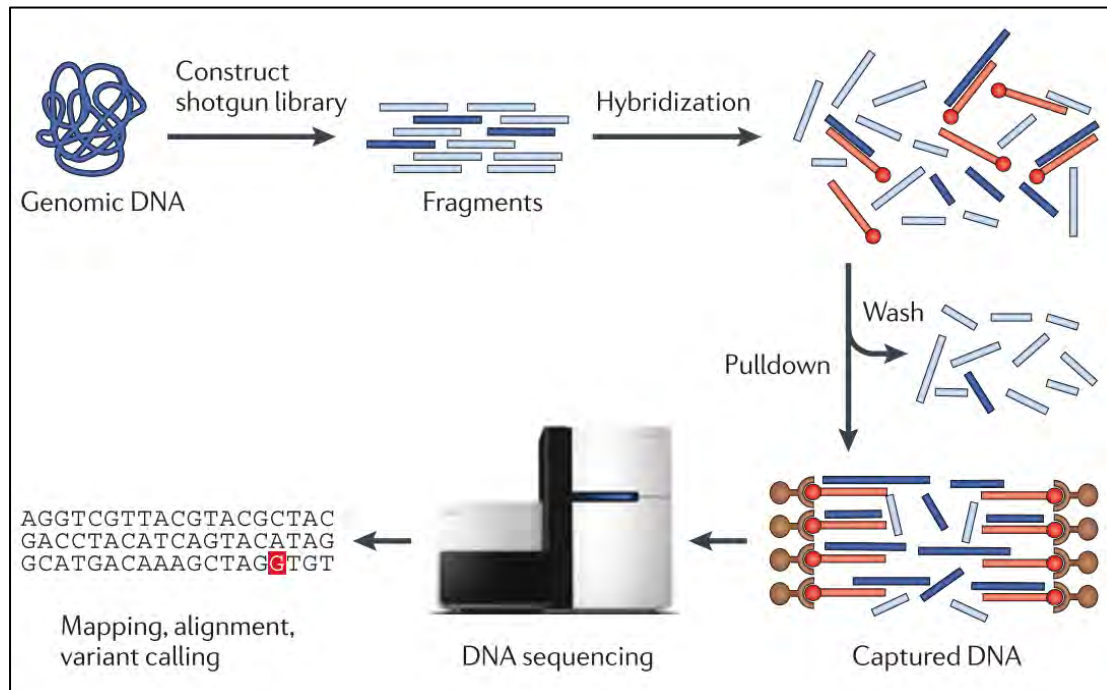


**Figura 45.** Esquema representativo del método de secuenciación de Sanger.

Desde el año 2005, una nueva generación de plataformas para la secuenciación de ADN (las llamadas en inglés "*next generation sequencing*") se encuentran cada vez más disponibles para los investigadores (Metzker 2010), reduciendo no sólo el coste sino también la complejidad en los abordajes. Uno de estos nuevos abordajes ha hecho posible determinar de una forma efectiva y relativamente económica todas las variaciones que se encuentran en el ADN codificante (el exoma); es lo que se conoce como **secuenciación exómica** (Bamshad et al. 2011).

Este procedimiento se basa en la técnica conocida como secuenciación en “tiro de escopeta” (“*shotgun sequencing*” por su traducción al inglés). Dicha técnica se había utilizado por primera vez hace más de 35 años (Staden 1979) pero, no fue hasta los años 90, cuando se logró poner a punto su utilización más generalizada (Edwards & Caskey 1991; Edwards et al. 1990), que llevó a la publicación del genoma completo del *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al. 1995), de la *Drosophila melanogaster* o mosca de la fruta (Adams et al. 2000) y posteriormente del genoma humano (Venter et al. 2001).

Esta técnica consiste en la fragmentación aleatoria del ADN en pequeñas porciones o “*reads*” con un tamaño de aproximadamente 25-500 pb. Al conjunto de estos fragmentos se lo conoce como “librería”. Posteriormente, estos fragmentos son flanqueados por secuencias pequeñas llamadas “adaptadores” para seguidamente ser hibridados con secuencias complementarias correspondientes a exones (provenientes de bibliotecas mundiales de secuencias de nucleótidos codificantes de proteínas). Posteriormente, se añaden ddNTP que son complementarios a la secuencia de los “adaptadores”, de forma que se asegura que la amplificación solo incluye el fragmento cortado en el primer paso. Posteriormente, los fragmentos hibridados (que solo contendrán ADN exómico) son capturados mediante varios métodos (captura por inmunoprecipitación mediada por biotina-estreptavidina, por hibridación en placa o por bolas magnéticas) para pasar a ser amplificados (“secuenciación paralela”), y enriquecidos mediante la secuenciación repetida de los fragmentos (“cobertura”) que se expresa como un número que indica la cantidad de repeticiones de la secuenciación que se ha realizado. Por último, estos fragmentos (que corresponden a los exones) son alineados con una secuencia de referencia que se obtiene ya sea a partir de bases de datos mundiales o a partir de sujetos controles en un proceso conocido como “*variant calling*” (Figura 46).



**Figura 46.** Esquema representativo de la secuenciación genética mediante análisis de exómica (Bamshad et al. 2011).

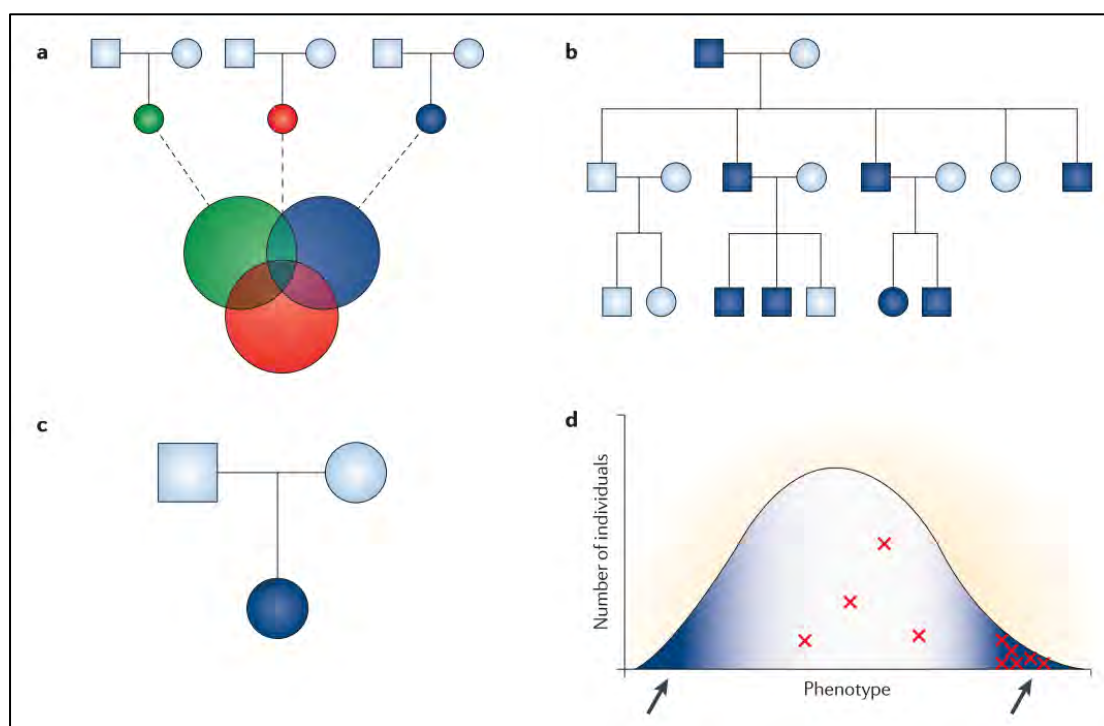
Una vez filtrados los resultados para eliminar artefactos técnicos y excluir las variantes comunes (aquellas con una frecuencia alélica  $\geq 5\%$ ), las diferencias observadas se analizan según la presencia de SNPs o de inserciones-delecciones (indel). La prioridad recae sobre aquellas variantes que afecten los nucleótidos altamente conservados, y aquellas que tengan un gran efecto sobre la función proteica.

El siguiente paso es determinar si las variantes observadas son o no causales, que dependerá del modelo de herencia observado. De esta forma, para modelos autosómicos recesivos, lo esperable es que los individuos afectados sean homocigotos para una variante rara o heterocigotos para dos variantes raras diferentes, y que cada progenitor sea portador de una de estas variantes. En cambio para modelos autosómicos dominantes o variaciones esporádicas, lo esperable es que el individuo afectado posea solo una variante rara y que esta sea “de novo” si ninguno de los progenitores está afectado.



En el caso de enfermedades complejas como la EM, donde el modelo de herencia es “no mendeliano”, se realiza el análisis de las variantes observadas tanto para el modelo autosómico recesivo como para el autosómico dominante. Finalmente, los resultados son reportados según el gen afectado, su localización en el genoma, la cobertura y la predicción de su consecuencia funcional.

Pero, qué muestras o sujetos secuenciar mediante este abordaje?. Existen básicamente cuatro estrategias para seleccionar y analizar las muestras o sujetos a secuenciar mediante esta técnica (Figura 47).

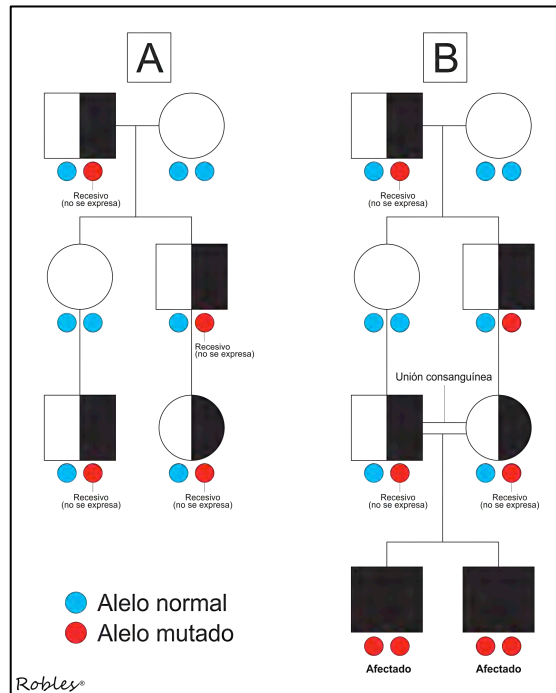


**Figura 47.** Las 4 estrategias de análisis de exómica (Bamshad et al. 2011).

1) La primera estrategia (Figura 47, a) consiste en analizar individuos no emparentados y comparar los hallazgos respecto a una secuencia de referencia disponible en bases de datos mundiales (como, por ejemplo, la dbSNP) o respecto a sujetos controles no afectados apareados por edad, sexo, raza, etc. Esta estrategia suele tener poco rendimiento, ya que solo un

2% de las variantes identificadas son en realidad “de novo”. Además, en una proporción baja pero no despreciable, las secuencias de referencia están contaminadas por variantes patológicas, que, a su vez, provoca resultados falsos negativos, especialmente en trastornos recesivos. Sin embargo, en ciertos casos esta estrategia ha sido suficiente para el descubrimiento de las bases genéticas de un trastorno mendeliano (Ng et al. 2010).

2) La segunda estrategia (Figura 47, b) es la utilizada en familias multiplex. En este caso, cuando se dispone de información sobre el posible patrón de herencia es cuando más rentables pueden ser los resultados, ya que mayor será la probabilidad de escoger al o a los individuos más informativos. En el caso de que se sospeche un patrón de herencia recesivo en familias consanguíneas, el mapeo por homocigosis (Alkuraya 2013) en base a los datos provenientes de GWAS, probablemente sea la mejor herramienta para detectar el o los individuos susceptibles para el estudio exómico. En este caso, la exómica reemplazaría la secuenciación por Sanger. Para entender un poco mejor este apartado y el significado del mapeo por homocigosis, se va a analizar un ejemplo práctico (Figura 48). Si estudiamos genéticamente a una determinada familia, observaremos que una serie de alelos potencialmente patogénicos no se expresan, ya que son heredados de forma recesiva, siendo los individuos portadores heterocigotos para dichos alelos (Figura 48, A). Si en vez de esto, analizamos una familia consanguínea, veremos que la endogamia favorecerá la expresión fenotípica de dichos alelos potencialmente patogénicos debido al aumento de homocigosis (Figura 48, B) que, a su vez, aumentará significativamente la probabilidad de identificar locus patogénicos en los individuos afectados que de otra forma no se habrían expresado dada su baja penetrancia (Bulayev et al. 2009). Es lo que se conoce como efecto Wahlund (Wahlund 1928) y su aplicación se ha utilizado para el desarrollo del mapeo por homocigosis durante años (Lander & Botstein 1987).



**Figura 48.** Esquema representativo del mapeo por homocigosis para familias multiplex (adaptada de Alkuraya 2013).

En el caso de una familia multiplex donde el patrón de herencia no esté claro, como es el caso de las enfermedades complejas, secuenciar los individuos emparentados más distantes en el árbol genealógico disminuye el número de variantes compartidas por dichos individuos, por lo que aumenta la probabilidad de encontrar diferencias significativas. Posteriormente, si no se encuentran diferencias, se puede realizar una estratificación funcional, consistente en escoger genes candidatos de acuerdo a su papel en una vía biológica determinada que tenga que ver con la enfermedad en cuestión o sus interacciones con genes o proteínas que causen un fenotipo similar.

3) La tercera estrategia (Figura 47, c) también se basa en el estudio de familias, concretamente tríos familiares (es decir el paciente afectado y sus dos padres). Esta estrategia se ha utilizado para el descubrimiento de variantes “de novo” tanto para enfermedades monogénicas (Hoischen et al. 2010) como para enfermedades complejas como el retraso mental (Vissers et al. 2010), la esquizofrenia (Girard et al. 2011) y el autismo (O’Roak et al. 2011).

4) La cuarta estrategia (Figura 47, d) es la denominada “de fenotipos extremos”. En este caso se escogen individuos no emparentados que se encuentren en ambos extremos de un fenotipo conocido, por ejemplo individuos con factores de riesgo cardiovasculares comparados con individuos con infarto agudo de miocardio o ictus (Cohen et al. 2004).

En definitiva, teniendo en cuenta que alrededor del 85% de las variaciones patogénicas se encuentran en las regiones codificantes, una gran proporción de variantes raras que producen efectos deletéreos se encontrarán dentro de dichas regiones. De esta forma, la principal ventaja de la secuenciación exómica es la resolución en sus resultados, además de ser un abordaje mucho más rápido y económico que el método tradicional de Sanger (Sanger & Coulson 1975; Sanger et al. 1977), permitiendo analizar grandes porciones de ADN e incluso el genoma completo. A diferencia de los estudios de ligamiento o los estudios de asociación, donde se presupone que un determinado marcador genético (RFLP, microsatélites o SNPs) se encuentra ligado a una variante que probablemente explique parte del riesgo a padecer la enfermedad (con una resolución que es capaz de identificar solo variantes comunes en el caso de los GWAS), la exómica revela la secuencia de todo el conjunto de nucleótidos implicados en la codificación de proteínas, incluyendo, por tanto, la variantes raras (aquellas con una frecuencia alélica <5%) que en el caso de los GWAS muchas veces no se detectan. Por otro lado, dentro de sus principales desventajas tenemos la falta de cobertura de todo el exoma, ya que se cree que entre el 5-10% de éste se pierde durante la secuenciación, la dificultad de establecer las secuencias que realmente codifican las proteínas (por lo que no todas las secuencias pueden ser alineadas con la misma eficiencia a la secuencia de referencia) y por último, la falta de métodos adecuados y consensuados de filtración de los resultados con el objetivo de obtener un número manejable de variantes que después puedan ser analizadas de forma más específica, especialmente en el caso de enfermedades complejas donde la baja penetrancia de dichas variantes puede causar resultados falsos negativos.

### 1.2.5.2. Estudios de análisis exómico en EM

Solo tres estudios a nivel mundial, dos de ellos a partir de muestras sanguíneas y uno a partir de linfocitos T CD4+, han sido llevados a cabo mediante abordaje exómico en EM. Los dos primeros han sido capaces de detectar variantes raras previamente no asociadas a EM pero en desequilibrio de ligamiento con genes que se han asociado al riesgo de desarrollar la enfermedad (*CYP27B1* y *TYK2*) según los resultados provenientes de los GWAS.

Ramagopalan y colaboradores (Ramagopalan et al. 2011) realizaron un abordaje exómico en 43 individuos escogidos al azar de familias multiplex con 4 o más miembros afectados distribuidos en más de una generación. Se generaron porciones de 76 pb con una cobertura promedio de x70. Se obtuvieron más de 58.000 SNPs y más de 5.000 indel por individuo sin observarse ninguna predicción sobre variantes con potencial poder dañino en el estudio comparativo. Posteriormente, tomando como base los 57 locus de riesgo descritos por el IMSSGC y el WTCCC en el GWAS del 2011 (IMSSGC & WTCCC2 2011) y comparando las variantes expresadas en sus 43 probandos, escogieron solo aquellas variantes identificadas como dañinas y que además fueran raras (es decir con una frecuencia alélica <5%). Esto lo consiguieron cotejando las variantes con dos bases de datos mundiales, el “1000 Genomes Project” y el “HapMap Project”. Los autores identificaron 3 variantes en los genes *CBLB*, *IL7R* y *CYP27B1*, y genotiparon estas variantes en una cohorte de validación compuesta de 3.046 tríos familiares observándose solo un SNPs (rs118204009\*T) con asociación estadísticamente significativa ( $p=1 \times 10^{-5}$ ) en el gen *CYP27B1* que producía un cambio de arginina a histidina en la posición 389 (R389H). Esta variante fue posteriormente genotipada en 422 pares de hermanos y en 1.873 controles sanos, y se confirmó que la variante era transmitida desde 4 progenitores heterocigotos a 4 pares de hermanos, no observándose su expresión en ninguno de los controles sanos ni en las bases de datos previamente mencionadas. Posteriormente, utilizando la cohorte de tríos familiares y la de pares de hermanos (en total 3.468 pacientes), los autores genotiparon otros 9

SNPs no sinónimos que se han descrito como potencialmente dañinos para el mismo gen, encontrando otras dos variantes (rs118204012\*C y rs118204011\*A) previamente asociadas al raquitismo tipo 1 dependiente de vitamina-D (OMIM: 264700) (Wang et al. 2002). Dado este último hallazgo, los autores seleccionaron 96 pacientes con EM no relacionados con las cohortes antes mencionadas en quienes se había observado niveles séricos bajos de 1,25-dihidroxi-vitamina-D (calcitriol) al menos en dos ocasiones en un año y secuenciaron todo el gen *CYP27B1*. Los resultados mostraron 1 paciente portador de R389H y otros dos con sendas mutaciones asociadas al raquitismo tipo 1 (R252C y Y413C). Aunque la frecuencia de estas mutaciones en el total de pacientes con EM era muy baja (0,05%), no se encontraron en ninguno de los controles sanos, por lo que los autores asociaron el estado portador en heterocigosis de las mutaciones a los bajos niveles de calcitriol y la presencia de dichas mutaciones en homocigosis con el raquitismo tipo 1. Este estudio fue el primero en describir una variante considerada como rara (<5%) asociada a la EM mediante un abordaje exómico, haciendo referencia al posible uso futuro de este tipo de abordaje en enfermedades complejas.

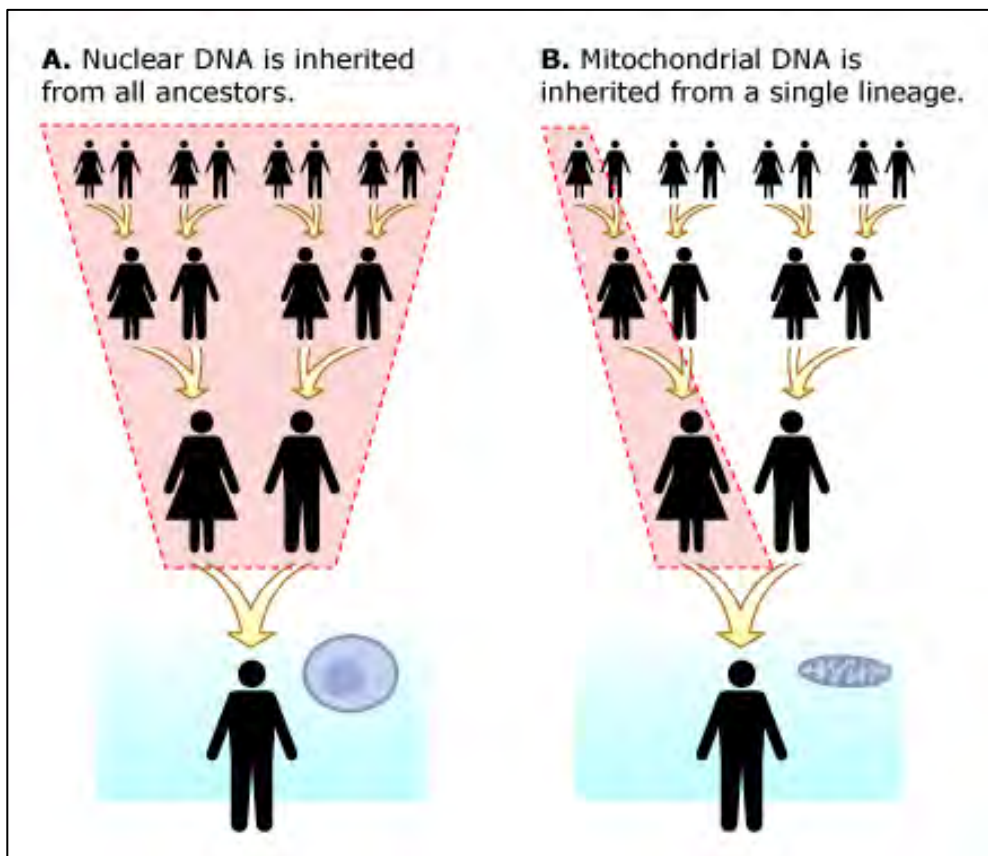
Dyment y colaboradores (Dyment et al. 2012), a partir de muestras obtenidas de una extensa e inusual familia con 15 miembros afectados de EM previamente descrita por ellos mismos (Dyment et al. 2002), seleccionaron de forma aleatoria a 4 de estos individuos para realizar secuenciación exómica. Se generaron porciones de 76 pb con una cobertura promedio de x70. Se obtuvieron más de 57.000 SNPs y más de 5.000 indel por individuo, de los cuales más de 20.000 (entre SNPs e indel) eran variantes compartidas entre los cuatro. Posteriormente, para refinar los resultados, los autores realizaron un estudio de ligamiento partiendo de un modelo estadístico de "variante rara" obteniendo un "LOD score" máximo de 1,75. Aunque no se demostró ligamiento ("LOD score" <3), los autores usaron estos datos para filtrar aquellas variantes que se habían establecido como dañinas en las regiones con mayor ligamiento, obteniéndose un total de 763 variantes. Se observó que, al comparar cuántas de estas variantes eran compartidas entre los diferentes individuos, solo un SNP (rs55762744) en el brazo corto del

cromosoma 19 (19p13) cumplía este criterio, correspondiendo a una mutación en el exón 3 del gen *TYK2* que producía un cambio de alanina por treonina en la posición 53 (A53T). Curiosamente este gen ya había sido previamente descrito en los estudios de asociación (WTCCC 2007) como un posible candidato de riesgo para pacientes con EM. Ninguno de los individuos era portador de los SNPs previamente relacionados con este gen y reportados en el GWAS del 2011 (rs8112449\*G) (IMSGC & WTCCC2 2011) ni en el del 2013 mediante “Inmunochip” (rs34536443\*C) (IMSGC 2013a). De hecho, el SNP reportado en el GWAS del 2013 se considera como protector para el desarrollo de la enfermedad, un efecto totalmente opuesto al observado con el SNP descrito en esta familia. Se genotipó la variante en el resto de la familia manifestándola el 72% de los afectados y el 47% de los no afectados. En una cohorte de validación compuesta por 2.104 tríos familiares, los autores observaron la variante solo en el 0,8% de los afectados. Por lo tanto, estos hallazgos sugerían que rs55762744 (A53T) podría ser una variante de riesgo para EM en esta familia en concreto, pero que otros factores genéticos o ambientales también podían influir en el riesgo de EM, debido a que no todos los portadores de la misma desarrollaban la enfermedad.

El último artículo publicado en EM utilizando esta aproximación es de Kemppinen y colaboradores (Kemppinen et al. 2014) que realizaron un estudio piloto utilizando por primera vez la secuenciación exómica de linfocitos T CD4+ provenientes del LCR de dos pacientes con EMRR. Se realizó también la secuenciación del ADN a partir de células de sangre periférica que sirvió como línea germinal de referencia. Los resultados mostraron un promedio de 1.784 aparentes variaciones entre ambas secuencias. La mayoría de estas variaciones (≈90%) correspondía a artefactos más que a mutaciones reales según el análisis de calidad. Sin embargo, filtrando los resultados en base a los hallazgos provenientes de los GWAS, los autores reportaron tres posibles mutaciones somáticas asociadas al gen *CD6* que no alcanzaron significación estadística. Aunque este estudio no reportó resultados significativos, abre la puerta hacia una nueva aplicación del abordaje exómico en pacientes con EM.

### 1.2.6. El ADN mitocondrial y la EM

A diferencia del ADN nuclear, que está sujeto a una gran cantidad de polimorfismos debido al proceso de recombinación y entrecruzamiento entre el material genético de ambos progenitores (Figura 49, A), el ADN mitocondrial tiene la característica única de transmitirse sin recombinarse y siempre por vía materna (Passarge 2007) (Figura 49, B).

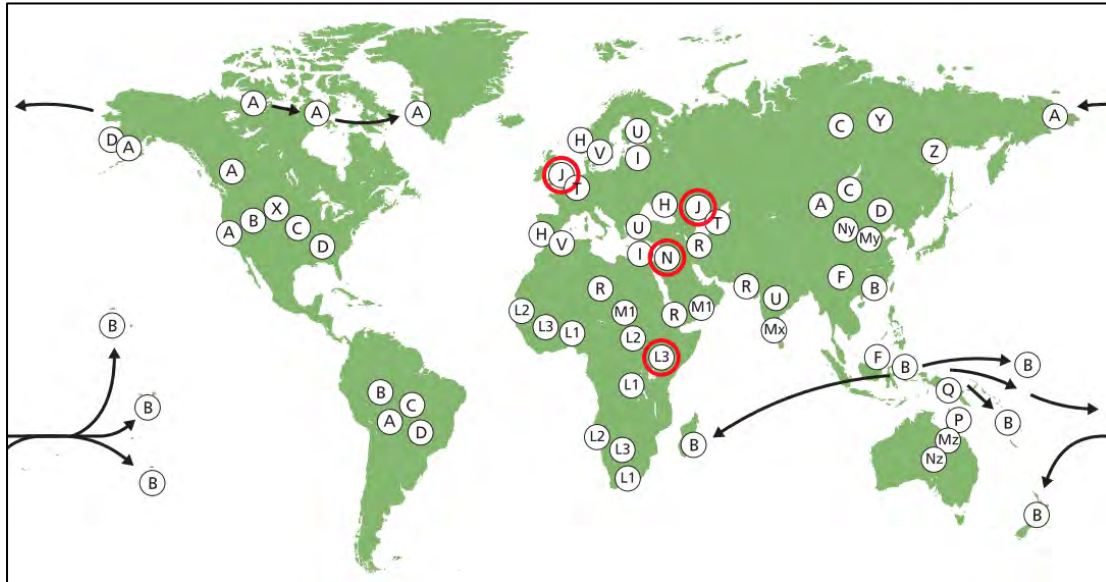


**Figura 49.** Esquema de transmisión del ADN mitocondrial (Passarge 2007).

Esto se debe a que durante la fecundación del óvulo, las mitocondrias del espermatozoide son digeridas y destruidas, utilizándose solo el ADN haploide del mismo. Esta ventaja que aporta el ADN mitocondrial lo convierte en una diana crucial para el estudio de genética de poblaciones y ha aportado información trascendental sobre cómo la especie humana migró desde África hace más de 150.000 años (Der Sarkissian et al. 2015).

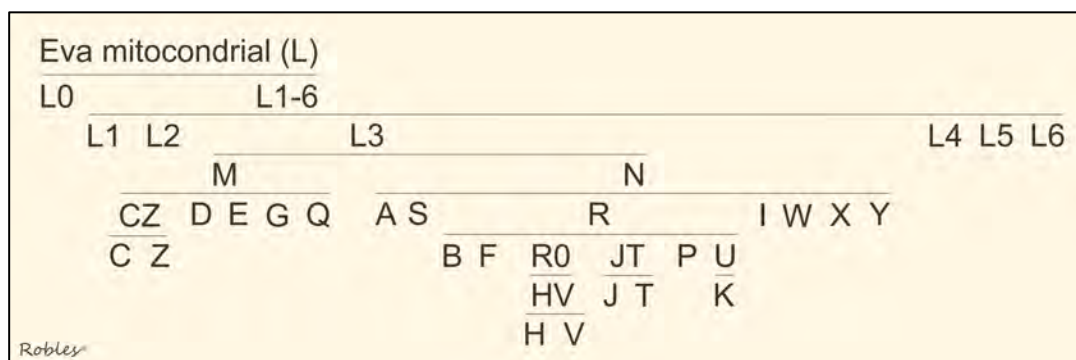


Para ello, se determinan los denominados haplogrupos, que se han descrito en diferentes áreas geográficas, en diferentes grupos poblacionales y en un momento determinado de la historia (Figura 50).



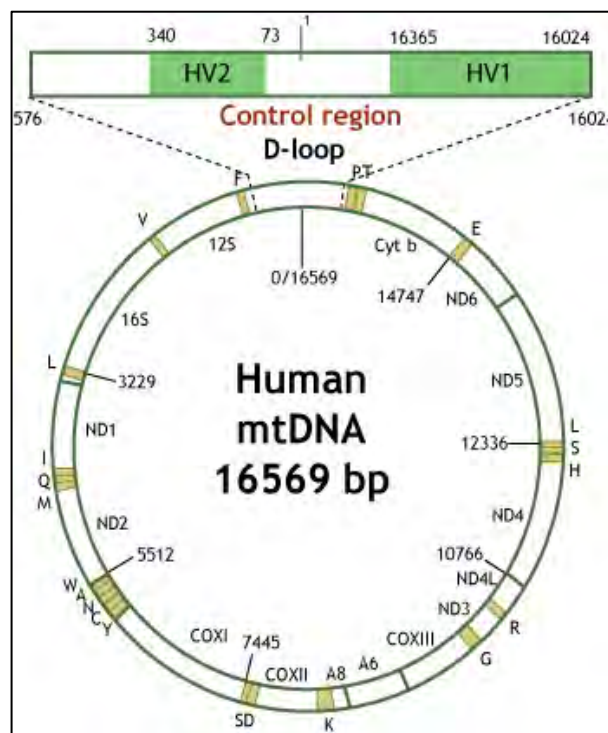
**Figura 50.** Distribución geográfica de los principales haplogrupos mitocondriales (Compston et al. 2006).

La nomenclatura utilizada para identificar los haplogrupos se basa en las letras mayúsculas de la A a la Z, designadas aproximadamente según el orden de su descubrimiento, aunque el primer gran haplogrupo descrito fue el L (la primera letra de la palabra Linaje) y posteriormente el M y el N. A partir de aquí se pueden asignar letras o números dependiendo de los subgrupos dentro del haplogrupo mayor (Nesheva 2014) (Figura 51).



**Figura 51.** Divisiones y subdivisiones de los haplogrupos mitocondriales.

Un haplogrupo está definido por uno o varios polimorfismos localizados en una zona denominada “región hipervariable 1 de la región control” (HV1) (Figura 52) que corresponde a un fragmento de 568 pb numeradas desde la posición 16.001 a la 16.568 del ADN mitocondrial. Cuando se describe uno o un grupo de polimorfismos que determinan el haplogrupo se suelen especificar los 3 últimos números de la posición junto al cambio de nucleótido observado (por ejemplo, M5 129,223,291,298) donde M5 corresponde al nombre del haplogrupo y el resto de números las diferentes posiciones dentro de la HV1 donde se encuentran los respectivos polimorfismos.



**Figura 52.** La HV1 y su localización dentro del ADN mitocondrial (Passarge 2007).

Si nos referimos a genética de poblaciones en términos de ADN mitocondrial, la población europea se asentó en el Paleolítico hace unos 40.000 años, correspondiendo a los haplogrupos U5, H, V, I, W, T y K. Después de la última glaciación, nuevos flujos poblacionales provenientes de la península Ibérica (haplogrupo H para la población vasca y haplogrupo V para el resto) y de Anatolia (haplogrupo J) hace unos 8.500-10.000 años, acabaron de

completar el conjunto de haplogrupos más importantes a nivel europeo (Compston et al. 2006).

Tal y como lo han demostrado los extensos estudios epidemiológicos y genéticos, la EM es más frecuente en población caucásica europea, especialmente aquella proveniente de Europa del Norte, por lo que el análisis de los haplogrupos en esta población nos puede aportar información crucial sobre la susceptibilidad subyacente. Las primeras migraciones provinieron de Escandinavia (Vikingos y Godos) y se asentaron en el norte de la Península Británica, Normandía, Cerdeña, Sicilia y el sur de Italia. Estos flujos migratorios trajeron fundamentalmente los haplogrupos J y T, que se han visto asociados de forma significativa a la EM, excepto en población vasca donde predomina el haplogrupo H (Otaegui et al. 2004).

Recientemente, estos hallazgos han sido replicados a gran escala por Tranah y colaboradores (Tranah et al. 2015) en más de 7.000 pacientes y más de 14.000 controles provenientes de 7 países europeos cuyas muestras habían sido analizadas previamente en uno de los GWAS con mayor población publicado hasta ahora (IMSGC & WTCCC2 2011), observando que los portadores de los haplogrupos JT, J y T tenían mayor riesgo de desarrollar EM y, en especial, las formas progresivas de la enfermedad. Ahora bien, no se conoce si este estado de portador se asocia a algún mecanismo patogénico mediado por la mitocondria, ni si, de ser así, podría justificarse por algún polimorfismo o mutación específicos que explicara parte de la heredabilidad de la EM.

Tal y como se ha comentado previamente, existe disfunción mitocondrial desde el inicio de la cascada inflamatoria que produce daño axonal y desmielinización mediadas por radicales libres y estrés oxidativo (Lu et al. 2000; Dutta et al. 2006; Mahad et al. 2008; Mahad et al. 2009; Mao & Reddy 2010; Campbell et al. 2011). De hecho, uno de los fármacos orales recientemente aprobados para el tratamiento de base de la enfermedad (teriflunomida; Aubagio®) (O'Connor et al. 2011; Confavreux et al. 2014) tiene un mecanismo de acción que actúa en la mitocondria al bloquear la síntesis de pirimidinas en los linfocitos activados disminuyendo, de esta

forma, la respuesta inflamatoria. Sin embargo, el papel específico de la mitocondria en la patogenia de la enfermedad no es del todo conocido.

La mayoría de las poblaciones, exceptuando algunas que están aisladas, han estado expuestas a prolongados periodos de adiciones y combinaciones genéticas, por lo que la probabilidad de encontrar una mutación fundadora es bastante improbable, y aunque algunos autores han intentado relacionar la EM a mutaciones concretas (Andalib et al. 2013), los estudios de replicación no han obtenido resultados positivos (Andalib et al. 2015a; Andalib et al. 2015b). Siguiendo este razonamiento, el estudio de poblaciones con cierto aislamiento genético sería de gran interés. En esta línea, Harding y colaboradores (Harding et al. 1992) describieron un grupo de 8 mujeres con antecedentes maternos de neuropatía óptica hereditaria de Leber – NOHL – (OMIM: 535000) y un cuadro clínico tipo EM (síntomas compatibles con brotes que afectaban otras vías diferentes a la visual). De hecho, 7 pacientes presentaban lesiones en la RM compatibles con desmielinización. Todos los casos tenían una de las 18 variantes alélicas mitocondriales más frecuentemente relacionadas con la NOHL, la denominada *MTND4\*LHON11778A* (rs199476112). Posteriormente, en una revisión de NOHL hecha por Riordan-Eva y Harding (Riordan-Eva & Harding 1995), el 45% de 24 mujeres con la variante antes descrita asociaban una enfermedad tipo EM. Desde entonces, la llamada **enfermedad de Harding**, considerada como la asociación de NOHL y síntomas acompañantes tipo EM solo ha sido descrita en hombres (Bhatti & Newman 1999; Olsen et al. 1995; Horváth et al. 2000; Tran et al. 2001; Buhmann et al. 2002). No obstante, nuevas revisiones en series de pacientes con NOHL, no han podido asociar ninguna de las 18 variantes alélicas con el desarrollo de síntomas o lesiones compatibles con un proceso desmielinizante tipo EM, por lo que queda por resolver si es que se trata de una entidad aislada o de un ejemplo de la heterogeneidad clínica de la EM. Probablemente la primera opción sería la más plausible, dada la cantidad de pacientes descritos a nivel mundial, aunque hasta ahora no sabemos si las variantes del ADN mitocondrial son las que en realidad dirigen o predisponen el proceso patogénico de la EM y de qué forma lo harían.

### 1.2.7. Conclusiones finales referentes a la genética de la EM

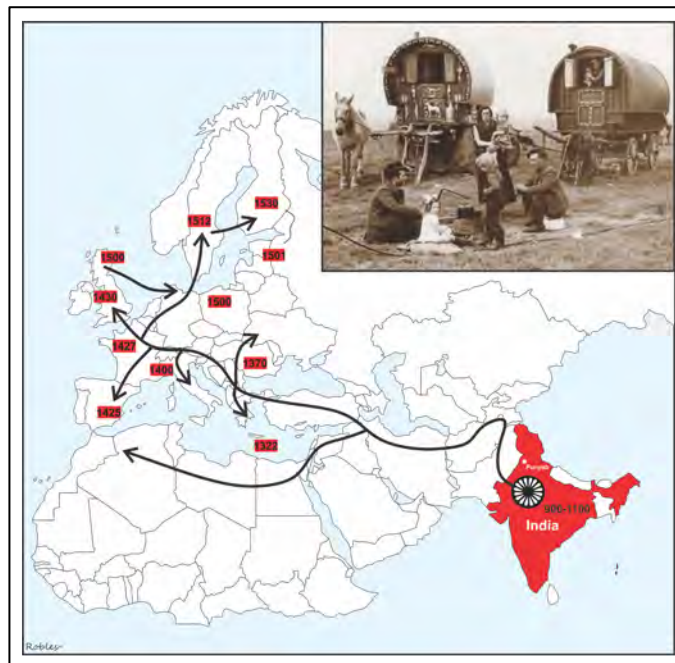
La EM es una enfermedad compleja, donde factores genéticos y ambientales interactúan de una forma no del todo conocida en el desarrollo de un proceso caracterizado por la desmielinización y la degeneración axonal.

La agregación familiar, la concordancia en gemelos homocigotos y las diferentes prevalencias en distintos grupos ancestrales, sugieren que los factores genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, hasta la actualidad nuestro conocimiento solo nos ha permitido explicar  $\approx 30\%$  de la heredabilidad total, siendo el alelo *HLA-DRB1\*15:01*, en el brazo corto del cromosoma 6, el más robustamente asociado, justificando  $\approx 10\%$  de este porcentaje. Fuera de la región HLA, se han descrito otros 110 locus de riesgo que en conjunto justifican  $\approx 20\%$  de la heredabilidad. Por consiguiente, la mayor parte de la heredabilidad de la EM está aún sin resolver.

## 1.3. ESTUDIOS EN POBLACIÓN GITANA

### 1.3.1. Los orígenes de la población gitana

La población gitana también conocida como pueblo “rom”, “roma” o “romaní”, tal y como la conocemos hoy en día, es el resultado de múltiples migraciones desde la India hacia Europa occidental (Gresham et al. 2001). Su origen es todavía hoy objeto de controversia pero se cree que provienen de una región del norte de la India conocida como Punyab (Figura 53). Esta teoría se basa en las similitudes entre sus rasgos lingüísticos (la lengua romaní es una lengua índica muy similar al panyabí), creencias y costumbres. Al tratarse de una cultura ágrafa y, por tanto, al no haber registros históricos escritos, hacen que su procedencia sea todo un misterio. Es importante señalar también que los primeros grupos de gitanos llegados a la Europa occidental fantaseaban acerca de sus orígenes, atribuyéndose una procedencia misteriosa y legendaria. La palabra española “gitano” parece provenir de la palabra “egiptano” y se aplicó a este pueblo por creerse que provenían del antiguo Egipto (Fraser 1995).



**Figura 53.** Ruta de migración del pueblo gitano desde la India a Europa (Fundación Secretariado Gitano 1982).

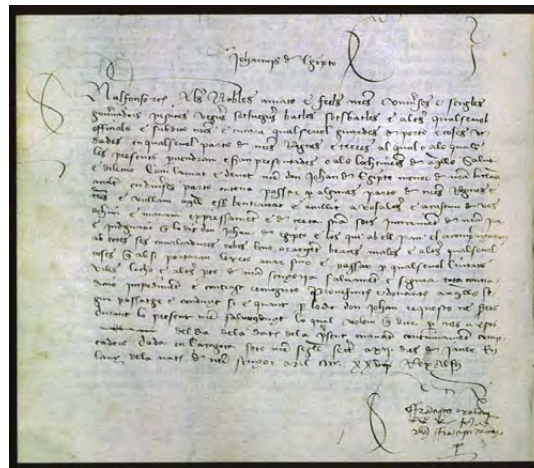
Las primeras migraciones se habrían producido durante los siglos V y X a través de Persia y Asia menor hacia áreas dentro del imperio Bizantino, donde su llegada data de los siglos XI a XII. Posteriormente entre los siglos XIV y XV, nuevas migraciones los establecieron en la península Balcánica (gitanos de los Balcanes) y Europa central específicamente en la región de Valaquia, actualmente correspondiente al sur de Rumanía (gitanos de Valaquia), continuando hacia el resto de Europa occidental (Fernández et al. 2008).

Más tarde, se produjeron 3 nuevas olas de migración: la primera durante el final del siglo XIX, después de la abolición de la esclavitud gitana en Rumanía; la segunda fuera de Yugoslavia, durante los años 60 y 70; y la tercera durante las dos últimas décadas siguiendo los cambios políticos y económicos en Europa del Este (Gresham et al. 2001; Morar et al. 2004).

La llegada de los gitanos a la Península Ibérica también es motivo de controversia. Se distinguirían así los gitanos del norte que llegaron por Perpiñán y de los cuales se tiene mayor documentación, los gitanos del sur, procedentes de Tánger atravesando el estrecho de Gibraltar, y los gitanos del este, que llegaron por la ribera mediterránea hacia el 1480 probablemente a causa de la caída de Constantinopla y del imperio Bizantino.

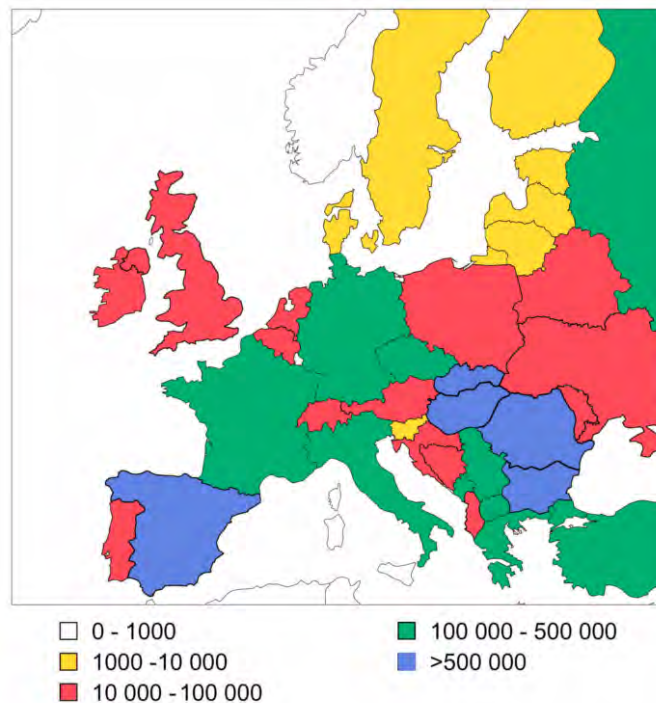
El primer documento conservado de su llegada a la Península Ibérica data de 1425 donde Alfonso V "El Magnánimo" concede salvoconducto a Tomás Sabba peregrino a Santiago de Compostela (Gresham et al. 2001). (Figura 54).

En el texto reza: *"A todos y cada uno de los nobles, amados y fieles nuestros... os decimos y mandamos... bajo pena de nuestra ira e indignación, que el mencionado don Tomás de Egipto y los que con él irán y le acompañan, con todas sus cabalgaduras, ropas, bienes, oro, plata, alforjas y cualesquiera otras cosas que lleven consigo, sean dejados estar y pasar por cualquier ciudad, villa, lugar y otras partes de nuestro señorío a salvo y con seguridad (...)"*



**Figura 54.** Carta de Alfonso V “El Magnánimo” concediendo salvoconducto a Tomás Sabba peregrino a Santiago de Compostela (Gresham et al. 2001).

Actualmente la población gitana en Europa alcanza los 10 millones de personas, siendo en España de aproximadamente unos 500.000 a 600.000 miembros (Kalaydjieva et al. 2001) (Figura 55). Andalucía es la comunidad autónoma con mayor número de gitanos, aproximadamente unos 300.000 en la actualidad (Fundación Secretariado Gitano 1982; Ramal et al. 2001).



**Figura 55.** Distribución geográfica y frecuencia de la población gitana en Europa (Kalaydjieva et al. 2001).



### 1.3.2. Estudios genéticos en población gitana

#### 1.3.2.1. La importancia del análisis genético en poblaciones aisladas

Dadas las características culturales propias de esta población, a su carácter nómada y a la alta consanguinidad existente debido a sus estrictas normas de emparejamiento, probablemente provenientes del sistema de endogamia propio de las castas hindúes o “*yatis*” (Fraser 1995), se puede asumir que ha habido muy poco intercambio genético entre los gitanos y otras poblaciones asiáticas y europeas, manteniéndose así las características genéticas de la población original.

Esto los convierte en una etnia con un elevado potencial de investigación genética, tal y como lo han sido otras poblaciones aisladas como la de finlandeses y judíos Askenazis (Motulsky 1995; Risch et al. 1995; de la Chapelle & Wright 1998). Es conocido que para el mapeo de enfermedades complejas en poblaciones aisladas, la presencia de endogamia y, por tanto, de consanguinidad favorece la agregación de locus y alelos que de forma aislada tienen una baja penetrancia (Bulayev et al. 2009). Esto se debe al aumento de la homocigosis, lo que a su vez aumenta significativamente la probabilidad de identificar variantes con efectos patogénicos. Es lo que se conoce como efecto Wahlund (Wahlund 1928).

En este mismo contexto, las diferencias en cuanto a la antigüedad de las poblaciones estudiadas, es otro factor importante a la hora de identificar locus patogénicos, ya que cuanto más antigua sea una población, mayor será el número de meiosis y procesos recombinantes en las sucesivas generaciones, por lo que mayor será la posibilidad de “aislar” un determinado locus causal (Jorde 2000) (Figura 27). Gracias a estas particularidades, se han podido identificar un total de 9 trastornos mendelianos con mutaciones propias de la población gitana (Kalaydjieva et al. 2001) (Tabla 12).

**Tabla 12.** Trastornos mendelianos descritos en población gitana (adaptada de Kalaydjieva et al. 2001).

Trastorno	OMIM	Her	Cr	Gen	Mutación	Referencias
Glaucoma congénito primario	231300	AR	2p21	<i>CYP1B1</i>	E387K	Plášilová et al. 1998 & 1999
Deficiencia de galactoquinasa	230200	AR	17q24	<i>GALK1</i>	P28T	Kalaydjieva et al. 1999
Enfermedad renal poliquística	613095	AD	4q21-q23	<i>PKD2</i>	R306X	Veldhuisen et al. 1997
Neuropatía hereditaria sensitivo-motora tipo Lom (CMT4D)	601455	AR	8q24	<i>NDRG1</i>	R148X	Kalaydjieva et al. 1996 & 2000
Neuropatía hereditaria sensitivo-motora tipo Russe (CMT4G)	605285	AR	10q22	<i>HK1</i>	G9712C	Rogers et al. 2000
Catarata congénita, dismorfismo facial y neuropatía	604168	AR	18q23	<i>CTDP1</i>	Exón 6	Angelicheva et al. 1999
Distrofia muscular de cinturas tipo 2C	253700	AR	13q12	<i>SGCG</i>	C283Y	Piccolo 1996; Lasa et al. 1998
Miastenia congénita	254210	AR	17p13	<i>CHRNE</i>	1267delG	Abicht et al. 1999
Trombastenia de Glanzmann	273800	AR	17q21	<i>ITGA2B</i>	IVS15DS, G-A+1	de la Salle C et al. 1995

Her: herencia; Cr: cromosoma

CMT4D: Charcot-Marie-Tooth-4D; CMT4G: Charcot-Marie Tooth-4G; AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva

### 1.3.2.2. Los haplogrupos del ADN mitocondrial en población gitana sana y con EM

A diferencia de otras poblaciones cuya historia y genealogía ha sido extensamente documentada, la población gitana, tal como se ha comentado anteriormente, se caracteriza por carecer de registros escritos. Esto, sumado a su carácter nómada y a ser considerados una minoría étnicamente desfavorecida en numerosos países con acceso restringido a los sistemas de salud o educación, ha hecho necesario inferir su historia demográfica y genealógica a través de estudios genéticos.

Así, durante más de 80 años se han llevado a cabo una serie de estudios poblacionales con la intención de responder a tres cuestiones básicas: 1) la similitud entre hindúes y gitanos, 2) la relación con poblaciones europeas y 3) la afinidad entre poblaciones gitanas de diferentes países.

A continuación se explica un resumen de estos estudios poblacionales:

Gresham y colaboradores (Gresham et al. 2001) describieron el linaje genético tanto femenino como masculino de 275 individuos sanos pertenecientes a 14 poblaciones de etnia gitana, analizando la estructura genética mitocondrial y del cromosoma Y en busca de los diferentes haplogrupos. Los resultados identificaron un total de 12 haplogrupos de los cuales M, H y U justificaban el 62% del linaje mitocondrial. Un análisis más detallado reveló que los subgrupos M5 y U3 justificaban casi la totalidad del linaje mitocondrial asociado a los haplogrupos M y U respectivamente.

El haplogrupo M es común en Asia y África oriental (Quintana-Murci et al. 1999) pero es raro en Europa (Richards et al. 1998; Simoni et al. 2000). Tiene una antigüedad aproximada de 60.000 a 65.000 años y probablemente se originó en la India. De hecho, una de sus subdivisiones, el haplogrupo M5, se ha descrito especialmente en Odisha, un estado situado en la costa este de la India (Thangaraj et al. 2006) y en población de origen gitano (Malyarchuk et al. 2006). En el estudio de Gresham y colaboradores en población gitana (Gresham et al. 2001), este haplogrupo se distribuía de forma bastante homogénea entre las diferentes poblaciones estudiadas.

El haplogrupo H es muy común en Europa (Simoni et al. 2000; Richards et al. 2000) y también se encuentra en la India (Kivisild et al. 1999). Tiene una antigüedad aproximada de 30.000 años y probablemente se originó en el Medio Oriente (Achilli et al. 2004). En el estudio de Gresham y colaboradores (Gresham et al. 2001), fue el haplogrupo más frecuentemente observado, distribuyéndose en 13 de las 14 poblaciones analizadas. Una de las poblaciones donde más se expresó este haplogrupo fue en la de Monteni (localizada en Bulgaria) y cuyos orígenes se remontan a una de las grandes olas de migración producidas durante el final del siglo XIX después de la abolición de la esclavitud gitana en Rumanía.

El haplogrupo U es común en el Medio Oriente y en Europa (Richards et al. 2000). Tiene una antigüedad aproximada de 50.000 a 60.000 años y probablemente se originó en el Medio Oriente. Una de sus subdivisiones, el haplogrupo U3, es muy frecuente en el Cáucaso con frecuencias importantes en Jordania (Abu-Amero et al. 2008), Irán (Quintana-Murci et al. 2004), Siria, Irak y Turquía, entre otros. Tiene una menor frecuencia en Europa y Asia Central, predominando especialmente en población gitana (Malyarchuk et al. 2006). En el estudio de Gresham y colaboradores (Gresham et al. 2001), este haplogrupo se distribuía especialmente en las poblaciones provenientes de España y Lituania. Toda esta información parece indicar que la mayoría de poblaciones gitanas analizadas hasta ahora tienen efectivamente un origen asiático común y están genéticamente más emparentados con los hindúes que con el resto de poblaciones europeas, tal como lo preveía su asociación dialéctico-lingüística (Kalaydjieva et al. 2001; Gresham et al. 2001).

Si nos referimos a pacientes con EM de etnia gitana, Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2008) publicaron el único estudio de linaje mitocondrial realizado en este grupo de pacientes a nivel español. Se analizaron un total de 14 pacientes y 25 controles sanos. Los controles correspondían a la serie española descrita por Gresham y colaboradores (Gresham et al. 2001). Además, también se compararon los datos con una cohorte de 15 pacientes con EM y 16 controles sanos de origen caucásico. Los resultados identificaron un total de 9 haplogrupos, de los cuales M, J y U justificaban el 53,84% del linaje mitocondrial, sin poderse observar dichos haplogrupos en la población caucásica. Un análisis más detallado reveló que los subgrupos M5 y U3 justificaban casi la totalidad del linaje mitocondrial asociado a M y U respectivamente. El análisis estadístico reveló que solo el haplogrupo U3 aparecía con una frecuencia significativamente menor en los pacientes con EM de origen gitano respecto a los sujetos controles de la misma etnia.

El haplogrupo J es muy común en Eurasia occidental (Simoni et al. 2000; Richards et al. 2000). Tiene una antigüedad aproximada de 30.000 a 40.000 años y probablemente se originó en el Medio Oriente (Achilli et al. 2004)

presentando una alta frecuencia en Arabia Saudita y disminuyendo progresivamente su frecuencia a medida que nos desplazamos hacia Europa, el Cáucaso, el norte de África y Asia Oriental (Abu-Amero et al. 2008). En el estudio de Gresham y colaboradores en población gitana (Gresham et al. 2001), solo justificaba el 4% del linaje mitocondrial expresándose fundamentalmente en las poblaciones de Kalderash y Monteni (localizadas en Bulgaria) y cuyos orígenes se remontan a una de las grandes olas de migración producidas durante el final del siglo XIX tras la abolición de la esclavitud gitana en Rumanía.

En definitiva, los datos demuestran que en la población gitana son 4 los haplogrupos observados con mayor frecuencia: M5, H, J y U3.

### 1.3.2.3. La región HLA en población gitana sana y con EM

Aunque no existen muchos estudios de la región HLA en población gitana sana, de Pablo y colaboradores (de Pablo et al. 1992) describieron los antígenos HLA de clase I y II en un grupo de 75 gitanos de origen español comparados con 74 controles españoles no gitanos. El alelo HLA de clase II más frecuentemente observado fue *DQ5 (DQB1\*05)*, junto con los haplotipos *DR16-DQ5-Dw21 (DRB1\*16-DQB1\*05)* y *DR14-DQ5-Dw9-DR52b (DRB1\*14-DQB1\*05-DRB3\*02)*.

Posteriormente, Ramal y colaboradores (Ramal et al. 2001) realizaron un interesante estudio poblacional donde se determinó la distribución de los diferentes haplotipos HLA de clase II entre un grupo de 80 adultos sanos de etnia gitana provenientes de Andalucía. El análisis de *HLA-DRB1* reveló que los alelos más frecuentemente observados fueron *DRB1\*14* (especialmente, *DRB1\*14:01* y *DRB1\*14:04*), *DRB1\*15:02*, *DRB1\*16:01* y *DRB1\*01:02*. El análisis de *HLA-DQB1* reveló que el alelo más frecuentemente observado fue *DQB1\*05:03*, mientras que el análisis de *HLA-DPB1* reveló que los alelos más frecuentes eran *DPB1\*02:01*, *DPB1\*04:01* y *DPB1\*04:02*. Ellos concluyeron que su población gitana probablemente era originaria de la India ya que compartían los haplotipos *DRB1\*14:04-DQB1\*05:03* y *DRB1\*15:02-*

*DQB1\*05:03* descritos por Rani y colaboradores en población originaria del norte de la India (Rani et al. 1998).

En un estudio reciente, Inotai y colaboradores (Inotai et al. 2015) analizaron las regiones *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-DRB1* en un grupo de 186 húngaros de etnia gitana comparados con 2.402 húngaros no gitanos. El análisis de *HLA-DRB1* reveló que los alelos más frecuentemente observados fueron *DRB1\*15*, *DRB1\*03* y *DRB1\*14*.

Referente a los estudios de HLA realizados en pacientes gitanos con EM, en 1981 Gyódi y colaboradores (Gyódi et al. 1981) describieron el primer análisis inmunoserológico (HLA determinado por técnica de microlinfocitotoxicidad) en un grupo de gitanos húngaros con EM demostrando que *HLA-A1*, *Bw52*, *Bw22*, *B40*, *Cw1*, *DR2* y *DRw8* estaban significativamente incrementados en los pacientes gitanos respecto a la población húngara.

Pálffy y colaboradores (Pálffy et al. 1986) describieron un análisis clínico e inmunogenético de 5 pacientes con EM de etnia gitana demostrando asociación con *HLA-DR2* y *HLA-B7*. Asimismo, concluyeron que probablemente en aquellos gitanos “puros”, la forma clínica de EM se parecía más a la forma asiática opticoespinal que a la caucásica.

Takács y colaboradores (Takács et al. 1990) y Kálmán y colaboradores (Kálmán et al. 1991) comunicaron una menor prevalencia de EM en gitanos húngaros (7,5 por 100.000 habitantes) a pesar de ser portadores del haplotipo *HLA-DR2*. También observaron que la ausencia de *HLA-DQw6* se correlacionaba con la menor incidencia de EM en esta población. Sin embargo, observaron también que *HLA-DQw6* otorgaba mayor susceptibilidad a la enfermedad en húngaros no gitanos.

Milanov y colaboradores (Milanov et al. 1999) determinaron la prevalencia de EM entre la población gitana en dos poblaciones pequeñas de Bulgaria (19,1 por 100.000 habitantes), llegando a la conclusión de que la EM es poco frecuente entre estos pacientes.

Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2008) reportaron una prevalencia similar de EM entre población gitana de la provincia de Málaga y la prevalencia en población general (52,9 por 100.000 habitantes). Esta cifra era significativamente mayor a la reportada en Hungría (Takács et al. 1990; Kálmán et al. 1991) y Bulgaria (Milanov et al. 1999). Por otro lado, los pacientes gitanos presentaban una alta frecuencia del haplotipo *DRB1\*14-DQB1\*05:03* que concordaba con los resultados descritos por Ramal en gitanos adultos sanos de la misma región (Ramal et al. 2001). En sujetos con EM, encontraron asociación para el haplotipo *DRB1\*15:01-DQB1\*06:02* pero especialmente para el alelo *DQB1\*06:02*, tal como lo habían demostrado en los pacientes no gitanos con EM de la misma región (Fernández et al. 2004). Aunque la muestra fue pequeña (12 pacientes y 25 controles), se trata del primer y único estudio hasta el momento donde se comparan los haplotipos HLA de clase II entre pacientes gitanos con EM y controles, ambos de la misma etnia.

## **2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## **2.1. JUSTIFICACIÓN**

La agregación familiar observada en la EM no ha podido ser del todo explicada desde un punto de vista genético. Por este motivo se plantea que variantes con una frecuencia alélica muy baja, y que, por tanto, escapan a la resolución de los abordajes genómicos actualmente disponibles, podrían ser las responsables de justificar un mayor porcentaje de la heredabilidad hasta ahora conocida sobre la enfermedad.

Las poblaciones aisladas tienen un alto grado de homogeneidad genética producto de la alta endogamia y de la elevada homocigosis. A diferencia de otras poblaciones, en las que la evolución natural favorece que una serie de alelos potencialmente patogénicos sean heredados de forma recesiva y en heterocigosis, en aquellas más “homocigotas” observaremos un incremento en la expresión fenotípica de dichos alelos que de otra forma no se expresarían dada su baja penetrancia (Bulayev et al. 2009). Es lo que se conoce como efecto Wahlund (Wahlund 1928). Estas poblaciones parecen, por tanto, ideales para la detección de variantes genéticas raras y pueden ofrecernos información clave acerca de las interacciones gen-gen, gen-ambiente y el efecto de la consanguinidad.

En este trabajo de tesis doctoral se presenta una extensa familia de etnia gitana en la que existe un número excepcionalmente elevado de pacientes afectados con diferentes formas clínicas de EM. Las características idiosincrásicas propias de esta etnia (alto grado de consanguinidad y, por tanto, mayor homocigosis y aislamiento genético) la convierten en una población de gran interés para identificar nuevos locus de riesgo relacionados con la enfermedad.

## **2.2. HIPÓTESIS**

La hipótesis de este trabajo de tesis es:

La familia objeto del estudio es portadora de uno o un grupo reducido de locus de susceptibilidad genética para el desarrollo de EM que no han sido descritos hasta ahora y que, por tanto, explican la heredabilidad observada en esta familia.

## **2.3. OBJETIVOS**

Los objetivos de este trabajo de tesis son:

1. Identificar, estructurar y caracterizar clínica y radiológicamente a todos los miembros de la familia incluidos en el estudio.
2. Establecer el origen ancestral de la familia en estudio mediante la determinación de los haplogrupos del ADN mitocondrial, y comparar estos resultados con los descritos en la literatura para poblaciones de etnia gitana.
3. Determinar el genotipo de los genes *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1* (correspondientes al haplotipo *HLA-DR15*) de todos los miembros de la familia incluidos en el estudio.
4. Genotipar los 12 principales locus de susceptibilidad no HLA asociados a la EM descritos previamente en los principales estudios de asociación (GWAS).
5. Explorar, mediante abordaje exómico, potenciales variantes del genoma en un grupo seleccionado de sujetos y validar los resultados en el total de individuos de la familia.



### **3. *PACIENTES Y MÉTODOS***



### **3.1. PACIENTES**

#### **3.1.1. Diseño**

Estudio observacional, descriptivo, de seguimiento clínico-radiológico y análisis genético de una extensa familia de etnia gitana afectada de EM y no afectados.

#### **3.1.2. Sujetos del estudio**

Todos los sujetos que participaron en el estudio fueron identificados y visitados en la Unitat de Neuroimmunologia i Esclerosi Múltiple (UNIEM) dentro del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta de Girona durante el periodo 2009-2014.

De forma breve, la UNIEM es la Unidad multidisciplinar de referencia en la provincia de Girona para los pacientes y familiares afectados de EM y otras enfermedades de base inmunológica que afectan al SNC. Dentro de su cartera de servicios asistenciales se encuentran las especialidades de Neurología, Enfermería especializada en EM, Neuropsicología, Psicología, y Laboratorio de investigación. Además, la UNIEM lleva a cabo una serie de ensayos clínicos en fase II, III y IV con nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad, así como varias líneas de investigación tanto clínicas como básicas. Durante un periodo de 12 años en funcionamiento, cuenta con un registro de más de 900 pacientes con EM, ofreciendo seguimiento continuado y tratamiento específico a aproximadamente 650 de ellos.

El estudio fue presentado para su valoración y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de nuestro Hospital (Decreto 406/2006) garantizándose el cumplimiento de los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki (World Medical Association 2013) así como la legislación vigente sobre confidencialidad, protección de datos personales y



normas éticas sobre estudios clínicos (Ley orgánica 15/1999; Real Decreto 1720/2007).

Además, desde en año 2011, el estudio forma parte de un proyecto financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (PI10/02649).

### **3.1.2.1. Criterios de inclusión y exclusión de los sujetos del estudio**

#### Criterios de inclusión:

- Sujetos miembros de la familia de estudio, estén o no afectados de EM.
- Los sujetos incluidos deberán tener  $\geq 18$  años de edad en el momento de la inclusión.
- Los sujetos deberán firmar el correspondiente consentimiento informado (Anexo 3).
- En el caso de sujetos menores de edad, solo se incluirán aquellos afectados de EM, siempre y cuando sus progenitores y/o tutores legales hayan firmado el consentimiento informado para participar en el estudio.

#### Criterios de exclusión:

- Sujetos menores de edad no afectados de EM miembros de la familia de estudio.
- Aquellos sujetos cuya participación no sea recomendable por razones médicas, psicológicas o psiquiátricas, a criterio del investigador.
- Sujetos que no autoricen la realización de un análisis genético.

### **3.1.2.2. Grupos de sujetos**

Los sujetos miembros de la familia de estudio identificados en la UNIEM se agruparon de la siguiente manera:

#### **3.1.2.2.1. Sujetos afectados**

##### *Sujetos afectados de EM*

Pacientes diagnosticados de EM según los criterios de Poser (Tabla 2) o los revisados de McDonald 2010 (Tabla 3), dependiendo del año en que el sujeto fuera inicialmente valorado, correspondiendo a las formas clínicas de EMRR, EMSP y EMPP. En este grupo se incluyen también aquellos pacientes con SCA que presenten 3 o más de los criterios de Barkhof para diseminación en espacio (Anexo 2).

##### *Sujetos afectados de SRA o EM presintomática*

Sujetos que, en el momento de la inclusión en el estudio, no han presentado ni presentan síntomas compatibles con un brote de EM pero en quienes una RM demuestra lesiones características de enfermedad inflamatoria desmielinizante primaria del SNC que cumplen los criterios de Okuda para el diagnóstico de SRA (Tabla 4).

#### **3.1.2.2.2. Sujetos no afectados**

Sujetos que, en el momento de la inclusión en el estudio, no han presentado ni presentan signos ni síntomas compatibles con un brote de EM y que tienen una RM normal.

### 3.1.3. Variables del estudio

Las variables que se recogieron y se analizaron en el estudio se pueden clasificar en 3 grandes grupos: variables clínicas, variables radiológicas y variables genéticas.

#### 3.1.3.1. Variables clínicas

##### Sujetos afectados de EM

- *Edad*: edad del primer brote o síntoma de la enfermedad (años).
- *Edad de diagnóstico*: edad en el momento del diagnóstico (años).
- *Sexo*: sexo (Hombre/Mujer).
- *Forma clínica*: SCA, EMRR, EMSP o EMPP, en el momento de la inclusión.
- *Topografía inicial*: localización clínica del brote inicial (Nervio óptico, Médula espinal, Tronco encefálico, Hemisférico, Poliregional).
- *Brotos*: número total de brotes durante la evolución de la enfermedad.
- *EDSS inicial*: EDSS en el momento del diagnóstico.
- *EDSS evolución*: EDSS en el momento del análisis (octubre de 2015).
- *Curso clínico*: “Estable” (sin nuevos brotes ni incremento de la EDSS), “Agresivo” (presencia de nuevos brotes de la enfermedad con o sin incremento de la EDSS), “Progresivo” (sin nuevos brotes pero con un incremento progresivo de la EDSS).
- *Antecedentes patológicos*: otras enfermedades que se hayan diagnosticado en los sujetos, con especial interés en las de base autoinmune o hereditaria (No/Sí).
- *TIM*: tratamiento inmunomodulador específico para la EM (No/Sí).

##### Sujetos afectados de SRA o EM presintomática

- *Edad*: edad en el momento en que se realiza la identificación del sujeto como SRA (años).
- *Sexo*: sexo (Hombre/Mujer).
- *EDSS inicial*: EDSS en el momento de la inclusión del sujeto.
- *EDSS evolución*: EDSS al final del estudio.

- *Curso clínico:* “Estable” (sin brotes ni incremento de la EDSS), o ha presentado un primer brote de la enfermedad (SCA).
- *Antecedentes patológicos:* otras enfermedades que se hayan diagnosticado en los sujetos, con especial interés en las de base autoinmune o hereditaria (No/Sí).

#### Sujetos no afectados

- *Edad:* edad en el momento en que se realiza la inclusión del sujeto en el estudio (años).
- *Sexo:* sexo (Hombre/Mujer).
- *EDSS inicial:* EDSS en el momento de la inclusión del sujeto.
- *Curso clínico:* dependiendo si el sujeto se ha mantenido “Estable” (continúa manteniéndose asintomático a lo largo del estudio), o ha presentado un primer brote de la enfermedad (SCA).
- *Antecedentes patológicos:* otras enfermedades que se hayan diagnosticado en los sujetos, con especial interés en las de base autoinmune o hereditaria (No/Sí).

#### **3.1.3.2. Variables radiológicas**

Las variables radiológicas se recogieron de forma similar para los sujetos afectados de EM (SCA, EMRR, EMSP, EMPP y SRA) y sujetos no afectados:

- *Patrón de afectación:* pudiendo tener una RM normal (RM normal), lesiones desmielinizantes típicas (LDT), lesiones vasculares subcorticales (LVS) o lesiones inespecíficas de sustancia blanca (LISB).
- *Lesiones en T2:* número total de LDT en las secuencias T2/FLAIR ( $\leq 9$ , 10-20,  $>20$ ).
- *Lesiones supratentoriales:* número total de LDT a nivel supratentorial en las secuencias T2/FLAIR.
- *Lesiones infratentoriales:* número total de LDT a nivel infratentorial en las secuencias T2/FLAIR.

- *Lesiones medulares*: ausencia o presencia de LDT en la médula espinal (No/Sí).
- *Lesiones en T1*: ausencia o presencia de LDT hipointensas en las secuencias T1 (No/Sí).
- *Lesiones Gd+*: número total de LTD que captan Gadolinio.
- *Criterios de Barkhof*: número de criterios de Barkhof para diseminación en espacio (1-2 criterios, 3-4 criterios) (Anexo 2).
- *Volumen T2*: volumen lesional en T2/FLAIR (ml).
- *SG\_FAST*: volumen de sustancia gris según el método FAST (ml).
- *SB\_FAST*: volumen de sustancia blanca según el método FAST (ml).
- *BPF\_FAST*: atrofia cerebral según el método FAST (BPF).
- *SG\_SPM*: volumen de sustancia gris según el método SPM12 (ml).
- *SB\_SPM*: volumen de sustancia blanca según el método SPM12 (ml).
- *BPF\_SPM*: atrofia cerebral mediante el método SPM12 (BPF).

### 3.1.3.3. Variables genéticas

Las variables genéticas se recogieron de forma similar para los sujetos afectados de EM (SCA, EMRR, EMSP, EMPP y SRA) y sujetos no afectados:

- Haplogrupos del ADN mitocondrial, incluyendo las variantes de la HV1 y el porcentaje del linaje mitocondrial que estos haplogrupos representaban.
- Genes *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1* con sus respectivos alelos.
- Los 12 principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS, incluyendo su alelo de riesgo, el cromosoma de localización y la distribución de los sujetos según fueran portadores en homocigosis (Hom), heterocigosis (Het) o no portadores (NoP) de dicho alelo.
- Variantes seleccionadas en base a los modelos autosómico recesivo y dominante del análisis exómico, incluyendo su alelo de referencia (REF), su alelo variante (VAR), el cromosoma de localización y la consecuencia en la expresión o función del gen.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y RADIOLÓGICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

#### 3.2.1.1. Protocolo de inclusión y registro de los sujetos

Todos los miembros de la familia eran candidatos a ser incluidos en el estudio siempre y cuando participasen voluntariamente y cumplieren con los criterios de inclusión y exclusión (apartado 3.1.2.1.). Para ello, se informó acerca de la existencia de este estudio a aquellos individuos que realizaban seguimientos clínicos periódicos en la UNIEM, solicitándoles su participación, además de la difusión del mismo entre los otros miembros de la familia.

Dadas la idiosincrasia propia de la familia de estudio, tanto el proceso de reclutamiento como la recogida de datos relacionados con sus orígenes y con la historia médica de cada individuo, fueron muy difíciles y arduos. Por estos motivos, la información no solo se obtenía a partir de una fuente, sino que siempre se cotejaba y se confrontaba entre varios miembros de la familia.

El consentimiento informado (Anexo 3) se obtuvo previa explicación por escrito de la naturaleza, duración y propósito del estudio, además de todos los inconvenientes y obstáculos que, dentro de lo razonable, podrían esperarse. Aquellos miembros de la familia que eran incluidos tenían derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. De la misma forma, se solicitó expresamente a cada sujeto incluido si deseaba o no conocer el resultado tanto del estudio radiológico como del estudio genético, informándosele sobre las posibles implicaciones que podrían conllevar dichos resultados.

En caso de aceptarse la participación y una vez incluido en el estudio, cada sujeto fue registrado en el programa *Cyrillic* versión 2.0 (*CyrillicSoftware*®) para la elaboración del árbol genealógico.

### 3.2.1.2. Protocolo de obtención de las variables clínicas

Las variables clínicas se obtuvieron mediante la entrevista y exploración neurológica por parte del doctorando, como neurólogo con formación específica en la atención y manejo de pacientes con EM. Dichas variables fueron recogidas en una base de datos específicamente creada para el estudio utilizando el programa *FileMaker Pro-Advanced-12.0v5* (*FileMaker-Inc.*). Los datos de carácter personal se almacenaron dentro de un único archivo protegido garantizando la confidencialidad según la Ley de protección de datos vigente (Ley orgánica 15/1999; Real Decreto 1720/2007).

### 3.2.1.3. Protocolo de obtención de las variables radiológicas

Se realizó una RM craneal y medular a todos los sujetos incluidos en el estudio según el protocolo especificado en el Anexo 4. La obtención de las variables radiológicas fue realizada por parte de una neurorradióloga experta. Estas variables fueron también recogidas en la misma base de datos anteriormente descrita.

#### Cálculo de volumetría e identificación de lesiones craneales

Se realizó un cálculo semiautomático de volumetría y de identificación de lesiones craneales en 15 de los sujetos incluidos en el estudio, por parte del Instituto de Investigación en Visión por Computador y Robótica (ViCOROB) de la Universitat de Girona (<http://vicorob.udg.edu/>). Dichos cálculos se efectuaron como parte del protocolo de análisis volumétrico que se realiza en todos los pacientes valorados en la UNIEM, sobre las imágenes de las secuencias T1, una vez corregida la intensidad de las lesiones mediante técnicas automáticas de procesamiento y segmentación tal y como se describe a continuación.

En primer lugar, debido a que la referencia espacial (posicionamiento) de todas las secuencias de imagen no era la misma, se realizó un “co-registro” para establecer un mismo espacio de referencia. Para ello, todas las imágenes de la secuencia FLAIR, fueron co-registradas al espacio de la

secuencia T1 según el método descrito por Rueckert y colaboradores (Rueckert et al. 1999). Posteriormente, se utilizaron las imágenes de la secuencia FLAIR para segmentar automáticamente las lesiones de sustancia blanca según el método descrito por Roura y colaboradores (Roura et al. 2015). Las lesiones identificadas mediante este último paso fueron utilizadas para rellenar y corregir las intensidades de las lesiones observadas en T1 según el método descrito por Valverde y colaboradores (Valverde et al. 2014).

Finalmente, una vez obtenidas las secuencias T1 “corregidas” se realizó la segmentación de tejidos utilizando tanto el método FAST (Zhang et al. 2001), como el método SPM12 (Ashburner & Friston 2005). A partir del resultado de la segmentación, se calcularon los volúmenes para cada tejido, multiplicando el número de vóxeles segmentados como SG (Sustancia Gris) y SB (Sustancia Blanca), por la medida de cada vóxel (0,003 ml). También se calculó el “*Brain Parenchymal Factor*” (BPF), como indicador global de atrofia cerebral, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{BPF} = \frac{\text{SB} + \text{SG}}{\text{SB} + \text{SG} + \text{LCR}}$$

#### 3.2.1.4. Protocolo de asignación de sujetos a los diferentes grupos

Una vez obtenidas las variables clínicas y radiológicas de los sujetos del estudio, se los asignó a uno de los 2 grupos anteriormente mencionados: **sujetos afectados**, incluyendo afectados de EM y afectados de SRA o EM presintomática; o **sujetos no afectados**.

Los sujetos que eran diagnosticados como afectados por alguna de las formas clínicas de la EM, posteriormente fueron seguidos de forma periódica en la UNIEM como parte del protocolo rutinario de actuación clínica de la Unidad.



### **3.2.2. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO**

Se realizaron varios estudios genéticos en la familia, que fueron clasificados en dos grandes grupos:

#### *Estudios de genética descriptiva*

Caracterización de los haplogrupos de ADN mitocondrial y genotipado de la región HLA.

#### *Estudios de acotamiento genético y búsqueda de genes candidatos*

Genotipado de los principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS y análisis de exómica.

#### **3.2.2.1. Obtención de las muestras de sangre**

La extracción de sangre se realizó mediante punción venosa por parte del equipo de enfermería de la UNIAM y se recogieron dos tubos con anticoagulante EDTA para la obtención de ADN y dos tubos PAXgene® para la obtención de ARN, que se congelaron en el momento de la recogida. Dicha extracción se realizó el mismo día en que se recogían las variables clínicas.

#### **3.2.2.2. Obtención de ADN y ARN**

La extracción de ADN se realizó mediante el kit “*Pure Gene*” (QIAGEN®) partiendo de 3 ml de sangre total y siguiendo las instrucciones del fabricante. En el paso final, la elución del ADN se realizó con agua estéril.

A partir de los tubos PAXgene®, con el kit “*PAXgene Blood RNA*” y siguiendo las instrucciones del fabricante, se obtuvo el ARN de los sujetos de estudio.

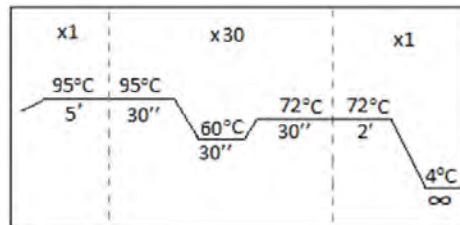
#### **3.2.2.3. Caracterización de los haplogrupos de ADN mitocondrial**

Para realizar la determinación del haplogrupo de ADN mitocondrial al que pertenecía cada individuo, se analizó la HV1 (Figura 52 del apartado 1.2.6.).

Para ello, se amplificó un fragmento de 636 pb mediante PCR convencional con un programa de 30 ciclos de amplificación y una temperatura de “annealing” de 60°C (Tabla 13 y Figura 56).

**Tabla 13.** “Primers” de amplificación de la HV1 del ADN mitocondrial.

	Secuencia
“Primer” directo	5'-ACTTCACAACAATCCTAATCCT-3'
“Primer” reverso	5'-CGGAGCGAGGAGAGTAGCAC-3'



**Figura 56.** Esquema del programa de amplificación para el análisis del ADN mitocondrial.

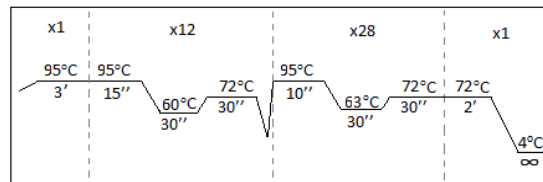
Una vez amplificado el fragmento y comprobada la PCR en un gel de agarosa al 2%, se secuenciaron los fragmentos amplificados mediante la técnica de Sanger, utilizando el sistema “ABI-PRISM Dye terminator” (Applied Biosystems®).

Los cambios en la secuencia se numeraron de acuerdo a la Secuencia de Referencia de Cambridge (CRS) (Anderson et al. 1981). La determinación de los haplogrupos se obtuvo mediante la plataforma online “MitoTool” (<http://www.mitotool.org/>) (MitoTool 2015).

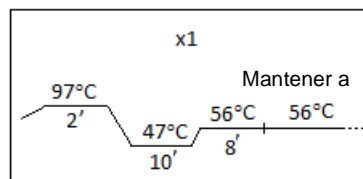
#### 3.2.2.4. Genotipado de la región HLA

Se determinó el genotipo de *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1* mediante el kit “Lifecodes HLA-SSO” (GeneProbes®) específico para cada uno de los dos genes.

El análisis se realizó con el sistema Luminex®. La técnica consiste en una amplificación múltiple de muchos fragmentos del gen a analizar (Figura 57). Seguidamente, se hibrida el ADN amplificado con unas sondas específicas unidas a microesferas (beads) (Figura 58). Cada microesfera presenta un color específico y diferente que será determinado por el láser rojo del sistema Luminex®. Solo hibridan aquellas sondas que encuentran su secuencia complementaria entre los fragmentos previamente amplificados. El aparato dispone también de un láser verde que será responsable de medir la unión de las sondas con el ADN del paciente.



**Figura 57.** Esquema del programa de amplificación para el genotipado de la región HLA.



**Figura 58.** Esquema del programa de hibridación para el genotipado de la región HLA.

Una vez realizada la lectura de fluorescencia de cada sonda, se analiza el resultado con el programa Quicktype® para la obtención del grupo HLA al que pertenece cada paciente.

### 3.2.2.5. Genotipado de los principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS

Se realizó el análisis genético de los 12 principales locus de susceptibilidad no HLA descritos en los primeros GWAS (Oksenberg & Baranzini 2010) (apartado 1.2.4.2 y Tabla 14).

**Tabla 14.** Locus de susceptibilidad no HLA con asociación a EM en los primeros GWAS (adaptada de Oksenberg & Baranzini 2010).

Cr	#dbSNP	A-R	Gen
1	rs2300747	A	CD58
1	rs10735781	G	EVI5
1	rs2760524	G	RGS1
5	rs6897932	C	IL7R
10	rs2104286	T	IL2RA
11	rs17824933	G	CD6
12	rs1800693	C	TNFRSF1A
16	rs12708716	A	CLEC16a
16	rs17445836	G	IRF8
18	rs763361	T	CD226
19	rs34536443	G	TYK2
20	rs6074022	G	CD40

Cr: cromosoma, #dbSNP: número según la dbSNP, A-R: alelo de riesgo

Dichos locus fueron estudiados en los sujetos de la familia mediante amplificación por PCR convencional con “Primers” diseñados por nosotros mismos (Tabla 15) con la plataforma informática <http://primer3.ut.ee/> y seguidamente secuenciados por Sanger con el sistema “ABi Prism™ 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems®).

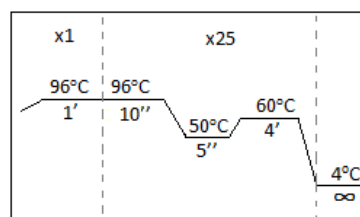
**Tabla 15.** SNPs no HLA con asociación a EM en los primeros GWAS y los “Primers” diseñados para su estudio.

#dbSNP	“Primer” directo 5’ a 3’	“Primer” reverso 5’ a 3’	TºA (ºC)	CA
rs2300747	TGCTCTGTTGTATCCCTAGCC	TTGCCATTGTAAATTCTATGTCC	58	35
rs10735781	TTTGGTTTCTGTTGGTGTGG	TCACCATTAGACCAGCCTTACA	60	30
rs2760524	GAATGCAATCTGCACTGTTGA	CAACAAAGTTGCTGGGACCT	58	35
rs6897932	TGCATGGCTACTGAATGCTC	GTCCGTGATCCCACACAATC	60	30
rs2104286	AGTTGGTGAGGAGGAGAAAGG	CCTCTCTCCCTGGAATGTCA	58	35
rs17824933	CCACCTGGTAGCTGGAAAGA	ACTCCTCGCCTTTCTTGTGA	58	35
rs1800693	TAGGGCCTCTGTTCACCAGT	CTCCCTCTCCCTCCCAAAG	59	35
rs12708716	GGGACAAACATCCAAACCAT	CCAAAGTTCCTGGAACAA	58	35
rs17445836	GGTAGACCAGGTGGAAATGG	AACTGTCCAAGAGGCAGAGG	60	30
rs763361	TCATTAGTTGTTGAAATGCAGTGA	GGTAGACCTTGGGTAGTGGAAA	58	35
rs34536443	CTGGTCTGATCCCCAAGC	CCCAGCCTATGCCTTTCTAA	58	35
rs6074022	GGTCCACTTCCACTTCCACT	CTCTCTCTCCCTCTCCCC	60	30

#dbSNP: número según la dbSNP, TºA: temperatura de “annealing”, CA: ciclos de amplificación

Mediante una reacción con el producto Exosap® se preparó el producto de la PCR para el siguiente paso de secuenciación. A continuación se muestra la reacción y el programa utilizados para la secuenciación:

Componentes Mix	Condiciones x1
<b>BigDye</b>	0,5µl
<b>Buffer BigDye</b>	1µl
<b>“Primer” (5µM) directo o reverso</b>	0,25µl
<b>Agua</b>	2,25µl
<b>Producto Exosap®</b>	1µl
<b>Total</b>	<b>5µl</b>



Finalizada la reacción, se purificó la muestra y el producto final se resuspendió con formamida. Los resultados fueron analizados con el software “SeqScape” (Applied Biosystems®).

### 3.2.2.6. Análisis de exómica

#### 3.2.2.6.1. Análisis inicial en un grupo seleccionado de sujetos

Se realizó el análisis de exómica en un total de 5 individuos pertenecientes al núcleo familiar principal de nuestro estudio (apartado 4.1. y Figura 60), usando la “segunda estrategia” de selección de los sujetos a secuenciar mediante esta técnica (apartado 1.2.5.1. y Figura 47, b).

De éstos, se incluyeron 4 sujetos afectados de EM (VI-9, VI-20, VII-3 y VII-20) que fueron seleccionados de manera que dos pertenecían a la misma generación (VI-9 y VI-20) y los otros dos pertenecían a las generaciones descendientes (VII-3 y VII-20). Asimismo, se introdujo en el análisis un individuo sano de la familia (VI-10) perteneciente a la generación más antigua de la cual disponíamos de muestras, de modo que, por su edad, fuese poco probable que desarrollara la enfermedad. Este individuo control se seleccionó de sexo masculino para minimizar al máximo la probabilidad de enfermedad autoinmune (más frecuentes en mujeres).

El estudio de exómica se realizó de forma externa por Sistemas Genómicos S.L. (Valencia). La plataforma utilizada fue SOLID™ (5500XL) con el sistema de enriquecimiento “*SureSelect Target*” para 71Mb (Agilent®).

El ADN se digirió en fragmentos o “*reads*” de aproximadamente 250 pb, se enriquecieron las secuencias de interés y finalmente se obtuvieron una gran cantidad de fragmentos asimétricos de 75nt y 35nt listos para su lectura, lográndose mapear más del 85% de los mismos (Tabla 16). Como medida estándar, el porcentaje de fragmentos mapeados debía ser mayor al 50%.

**Tabla 16.** Datos relativos al análisis exómico de los sujetos seleccionados.

Sujetos	# total de fragmentos obtenidos	Tamaño promedio de los fragmentos (pb)	% de fragmentos mapeados
VI-9	205.377.579	256	87
VI-10*	201.241.015	257	86
VI-20	186.144.570	255	87
VII-3	207.764.268	259	86
VII-20	189.611.581	257	87

\*Sujeto miembro de la familia considerado como control

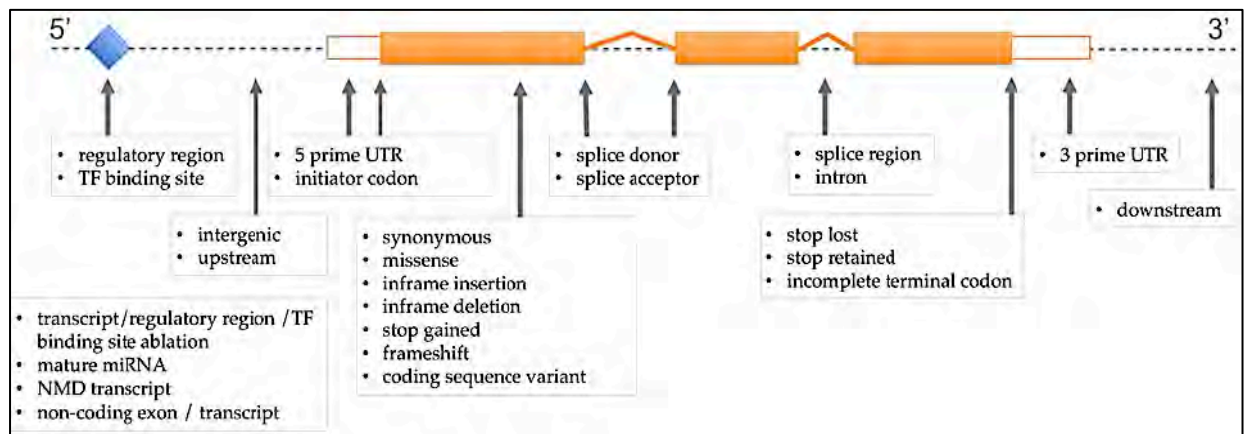
La información proveniente de los fragmentos fue alineada al genoma humano de referencia (versión GRCh37/hg19) usando el software bioinformático “Bioscope” (<http://solidsoftwaretools.com>) (Bioscope 2015) con el objetivo de aislar las secuencias correspondientes al exoma. Posteriormente a la alineación, se realizó un filtrado de aquellas secuencias que pudieran introducir resultados erróneos en los análisis posteriores, eliminándose las que mostraban una baja calidad y aquellas que se encontraban duplicadas. Para ello se utilizaron las herramientas “Picard” (Picard Tools 2015) y “SAMtools” (Li et al. 2009) que son un conjunto de instrumentos diseñados para trabajar con datos provenientes de secuenciaciones de nueva generación.

Una vez que las secuencias exómicas fueron aisladas y filtradas se procedió a compararlas entre los 4 sujetos afectados (VI-9, VI-20, VII-3, VII-20) y el sujeto control (VI-10) usando una combinación de 3 algoritmos diferentes: “VarScan” (Koboldt et al. 2009), “GATK” (McKenna et al. 2010) y “Bioscope” (Bioscope 2015). Como norma general, el sujeto control debía ser homocigoto para el alelo de referencia observado durante el proceso de alineación con el genoma humano GRCh37/hg19.

Aquellas variantes que eran comunes entre los 4 sujetos afectados pero que no estaban presentes en el sujeto control fueron consideradas para el estudio (“variant calling”). La nomenclatura que se estableció para cada variante fue la asignada por la base de datos “Ensembl” (Flicek et al. 2012; Ensembl

2015) que contiene información sobre las principales variantes humanas recogidas a nivel mundial (dbSNP, HapMap Project, 1000 Genomes Project, COSMIC, entre otras).

Esta nomenclatura y la ubicación de la variante en el genoma puede consultarse en la Figura 59.



**Figura 59.** Nomenclatura y ubicación de las variantes observadas en el análisis exómico según la base de datos “Ensembl”.

Posteriormente, aquellas variantes que podían ser **potencialmente patogénicas** fueron distribuidas de acuerdo a los dos principales modelos de herencia que se detallan posteriormente.

### 3.2.2.6.2. Validación de las variantes potencialmente patogénicas según el análisis de exómica

Las **variantes potencialmente patogénicas**, ya sea por su efecto sobre el transcrito o por su acción sobre la estructura o función de la proteína, fueron estudiadas en los individuos del núcleo familiar principal.

La validación se realizó por PCR convencional seguida de secuenciación por Sanger siguiendo los pasos descritos anteriormente en el apartado 3.2.2.5.



El genotipo de cada individuo para una variante concreta se determinó según el número de veces que se había leído dicha variante respecto al número de veces que se había leído aquella posición.

En función de este valor, se clasificó el genotipado en:

- **0:** Homocigoto para el alelo de referencia (*“Homozygous for the reference allele”*)
- **>0 y ≤0,12:** Probablemente homocigoto para el alelo de referencia (*“Probable homozygous for the reference allele”*).
- **>0,12 y <0,35:** Parece ser heterocigoto (*“Uncertain heterozygous”*).
- **≥0,35 y <0,65:** Probablemente heterocigoto (*“Probable heterozygous”*).
- **≥0,65 y <0,85:** Parece ser homocigoto para el alelo variante (*“Uncertain homozygous for the variant allele”*).
- **≥0,85 y ≤1:** Probablemente homocigoto para el alelo variante (*“Probable homozygous for the variant allele”*).

### 3.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### Análisis descriptivo univariante:

Las variables categóricas se expresan mediante sus frecuencias (absoluta y relativa). Las variables numéricas se resumen mediante los estadísticos descriptivos: media y desviación estándar o mediana y rango intercuartílico (si la distribución de los datos presentan una asimétrica muy marcada o valores anormalmente alejados).

#### Análisis descriptivo bivariante:

La relación entre dos variables categóricas se analizó mediante la prueba  $\chi^2$  de Pearson ó el test exacto de Fisher con comparaciones múltiples a posteriori por el método de Bonferroni, si se observaba una asociación global entre las variables y alguna de ellas contenía tres o más categorías. La representación gráfica entre dos variables categóricas se realizó mediante el gráfico de mosaico.

Se consideró un nivel de significación estadística del 5%. Los programas estadísticos utilizados fueron: IBM SPSS v21 (*"IBM Corp. Released 2012"*) y el programa R (*"R Development Core Team 2015"*).



## **4. RESULTADOS**



#### 4.1. ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN DE LA FAMILIA

Se identificaron un total de 135 miembros pertenecientes a la familia objeto del estudio distribuidos a lo largo de 8 generaciones – 30 miembros fueron estudiados y analizados (Figura 60).

El caso índice (sujeto VI-9) fue identificado por el Dr. David Genís en una primera visita rutinaria realizada en mayo del 2009 en la UNIEM dentro del Servicio de Neurología del Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona. Desde entonces, y durante un periodo de 5 años, se han ido identificando e incluyendo el resto de miembros participantes en este estudio. El último sujeto (VI-13), fue incluido en noviembre de 2014.

Los individuos de este estudio pertenecen a una extensa familia de etnia gitana cuyos ascendientes (según la información proporcionada por sus propios miembros), después de numerosas migraciones, llegaron a España procedentes de Portugal.

Analizando el árbol genealógico detenidamente, observamos que la familia reúne un total de 6 parejas consanguíneas: entre los sujetos V-2 y V-3, VI-2 y VI-3, VI-9 y VI-10, VI-19 y VI-20, VI-27 y VI-28, y entre VII-9 y VII-10 (Figura 60). Asimismo, existen 4 núcleos familiares bien diferenciados pero relacionados directa o indirectamente entre sí: los descendientes de los sujetos I-1 y I-2, los III-1 y III-2, los III-3 y III-4 y los III-5 y III-6. Además, observamos que la mayor parte de individuos afectados (6 sujetos en total) son descendientes de los sujetos III-3 y III-4, por lo que, este grupo de descendientes (21 sujetos en total), lo hemos considerado como el **núcleo familiar principal** de nuestro estudio.

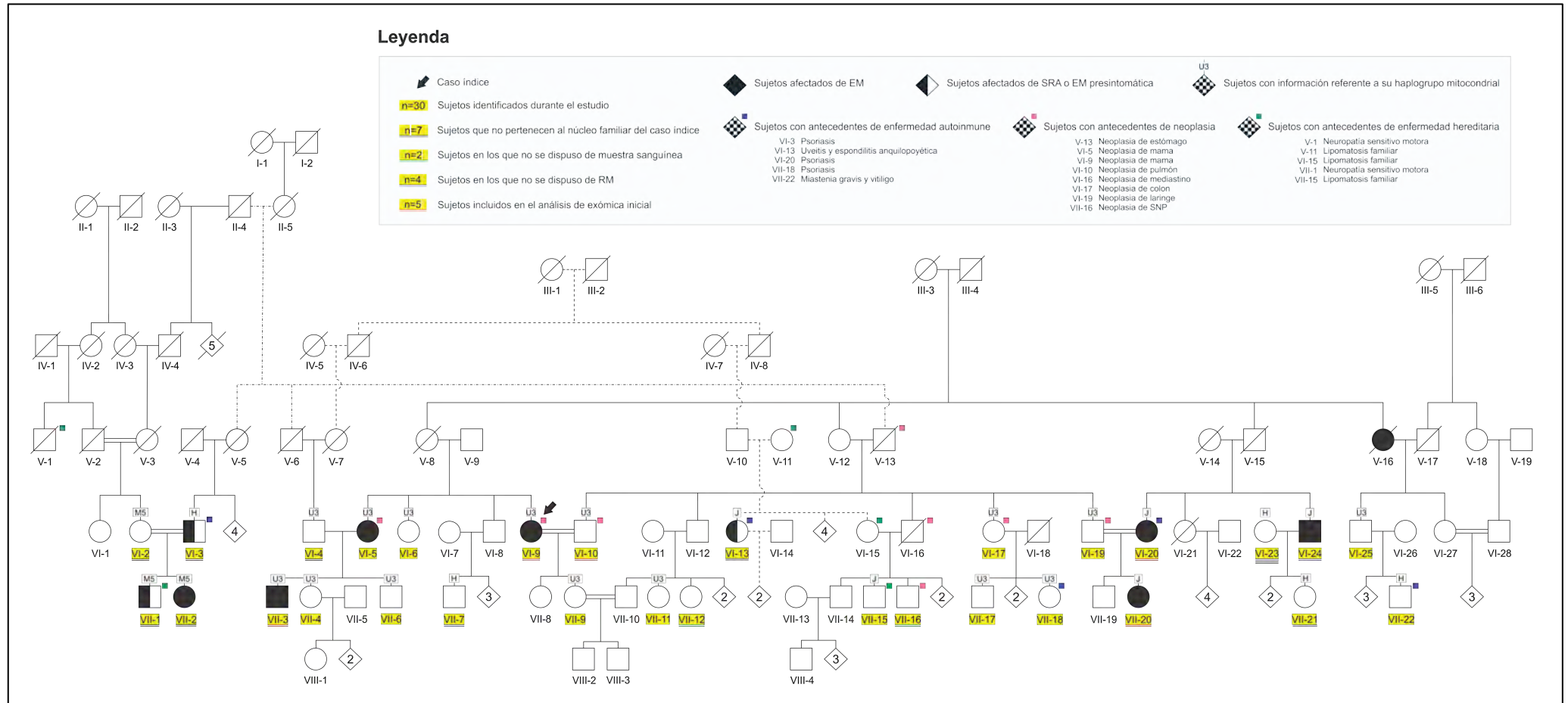


Figura 60. Árbol genealógico de la familia en estudio.

## 4.2. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y RADIOLÓGICAS DE LA FAMILIA

De los 30 sujetos incluidos, 16 (53,3%) eran mujeres y 14 (46,7%) eran hombres, con una edad media para ambos sexos de  $40 \pm 13,92$  años en el momento del análisis (octubre de 2015). Diez de estos sujetos (33,3%) se clasificaron como “afectados EM” por presentar alguna forma ya sea clínica (SCA o EM) o presintomática de la EM (SRA), mientras que 20 sujetos (66,7%) no presentaban signos, síntomas ni hallazgos en la RM compatibles con la enfermedad.

La media de la EDSS inicial fue de  $0,5 \pm 0,91$ , mientras que la media de la EDSS en el momento del análisis (octubre de 2015) fue de  $1 \pm 2,10$ . La totalidad de los sujetos no afectados (100%) y la mayoría de los afectados (60%) mantuvieron un curso clínico estable a lo largo del tiempo.

La familia presentaba, entre los antecedentes patológicos, una alta prevalencia de varios tipos de neoplasias que afectaban a un total de 8 individuos pertenecientes todos a un mismo núcleo familiar, de los cuales 6 pudieron ser incluidos en el estudio (4 de ellos no afectados por la enfermedad neurológica y 2 afectados). La tipología y distribución de los diferentes tipos de neoplasias se puede consultar en el árbol genealógico (Figura 60) y en la descripción específica de cada individuo que se detallará posteriormente. Asimismo, 5 sujetos (2 de ellos no afectados por la enfermedad y 3 afectados) presentaban algún tipo de enfermedad autoinmune diferente a la EM entre las que se encontraban psoriasis, uveítis, espondilitis anquilopoyética, vitiligo y miastenia gravis. También se observaron antecedentes de enfermedad hereditaria (neuropatía sensitivo-motora y lipomatosis familiar hereditarias) y narcolepsia (Tabla 17).



**Tabla 17.** Variables clínicas de los sujetos no afectados y afectados de nuestro estudio (n=30).

Variables clínicas	No afectados (n=20)	Afectados EM (n=10)
Edad	41 ±14,18	37 ±13,68
Edad diagnóstico	-	35 ±13,35*
Sexo		
Hombre	10 (50%)	4 (40%)
Mujer	10 (50%)	6 (60%)
Forma clínica		
No afectado	20 (100%)	0 (0%)
SRA	0 (0%)	3 (30%)
SCA	0 (0%)	1 (10%)
EMRR	0 (0%)	4 (40%)
EMSP	0 (0%)	2 (20%)
Topografía inicial		
Nervio óptico	-	1 (14,3%)
Tronco encefálico	-	3 (42,9%)
Hemisférico	-	2 (28,6%)
Poliregional	-	1 (14,3%)
Brotos	-	4 (1,63)*
EDSS inicial	0,2 ±0,50	1,1 ±1,26
EDSS evolución	0,2 ±0,50	2,6 ±3,07
Curso clínico		
Estable	20 (100,0%)	6 (60%)
Progresivo	-	2 (20%)
Agresivo	-	2 (20%)
AP enf. hereditaria		
No	19 (95%)	9 (90%)
Sí	1 (5%)	1 (10%)
AP neoplasia		
No	16 (80%)	8 (80%)
Sí	4 (20%)	2 (20%)
AP narcolepsia		
No	19 (95%)	9 (90%)
Sí	1 (5%)	1 (10%)
AP enf. autoinmune		
No	18 (90%)	7 (70%)
Sí	2 (10%)	3 (30%)
TIM		
No	20 (100%)	7 (70%)
Sí	0 (0%)	3 (30%)

Las variables numéricas se expresan como media ± desviación estándar y las variables categóricas como n (%). **EM**: esclerosis múltiple, **SRA**: síndrome radiológicamente aislado, **SCA**: síndrome clínicamente aislado, **EMRR**: EM remitente recurrente, **EMSP**: EM secundaria progresiva **AP**: antecedentes patológicos, **TIM**: tratamiento inmunomodulador

\*Cálculo realizado sobre un total de 7 sujetos

Se pudo realizar RM craneal y medular a 26 sujetos (17 no afectados y 9 afectados), ya que 4 de ellos no dieron el consentimiento para su realización. Todos los afectados en los que se pudo realizar una RM mostraban lesiones desmielinizantes típicas (LDT) (descripción más detallada posteriormente). Entre los sujetos no afectados, 9 (52,9%) tenían una RM normal, 5 (29,4%) presentaban lesiones vasculares subcorticales (LVS) y 3 (17,6%) presentaban lesiones inespecíficas de sustancia blanca (LISB) (Tabla 18).

**Tabla 18.** Variables radiológicas de los sujetos no afectados y afectados de nuestro estudio (n=26).

<b>Variables radiológicas</b>	<b>No afectados (n=20)</b>	<b>Afectados EM (n=10)</b>
<b>RM realizada</b>		
No	3 (15%)	1 (10%)
Sí	17 (85%)	9 (90%)
<b>RM patrón de afectación</b>		
RM normal	9 (52,9%)	0 (0%)
LDT	0 (0%)	9 (100%)
LVS	3 (17,6%)	0 (0%)
LISB	5 (29,4%)	0 (0%)
<b>Lesiones en T2</b>		
<=9	-	3 (33,3%)
10-20	-	2 (22,2%)
>20	-	4 (44,4%)
Lesiones supratentoriales		14,67 ±8,69*
Lesiones infratentoriales		2,33 ±3,81*
<b>Lesiones medulares</b>		
No	-	6 (66,7%)
Sí	-	3 (33,3%)
<b>Lesiones en T1</b>		
No	-	4 (44,4%)
Sí	-	5 (55,6%)
Lesiones Gd+	-	1,56 ±2,13*
<b>Criterios de Barkhof</b>		
1-2 criterios	-	2 (22,2%)
3-4 criterios	-	7 (77,8%)

Las variables numéricas se indican como media ± desviación estándar y las variables categóricas como n (%). **EM**: esclerosis múltiple, **LDT**: lesiones desmielinizantes típicas, **LVS**: lesiones vasculares subcorticales, **LISB**: lesiones inespecíficas de sustancia blanca.

\*Cálculo realizado sobre un total de 9 sujetos

#### 4.2.1. Descripción del grupo de sujetos afectados

En el grupo de sujetos afectados, 7 individuos presentaron alguna forma clínica de EM (SCA, EMRR o EMSP) y otros 3 presentaron un SRA.

##### 4.2.1.1. Descripción clínico-radiológica del grupo de sujetos afectados de EM

De los 7 sujetos afectados de EM, 6 pertenecen al núcleo familiar principal de nuestro estudio. Cinco de ellos eran mujeres (71,4%), y 2 eran hombres (28,6%). La edad media de inicio de los síntomas fue de  $33 \pm 12,29$  años, mientras que la edad media de diagnóstico fue de  $35 \pm 13,35$  años, siendo la EMRR el diagnóstico más prevalente (57,1%). Ninguno de los sujetos se diagnosticó de EMPP.

La mayoría de estos pacientes debutó con un brote de tronco encefálico (42,9%), siendo la media de brotes durante la evolución de la enfermedad de  $4 \pm 1,63$ . La media de la EDSS inicial fue de  $1,57 \pm 1,24$  y de  $3,71 \pm 3,05$  para la EDSS en el momento del análisis (octubre de 2015). Referente al curso clínico de la enfermedad, 3 sujetos (VI-5, VI-9 y VII-3) se mantuvieron estables, 2 (VII-2 y VII-20) presentaron un curso clínico agresivo y los otros 2 (VI-20 y VI-24) un curso clínico progresivo de la enfermedad. Solo 3 sujetos (42,9%) recibían TIM en el momento de la inclusión, de los cuales 2 habían presentado un curso agresivo de la EM. Referente a los antecedentes patológicos, 2 mujeres (una con SCA [VI-5] y la otra con EMRR [VI-9]) estaban diagnosticadas de cáncer de mama y una tercera (VI-20) de psoriasis (Tabla 17 y 19).

Referente a los datos radiológicos, solo un sujeto (VI-24) no accedió a realizarse la RM como parte del estudio. En la mayoría de sujetos, el número de LDT fue  $\geq 10$  y en el 44,4% fue  $> 20$  lesiones. Además, 5 sujetos (55,6%) presentaban lesiones hipointensas en la secuencia T1. La mayoría de las LDT se distribuían a nivel supratentorial y sujetos (57,1%) presentaban además lesiones infratentoriales. Solo 3 sujetos (33,3%) presentaban lesiones a nivel medular, siendo éstos los únicos que presentaban lesiones

captantes de Gadolinio. La mayoría de sujetos (77,8%) cumplían 3 ó 4 de los criterios de Barkhof para diseminación en espacio (Tabla 18 y 19).

A continuación se realiza una breve descripción clínica de los 7 sujetos afectados con alguna forma de EM (Tabla 19). Se realiza también una breve descripción del sujeto VI-16 que, aunque no se incluye dentro del análisis de los datos, se consideró por historia clínica como afectado.

#### Sujeto V-16

Esta paciente era tía materna del caso índice (sujeto VI-9). La evidencia de que pudo haber padecido EM es histórica y proviene de los datos proporcionados por su hijo (sujeto VI-25) quien participó en el estudio como no afectado. Él refería que su madre presentó un cuadro progresivo de alteración de la marcha que la condujo a permanecer durante muchos años en una silla de ruedas y posteriormente a permanecer casi la mayor parte del día en la cama hasta su muerte a la edad de 63 años. No se realizó autopsia, por lo que un diagnóstico neurológico nunca fue efectuado. Aunque esta paciente se consideró en el recuento final como sujeto afectado de EM, no se incluyó en el análisis estadístico.

#### Sujeto VI-5

Mujer de 62 años de edad que como único antecedente patológico de interés presentaba un carcinoma intraductal de mama izquierda diagnosticado en el año 2009, por el que requirió cirugía y radioterapia. Es hermana del caso índice (sujeto VI-9).

A la edad de 56 años, y como parte de la evaluación realizada a su hermana, acepta participar en el estudio. La exploración neurológica fue normal con una EDSS de 0. Sin embargo, la RM craneal mostró abundantes lesiones desmielinizantes compatibles con EM que cumplían los criterios de Okuda (Tabla 4) para el diagnóstico de SRA. Se mantuvo clínica y radiológicamente estable durante 3 años hasta que, a la edad de 59 años, presentó un primer brote de la enfermedad (SCA) con afectación del tronco encefálico.

Posteriormente se ha mantenido estable sin nueva actividad clínica ni radiológica, y sin TIM.

Uno de sus hijos (sujeto VII-3) está afectado por la enfermedad.

#### Sujeto VI-9

Corresponde al caso índice. Mujer que fue identificada como parte de una primera visita rutinaria a mediados del año 2009 en la UNIEM, cuando tenía 54 años de edad y con el objetivo de realizar controles en nuestro centro de su EMRR previamente diagnosticada en otra comunidad autónoma. Como antecedentes patológicos de interés, se le diagnosticó un carcinoma ductal infiltrante grado II de mama derecha en el año 2007 que requirió cirugía, quimioterapia y radioterapia. Además presentaba sintomatología compatible con narcolepsia, aunque ella nunca ha accedido a realizarse el estudio diagnóstico.

A los 27 años de edad, presentó clínica compatible con un brote hemisférico de predominio sensitivo. Posteriormente presentó un total de 6 brotes (2 brotes por año durante los 3 primeros años) siendo diagnosticada de EMRR a la edad de 30 años. La exploración neurológica en el momento de la inclusión en el estudio reveló una EDSS de 1,0. La RM craneal mostraba lesiones desmielinizantes compatibles con EM. Se ha mantenido estable sin empeoramientos ni nuevos brotes de la enfermedad durante más de 25 años por lo que no ha sido tratada con TIM.

La paciente está casada con un primo hermano (sujeto VI-10) sin que ninguno de sus descendientes directos presenten la enfermedad hasta la actualidad.

#### Sujeto VI-20

Mujer de 55 años de edad, que como único antecedente patológico de interés, presenta una psoriasis actualmente sin tratamiento de base. Es prima hermana del caso índice (sujeto VI-9).

A los 44 años de edad presentó clínica compatible con un brote hemisférico, siendo diagnosticada de EMRR al año siguiente. Posteriormente presentó un total 5 brotes, siempre con empeoramientos progresivos y secuelas residuales. La exploración neurológica inicial reveló una EDSS de 4,0. Una RM craneal mostró abundantes lesiones desmielinizantes compatibles con EM. Después del diagnóstico, se inició TIM que mantuvo hasta el año 2010 cuando se retiró por falta de eficacia. Después de un curso clínico remitente-recidivante, ha presentado un empeoramiento lento y progresivo considerándose una forma progresiva de la enfermedad (EMSP) desde el año 2008. Actualmente presenta secuelas motoras graves de la enfermedad con una EDSS de 8,5.

La paciente está casada con un primo hermano (sujeto VI-19). Una de sus hijas (sujeto VII-20) está afectada por la enfermedad.

#### Sujeto VI-24

Hombre de 63 años de edad, residente en Portugal y sin antecedentes patológicos de interés. Es primo hermano del caso índice (sujeto VI-9) y hermano del sujeto VI-20.

A los 33 años de edad, presentó clínica compatible con un brote de tronco encefálico, siendo diagnosticado de EMRR al cabo de 7 años. Posteriormente presentó un total de 3 brotes, siempre con empeoramientos progresivos y secuelas residuales. No hemos tenido acceso a la RM craneal, ya que el paciente se la hizo en Portugal, y aprovechando un viaje a España por motivos familiares fue visitado en la UNIEM donde se realizó la historia clínica y la extracción de sangre sin darnos su consentimiento para realizar un nuevo estudio radiológico. La exploración neurológica en aquel momento reveló una EDSS de 4,0 y, por historia clínica retrospectiva, calculamos una EDSS de 1,5 al inicio de la enfermedad. El paciente no ha recibido TIM hasta el momento actual. Después del diagnóstico, inició un curso lentamente progresivo de la enfermedad sin presentar nuevos brotes por lo que fue considerado como una EMSP en el momento de la inclusión.

El paciente acudió a la visita con su esposa (sujeto VI-23) y su hija (sujeto VII-21) las cuales no presentaban signos ni síntomas compatibles con EM. Ellas consintieron también la realización del estudio genético pero no la del estudio radiológico mediante RM.

#### Sujeto VII-2

Mujer de 35 años de edad, sin antecedentes patológicos de interés, hija del matrimonio consanguíneo entre los sujetos VI-2 y VI-3. Es la única afectada miembro de la familia que no pertenece directamente al núcleo relacionado con el caso índice (sujeto VI-9). Sin embargo, un hermano de su abuela paterna sí que se relacionó con dicho núcleo familiar al casarse con el sujeto V-12. A los 25 años de edad, presentó clínica compatible primero con un brote poliregional y posteriormente medular, siendo diagnosticada de EMRR. Posteriormente presentó un total de 4 brotes. La exploración neurológica inicial reveló una EDSS de 2,0. La RM craneal mostró abundantes lesiones desmielinizantes compatibles con EM. La paciente inició TIM con Avonex® pero debido a la aparición de nuevos brotes clínicos y nueva actividad radiológica se cambió el tratamiento a Tysabri®. Dada esta evolución, el curso clínico se consideró como agresivo, con una EDSS actual de 5,0. Desde el cambio de TIM, la paciente se ha mantenido clínica y radiológicamente estable.

#### Sujeto VII-3

Hombre de 39 años de edad, sin antecedentes patológicos de interés. Es sobrino materno del caso índice (sujeto VI-9) e hijo de una de sus hermanas (sujeto VI-5) que está afectada de EM. A los 24 años de edad, presentó clínica compatible con un brote de tronco encefálico, siendo diagnosticado de EMRR al año siguiente. Posteriormente ha presentado un total 4 brotes. La exploración neurológica inicial reveló una EDSS de 1,0. La RM craneal mostró abundantes lesiones desmielinizantes compatibles con EM. Después del diagnóstico, se inició TIM con Copaxone®, manteniéndose estable clínica y radiológicamente hasta la actualidad.

*Sujeto VII-20*

Mujer de 36 años de edad, sin antecedentes patológicos de interés, hija del matrimonio consanguíneo entre los sujetos VI-19 y VI-20. Es sobrina de segundo grado del caso índice (sujeto VI-9).

A los 22 años de edad, presentó clínica compatible con un brote de nervio óptico, siendo diagnosticada de EMRR al año siguiente. Posteriormente ha presentado un total de 5 brotes. La exploración neurológica inicial reveló una EDSS de 1,5. La RM craneal mostró abundantes lesiones desmielinizantes compatibles con EM. La paciente inició TIM con Rebif® que posteriormente se optimizó a Gilenya® debido a la aparición de nuevos brotes y nueva actividad radiológica. Dada esta evolución, el curso clínico se consideró como agresivo, con una EDSS actual de 6,0 debido a las importantes secuelas residuales. Desde el cambio de TIM, la paciente se ha mantenido clínica y radiológicamente estable.



**Tabla 19.** Características clínico-radiológicas del grupo de 7 sujetos afectados por alguna de las formas clínicas de EM.

<b>Variab</b> les	<b>VI-5</b>	<b>VI-9</b>	<b>VI-20</b>	<b>VI-24</b>	<b>VII-2</b>	<b>VII-3</b>	<b>VII-20</b>
Edad	56	27	44	33	25	24	22
Edad diagnóstico	59	30	45	40	25	25	23
Sexo	Mujer	Mujer	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
Forma clínica	SCA	EMRR	EMSP	EMSP	EMRR	EMRR	EMRR
Topografía inicial	TE	H	H	TE	PR	TE	TE
Brotos	1	6	5	3	4	4	5
EDSS inicial	0	1,0	4,0	1,5	2,0	1,0	1,5
EDSS evolución	0	1,0	8,5	4,0	5,0	1,5	6,0
Curso clínico	Estable	Estable	Progresivo	Progresivo	Agresivo	Estable	Agresivo
Ant. patológicos	Neo	Neo+Narc	Psoriasis	-	-	-	-
TIM	No	No	No	No	Sí	Sí	Sí
<b>RM</b>							
Lesiones en T2	>20	<=9	10-20	-	>20	>20	>20
Supratentoriales	>20	3	10-20	-	>20	>20	>20
Infratentoriales	0	0	2	-	10-20	3	2
Medulares	No	No	No	-	Sí	Sí	Sí
Lesiones en T1	Sí	No	Sí	-	Sí	Sí	Sí
Lesiones Gd+	0	0	0	-	4	4	5
Criterios Barkhof	3-4	1-2	3-4	-	3-4	3-4	3-4

**SCA:** síndrome clínicamente aislado, **EMRR:** esclerosis múltiple remitente recurrente, **EMSP:** esclerosis múltiple secundaria progresiva

**Topografía inicial:** **TE:** tronco encefálico; **H:** hemisférico; **PR:** poliregional

**Neo:** antecedentes de cáncer de mama; **Narc:** antecedentes de narcolepsia

#### 4.2.1.2. Descripción clínico-radiológica del grupo de sujetos afectados de SRA o EM presintomática

Los 3 sujetos afectados de SRA no habían presentado signos ni síntomas compatibles con la enfermedad pero la RM mostraba lesiones desmielinizantes que cumplían los criterios de Okuda (Tabla 4) para el diagnóstico de SRA. Se debe destacar que ninguno de estos 3 sujetos pertenecen al núcleo familiar principal de nuestro estudio. Dos de ellos eran hombres (66,7%) y el tercero era mujer (33,3%). La edad media de identificación fue de 48 ±12,16 años.

Todos los sujetos tenían una EDSS inicial y de evolución de 0 y se mantuvieron clínicamente estables. Referente a los antecedentes

patológicos, un hombre (sujeto VI-3) estaba diagnosticado de psoriasis, una mujer (sujeto VI-13) estaba diagnosticada de uveítis de repetición y de espondilitis anquilopoyética, y otro hombre (sujeto VII-1) estaba diagnosticado de una neuropatía hereditaria sensitivo-motora.

En cuanto a los datos radiológicos, solo un sujeto (sujeto VI-13) presentaba un número de LDT mayor de 10. Asimismo, solo un sujeto (sujeto VII-1) presentaba lesiones infratentoriales además de una lesión captante de Gadolinio. Ningún sujeto presentó lesiones medulares ni lesiones hipointensas en T1.

A continuación se realiza una breve descripción clínica de los 3 sujetos afectados de SRA o EM presintomática (Tabla 20).

#### Sujeto VI-3

Hombre de 61 años de edad, que como único antecedente patológico de interés presentaba una psoriasis sin tratamiento de base. No pertenece directamente al núcleo relacionado con el caso índice (sujeto VI-9). Sin embargo, un hermano de su madre, sí que se relacionó con dicho núcleo familiar al casarse con el sujeto V-12.

A los 56 años de edad, acepta participar en el estudio. La exploración neurológica fue normal con una EDSS de 0. Sin embargo, la RM craneal mostró lesiones desmielinizantes compatibles con EM que cumplían los criterios de Okuda (Tabla 4) para el diagnóstico de SRA. Se ha mantenido estable tanto clínica como radiológicamente, motivo por el que no se ha considerado tributario de TIM.

Este sujeto está casado con una prima hermana (sujeto VI-2). Tiene una hija (sujeto VII-2) afectada por la enfermedad y un hijo (sujeto VII-1) que presenta un SRA.

Sujeto VI-13

Mujer de 55 años de edad, que como antecedentes patológicos de interés presentaba una uveítis autoinmune en tratamiento con anticuerpo monoclonal (adalimumab) y de una espondilitis anquilopoyética. No pertenece directamente al núcleo relacionado con el caso índice (sujeto VI-9) pero una hermana (sujeto VI-15) y un primo de segundo grado (sujeto VI-4) se relacionaron con dicho núcleo familiar al casarse con los sujetos VI-16 y VI-5, respectivamente.

A los 54 años de edad, acepta participar en el estudio. La exploración neurológica fue normal con una EDSS de 0. Sin embargo, la RM craneal mostró abundantes lesiones desmielinizantes compatibles con EM que cumplían los criterios de Okuda (Tabla 4) para el diagnóstico de SRA. Se ha mantenido estable tanto clínica como radiológicamente motivo por el que no se ha considerado tributaria de TIM.

Sujeto VII-1

Hombre de 39 años de edad, que como único antecedente patológico de interés presenta una neuropatía hereditaria autosómica recesiva con afectación sensitivo-motora (Charcot-Marie-Tooth tipo 4G, tipo Russe; OMIM: 605285. Ver Tabla 12) diagnosticada a los 13 años de edad. No pertenece directamente al núcleo relacionado con el caso índice (sujeto VI-9). Sin embargo, un hermano de su abuela paterna sí que se relacionó con dicho núcleo familiar al casarse con el sujeto V-12.

A los 34 años de edad, acepta participar en el estudio. Las alteraciones neurológicas que presentaba en la exploración neurológica eran debidas a su neuropatía (EDSS de 0). Sin embargo, la RM craneal mostró lesiones desmielinizantes compatibles con EM que cumplían los criterios de Okuda (Tabla 4) para el diagnóstico de SRA. Se ha mantenido estable tanto clínica como radiológicamente motivo por el que no se ha considerado tributario de TIM.

**Tabla 20.** Características clínico-radiológicas del grupo de 3 sujetos afectados de SRA.

<b>Variables</b>	<b>VI-3</b>	<b>VI-13</b>	<b>VII-1</b>
Edad	56	54	34
Sexo	Hombre	Mujer	Hombre
Forma clínica	SRA	SRA	SRA
EDSS inicial	0	0	0
EDSS evolución	0	0	0
Curso clínico	Estable	Estable	Estable
Ant. patológicos	Psoriasis	Uveítis+EA	CMT4G
<b>RM</b>			
Lesiones en T2	<=9	10-20	<=9
Supratentoriales	9	10	5
Infratentoriales	0	0	2
Medulares	No	No	No
Lesiones en T1	No	No	No
Lesiones Gd+	0	0	1
Criterios Barkhof	3-4	3-4	1-2

**SRA:** síndrome radiológicamente aislado, **EA:** espondilitis anquilopoyética, **CMT4G:** Charcot-Marie-Tooth tipo 4G

#### 4.2.2. Descripción del grupo de sujetos no afectados

Un total de 20 sujetos no afectados fueron incluidos en el estudio. Aunque ninguno de ellos presentó sintomatología compatible con brotes ni lesiones de características desmielinizantes en la RM craneal, ciertos datos referentes a sus antecedentes patológicos y a su exploración física, justifican una mención específica.

El esposo y a la vez primo hermano (sujeto VI-10) del caso índice (sujeto VI-9) fue diagnosticado de una doble neoplasia pulmonar a los 49 y 54 años de edad, respectivamente, por las cuales fue intervenido quirúrgicamente además de someterse a quimioterapia y radioterapia. Investigando en los antecedentes familiares, descubrimos que su padre (sujeto V-13) había fallecido como consecuencia de una neoplasia de estómago. Una de sus hijas (sujeto VII-9) fue diagnosticada de narcolepsia a los 25 años de edad (recordemos que su madre también presentaba síntomas compatibles,

aunque sin haberse podido confirmar el cuadro clínico). El sujeto VI-17, prima hermana del caso índice y hermana del sujeto VI-10, fue diagnosticada de un adenocarcinoma intramucoso de sigma a los 71 años de edad. Una de sus hijas (sujeto VII-18) está diagnosticada de psoriasis. El sujeto VI-19, primo hermano del caso índice y hermano de los sujetos VI-10 y VI-17, fue diagnosticado de un carcinoma escamoso de laringe a los 55 años de edad por el que fue intervenido quirúrgicamente además de someterse a quimioterapia y radioterapia. El sujeto VII-16, sobrino del caso índice, fue diagnosticado de un schwannoma de raíz medular dorsal a los 36 años de edad por el que fue intervenido quirúrgicamente. Un hermano de este sujeto (sujeto VII-15) fue diagnosticado de lipomatosis familiar múltiple. Investigando en los antecedentes familiares, descubrimos que la madre de estos dos sujetos (sujeto VI-15) y su abuela materna (sujeto V-11) también padecían de lipomatosis familiar múltiple. Su padre (sujeto VI-16) había fallecido a causa de un probable tumor mediastínico. Finalmente, el sujeto VII-22, sobrino del caso índice, fue diagnosticado de miastenia gravis a los 19 años de edad además de presentar vitiligo desde los 15 años.

### **4.3. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS DE LA FAMILIA**

Se obtuvieron muestras sanguíneas para el análisis de las variables genéticas de 28 sujetos de los 30 incluidos en el estudio.

Para los hallazgos relacionados con la genética descriptiva (es decir, el ADN mitocondrial y la región HLA), se excluyeron del análisis estadístico a aquellos sujetos con SRA (VI-3, VI-13 y VII-1) ya que consideramos que podrían ser un factor de confusión a la hora de interpretar los resultados. Además no disponíamos de una cohorte de sujetos de etnia gitana y origen español con características clínicas comparables. Por lo tanto, dentro de estos análisis se incluyeron un total de 25 sujetos, de los cuales 7 estaban

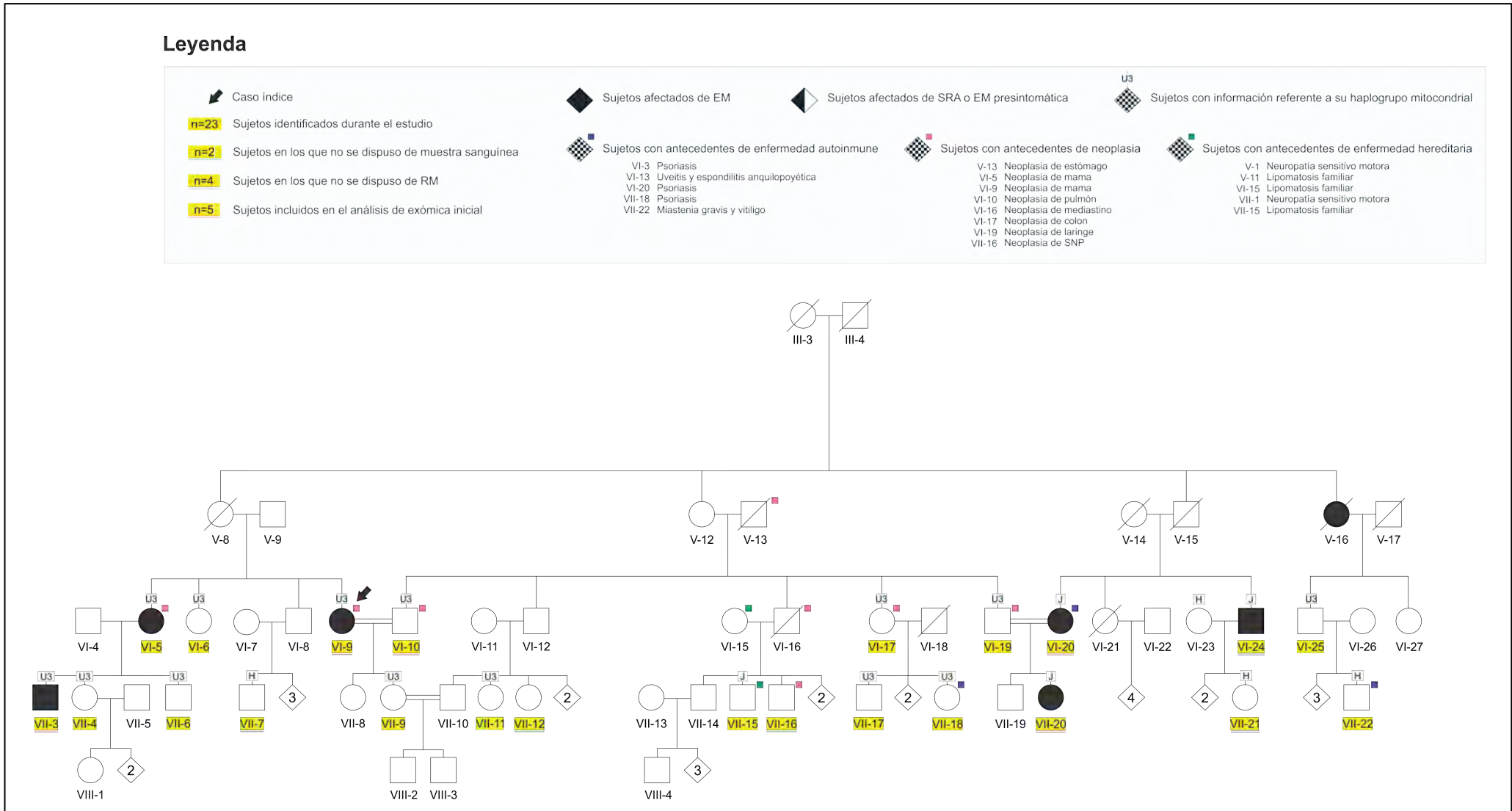
afectados por la enfermedad. Para este grupo de 25 sujetos, se realizó también un análisis comparativo con otras cohortes de individuos.

En el caso del ADN mitocondrial, se compararon los haplogrupos y las variantes de la HV1 de los sujetos afectados y no afectados de la familia con la cohorte de individuos de etnia gitana afectados de EM publicada por Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2008) y con la cohorte “europea” de etnia gitana no afectada de EM publicada por Gresham y colaboradores (Gresham et al. 2001). Para el caso del análisis de la región HLA, se compararon los resultados observados en la familia con los de un grupo de 108 pacientes afectados con EM de origen español y etnia no gitana, y un grupo de 100 sujetos controles con otras enfermedades neurológicas (no EM), también de origen español y etnia no gitana. Estos dos grupos de sujetos procedían de una colección de muestras propias de la UNIAM.

Por otro lado, para los hallazgos relacionados con el acotamiento genético y búsqueda de genes candidatos (es decir, el genotipado de los principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS, y el análisis de exómica), se excluyeron del análisis estadístico no solo a los sujetos con SRA (sujetos VI-3, VI-13 y VII-1) sino también a todos aquellos que no perteneciesen al núcleo familiar principal. Por lo tanto, se incluyeron un total de 21 sujetos, de los cuales 6 estaban afectados por la enfermedad (Figura 61). Para este análisis, en vez de realizar comparaciones con otras cohortes de control, se realizaron las comparaciones entre sujetos afectados y no afectados pertenecientes a la familia del estudio.

**Legenda**

<p>↖ Caso índice</p> <p><b>n=23</b> Sujetos identificados durante el estudio</p> <p><b>n=2</b> Sujetos en los que no se dispuso de muestra sanguínea</p> <p><b>n=4</b> Sujetos en los que no se dispuso de RM</p> <p><b>n=5</b> Sujetos incluidos en el análisis de exómica inicial</p>	<p>◆ Sujetos afectados de EM</p> <p>◆ Sujetos afectados de SRA o EM presintomática</p> <p>◆ Sujetos con información referente a su haplogrupo mitocondrial</p>	<p>◆ Sujetos con antecedentes de enfermedad autoinmune</p> <p>VI-3 Psoriasis VI-13 Uveitis y espondilitis anquilopoyética VI-20 Psoriasis VII-18 Psoriasis VII-22 Miastenia gravis y vitiligo</p>	<p>◆ Sujetos con antecedentes de neoplasia</p> <p>V-13 Neoplasia de estómago VI-5 Neoplasia de mama VI-9 Neoplasia de mama VI-10 Neoplasia de pulmón VI-16 Neoplasia de mediastino VI-17 Neoplasia de colon VI-19 Neoplasia de laringe VII-16 Neoplasia de SNP</p>	<p>◆ Sujetos con antecedentes de enfermedad hereditaria</p> <p>V-1 Neuropatía sensitivo motora V-11 Lipomatosis familiar VI-15 Lipomatosis familiar VII-1 Neuropatía sensitivo motora VII-15 Lipomatosis familiar</p>
---	--	---	--	---



**Figura 61.** Árbol genealógico de la familia en estudio, incluyendo solo los miembros pertenecientes al núcleo familiar principal.

#### 4.3.1. Descripción de los haplogrupos de ADN mitocondrial

Los 4 principales haplogrupos descritos en población gitana (M5, H, J y U3) fueron identificados dentro de los 25 sujetos analizados (Tabla 21). Todos los haplogrupos observados fueron concordantes a nivel parenteral y confirmaban la distribución del árbol genealógico.

**Tabla 21.** Distribución de los diferentes haplogrupos observados en los miembros de la familia.

Haplogrupos	Variantes de la HV1	Sujetos	Forma clínica	Linaje %
<b>M5</b>	129, 223, 291, 298	VI-2	NA	8
	129, 223, 291, 298	VII-2	EMRR	
<b>H</b>	311	VI-23	NA	16
	311	VII-7	NA	
	311	VII-21	NA	
	129	VII-22	NA	
<b>J</b>	69, 126, 145, 222, 235, 261, 271	VI-20	EMSP	16
	69, 126, 145, 222, 235, 261, 271	VI-24	EMSP	
	69, 126	VII-15	NA	
	69, 126, 145, 222, 235, 261, 271	VII-20	EMRR	
<b>U3</b>	343	VI-4	NA	60
	343	VI-5	SCA	
	343	VI-6	NA	
	343	VI-9	EMRR	
	343	VI-10	NA	
	343	VI-17	NA	
	343	VI-19	NA	
	343	VI-25	NA	
	343	VII-3	EMRR	
	343	VII-4	NA	
	343	VII-6	NA	
	343	VII-9	NA	
	343	VII-11	NA	
	343	VII-17	NA	
343	VII-18	NA		

**HV1:** región hipervariable 1 de la región control, **SCA:** síndrome clínicamente aislado, **EMRR:** esclerosis múltiple remitente recidivante, **EMSP:** esclerosis múltiple secundaria progresiva, **NA:** no afectado



Haplogrupo M5

Justificaba el 8% del linaje mitocondrial en este estudio y correspondía a 1 sujeto afectado de EMRR (VII-2) y a otro no afectado (VI-2).

Haplogrupo H

Justificaba el 16% del linaje mitocondrial en este estudio y correspondía a un total de 4 sujetos de la familia, ninguno de ellos afectado (VI-23, VII-7, VII-21 y VII-22).

Haplogrupo J

Justificaba el 16% del linaje mitocondrial en este estudio y correspondía a un total de 4 sujetos de la familia: 2 de ellos afectados por formas progresivas de la enfermedad (VI-20 y VI-24), 1 por una EMRR de curso agresivo (VII-20) y solo uno (VII-15) resultó no afectado.

Haplogrupo U3

Justificaba el 60% del linaje mitocondrial en este estudio y correspondía a un total de 15 sujetos de la familia, la mayoría de ellos no afectados (VI-4, VI-6, VI-10, VI-17, VI-19, VI-25, VII-4, VII-6, VII-9, VII-11, VII-17 y VII-18). Solo 3 sujetos de la familia portadores de este haplogrupo resultaron afectados, 2 por una EMRR (VI-9 y VII-3) y 1 por un SCA (VI-5).

Al comparar la distribución de los 4 haplogrupos y las variantes de la HV1 estudiados entre los sujetos afectados y no afectados de la familia con las cohortes publicadas por Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2008) y Gresham y colaboradores (Gresham et al. 2001), se observaron diferencias estadísticamente significativas en el haplogrupo J ( $p=0,039$ ) mostrando una mayor presencia entre los sujetos afectados (Tabla 22). En concreto, un 42,9% de los sujetos de la familia presentan el haplogrupo J y corresponden a sujetos con formas progresivas de la enfermedad y un sujeto con una EMRR agresiva (Tabla 11 y Figura 62).

**Tabla 22.** Asociación de los haplogrupos y las variantes de la HV1 observados entre los miembros de la familia y los controles.

Haplogrupos y variantes de la HV1	GyEM-Gi	GyCO-Gi	GyEM	GyCO	Valor de $p^*$
<b>M5</b>					0,234
129, 223, 291, 298	1	1	2	4	
<b>H</b>					0,123
311	0	3	0	0	
129	0	1	0	0	
<b>J</b>					<b>0,039</b>
69, 126	0	1	1	0	
69, 126, 145, 222, 235, 261, 271	3	0	1	1	
<b>U3</b>					0,332
343	3	12	2	11	
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	

HV1: región hipervariable 1 de la región control

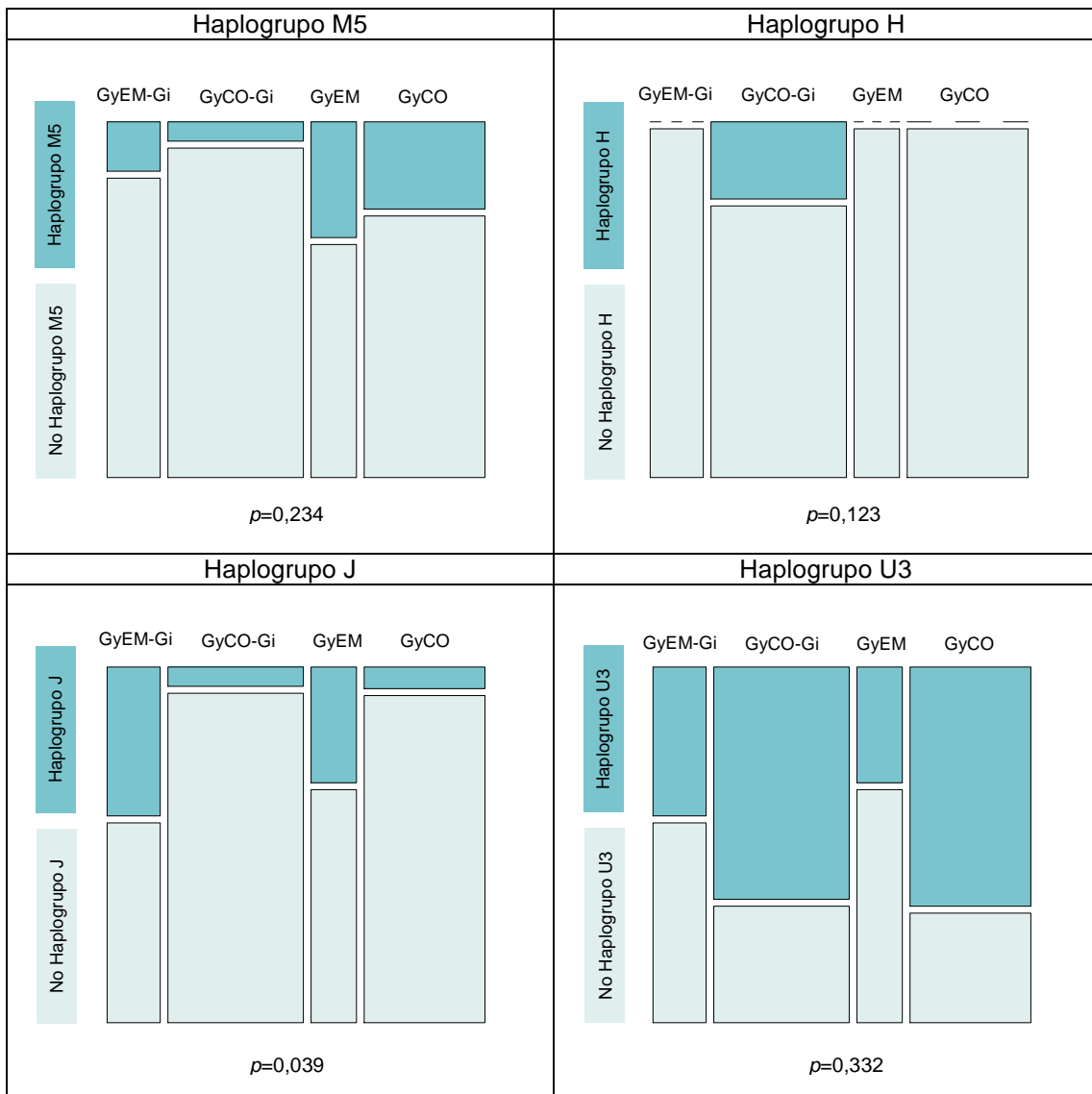
GyEM-Gi: sujetos afectados de EM pertenecientes a la familia en estudio (no se incluyeron los sujetos con SRA)

GyCO-Gi: sujetos no afectados pertenecientes a la familia en estudio (no se incluyeron los sujetos con SRA)

GyEM: pacientes afectados de EM de etnia gitana descritos por Fernández y colaboradores en 2008

GyCO: sujetos de etnia gitana no afectados de EM descritos por Gresham y colaboradores en 2001

\*El valor de  $p$  se ha obtenido mediante el test exacto de Fisher



**GyEM-Gi:** sujetos afectados de EM pertenecientes a la familia en estudio (no se incluyeron los sujetos con SRA)  
**GyCO-Gi:** sujetos no afectados pertenecientes a la familia en estudio (no se incluyeron los sujetos con SRA)  
**GyEM:** pacientes afectados de EM de etnia gitana descritos por Fernández y colaboradores en 2008  
**GyCO:** sujetos de etnia gitana no afectados de EM descritos por Gresham y colaboradores en 2001

**Figura 62.** Representación gráfica de la presencia de haplogrupos (M5, H, J y U3) observados entre los miembros de la familia y los controles.

#### 4.3.2. Descripción de los resultados del genotipado de la región HLA

Siete de los 25 sujetos a los que se analizaron los genes *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1* estaban afectados por la enfermedad.

Además, tal como se comentó previamente, para el caso del gen *HLA-DRB1* se compararon las cohortes con un grupo de 108 pacientes afectados de EM

de origen español y etnia no gitana, y un grupo de 100 sujetos controles con otras enfermedades neurológicas (no EM) también de origen español y etnia no gitana, ambos procedentes de una colección de muestras propias de la UNIEM. Por lo que en total existían 4 grupos comparativos.

Los resultados mostraron que dentro del gen *HLA-DRB1* los alelos encontrados para la familia en estudio fueron \*03, \*04, \*07, \*08, \*11, \*13 y \*14, siendo el alelo *HLA-DRB1\*03* el más frecuentemente observado tanto en los sujetos afectados (35,7%) como en los no afectados (41,7%), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos (Tabla 23). En cuanto a la región *HLA-DQB1*, los alelos encontrados fueron \*02, \*03, \*04, \*05 y \*06, siendo el alelo *HLA-DQB1\*02* el más frecuentemente observado (71,4%), sin observarse tampoco diferencias significativas entre los dos grupos. Todos los sujetos portadores del alelo *HLA-DRB1\*03* eran portadores también del alelo *HLA-DQB1\*02*.

Los resultados para las cohortes comparativas mostraron que dentro del gen *HLA-DRB1* los alelos encontrados fueron \*01, \*03, \*04, \*07, \*08, \*09, \*10, \*11, \*12, \*13, \*14, \*15 y \*16, siendo el alelo *HLA-DRB1\*15* el más frecuentemente observado en pacientes con EM (22,2%) mientras que *HLA-DRB1\*11* fue el más frecuentemente observado en controles (14,5%) (Tabla 23). Cabe destacar que ningún miembro de la familia en estudio presentó el alelo de riesgo *HLA-DRB1\*15*.

Observamos que, al analizar la distribución del alelo protector *HLA-DRB1\*14*, éste estaba presente en una mayor proporción de sujetos con EM pertenecientes a la familia, a diferencia de los pacientes con EM de origen español y etnia no gitana (28,6% vs 0,9%). Todos los sujetos portadores del alelo *HLA-DRB1\*14* eran portadores también del alelo *HLA-DQB1\*05*.

Cuando comparamos la presencia de los diferentes alelos entre los cuatro grupos de sujetos, observamos diferencias estadísticamente significativas para *HLA-DRB1\*01*, *HLA-DRB1\*03*, *HLA-DRB1\*11*, *HLA-DRB1\*14* y *HLA-DRB1\*15* (en negrita en la Tabla 23). Mediante el análisis de comparaciones múltiples, se observó una diferencia estadísticamente significativa con

respecto al alelo *HLA-DRB1\*03* entre los sujetos no afectados pertenecientes a la familia y los sujetos controles de origen español y etnia no gitana ( $p=0,0001$ ). También se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al alelo *HLA-DRB1\*14* entre los sujetos afectados de EM pertenecientes a la familia y los pacientes con EM de origen español y etnia no gitana ( $p=0,0001$ ).

**Tabla 23.** Resultados observados para el gen *HLA-DRB1* tanto en la familia en estudio como en las cohortes comparativas.

Alelos de la región HLA-DRB1	GyEM-Gi (n=14)	GyCO-Gi (n=36)	PctsEM (n=216)	CO (n=200)	GyEM-Gi vs GyCO-Gi (*)	GyEM-Gi vs PctsEM (*)	GyCO-Gi vs CO (*)
<b>HLA-DRB1*01</b>			13 (6,02%)	27 (13,50%)	1,000	1,000	0,018
<b>HLA-DRB1*03</b>	5 (35,71%)	15 (41,67%)	36 (16,67%)	25 (12,50%)	0,758	0,140	<b>0,0001</b>
HLA-DRB1*04	3 (21,43%)	6 (16,67%)	31 (14,35%)	26 (13,00%)	0,697	0,442	0,597
HLA-DRB1*07	2 (14,29%)	5 (13,89%)	24 (11,11%)	25 (12,50%)	1,000	0,663	0,788
HLA-DRB1*08		4 (11,11%)	11 (5,09%)	8 (4,00%)	0,566	1,000	1,000
HLA-DRB1*09			1 (0,46%)		1,000	1,000	1,000
HLA-DRB1*10			1 (0,46%)		1,000	1,000	1,000
<b>HLA-DRB1*11</b>		3 (8,33%)	14 (6,48%)	29 (14,50%)	0,550	1,000	0,432
HLA-DRB1*12			3 (1,39%)	2 (1,00%)	1,000	1,000	1,000
HLA-DRB1*13		1 (2,78%)	26 (12,04)	24 (12,00%)	1,000	0,378	0,140
<b>HLA-DRB1*14</b>	4 (28,57%)	2 (5,56%)	2 (0,93%)	10 (5,00%)	0,044	<b>0,0001</b>	1,000
<b>HLA-DRB1*15</b>			48 (22,22%)	21 (10,50%)	1,000	0,046	0,051
HLA-DRB1*16			6 (2,78%)	4 (2,00%)	1,000	1,000	1,000

**GyEM-Gi:** sujetos afectados de EM pertenecientes a la familia en estudio (no se incluyeron los sujetos con SRA)

**GyCO-Gi:** sujetos no afectados pertenecientes a la familia en estudio (no se incluyeron los sujetos con SRA)

**PctsEM:** pacientes con EM de origen español y etnia no gitana (colección propia UNIAM)

**CO:** sujetos control de origen español y etnia no gitana afectados por otras enfermedades (no EM) (colección propia UNIAM)

Los valores absolutos de (**n**) se expresaron como frecuencia alélica, es decir la frecuencia absoluta real multiplicada por 2 (correspondiente a un alelo de origen paterno y el otro de origen materno)

**En negrita:** los alelos significativos en la comparación inicial entre los cuatro grupos (para este análisis se usó chi cuadrado)

(\*) El valor de *p* se ha obtenido mediante el test exacto de Fisher (valor ajustado para comparaciones múltiples)

### 4.3.3. Descripción de los resultados del genotipado de los principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS

Ante los resultados obtenidos hasta ese momento y, debido a la ausencia de diferencias claras mediante el estudio de la región HLA (*HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*), el siguiente paso fue secuenciar los SNPs que hasta ese momento habían sido asociados con otras regiones del genoma (no HLA). Para ello, se tomó como referencia el artículo de revisión publicado en el 2010 por Oksenberg y Baranzini (Oksenberg & Baranzini 2010) en el que se recogen los 12 principales locus de susceptibilidad no HLA asociados a la enfermedad hasta ese momento y validados en grandes estudios de asociación (Tabla 14 y Figura 63).

<b>Table 2   Established non-MHC susceptibility genes and variants in MS</b>					
Gene	Associated single nucleotide polymorphism	Location	Risk allele	Estimated odds ratio	Protein function
<i>CD58</i>	rs2300747	1p13	A	1.18	Cell adhesion; immunological co-stimulation
<i>EVI5</i>	rs10735781	1p22.1	G	1.23	Rab GTPase activator; cell cycle
<i>RGS1</i>	rs2760524	1q31	G	1.13	GTPase activator
<i>IL7R</i>	rs6897932	5p13	C	1.04	Cytokine receptor
<i>IL2RA</i>	rs2104286	10p15–p14	T	1.18	Cytokine receptor
<i>CD6</i>	rs17824933	11q13	G	1.16	Cell adhesion
<i>TNFRSF1A</i>	rs1800693	12p13.2	C	1.23	Cytokine receptor
<i>CLEC16a</i>	rs12708716	16p13.3	A	1.17	Not determined
<i>IRF8</i>	rs17445836	16q24.1	G	1.33	Transcription
<i>CD226</i>	rs763361	18q22.3	T	1.04	Cell adhesion
<i>TYK2</i>	rs34536443	19p13.2	G	1.30	Intracellular signaling
<i>CD40</i>	rs6074022	20q12	G	1.22	Immunological co-stimulatory receptor

Abbreviation: MS, multiple sclerosis.

**Figura 63.** Los 12 principales locus de susceptibilidad no HLA asociados a la enfermedad según los principales GWAS hasta el 2010 (Oksenberg & Baranzini 2010).

Este análisis se realizó mediante secuenciación por Sanger en un total de 21 sujetos pertenecientes al núcleo familiar principal, de los cuales 6 sujetos correspondían a pacientes afectados por la enfermedad (Figura 61).

Los resultados de este primer abordaje se muestran en la Tabla 24. Tal como se puede observar, para el gen *CD58* (OMIM: 153420), el SNP rs2300747\*A se observaba con mayor frecuencia entre los sujetos afectados que entre los no afectados con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,046$ ) teniendo en cuenta que todos los sujetos afectados eran homocigotos para el alelo de riesgo.

**Tabla 24.** Resultados de los 12 principales locus de susceptibilidad no HLA descritos previamente en los GWAS.

Cr	#dbSNP	A-R	Gen candidato	GyEM-Gi (n=6)			GyCO-Gi (n=15)			Valor de $p^*$
				Hom	Het	NoP	Hom	Het	NoP	
1	rs2300747	A	<i>CD58</i>	6	0	0	7	8	0	<b>0,046</b>
1	rs10735781	G	<i>EVI5</i>	2	4	0	4	7	4	0,562
1	rs2760524	G	<i>RGS1</i>	6	0	0	14	1	0	1,000
5	rs6897932	C	<i>IL7R</i>	1	5	0	5	9	1	0,723
10	rs2104286	T	<i>IL2RA</i>	5	1	0	12	3	0	1,000
11	rs17824933	G	<i>CD6</i>	0	3	3	0	3	12	0,291
12	rs1800693	C	<i>TNFRSF1A</i>	1	4	1	3	8	4	1,000
16	rs12708716	A	<i>CLEC16a</i>	6	0	0	11	2	2	1,000
16	rs17445836	G	<i>IRF8</i>	5	1	0	12	3	0	1,000
18	rs763361	T	<i>CD226</i>	3	3	0	4	10	1	0,723
19	rs34536443	G	<i>TYK2</i>	0	0	6	0	0	15	1,000
20	rs6074022	G	<i>CD40</i>	0	1	5	0	5	10	0,623

Cr: cromosoma, #dbSNP: número según la dbSNP, A-R: alelo de riesgo

GyEM-Gi: sujetos afectados de EM pertenecientes a la familia en estudio (solo núcleo familiar principal)

GyCO-Gi: sujetos no afectados pertenecientes a la familia en estudio (solo núcleo familiar principal)

Hom: portadores en homocigosis del A-R

Het: portadores en heterocigosis del A-R

NoP: no portadores del A-R

\*El valor de  $p$  se ha obtenido mediante el test exacto de Fisher

Debido a este hallazgo, se consideró oportuno profundizar en el estudio del gen *CD58* y se genotiparon los otros 3 SNPs significativamente asociados con la enfermedad según los diferentes GWAS publicados entre 2007 y 2013: rs12044852\*C (IMSGC 2007), rs1335532\*A (IMSGC & WTCCC2 2011) y rs6677309\*A (IMSGC 2013a).

Los resultados de este segundo abordaje mostraron que los SNPs: rs1335532\*A y rs6677309\*A tenían el mismo patrón de asociación que el primer SNP analizado (rs2300747\*A) observándose con mayor frecuencia entre los sujetos afectados que entre los no afectados ( $p=0,046$ ), mientras que el SNP rs12044852\*C presentaba el mismo genotipado de riesgo para todos los sujetos, afectados y no afectados por la enfermedad.

#### 4.3.4. Descripción de los resultados del análisis de exómica

La EM es una enfermedad genéticamente compleja en la que es complicado definir un patrón de herencia mendeliana. Por este motivo, se realizó una priorización para la identificación de posibles genes candidatos distribuyendo las **variantes potencialmente patogénicas** de acuerdo a un modelo de herencia autosómico recesivo y otro de herencia autosómico dominante como parte del abordaje propuesto por Ng y colaboradores (Ng et al. 2010).

##### Modelo de herencia autosómico recesivo

En este modelo se seleccionaron variantes con una frecuencia alélica menor (MFA) <5% en la población general y que estuvieran presentes en los 2 alelos del sujeto, ya fuera en la misma posición (homocigoto) o en dos posiciones diferentes dentro del mismo gen (heterocigoto compuesto).

##### Modelo de herencia autosómico dominante

En este modelo se seleccionaron variantes con una MFA <1% y que estuvieran presentes al menos en uno de los alelos del sujeto.



#### 4.3.4.1. Acotamiento y validación de las variantes potencialmente patogénicas en base al modelo de herencia autosómico recesivo

Aplicando los criterios para este modelo se pudieron aislar 59 genes. De estos, se seleccionaron 16 con variantes que podían afectar la expresión o la función del gen (Tabla 25). Posteriormente se cotejaron las variantes con la base de datos “PolyPhen” (PolyPhen 2015) y se escogieron 10 genes cuyas variantes podían producir una alteración significativa en la estructura o función de la proteína (Tabla 25).

**Tabla 25.** Resultados del análisis de exómica basado en el modelo de herencia autosómico recesivo: 16 genes con variantes que podían afectar la expresión o la función del gen.

Cr	Gen	REF	VAR	#dbSNP <sup>a</sup>	Consecuencia
1	<i>ARHGAP30</i>	T	A	-	missense_variant
1	<b><i>SEC22B</i></b>	T	C	rs2590131	non_coding_exon_variant
3	<b><i>IL17RC</i></b>	C	G	rs183956	3_prime_UTR_variant
6	<i>HLA-C</i>	T	C	rs1130935	missense_variant
6	<b><i>PRIM2</i></b>	C	T	rs9885751	non_coding_exon_variant
7	<i>MUC3A</i>	A	G	-	missense_variant
8	<i>ZNF707</i>	A	G	rs11786757	synonymous_variant
9	<b><i>FOCAD</i></b>	T	G	-	missense_variant
10	<b><i>RUFY2</i></b>	C	T	rs749641152	splice_region_variant
11	<b><i>OR4C5</i></b>	C	T	rs75027745	missense_variant
11	<b><i>THYN1</i></b>	A	C	-	missense_variant
12	<b><i>C12orf45</i></b>	A	G	-	missense_variant
12	<b><i>EMG1</i></b>	T	C	rs17857448	non_coding_exon_variant
14	<i>IGHV7-81</i>	T	A	rs61741319	missense_variant
17	<i>KCNJ12</i>	G	A	rs1657740	missense_variant
19	<b><i>KIR2DL1</i></b>	T	C	rs670771	splice_region_variant

Cr: cromosoma, REF: alelo de referencia, VAR: alelo variante, #dbSNP: número según la dbSNP  
En **negrita** los 10 genes aislados en base a las variantes que podían producir alteración en la estructura o función de la proteína de acuerdo a la base “PolyPhen”

<sup>a</sup>Variantes descritas en la dbSNP. Los demás espacios en blanco corresponden a variantes nuevas no descritas previamente y, por tanto, sin número de identificación

Finalmente, de los 10 genes anteriormente mencionados, se aislaron 3 con variantes potencialmente patogénicas en base a su función e implicación en el sistema inmune (Tabla 26). Se realizó la secuenciación por Sanger de estos 3 genes en los 21 sujetos pertenecientes al núcleo familiar principal

lográndose validar los resultados de la exómica para el gen **KIR2DL1** (OMIM: 604936) – rs670771\*C *splice\_region\_variant* –.

Para este gen en particular, se observó que la variante rs670771\*C producía un cambio en una región de “*splicing*” (concretamente c.818-7T>C) que se expresaba con mayor frecuencia entre los sujetos afectados comparados con los no afectados ( $p=0,049$ ).

**Tabla 26.** Resultados del análisis de exómica basado en el modelo de herencia autosómico recesivo: los 3 genes aislados durante el acotamiento en base a su función e implicación en el sistema inmune.

Cr	Gen	REF	VAR	#dbSNP <sup>a</sup>	Consecuencia (s)	Valor p*
3	<i>IL17RC</i>	C	G	rs183956 <sup>a</sup>	3_prime_UTR_variant	-
11	<i>THYN1</i>	A	C	-	missense_variant	-
19	<b><i>KIR2DL1</i></b>	T	C	rs670771 <sup>a</sup>	splice_region_variant	<b>0,049</b>

Cr: cromosoma, REF: alelo de referencia, VAR: alelo variante, #dbSNP: número según la dbSNP  
En **negrita**, el gen cuyos resultados de exómica se validaron mediante secuenciación por Sanger

<sup>a</sup>Variantes descritas en la dbSNP. El resto corresponde a variantes previamente no descritas

\*El valor de p se ha obtenido mediante el test exacto de Fisher

#### 4.3.4.2. Acotamiento y validación de las variantes potencialmente patogénicas en base al modelo de herencia autosómico dominante

Aplicando los criterios para este modelo se pudieron aislar 277 genes. De estos, se seleccionaron 81 genes con variantes que podían afectar la expresión o la función del gen. Posteriormente se cotejaron estas variantes con la base de datos “*PolyPhen*” (PolyPhen 2015) y se escogieron 20 genes con alteraciones “posiblemente” o “probablemente” dañinas en la estructura o función de la proteína (Tabla 27). De éstos, se seleccionaron solo aquellos genes con alteraciones “probablemente” dañinas, obteniendo un total de 7 genes (Tabla 27). No obstante, analizando más detenidamente las variantes de estos genes, se observó que la mayoría de sujetos afectados eran “*Uncertain heterozygous*” para el alelo variante con una baja cobertura durante el proceso de secuenciación repetida. Además, en alguna de las

secuenciaciones, el sujeto control también mostraba ser portador del alelo variante. Todos estos datos sugerían que los resultados de la exómica mediante esta forma de acotamiento no se validarían; hecho que se confirmó al genotipar la variante relacionada con el gen *THYN1* (OMIM: 613739) donde tanto los sujetos afectados como el sujeto control eran portadores del alelo de referencia (Tabla 27).

**Tabla 27.** Resultados del análisis de exómica basado en el modelo de herencia autosómico dominante: 20 genes cuyas variantes podían producir una alteración “posiblemente” o “probablemente” dañina en la estructura o función de la proteína según la base “PolyPhen”.

Cr	Gen	REF	VAR	#dbSNP <sup>a</sup>	Consecuencia
2	<i>IFT172</i>	C	A	-	missense_variant
3	<i>PTPRG</i>	C	G	-	missense_variant
4	<i>ARHGAP24</i>	A	C	-	missense_variant
4	<b><i>CCDC158</i></b>	G	T	-	missense_variant
8	<i>CHRAC1</i>	C	T	-	missense_variant
8	<b><i>CYHR1</i></b>	A	G	rs758206016	missense_variant
9	<i>FOCAD</i>	T	G	-	missense_variant
11	<i>OR4C5</i>	C	T	rs75027745	missense_variant
11	<b><i>THYN1*</i></b>	A	C	-	missense_variant
12	<i>C12orf45</i>	A	G	-	missense_variant
13	<i>AMER2</i>	G	T	-	missense_variant
13	<b><i>CCDC168</i></b>	T	G	-	missense_variant
13	<b><i>UGGT2</i></b>	C	A	-	missense_variant
16	<b><i>CTCF</i></b>	C	A	-	missense_variant
16	<i>PRDM7</i>	A	T	-	missense_variant
18	<i>PIK3C3</i>	A	T	-	missense_variant
19	<i>GYS1</i>	C	T	rs773246468	missense_variant
19	<i>IL27RA</i>	T	G	-	missense_variant
19	<b><i>MYH14</i></b>	G	C	rs375694189	missense_variant
22	<i>PNPLA5</i>	A	T	rs781647730	missense_variant

Cr: cromosoma, REF: alelo de referencia, VAR: alelo variante, #dbSNP: número según la dbSNP  
En **negrita** los 7 genes con alteraciones “probablemente” dañinas en la estructura o función de la proteína de acuerdo a la base “PolyPhen”

\*El resultado de exómica no se pudo validar mediante la secuenciación por Sanger

<sup>a</sup>Variantes descritas en la dbSNP. Los demás espacios en blanco corresponden a variantes nuevas no descritas previamente y, por tanto, sin número de identificación

Seguidamente, se realizó un segundo acotamiento de las variantes escogidas basado en la función e implicación en el sistema inmune que pudieran tener los 81 genes previamente seleccionados. De esta forma, se aislaron 4 nuevos genes (Tabla 28).

Finalmente, se realizó la secuenciación por Sanger de estos 4 genes en los 21 sujetos pertenecientes al núcleo familiar principal lográndose validar los resultados de la exómica en 2 de estos genes (Tabla 28). Para el caso del gen **KIR2DL1** (OMIM: 604936), se observó que la variante rs670771\*C producía un cambio en una región de “*splicing*” (concretamente c.818-7T>C) que se observaba con mayor frecuencia entre los sujetos afectados comparados con los no afectados ( $p=0,049$ ). En el caso del gen **CD207** (OMIM: 604862), la variante rs115727537\*T producía un cambio “*missense*” (concretamente c.251G>A) que se observaba con mayor frecuencia entre los sujetos afectados comparados con los no afectados ( $p=0,019$ ) considerando en el análisis tanto a portadores como no portadores. Cuando se analizaron solo a los sujetos portadores considerando si eran heterocigotos u homocigotos para la variante, también se observó una diferencia estadísticamente significativa a favor de los heterocigotos ( $p=0,021$ ).

**Tabla 28.** Resultados del análisis de exómica basado en el modelo de herencia autosómico dominante: los 4 genes aislados durante el segundo acotamiento en base a su función e implicación en el sistema inmune.

Cr	Gen	REF	VAR	#dbSNP	Consecuencia (s)	Valor $p^*$
2	<b>CD207</b>	C	T	rs115727537	missense_variant	<b>0,019</b>
17	EME1	A	AAGC	rs144820580	inframe_insertion	-
17	KCNJ12	G	A	rs1657740	missense_variant	-
19	<b>KIR2DL1</b>	T	C	rs670771	splice_region_variant	<b>0,049</b>

Cr: cromosoma, REF: alelo de referencia, VAR: alelo variante, #dbSNP: número según la dbSNP  
 En **negrita**, los genes cuyos resultados de exómica se validaron mediante secuenciación por Sanger  
 \*El valor de  $p$  se ha obtenido mediante el test exacto de Fisher



## **5. DISCUSIÓN**



Mediante este trabajo de tesis doctoral se ha estudiado, tanto clínica como genéticamente, a una extensa familia de etnia gitana con una forma hereditaria de EM.

El elevado número de miembros afectados, la presencia de varias formas clínicas de la enfermedad incluida la presintomática (SRA) y las características étnicas de la familia (una alta endogamia y, por tanto, una elevada homocigosis dentro de la misma), la convierten en una población aislada excepcional para el estudio de nuevos sustratos genéticos asociados a la enfermedad.

Los resultados de esta tesis han permitido identificar ciertas variantes genéticas, algunas de ellas no descritas previamente, de forma significativamente más elevada entre los sujetos de la familia afectados de EM en comparación a los no afectados, sugiriendo la existencia de varios genes candidatos implicados en el desarrollo de la enfermedad en esta familia concreta.

## **5.1. LA HEREDABILIDAD PERDIDA DE LA EM**

Hasta el momento actual, los estudios genéticos en EM solo han podido explicar aproximadamente el 30% de la heredabilidad total de la enfermedad. Varias teorías intentan explicar el gran porcentaje de heredabilidad que aún no conocemos:

### Variantes raras:

Los GWAS están diseñados para identificar variantes comunes, es decir, aquellas con una frecuencia alélica  $\geq 5\%$ , por lo que aquellas variantes más raras que no alcancen dicha frecuencia pueden escapar al análisis. Este hecho fue evidenciado por primera vez en el 2011 por Ramagopalan y colaboradores (Ramagopalan et al. 2011) y posteriormente por Dymment y colaboradores (Dymment et al. 2012), quienes identificaron nuevas variantes



de riesgo para EM asociadas a los genes *CYP27B1* y *TYK2*, respectivamente usando un abordaje exómico para el análisis genético. Este tipo de abordaje es el que se ha utilizado en este trabajo de tesis doctoral.

#### Variantes comunes:

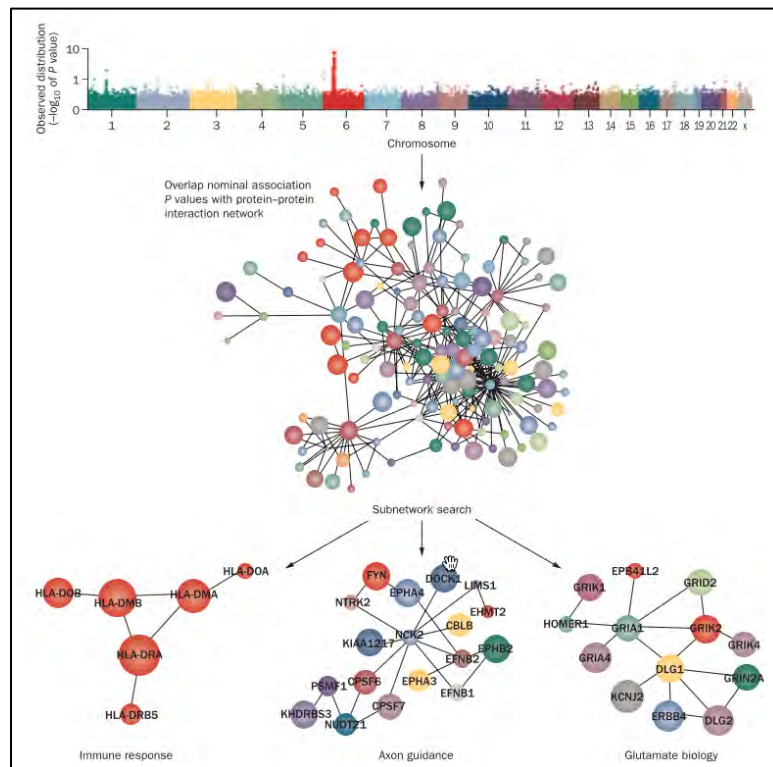
Probablemente los GWAS con un mayor tamaño muestral sean capaces de identificar nuevos locus de susceptibilidad que incrementen el porcentaje de heredabilidad hasta ahora conocido.

#### Interacciones gen-gen:

La expresión fenotípica de ciertas enfermedades puede estar regulada por dos o más genes, de tal manera que alguno de ellos puede aumentar el riesgo a desarrollar la enfermedad mientras que la interacción con otros puede tener un efecto protector. Es lo que se conoce como fenómenos epistáticos, y en la EM se han estudiado ampliamente dentro de los genes del complejo HLA.

#### Análisis genético de vías y redes en EM:

Tanto los genes como las proteínas de los sistemas biológicos operan dentro de vías que ejercen múltiples funciones en el organismo como son las vías de señalización celular, el metabolismo de aminoácidos o los mecanismos de inflamación celular. Por tanto, las variaciones genéticas asociadas a una enfermedad pueden ser analizadas dentro del contexto de una vía biológica conocida y de sus relaciones con otros procesos o vías implicadas. De esta manera podemos agregar información importante y categorizar mejor la asociación de una variante a una enfermedad. En el caso de la EM, uno de los primeros estudios realizados en este ámbito fue publicado en el 2009 por Baranzini y colaboradores (Baranzini, Galwey, et al. 2009) quienes, a partir de los datos obtenidos por los GWAS publicados hasta ese momento, encontraron tres vías sobreexpresadas en pacientes con EM: respuesta inmune mediada por células T, orientación axonal/potenciación sináptica y vías de señalización mediadas por glutamato (Figura 64).



**Figura 64.** Vías y redes en pacientes con EM según los datos obtenidos a partir de los primeros GWAS (Baranzini, Galwey, et al. 2009).

### Epigenética e interacciones gen-ambiente:

La epigenética se define como el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica sin modificar la secuencia del ADN. Esta disciplina representa un puente entre las influencias genéticas y ambientales en el desarrollo de un fenotipo. Así, los cambios epigenéticos permiten que unos genes se expresen o no, en función de condiciones externas, y son esenciales en la diferenciación celular y tisular que tiene lugar durante el desarrollo embrionario y, también, en los organismos adultos (Iridoy Zulet et al. 2015). Los tres principales procesos epigenéticos que ocurren en las células de los mamíferos son la metilación del ADN, la modificación de las histonas y la acción de los ARN no codificantes. De ellos, el más conocido y sobre el que más estudios se han publicado, es la metilación del ADN que consiste en la unión de un grupo metilo a un residuo de citosina en la cadena de ADN. Esta unión se produce en las llamadas islas de citosina-guanina (CpG) que son muy abundantes en las regiones promotoras y reguladoras de los genes.

De este modo, la hipermetilación es habitualmente un mecanismo de represión génica al inhibir la transcripción del ADN. Aunque el papel de la epigenética en la EM no es del todo claro (Van-den-Elsen et al. 2014), se han descrito posibles mecanismos epigenéticos implicados en los principales factores de riesgo ambiental asociados a la enfermedad (Iridoy Zulet et al. 2015).

Es conocido que *HLA-DR15* determina la respuesta inmune a la infección por el VEB mediante la activación de linfocitos T CD4+ (Lünemann, Kamradt, Martin, & Münz, 2007; Junker et al., 2009). Además, los alelos HLA reconocen epítomos del EBNA1 (Krüger et al. 2003). Por otro lado, recientemente se ha descrito que variantes genómicas en el EBNA2, que contiene las regiones más variables del genoma viral, se asocian a riesgo de desarrollar la enfermedad (Mechelli et al. 2015).

Varios estudios han encontrado una asociación positiva entre el tabaco y la enfermedad (Suter, Anders, & Aagaard, 2012; Toledo-Rodriguez et al., 2010; Arruti et al. 2015). Uno de los más importantes fue el publicado por Hedström y colaboradores (Hedström et al. 2011) quienes observaron que el riesgo para EM era significativamente mayor para los pacientes portadores de *HLA-DRB15*, incluso en presencia del alelo protector *HLA-A\*02*.

Variantes en el gen *VDR* (receptor de vitamina D) (Joshi et al. 2011; Tajouri et al. 2005), en el gen *CYP24A1* (IMSGC & WTCCC2 2011) y en el gen *CYP27B1* (ANZgene 2009) parecen incrementar el riesgo a padecer EM. Un estudio interesante publicado por Ramagopalan y colaboradores (Ramagopalan et al. 2009) describe la presencia de un elemento respondedor a vitamina D en la región promotora de *HLA-DRB15*. Dicho elemento responde a la administración de 1,25 dihidroxi-vitamina D regulando la expresión de genes en las células B. Este hallazgo refuerza la idea de que niveles altos de vitamina D, especialmente en individuos portadores de *HLA-DRB15*, podrían reducir el riesgo de desarrollar EM.

## **5.2. ANÁLISIS DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y RADIOLÓGICAS DE LA FAMILIA**

Los sujetos estudiados de la familia fueron un total de 30, 10 de los cuales se consideraron como afectados. De estos, 7 presentaron alguna forma clínica de EM, mientras que 3 presentaron un SRA. Ninguno de los sujetos afectados presentó EMPP. La mayoría de los afectados eran mujeres (60%) y se mantuvieron clínicamente estables.

Al estudiar detenidamente el árbol genealógico nos llamó la atención que la mayoría de sujetos afectados en nuestro estudio (6 de 7) pertenecían a un mismo núcleo familiar que descendía de los sujetos III-3 y III-4. Al analizar sus antecedentes patológicos, observamos que existía una alta prevalencia de varios tipos de neoplasias que afectaban a un total de 8 miembros, todos pertenecientes a dicho núcleo familiar principal, además de otras enfermedades autoinmunes y con componente hereditario (Figura 60).

Clínicamente, un 42,9% de los sujetos afectados debutó con un brote de tronco encefálico y presentó una media de la EDSS por debajo de 3. A nivel radiológico, la mayoría de los sujetos afectados (66,6%) presentaba 10 o más lesiones desmielinizantes típicas en la secuencia T2/FLAIR y cumplía 3 o más criterios de Barkhof para diseminación en espacio (Anexo 2).

### **5.2.1. La familia en estudio como población aislada**

Dado que la agregación familiar observada en la EM no ha podido ser totalmente explicada desde el punto de vista genético, se hipotetiza que variantes raras con una frecuencia alélica muy baja podrían ser las responsables de explicar mejor la heredabilidad de la enfermedad de la que se conoce actualmente. Una estrategia válida para acotar dichas variantes raras podría ser re-secuenciar las regiones genómicas de riesgo reportadas por los GWAS. Sin embargo, este abordaje no ha resultado ser del todo útil en otras enfermedades complejas autoinmunes como es la enfermedad de Crohn (Momozawa et al. 2011) o, incluso, en la misma EM, donde el mapeo

fino de 68 locus de riesgo no mostró nuevas variantes asociadas a la enfermedad (IMSGC 2013a).

Las poblaciones aisladas tienen muy poca variabilidad genética (Fisher 1930) y, por tanto, presentan un alto grado de homogeneidad debido a la consanguinidad. Este hecho las convierte en poblaciones ideales para la detección de variantes genéticas raras o, incluso, mutaciones fundadoras. Además, su estudio nos puede ofrecer información crucial sobre la o las interacciones gen-gen, gen-ambiente y el efecto de la propia consanguinidad. Respecto a ésta, si estudiamos genéticamente a una determinada familia, observaremos que una serie de alelos potencialmente patogénicos no se expresan, porque son heredados de forma recesiva por las sucesivas generaciones. Si en vez de esto, analizamos una familia con una alta consanguinidad, la endogamia favorecerá la expresión fenotípica de dichos alelos recesivos potencialmente patogénicos debido al aumento de la homocigosis que aumentará significativamente la probabilidad de identificar locus patogénicos en los individuos afectados que, de otra forma, no se observarían dada su baja penetrancia (Bulayev et al. 2009). Este efecto es lo que se conoce como efecto Wahlund (Wahlund 1928).

Aunque algunos autores no han encontrado una clara relación entre el grado de consanguinidad y el riesgo de desarrollar EM (Binzer et al. 2014), el estudio de familias con varios miembros afectados (como es el caso de la familia presentada en este trabajo) continúa siendo una buena estrategia para el descubrimiento de nuevas variantes patogénicas asociadas a la enfermedad (Sawcer 2008; Cirulli & Goldstein 2010; Ramagopalan et al. 2011; Dyment et al. 2012; Granström et al. 2014; Boullerne et al. 2015). En este sentido, cabe destacar dos trabajos recientes.

Granström y colaboradores (Granström et al. 2014) describieron una paciente pediátrica, su madre y su abuela afectadas con la enfermedad de Hirschsprung (OMIM: 142623), un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen *EDNRB* –“*Endothelin Receptor, Type B*”– (OMIM: 131244) que produce una ausencia de células ganglionares en el colon produciendo ausencia de movimiento y obstrucción intestinal. Además, tanto

su madre como su abuela presentaban características clínicas y radiológicas compatibles con EM. Los autores describieron una nueva mutación (c.C397T,p.R133X; refNM\_000115) en el gen *EDNRB* que podría estar en relación, también, con la susceptibilidad a la EM.

Boullerne y colaboradores (Boullerne et al. 2015) describieron una familia con 5 hermanos afectados de EM en la que un análisis exhaustivo de la rama materna detectó la presencia de varios tipos de cáncer en 6 de los familiares ascendientes, entre ellos hepático, de ovario, de mama y colorectal, características que acompañan al síndrome de Peutz Jeghers (OMIM: 175200), un raro trastorno de herencia autosómica dominante causado por mutaciones en el gen *STK11* –“*Serine/Threonine Protein Kinase 11*”– (OMIM: 602216) caracterizado por pólipos gastrointestinales, manchas mucocutáneas y riesgo incrementado de varios tipos de cáncer como mama, colon y ovario (Launonen 2005). Los autores describieron un SNP (rs9282860\*C; OR: 1,45 [IC no especificado]) asociado al gen antes mencionado. Posteriormente, validaron este SNP en un grupo de 750 pacientes con EM y 650 controles, observándose en una mayor proporción de pacientes (10,4%) que de controles (7,4%), con una tendencia a la significación ( $p=0,058$ ).

En el caso de la familia en estudio, observamos una elevada endogamia con un total de 6 matrimonios consanguíneos entre los sujetos V-2 y V-3; VI-2 y VI-3; VI-9 y VI-10; VI-19 y VI-20; VI-27 y VI-28; y entre VII-9 y VII-10 (Figura 60). Además, el hecho de pertenecer a la etnia gitana, hace muy poco probable que se haya producido intercambio genético con otro tipo de población no perteneciente a esta etnia en particular, por lo que se trata de una población aislada con una alta probabilidad de ser portadora de nuevas variantes de riesgo para desarrollar EM.

### 5.3. ANÁLISIS DE LOS HAPLOGRUPOS DEL ADN MITOCONDRIAL DE LA FAMILIA

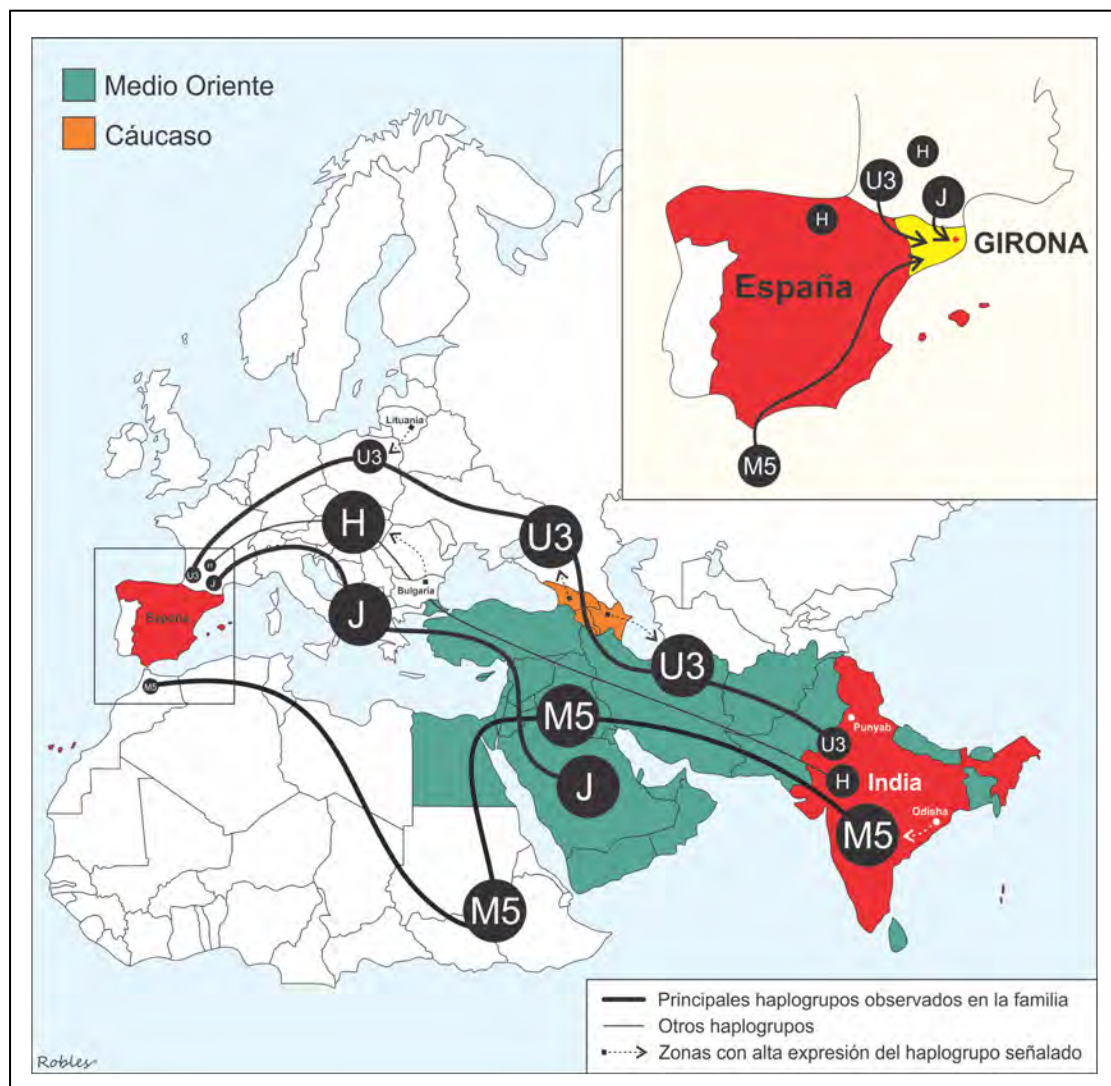
La familia en estudio se correlaciona con la mayoría de poblaciones de etnia gitana a nivel mundial, mostrando los 4 principales haplogrupos de ADN mitocondrial descritos en esta población: M5, H, J y U3.

El trabajo publicado por Tranah y colaboradores (Tranah et al. 2015) llevado a cabo en más de 7.000 pacientes y más de 14.000 controles provenientes de 7 países europeos, cuyas muestras habían sido analizadas previamente en uno de los GWAS con mayor población publicado hasta ahora (IMSGC & WTCCC2 2011), mostró que los portadores de los haplogrupos JT, J y T tenían mayor riesgo de desarrollar EM, sobre todo las formas progresivas de la enfermedad.

Al analizar los resultados en nuestra familia, el haplogrupo J mostró una mayor presencia ( $p=0,039$ ) en 3 de los sujetos afectados por formas secundarias progresivas o agresivas de la enfermedad (sujetos VI-20, VI-24 y VII-20), todos ellos familiares directos. Aunque este hallazgo se corresponde con lo observado por Tranah y colaboradores, no es aplicable a todos los miembros de nuestra familia porque de los 4 afectados restantes, 3 son portadores del haplogrupo U3 (sujetos VI-5, VI-9, y VII-3) y otro del haplogrupo M5. Además, si suponemos que el haplogrupo J podría explicar parte de la heredabilidad observada en estos individuos, se debería asumir que dicho riesgo viene conferido por el sujeto V-14, que no pertenece a la familia en estudio. No obstante, no puede descartarse totalmente su implicación, al menos en este pequeño núcleo familiar.

Los miembros del núcleo familiar principal (desde el sujeto VI-5 hasta el VI-25, incluyendo sus descendientes) presentan el haplogrupo U3 y, los miembros de otro de los principales núcleos familiares (sujetos VI-2, VII-1 y VII-2) son portadores del haplogrupo M5.

Estos resultados permiten deducir, con una alta probabilidad de certeza, que el origen de la familia en estudio podría estar ubicado en la zona correspondiente a Medio Oriente, pudiendo incluso mapear la probable ruta de migración de los principales núcleos familiares a través de Europa (haplogrupo U3) y el norte de África (haplogrupo M5) hasta su entrada en la península Ibérica (Figura 65).



**Figura 65.** Probable ruta de migración de la familia en estudio en base a sus haplogrupos mitocondriales.



## 5.4. ANÁLISIS DE LA REGIÓN HLA Y SUS ALELOS EN LA FAMILIA

Los alelos de la región HLA más frecuentemente observados en los miembros de la familia en estudio fueron *HLA-DRB1\*03* y *HLA-DQB1\*02* (Tabla 23). Todos los sujetos portadores de *HLA-DRB1\*03* eran también portadores de *HLA-DQB1\*02*, por lo que se puede considerar que ambos alelos se encuentran en desequilibrio de ligamiento, considerándolos, por tanto, como un haplotipo. Un hecho similar se observó para los alelos *HLA-DRB1\*14* y *HLA-DQB1\*05*.

Comparando la presencia de los diferentes alelos HLA de la familia con los de otras cohortes de etnia gitana descritas a nivel mundial, llaman la atención ciertos hallazgos:

- *Referente a alelos presentes en población gitana no afectada de EM:* Los resultados del análisis en esta familia tienen una clara concordancia con el alelo *HLA-DRB1\*03* y, en menor proporción, con el alelo *HLA-DRB1\*14*, descritos en el 2015 por Inotai y colaboradores (Inotai et al. 2015) en gitanos sanos de origen húngaro. Por otro lado, solamente tienen una mínima concordancia con los alelos *HLA-DRB1\*14*, *HLA-DRB1\*16* y *HLA-DQB1\*05* descritos por de Pablo y colaboradores (de Pablo et al. 1992) y por Ramal y colaboradores (Ramal et al. 2001) en gitanos sanos de origen español.
- *Referente a alelos presentes en población gitana afectada de EM:* los resultados del análisis en esta familia no muestran la asociación con el haplotipo *DRB1\*15:01-DQB1\*06:02* ni con el alelo *HLA-DQB1\*06:02* (en nuestra familia solo se expresó en un sujeto que no estaba afectado) descritos por Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2008). En cambio sí que se observó una asociación significativa respecto al alelo *HLA-DRB1\*14* (probablemente como parte del haplotipo *DRB1\*14-DQB1\*05:03*) entre los sujetos afectados de la familia en estudio y pacientes con EM de origen español. Esta

asociación ya había sido descrita también por el mismo autor en el mismo trabajo (Fernández et al. 2008).

La familia de estudio no es portadora de alelos HLA que han sido descritos en otras cohortes de pacientes con EM no gitanos pero de origen español. No se observó la asociación con el alelo *HLA-DQB1\*06:02* descrita por Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2004), ni con los haplotipos *DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02*, *DRB1\*04:02-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02* y *HLA-DRB1\*013-DQA1\*05-DQB1\*03:01* descritos por Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2009), ni la asociación del alelo *HLA-DRB1\*08* con una mayor severidad de la enfermedad descrita por Romero-Pinel y colaboradores (Romero-Pinel et al. 2010).

El alelo *HLA-DRB1\*03*, que se observó con mayor frecuencia en la familia de estudio, fue asociado inicialmente al riesgo de padecer EM en la población de Cerdeña (Italia) como parte del haplotipo *DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01* (Marrosu et al. 1997; Marrosu et al. 1998); pero también en Turquía (Saruhan-Direskeneli et al. 1997) y en mestizos de origen mexicano (Alvarado-de la Barrera et al. 2000). Posteriormente, un estudio de mapeo fino de la región HLA llevado a cabo en 490 familias con EM provenientes de Cerdeña demostró asociación de la enfermedad con 6 haplotipos distintos: *DRB1\*03:01-DQB1\*02:01* (el de mayor asociación estadística), *DRB1\*04:05-DQB1\*03:01*, *DRB1\*13:03-DQB1\*03:01*, *DRB1\*04:05-DQB1\*03:02*, *DRB1\*15:01-DQB1\*06:02* y *DRB1\*11:04-DQB1\*03:01* (Marrosu et al. 2001). Recientemente, estos mismos hallazgos han sido validados en un extenso estudio en más de 2.500 pacientes con EM y más de 1.300 controles sanos provenientes de Cerdeña, donde se observó una asociación positiva entre el haplotipo *DRB1\*03:01-DQB1\*02:01* y la presencia de la enfermedad (OR:1,7 [1,5-1,9]) (Cocco et al. 2013). También, varios análisis condicionales en población caucásica (Yeo et al. 2007; Marrosu et al. 2001; Dymment et al. 2005; Barcellos et al. 2006; Lincoln et al. 2009; Field et al. 2010; IMSGC & WTCCC2 2011; Patsopoulos et al. 2013; Hollenbach & Oksenberg 2015; IMSGC 2015), han confirmado la relevancia del alelo *HLA-DRB1\*03:01* para el riesgo de desarrollar la enfermedad en este grupo poblacional.

Los resultados del estudio HLA de esta familia sugieren que la mayor parte de ella está más emparentada con gitanos de otros países europeos (sobre todo gitanos húngaros, por la expresión de *HLA-DRB1\*03*) que con otros grupos de gitanos, y población sana, de origen español. Sin embargo, un 28,6% de los afectados en esta familia es portadora del haplotipo *DRB1\*14-DBQ1\*05* descrito, por el contrario, en gitanos sanos de origen español (Ramal et al. 2001) (Tabla 23). Aunque se trata de un porcentaje pequeño, estos resultados, empero, sí que concuerdan con los observados por Fernández y colaboradores en gitanos andaluces afectados de EM (Fernández et al. 2008) por lo que serán necesarios otros estudios para aclarar si *HLA-DRB1\*14* en población gitana ejerce un efecto contrario al descrito en población caucásica, donde desempeña un papel protector (Dyment et al. 2005; Barcellos et al. 2006; Ramagopalan, Anderson, et al. 2007; Oksenberg et al. 2008).

Ningún sujeto de la familia en estudio es portador del alelo de riesgo *HLA-DRB1\*15* observado, sobre todo, en caucásicos europeos y norteamericanos (Compston et al. 2006; Yeo et al. 2007; Hollenbach & Oksenberg 2015). Estos resultados sugieren que el haplotipo *DRB1\*03-DQB1\*02* y, sobre todo, el alelo *HLA-DRB1\*03* sean responsables en parte de la susceptibilidad genética a padecer la enfermedad dentro de esta familia, y que dicho riesgo se haya adquirido posiblemente en su paso por Cerdeña y Europa, durante su migración hacia la península ibérica (Figura 65).

A raíz de los resultados del análisis de la región HLA en esta familia, se puede decir que una de las aportaciones de este trabajo de tesis doctoral es que se describe por primera vez una familia de origen gitano afectada de una forma hereditaria de EM cuyos miembros son portadores, en su mayoría, del alelo *HLA-DRB1\*03* que se ha asociado al riesgo de desarrollar la enfermedad sobre todo en Cerdeña (Marrosu et al. 1997; Marrosu et al. 1998; Marrosu et al. 2001; Cocco et al. 2013) y en población caucásica (Yeo et al. 2007; Marrosu et al. 2001; Dyment et al. 2005; Barcellos et al. 2006; Lincoln et al. 2009; Field et al. 2010; IMSGC & WTCCC2 2011; Patsopoulos et al. 2013; Hollenbach & Oksenberg 2015; IMSGC 2015).

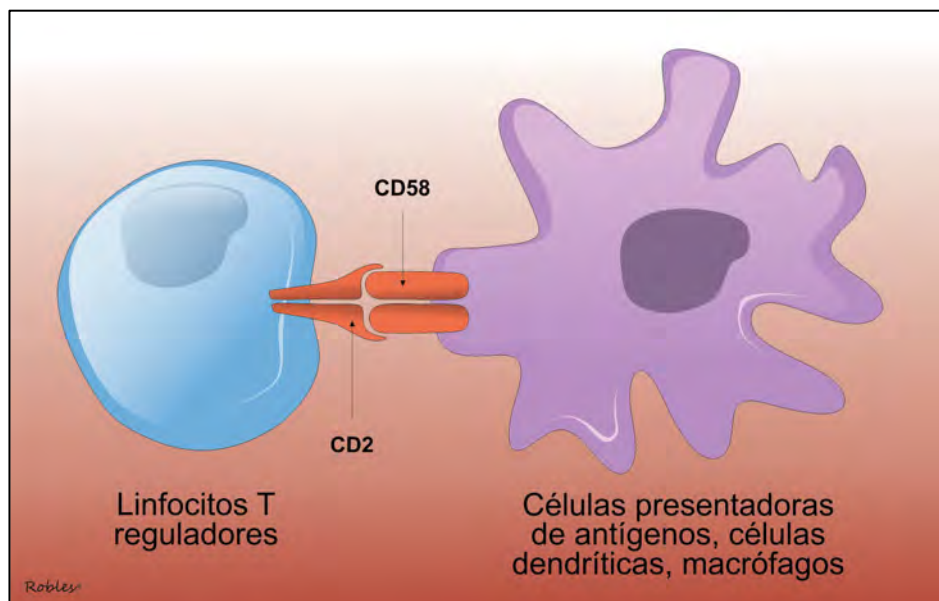
## 5.5. ANÁLISIS DEL ACOTAMIENTO GENÉTICO EN BASE A LOS PRINCIPALES GWAS PUBLICADOS HASTA EL 2010

### 5.5.1. El locus *CD58* y la EM

El gen *CD58* (OMIM: 153420) se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p13). Consta de ≈65 kb y 6 exones (Wallich et al. 1998). Codifica la proteína CD58 que se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígenos, células dendríticas y macrófagos, actuando como ligando de la proteína CD2 de los linfocitos T reguladores e interviniendo en la adhesión y activación de los mismos (Ikemizu et al. 1999) (Figura 66). Estos linfocitos T reguladores activados son generados en el timo y se distinguen por expresar CD25 en su superficie y FoxP3 como factor de transcripción (Sakaguchi et al. 2008; Sakaguchi et al. 2010). Actúan regulando la tolerancia inmunológica a nivel periférico, por lo que la disminución de su expresión o la de *CD58* se ha relacionado con un aumento de la respuesta inflamatoria implicada en las enfermedades autoinmunes (Baecher-Allan & Hafler 2006) incluyendo la EM (Fletcher et al. 2009; Lowther & Hafler 2012).

Este gen también se ha implicado en la regulación de la hemostasia y de la infección celular por el VEB y se ha asociado también a enfermedades como el liquen plano oral (Kirby et al. 1995) y la fiebre hemorrágica con síndrome renal (Xie et al. 2008).

El primer indicio de asociación entre este locus y la EM fue observado en el 2007 como parte del primer GWAS publicado por el IMSGC (IMSGC 2007), donde se observó que el SNP que mostraba mayor asociación era el rs12044852\*C (OR: 1,24 [1,12-1,37]).

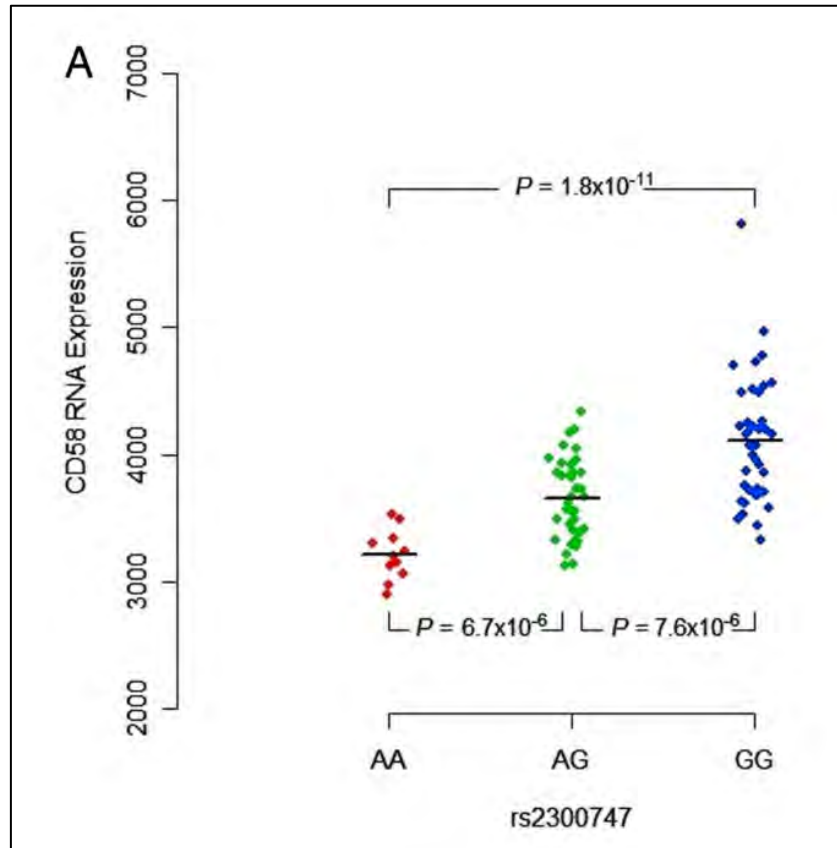


**Figura 66.** Proteína CD58 y su participación en la adhesión y activación de linfocitos.

En el 2008, Arthur y colaboradores (Arthur et al. 2008) estudiaron los perfiles de expresión genética en sangre periférica de pacientes con EMRR durante el brote y durante la remisión del mismo. Ellos observaron que *CD58* se encontraba sobreexpresado durante la remisión del brote, corroborando su función como regulador de la función inflamatoria. En el mismo año, Rubio y colaboradores (Rubio et al. 2008) replicaron los resultados observados en el GWAS del 2007 para el gen *CD58* en una cohorte de pacientes australianos.

Posteriormente, De Jager y colaboradores (De Jager, Baecher-Allan, et al. 2009) realizaron un mapeo fino de la región del gen *CD58* utilizando una batería de 24 SNPs en una cohorte de 5.326 pacientes compuesta por series de casos y tríos familiares con EM. Observaron que la región con mayor asociación correspondía a una zona de unos 76 kb donde encontraron un haplotipo con efecto protector correspondiente a los SNPs rs12044852\*A (OR: 0,84 [0,76–0,92]) y rs2300747\*G (OR: 0,82 [0,75–0,89]). Dicho efecto protector era mediado por el aumento, dosis dependiente, en la expresión de *ARN-CD58* dentro de las células mononucleares de pacientes con EM lo que limitaría la inflamación mediada por dichas células. Por el contrario, observaron que el alelo rs2300747\*A se asociaba a mayor riesgo de EM

sobre todo para aquellos pacientes homocigotos (AA) produciendo una disminución en la expresión de *ARN-CD58* (Figura 67). Esto produciría una disfunción de las células T reguladoras mediada por la inhibición de FoxP3.



**Figura 67.** Expresión de *ARN-CD58* en base a los alelos de rs2300747 (De Jager, Baecher-Allan, et al. 2009).

Los resultados observados por De Jager y colaboradores fueron replicados en una cohorte de pacientes suecos (Brynedal et al. 2009) y corroborados en un metaanálisis de los estudios publicados hasta ese momento (Hoppenbrouwers et al. 2009).

En el 2011, el IMSSGC junto al WTCCC (IMSSGC & WTCCC2 2011) publican uno de los GWAS más grandes hasta ese momento donde se describió un nuevo SNP de susceptibilidad asociado al gen *CD58*, rs1335532\*A (OR: 1,18 [1,12-1,24]) (Tabla 8 y 9).

En el 2013, el IMSGC (IMSGC 2013a) publicó el GWAS que ha incluido la mayor cantidad de pacientes con EM hasta la fecha utilizando el abordaje mediante Inmunochip. En este estudio se corroboró la asociación de los SNPs asociados al gen *CD58* antes mencionados y se describió un nuevo SNP de susceptibilidad asociado al mismo gen, rs6677309\*A (OR: 1,29 [1,24-1,33]). También se describieron otros 20 SNPs en fuerte desequilibrio de ligamiento con rs6677309\*A.

Más recientemente, Kim y colaboradores (J. Y. Kim et al. 2014) encontraron asociación entre los principales SNPs de riesgo asociados a *CD58* (rs12044852\*C, rs2300747\*A, rs1335532\*A y rs1016140\*G) y la presencia de neuromielitis óptica en una cohorte de pacientes japoneses.

En el 2015, Torbati y colaboradores (Torbati et al. 2015), estudiaron una cohorte de pacientes iraníes con EM y observaron que el ser portador de rs12044852\*C se correlacionaba con el desarrollo de la enfermedad y con una peor respuesta al tratamiento con interferón-β.

Finalmente, Hecker y colaboradores (Hecker et al. 2015) proponen una posible implicación del microARN hsa-miR-548ac en la patogénesis de la EM asociada a *CD58*, dada su estrecha asociación al SNP rs1414273.

En conclusión: un total de 24 SNPs relacionados con el gen *CD58* se han asociado al riesgo de padecer EM, todos ellos dentro del intrón 1 (Tabla 29).

Cuatro de estos SNPs han mostrado la mayor asociación estadística en los diferentes GWAS publicados desde el 2007 al 2013. Las variantes alélicas de dos de ellos (rs12044852\*A y rs2300747\*G) han demostrado ser protectoras contra el desarrollo de la enfermedad mediante un aumento en la expresión de *ARN-CD58*. Por otro lado, el SNP rs2300747\*A se ha asociado al riesgo de padecer EM, sobre todo para aquellos pacientes que son homocigotos para dicho alelo. Este efecto estaría mediado por la disminución en la expresión de *ARN-CD58* lo que produciría un aumento de la respuesta inflamatoria mediada por las células T reguladoras.

**Tabla 29.** Los 24 SNPs relacionados con el gen *CD58* y asociados a la EM.

<b>SNPs descritos (total = 24)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Los 4 SNPs con mayor asociación</b>	
rs12044852*C	IMSGC 2007
rs2300747*A	De Jager et al. 2009
rs1335532*A	IMSGC & WTCCC2 2011
rs6677309*A	IMSGC 2013a
<b>Variantes alélicas con efecto protector</b>	
rs12044852*A	De Jager et al. 2009
rs2300747*G	De Jager et al. 2009
<b>SNPs en DL con rs6677309*A<sup>a</sup></b>	
rs10802190*A/T	IMSGC 2013a
rs1034920*T/C	IMSGC 2013a
rs1034921*G/A	IMSGC 2013a
rs10802192*T/C	IMSGC 2013a
rs1016140*G/T	IMSGC 2013a
rs1414273*C/T	IMSGC 2013a
rs1414275*A/G	IMSGC 2013a
rs11588376*T/C	IMSGC 2013a
rs10801908*C/T	IMSGC 2013a
rs10802191*T/A	IMSGC 2013a
rs1034919*G/C	IMSGC 2013a
rs10754445*A/T	IMSGC 2013a
rs10924109*T/C	IMSGC 2013a
rs758518*A/G	IMSGC 2013a
rs2300746*C/G	IMSGC 2013a
rs12141411*G/A	IMSGC 2013a
rs12044773*C/A	IMSGC 2013a
rs12038673*G/A	IMSGC 2013a
rs10924108*T/C	IMSGC 2013a
rs10754324*T/C	IMSGC 2013a

**SNPs:** polimorfismos de nucleótido simple

**DL:** desequilibrio de ligamiento

<sup>a</sup>En este caso no se especifican los alelos de riesgo ya que aún no se disponen de estudios de validación

Los alelos de riesgo rs2300747\*A, rs1335532\*A y rs6677309\*A relacionados con el gen *CD58* se encontraban en homocigosis en todos los sujetos afectados de EM de la familia estudiada en comparación con los sujetos controles en los que se encontraban en heterocigosis en 7 de ellos ( $p=0,046$ ).



Basándonos en las observaciones demostradas por De Jager y colaboradores (De Jager, Baecher-Allan, et al. 2009) y por la mayoría de GWAS y estudios de validación publicados hasta la fecha (IMSGC 2007; Rubio et al. 2008; De Jager, Baecher-Allan, et al. 2009; Hoppenbrouwers et al. 2009; IMSGC 2013a; Torbati et al. 2015; Hecker et al. 2015), se puede considerar a *CD58* como un gen candidato a participar en el desarrollo de EM en esta familia en particular.

## 5.6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EXÓMICA DE LA FAMILIA

La familia en estudio fue analizada mediante un abordaje exómico debido a los buenos resultados obtenidos por parte de Ramagopalan (Ramagopalan et al. 2011) y Dymont (Dymont et al. 2012) identificando nuevas variantes de riesgo para EM asociadas a los genes *CYP27B1* y *TYK2* respectivamente usando este método y a la capacidad limitada de los GWAS a la hora de identificar variantes raras con una frecuencia alélica <5%.

Queremos destacar que en el estudio de exómica se incluyeron 4 individuos afectados de EM y también un individuo sano con el objetivo de discriminar aquellas variantes propias de la familia pero no relacionadas con la enfermedad. Al tratarse de una familia de etnia gitana y, por tanto, de una población aislada, sus individuos pueden compartir muchas variantes que los diferencien de la secuencia consenso definida para caucásicos con EM, pero que no tienen porque estar relacionadas con la enfermedad.

### 5.6.1. El locus *CD207*

El gen *CD207* (OMIM: 604862) se localiza en el brazo corto del cromosoma 2 (2p13). Consta de 5,6 kb y 6 exones (Valladeau et al. 2002). Codifica una lectina tipo-C conocida como *Langerina*. Esta proteína actúa como receptor capaz de reconocer el monosacárido manosa que está presente en los

agentes patógenos. Se expresa exclusivamente en las células de Langerhans y participa en la presentación de antígenos. (Valladeau et al. 2000). Este gen también se ha asociado a la deficiencia de gránulos de Birbeck (OMIM: 613393) (Mommaas et al. 1994) y al sarcoma de células de Langerhans (Howard et al. 2015).

La variante rs115727537\*T se observó en todos los miembros afectados de EM de la familia en estudio (6 individuos), mientras que solo se detectó en 6 de los 15 individuos controles ( $p=0,019$ ). Se trata de una variante poco frecuente en la población mundial (MFA= 0,0038) y observada sobre todo en población africana.

Hasta ahora, no se ha descrito ninguna asociación del gen *CD207*, ni su variante rs115727537\*T, con la EM. Sin embargo, en un trabajo realizado in vivo, Schwarz y colaboradores (Schwarz et al. 2012) demostraron la implicación de la *Langerina* en la producción de linfocitos T reguladores inducida por la presencia de 1,25 dihidroxi-vitamina D. En este estudio se expusieron los ratones a un ungüento hecho a base de la forma activa de la vitamina D (1,25 dihidroxi-vitamina D) observándose un aumento de linfocitos T reguladores. Esta inducción era mediada por las células de Langerhans que presentaban a la 1,25 dihidroxi-vitamina D como un antígeno. Aquellos ratones que no expresaban *Langerina* eran incapaces de producir linfocitos T reguladores. Este hallazgo, pendiente de ser validado, nos permite hipotetizar una posible relación entre este locus y la susceptibilidad a padecer EM en la familia del estudio.

### 5.6.2. El complejo genético KIR y la EM

Las moléculas KIR (*“Killer-immunoglobulin-like receptors”*) son receptores altamente polimórficos expresados fundamentalmente por las células NK pero también por los linfocitos T CD4+. Su función es regular, de forma directa o mediada por citosinas, la respuesta inmune en estas células (Biron 1997). Esta respuesta está estrechamente relacionada a la tolerancia inmunitaria (Vivier et al. 2012) y está regulada por una serie de KIR, tanto

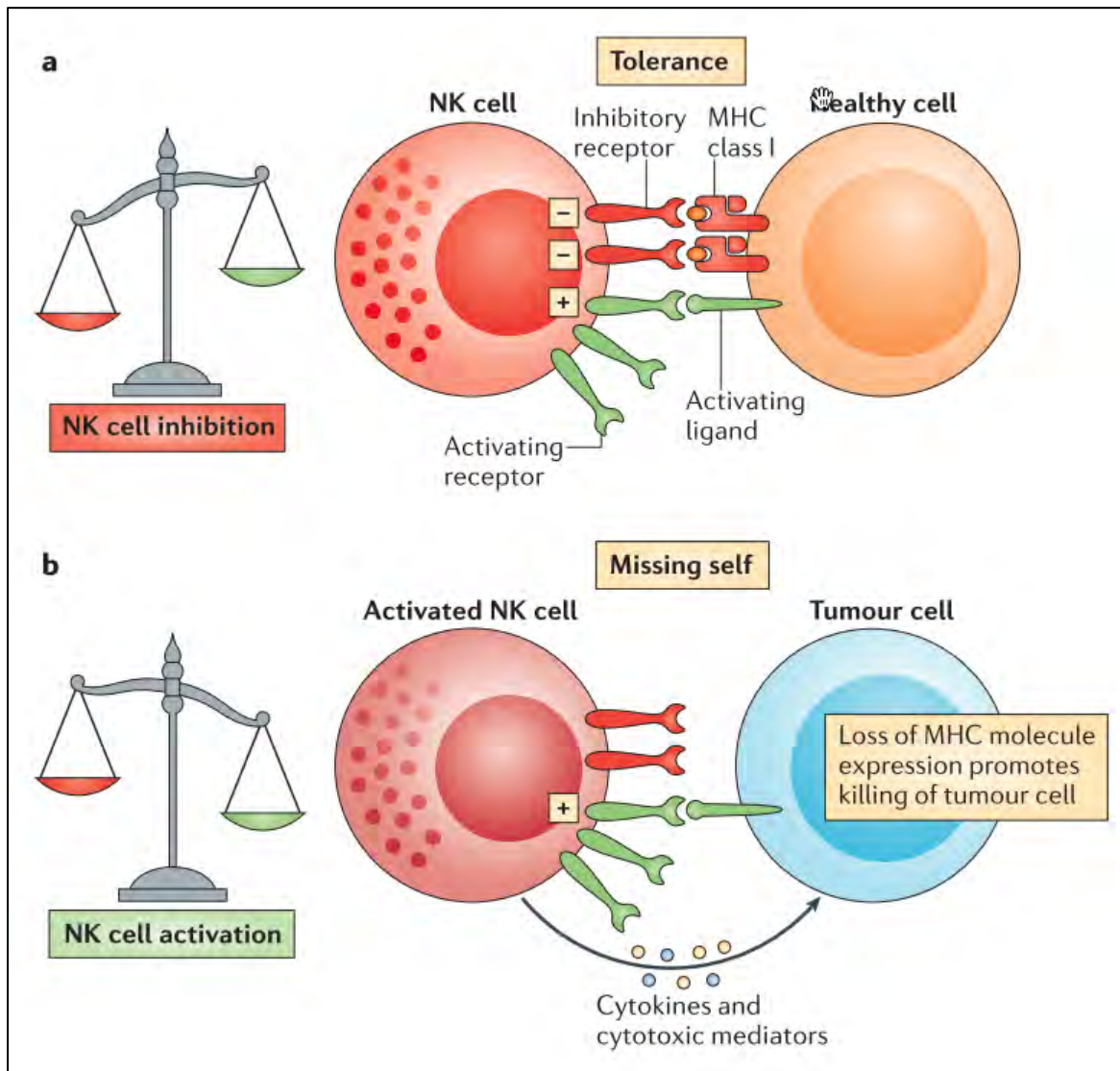
activadores como inhibidores, que interactúan constantemente con uno o más epítomos de alelos HLA de clase I (*HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*), mediando y actuando sobre todo contra virus y células tumorales (Bashirova et al. 2006; Parham & Moffett 2013) (Figura 68).

El complejo genético que codifica los KIR, se localiza en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13). Consta de  $\approx 1$  Mb que regulan la expresión de un grupo de entre 4 y 14 genes que muestran una amplia heterogeneidad (Parham 2005).

Los KIR pueden ser expresados por linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Van-Bergen et al. 2009) y, por tanto, la amplia heterogeneidad observada en estos receptores puede justificar el efecto protector hacia la EM asociado a alelos HLA de clase I (*HLA-A\*02:01*) o la susceptibilidad asociada a alelos HLA de clase II (*HLA-DRB1\*15:01*, *HLA-DRB1\*03:01* y *HLA-DRB1\*13:03*).

Sin embargo, aunque la mayoría de los efectos predisponentes, protectores y epistáticos ejercidos por alelos de la región HLA han podido ser validados en los múltiples GWAS realizados e incluso en los estudios con abordaje mediante Inmunochip, en la actualidad estos abordajes no han sido capaces de detectar una asociación directa entre los KIR y la EM. Esto probablemente se deba a la escasez de marcadores específicos en la mayoría de plataformas de microarrays disponibles actualmente que evalúan la región correspondiente a los KIR (Cortes & Brown 2011).

No obstante, otros estudios con marcadores orientados específicamente a la región KIR (Hollenbach & Oksenberg 2015), han demostrado que la presencia o ausencia de ciertas variantes pueden conferir un efecto predisponente o protector contra la EM (Tabla 30).



**Figura 68.** Funciones del complejo genético KIR (Vivier et al. 2012).

**Tabla 30.** Resumen de los alelos KIR implicados hasta ahora en la EM (Hollenbach & Oksenberg 2015).

Alelo o locus	Efecto	Casos (n)	Referencia
<i>KIR2DL3</i> (ausencia)	Predisponente	321	Jelčić et al. 2012
<i>KIR2DL5/KIR3DS1</i>	Predisponente	200	García-León et al. 2011
<i>KIR2DS1</i>	Protector	121	Fusco et al. 2010
<i>KIR2DS1</i>	Protector	443	Bettencourt et al. 2014
<i>Bw4</i> (ligando 3DL1)	Protector	631	Lorentzen et al. 2009

El gen *KIR2DL1* (OMIM: 604936) codifica el receptor del mismo nombre, consta de ≈14,5 Kb y ejerce una función inhibitoria al interactuar con epítomos específicos sobre todo de *HLA-C* pero también sobre un pequeño subgrupo de *HLA-B* (Colonna et al. 2000; Parham 2005; Moretta et al. 2006). Hasta ahora, no se ha descrito una asociación entre *KIR2DL1* y la EM (Tabla 30).

En el año 2007, Yeo y colaboradores (Yeo et al. 2007) estudiaron, utilizando microsatélites y SNPs, un grupo de 480 tríos familiares y un grupo de 721 casos esporádicos de EM comparados con 3.660 controles. Observaron una asociación residual a un HLA de clase I (*HLA-C*) y, concretamente, que *HLA-C\*05* tenía un efecto protector contra la enfermedad.

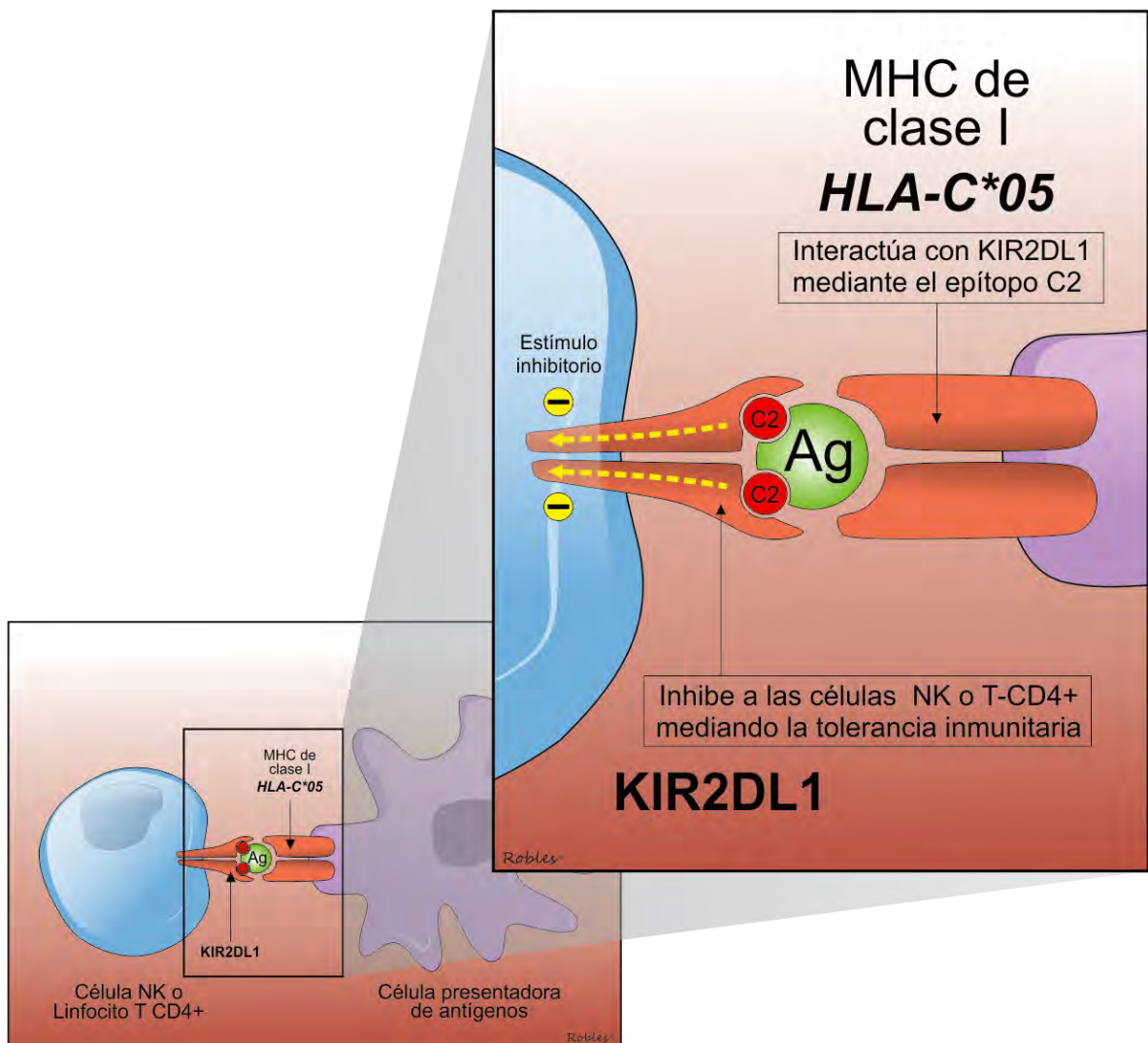
*HLA-C\*05* interacciona específicamente con *KIR2DL1* mediante el epítomo denominado C2 (Colonna et al. 2000; Parham 2005; Moretta et al. 2006; Yeo et al. 2007). Considerando que *HLA-C\*05* actúa como protector para la EM y que *KIR2DL1* ejerce una función inhibidora sobre las células NK y sobre linfocitos T CD4+, la presencia de polimorfismos que alteren la función de *KIR2DL1* podría afectar la tolerancia inmunitaria mediada por *HLA-C\*05* y, por tanto, potenciar la respuesta inmune mediada por estas células contra antígenos propios. Esta respuesta inmune podría incluso estar desencadenada por el VEB que es uno de los factores de riesgo ambientales relacionados con la enfermedad (Figura 69). De hecho, la presencia de polimorfismos en los KIR puede predisponer a la infección por este virus (Qiang et al. 2012; Huo et al. 2015).

Por otro lado, los KIR también participan como mediadores de la respuesta inmune contra células tumorales (Figura 68). La Torre y colaboradores (La Torre et al. 2009) observaron una relación entre polimorfismos de KIR y gliomas cerebrales de alto grado en la población de Sicilia. La alta prevalencia de diferentes tipos de neoplasias en la familia de estudio plantea la posibilidad de que polimorfismos que alteren la función de *KIR2DL1* podrían también afectar la respuesta inmunitaria mediada por *HLA-C\*05* hacia células tumorales, aumentado, por tanto, el riesgo de neoplasias en la familia. Actualmente, el papel del gen KIR en relación al cáncer no está claro, pero es objeto de intensa investigación (Dutta et al. 2014; Babor et al. 2014;

Arima et al. 2015; Al Omar et al. 2015; Yeung et al. 2015; Konjević et al. 2015).

En la familia de estudio, la variante rs670771\*C del gen *KIR2DL1* mostró una presencia más elevada entre los sujetos afectados de EM en comparación a los sujetos controles, tanto en un modelo de herencia autosómico dominante como en un modelo autosómico recesivo ( $p=0,049$ ).

De esta forma, se puede considerar a *KIR2DL1* como un gen candidato a participar en el desarrollo de EM en esta familia en concreto. Además, posiblemente participe en mediar la predisposición a diferentes tipos de neoplasias observada en el núcleo familiar principal (Figura 69).



**Figura 69.** Posible mecanismo por el que *KIR2DL1* mediaría la predisposición a padecer EM y neoplasias en la familia de estudio.



## 5.7. LIMITACIONES

Las limitaciones principales de este trabajo de tesis se pueden agrupar en:

### 1. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra es reducido ya que se trata de un estudio llevado a cabo en una familia concreta. Además, las características étnicas y la idiosincrasia propias de los miembros de la familia, hicieron aún más dificultosa la tarea de reclutamiento de los individuos, de información epidemiológica y clínica, de obtención de muestras biológicas y de obtención de estudios de neuroimagen.

### 2. Distribución geográfica de los sujetos de estudio

La distribución geográfica de los sujetos incluidos en el estudio se limita al entorno de la provincia de Girona, por lo que no se puede descartar la influencia de posibles factores ambientales en los resultados obtenidos.

### 3. Características étnicas de la población de estudio

Debido a que esta familia se trata de una población aislada, es decir, con una elevada endogamia, y por tanto, con poco o nulo intercambio genético con otro tipo de población, las variantes genéticas asociadas al riesgo de padecer la enfermedad identificadas en esta familia, puede que no sean extrapolables a otras poblaciones (incluida la población caucásica).

### 4. Ausencia de una cohorte de control con características comparables

No se dispuso de una cohorte de control sana de etnia gitana comparable a los miembros de la familia en estudio. Con el fin de minimizar la ausencia de dichos controles, en el análisis de resultados referentes al ADN mitocondrial, comparamos nuestra cohorte con la de individuos de etnia gitana afectados de EM publicada por Fernández y colaboradores (Fernández et al. 2008) y con la cohorte “europea” de etnia gitana no afectada de EM publicada por Gresham y colaboradores (Gresham et al.



2001). Asimismo, para el caso del análisis de la región HLA, se compararon los resultados observados en la familia con los de un grupo de 108 pacientes afectados con EM de origen español y etnia no gitana y un grupo de 100 sujetos controles con otras enfermedades neurológicas (no EM) también de origen español y etnia no gitana, ambos procedentes de una colección de muestras propias de la UNIEM. Para el estudio de exómica hemos utilizado un miembro sano de la familia para descartar variantes propias de la familia pero no relacionadas con la enfermedad.

## **5. Diseño del estudio**

Al tratarse de un estudio transversal limita los hallazgos clínicos y radiológicos (y su posible correlación con las variables genéticas) que puedan ir apareciendo si realizáramos un seguimiento prospectivo como parte de un estudio longitudinal.

## **6. Estudios de expresión o funcionales**

Hacen falta estudios de expresión o funcionalidad, para demostrar los efectos que los cambios descritos provocan en el funcionamiento de las proteínas afectadas.

## **5.8. PERSPECTIVAS DE FUTURO**

En este estudio, hemos podido identificar la existencia de variantes genéticas relacionadas con varios genes candidatos que podrían estar implicados en el desarrollo de EM en esta familia concreta. Algunas de estas variantes no habían sido descritas previamente en la literatura.

Las perspectivas de futuro que se plantean como continuación de este trabajo de tesis doctoral son:

### **1. Seguimiento longitudinal de la familia en estudio**

Los miembros de la familia incluidos en el estudio se seguirán de forma prospectiva tanto desde el punto de vista clínico como radiológico con el objetivo de analizar el curso clínico de su enfermedad. En este sentido, un grupo de sujetos con especial interés son aquellos con SRA, ya que corresponden a una forma presintomática de la enfermedad y, por tanto, a una posible fuente de marcadores de conversión clínica a EM. Aunque en el presente trabajo de tesis se han considerado como un factor de confusión dado el bajo número de sujetos y a la ausencia de vínculo con el núcleo familiar principal, en el caso de identificar nuevos miembros con características similares, podría tratarse de una cohorte muy interesante a analizar.

### **2. Ampliación del tamaño de la muestra**

El seguimiento longitudinal prospectivo de los miembros de la familia permitirá aumentar el reclutamiento de nuevos individuos y, de esta forma, aumentar el tamaño de la muestra.

### **3. Obtención de una cohorte control con características comparables**

Uno de los requisitos fundamentales para dar consistencia a los resultados de esta tesis doctoral es poder comparar la familia de estudio con una cohorte control que posea características epidemiológicas y demográficas similares. Para ello, se contactará con la Unión Romaní

([http://www.unionromani.org/asosdir\\_es.htm](http://www.unionromani.org/asosdir_es.htm)) (Unión Romani. 2015) para poder dar a conocer este estudio y solicitar su máxima colaboración.

#### **4. Validación de los resultados en otras cohortes**

Se realizará una validación de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral en otras cohortes de pacientes afectados con EM que sean seguidas por otras Unidades de EM (Red Española de EM – REEM –) u otras a nivel europeo y americano, con el objetivo de confirmar o descartar que los resultados obtenidos en este estudio sean específicos de la población analizada (etnia gitana) o estén influenciados por factores ambientales o genéticos del entorno inmediato. En el caso de confirmar que los resultados observados sean específicos de la población actual, se intentará la validación con pacientes de etnia gitana.

#### **5. Estudios de expresión o funcionales**

Uno de los siguientes pasos en el que estamos trabajando actualmente en la familia de estudio, son estudios de expresión o funcionalidad, para demostrar los efectos que las variantes descritas provocan en el funcionamiento de las proteínas afectadas.

## **6. CONCLUSIONES**



Las conclusiones derivadas del estudio realizado en esta tesis doctoral son:

1. Los sujetos incluidos en el presente estudio (30 sujetos en total) pertenecen a una extensa familia de etnia gitana con una forma hereditaria de EM. Aquellos sujetos afectados (10 sujetos en total) mostraron una amplia variabilidad clínica, presentando diferentes formas de la enfermedad (SRA, SCA, EMRR y EMSP) además de una alta carga lesional en la RM, cumpliendo 3 o más de los criterios de Barkhof para diseminación en espacio.
2. El origen ancestral de los sujetos incluidos en el presente estudio se ubica probablemente en la zona correspondiente al Medio Oriente, ya que se observaron los 4 principales haplogrupos descritos para población gitana en aquella región M5, H, J y U3, sobre todo el haplogrupo U3. El haplogrupo J mostró una mayor presencia entre los individuos afectados de la familia respecto a los no afectados, comparado con otras cohortes de etnia gitana afectados y no afectados de EM descritas en la literatura.
3. Los alelos *HLA-DRB1\*03* y *HLA-DQB1\*02* fueron los más frecuentemente observados en los sujetos de la familia en estudio. En todos los casos analizados, estos dos alelos se heredaron juntos como parte de un mismo haplotipo, por lo que dicho haplotipo *DRB1\*03-DQB1\*02* se considera en parte responsable de la susceptibilidad genética a padecer la enfermedad dentro de esta familia. Ningún sujeto mostró el alelo de riesgo *HLA-DRB1\*15*.

4. De los 12 principales locus no HLA asociados a la EM, el gen *CD58* se propone como candidato a participar en el desarrollo de EM en la familia de estudio. En concreto, los SNPs rs2300747\*A, rs1335532\*A y rs6677309\*A, se observaron en homocigosis en todos los sujetos afectados de EM.
  
5. Mediante el abordaje exómico, por un lado, el modelo autosómico recesivo identificó el gen *KIR2DL1* (rs115727537\*T) como candidato para el desarrollo de EM en la familia de estudio. Por otro lado, el modelo autosómico dominante identificó los genes *KIR2DL1* (rs115727537\*T) y *CD207* (rs670771\*C) como candidatos para el desarrollo de la EM en la familia de estudio.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





- Abecasis, G.R., Cherny, S.S. & Cardon, L.R., 2001. The impact of genotyping error on family-based analysis of quantitative traits. *European Journal of Human Genetics*, 9(2), pp.130–134.
- Abicht, A. et al., 1999. A common mutation (1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology*, 53(7), pp.1564–1564.
- Abu-Amero, K.K. et al., 2008. Mitochondrial DNA structure in the Arabian Peninsula. *BMC evolutionary biology*, 8(1), p.45.
- Achilli, A. et al., 2004. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *American journal of human genetics*, 75(5), pp.910–8.
- Adams, M.D. et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), pp.2185–95.
- AIAQS, 2012. Guía de práctica clínica sobre la atención a las personas con esclerosis múltiple. Disponible en: [http://www.guiasalud.es/GPC/GPC\\_518\\_Esclerosis\\_multiple\\_compl.pdf](http://www.guiasalud.es/GPC/GPC_518_Esclerosis_multiple_compl.pdf). Consulta: 10 octubre 2014. , pp.1–68.
- Aira, L.E. et al., 2014. Immunological and histological evaluation of clinical samples from psoriasis patients treated with anti-CD6 itolizumab. *mAbs*, 6(3), pp.783–93.
- Akesson, E. et al., 2002. A genome-wide screen for linkage in Nordic sib-pairs with multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 3(5), pp.279–85.
- Akiba, T. et al., 1980. Localization of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase activity in the mammalian kidney. *Biochemical and biophysical research communications*, 94(1), pp.313–8.
- Akkad, D.A. et al., 2015. Multiple sclerosis risk loci correlate with cervical cord atrophy and may explain the course of disability. *Neurogenetics*, 16(3), pp.161–8.
- Aladro, Y. et al., 2005. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology*, 24(1-2), pp.70–5.

- Alcina, A. et al., 2013. Identification of a functional variant in the KIF5A-CYP27B1-METTL1-FAM119B locus associated with multiple sclerosis. *Journal of medical genetics*, 50(1), pp.25–33.
- Alcina, A. et al., 2012. Multiple sclerosis risk variant HLA-DRB1\*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations. *PloS one*, 7(1), p.e29819.
- Alcina, A., Fernández, O., et al., 2010. Tag-SNP analysis of the GFI1-EVI5-RPL5-FAM69 risk locus for multiple sclerosis. *European Journal of Human Genetics*, 18(7), pp.827–31.
- Alcina, A., Vandenbroeck, K., et al., 2010. The autoimmune disease-associated KIF5A, CD226 and SH2B3 gene variants confer susceptibility for multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 11(5), pp.439–45.
- Alkuraya, F.S., 2013. The application of next-generation sequencing in the autozygosity mapping of human recessive diseases. *Human Genetics*, 132(11), pp.1197–1211.
- Allison, R.S. & Millar, J.H., 1954. Prevalence of disseminated sclerosis in Northern Ireland. *The Ulster medical journal*, 23(Suppl. 2), pp.1–27.
- Alloza, I. et al., 2012. ANKRD55 and DHCR7 are novel multiple sclerosis risk loci. *Genes and Immunity*, 13(3), pp.253–257.
- Almohmeed, Y.H. et al., 2013. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PloS one*, 8(4), p.e61110.
- Alvarado-de la Barrera, C. et al., 2000. HLA class II genotypes in Mexican Mestizos with familial and nonfamilial multiple sclerosis. *Neurology*, 55(12), pp.1897–900.
- Álvarez-Cermeño, J.C. & Villar, L.M., 2013. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands—a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nature Reviews Neurology*, 9(6), pp.303–304.
- Aminzadeh, K.K. & Etminan, M., 2007. Dental amalgam and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of public health dentistry*, 67(1), pp.64–6.

- Amirzargar, A. et al., 1998. HLA class II (DRB1, DQA1 and DQB1) associated genetic susceptibility in Iranian multiple sclerosis (MS) patients. *European journal of immunogenetics*, 25(4), pp.297–301.
- Andalib, S. et al., 2015a. Lack of association between mitochondrial DNA G15257A and G15812A variations and multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 356(1-2), pp.102–106.
- Andalib, S. et al., 2015b. Mitochondrial DNA T4216C and A4917G variations in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 356(1-2), pp.55–60.
- Andalib, S. et al., 2013. Multiple sclerosis and mitochondrial gene variations: a review. *Journal of the Neurological Sciences*, 330(1-2), pp.10–5.
- Anderson, S. et al., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), pp.457–65.
- Andlin-Sobocki, P. et al., 2005. Cost of disorders of the brain in Europe. *European Journal of Neurology*, 12 Suppl 1, pp.1–27.
- Angelicheva, D. et al., 1999. Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome: a novel developmental disorder in Gypsies maps to 18qter. *European Journal of Human Genetics*, 7(5), pp.560–566.
- Antón Aranda, E. et al., 1991. Epidemiology and clinical evolutionary aspects of multiple sclerosis in Navarra. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 6(5), pp.160–9.
- ANZgene, 2009. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nature Genetics*, 41(7), pp.824–8.
- ANZgene, 2011. Polymorphisms in the receptor tyrosine kinase MERTK gene are associated with multiple sclerosis susceptibility. *PloS one*, 6(2), p.e16964.
- Aragonés JM, M.J.O. de la R.C., 1968. Estudio de la incidencia relativa y absoluta de la esclerosis múltiple en nuestra región. *An Med Cir (Barcelona)*, 54, pp.13–15.

- Arima, N. et al., 2015. Influence of Differently Licensed KIR2DL1-Positive Natural Killer Cells in Transplant Recipients with Acute Leukemia: A Japanese National Registry Study. *Biology of blood and marrow transplantation*, Epub ahead.
- Arruti, M. et al., 2015. Smoking and multiple sclerosis. *Revista de Neurología*, 60(4), pp.169–78.
- Arthur, A.T. et al., 2008. Genes implicated in multiple sclerosis pathogenesis from consilience of genotyping and expression profiles in relapse and remission. *BMC medical genetics*, 9, p.17.
- Ascherio, A. & Munger, K.L., 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology*, 61(4), pp.288–99.
- Ascherio, A., Munger, K.L. & Lünemann, J.D., 2012. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 8(11), pp.602–612.
- Ashburner, J. & Friston, K.J., 2005. Unified segmentation. *NeuroImage*, 26(3), pp.839–51.
- Aulchenko, Y.S. et al., 2008. Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nature genetics*, 40(12), pp.1402–1403.
- Babor, F. et al., 2014. KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse. *Blood*, 124(14), pp.2248–51.
- Baccala, R. et al., 2013. Essential requirement for IRF8 and SLC15A4 implicates plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), pp.2940–5.
- Bachmaier, K. et al., 2000. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature*, 403(6766), pp.211–6.

- Baecher-Allan, C. & Hafler, D.A., 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunological reviews*, 212, pp.203–16.
- Bagos, P.G., Nikolopoulos, G. & Ioannidis, A., 2006. Chlamydia pneumoniae infection and the risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Multiple Sclerosis*, 12(4), pp.397–411.
- Baker, A.R. et al., 1988. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(10), pp.3294–8.
- Baldwin, A.S., 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, 14, pp.649–83.
- Bamshad, M.J. et al., 2011. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature reviews. Genetics*, 12(11), pp.745–55.
- Ban, M. et al., 2002. A genome screen for linkage in Australian sibling-pairs with multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 3(8), pp.464–9.
- Ban, M. et al., 2010. A non-synonymous SNP within membrane metalloendopeptidase-like 1 (MMEL1) is associated with multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 11(8), pp.660–4.
- Ban, M. et al., 2013. No evidence of association between mutant alleles of the CYP27B1 gene and multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 73(3), pp.430–2.
- Ban, M. et al., 2009. Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *European Journal of Human Genetics*, 17(10), pp.1309–13.
- Baranzini, S.E., Wang, J., et al., 2009. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Human molecular genetics*, 18(4), pp.767–78.
- Baranzini, S.E. et al., 2010. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature*, 464(7293), pp.1351–1356.

- Baranzini, S.E., Galwey, N.W., et al., 2009. Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 18(11), pp.2078–2090.
- Baranzini, S.E. et al., 2015. Prognostic biomarkers of IFN $\beta$  therapy in multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*, 21(7), pp.894–904.
- Barcellos, L.F. et al., 2006. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Human molecular genetics*, 15(18), pp.2813–24.
- Barduzal Angles, S. et al., 1987. Multiple sclerosis: a retrospective epidemiologic study in Aragon (1975-1985). *Neurología (Barcelona, Spain)*, 2(3), pp.97–100.
- Barizzone, N. et al., 2013. No evidence for a role of rare CYP27B1 functional variations in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 73(3), pp.433–7.
- Barkhof, F. et al., 1997. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*, 120, pp.2059–2069.
- Barletta, C. et al., 1987. Relationship between the c-myb locus and the 6q-chromosomal aberration in leukemias and lymphomas. *Science*, 235(4792), pp.1064–7.
- Barragán-Martínez, C. et al., 2012. Organic solvents as risk factor for autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 7(12), p.e51506.
- Barrett, J.C. et al., 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics*, 40(8), pp.955–62.
- Bashirova, A.A. et al., 2006. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annual review of genomics and human genetics*, 7, pp.277–300.
- Bawa, P. et al., 2015. Integrative Analysis of Normal Long Intergenic Non-Coding RNAs in Prostate Cancer. *PloS one*, 10(5), p.e0122143.

- Bayes, M. & Price, M., 1763. An Essay towards Solving a Problem in the Doctrine of Chances. By the Late Rev. Mr. Bayes, F. R. S. Communicated by Mr. Price, in a Letter to John Canton, A. M. F. R. S. *Philosophical Transactions*, 53, pp.370–418.
- Bazrafshani, M.R. et al., 2003. Polymorphisms in the IL-10 and IL-12 gene cluster and risk of developing recurrent aphthous stomatitis. *Oral diseases*, 9(6), pp.287–91.
- Belbasis, L. et al., 2015. Environmental risk factors and multiple sclerosis : an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*, 4422(14), pp.1–11.
- Ben-Selma, W. et al., 2015. Age- and gender-specific effects on VDR gene polymorphisms and risk of the development of multiple sclerosis in Tunisians: a preliminary study. *International journal of immunogenetics*, 42(3), pp.174–81.
- Benito-León, J. et al., 1998. Multiple sclerosis in Móstoles, central Spain. *Acta neurologica Scandinavica*, 98(4), pp.238–42.
- Berge, T., Leikfoss, I.S. & Harbo, H.F., 2013. From Identification to Characterization of the Multiple Sclerosis Susceptibility Gene CLEC16A. *International journal of molecular sciences*, 14(3), pp.4476–97.
- Bergkvist, M. & Sandberg-Wollheim, M., 2001. Serological differences in monozygotic twin pairs discordant for multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica*, 104(5), pp.262–5.
- Bettencourt, A. et al., 2014. The role of KIR2DS1 in multiple sclerosis -KIR in Portuguese MS patients. *Journal of neuroimmunology*, 269(1-2), pp.52–5.
- Bhatti, M.T. & Newman, N.J., 1999. A multiple sclerosis-like illness in a man harboring the mtDNA 14484 mutation. *Journal of neuro-ophthalmology*, 19(1), pp.28–33.



- Bielekova, B. et al., 2004. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), pp.8705–8.
- Bielekova, B. et al., 1999. Preferential expansion of autoreactive T lymphocytes from the memory T-cell pool by IL-7. *Journal of neuroimmunology*, 100(1-2), pp.115–23.
- Binzer, M. et al., 1994. Familial clustering of multiple sclerosis in a northern Swedish rural district. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 57(4), pp.497–9.
- Binzer, S. et al., 2014. High inbreeding in the Faroe Islands does not appear to constitute a risk factor for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 21(8), pp.996–1002.
- Bioscope. Disponible en: <http://www.lifetechnologies.com>. Consulta: 10 octubre 2015, 2015. Bioscope.
- Biron, C.A., 1997. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Current opinion in immunology*, 9(1), pp.24–34.
- Bitting, L. et al., 1996. Beta-amyloid peptide secretion by a microglial cell line is induced by beta-amyloid-(25-35) and lipopolysaccharide. *The Journal of biological chemistry*, 271(27), pp.16084–9.
- Blanco-Kelly, F. et al., 2011. Members 6B and 14 of the TNF receptor superfamily in multiple sclerosis predisposition. *Genes and immunity*, 12(2), pp.145–8.
- Bloch, D.B. et al., 1996. Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body. *The Journal of biological chemistry*, 271(46), pp.29198–204.
- Bobowick, A.R. et al., 1978. Twin study of multiple sclerosis: an epidemiologic inquiry. *Neurology*, 28(10), pp.978–87.
- Boullerne, A.I. et al., 2015. A Single-Nucleotide Polymorphism in Serine-Threonine Kinase 11, the Gene Encoding Liver Kinase B1, Is a Risk Factor for Multiple Sclerosis. *ASN Neuro*, 7(1), pp.1–13.

- Boulton, T.G. et al., 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 65(4), pp.663–75.
- Braliou, G.G. et al., 2015. Polymorphisms of the CD24 Gene Are Associated with Risk of Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 16(6), pp.12368–81.
- Brand, O.J. et al., 2007. Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs. *Clinical endocrinology*, 66(4), pp.508–12.
- Brassat, D. et al., 2005. The HLA locus and multiple sclerosis in Sicily. *Neurology*, 64(2), pp.361–3.
- Brightbill, H.D. et al., 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285(5428), pp.732–6.
- Broadley, S. et al., 2001. A genome screen for multiple sclerosis in Italian families. *Genes and immunity*, 2(4), pp.205–10.
- Brønnum-Hansen, H., Koch-Henriksen, N. & Stenager, E., 2004. Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain*, 127(Pt 4), pp.844–50.
- Brück, W., 2005. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *Journal of neurology*, 252 Suppl, pp.v3–9.
- Brum, D.G. et al., 2007. Association of the HLA-DRB1\*15 allele group and the DRB1\*1501 and DRB1\*1503 alleles with multiple sclerosis in White and Mulatto samples from Brazil. *Journal of neuroimmunology*, 189(1-2), pp.118–24.
- Brüstle, A. et al., 2012. The NF-κB regulator MALT1 determines the encephalitogenic potential of Th17 cells. *The Journal of clinical investigation*, 122(12), pp.4698–709.

- Brynedal, B. et al., 2009. Differential expression, and genetic association, of CD58 in Swedish multiple sclerosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), p.E58; author reply E59.
- Buñill, E. et al., 1995. Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, northern Spain. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 58(5), pp.577–581.
- Buhmann, C., Gbadamosi, J. & Heesen, C., 2002. Visual recovery in a man with the rare combination of mtDNA 11778 LHON mutation and a MS-like disease after mitoxantrone therapy. *Acta neurologica Scandinavica*, 106(4), pp.236–9.
- Bulayev, O. a., Pavlova, T. a. & Bulayeva, K.B., 2009. The effect of inbreeding on aggregation of complex diseases in genetic isolates. *Russian Journal of Genetics*, 45(8), pp.961–968.
- Burton, J.M. et al., 2010. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology*, 74(23), pp.1852–9.
- Burton, P.R., Tobin, M.D. & Hopper, J.L., 2005. Genetic Epidemiology 1 Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*, 366, pp.941–951.
- Bustin, S.A. et al., 1994. Cloning and characterization of ERF-1, a human member of the Tis11 family of early-response genes. *DNA and cell biology*, 13(5), pp.449–59.
- Byun, E. et al., 2008. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Archives of neurology*, 65(3), pp.337–44.
- Cabaleiro, T. et al., 2013. Association between psoriasis and polymorphisms in the TNF, IL12B, and IL23R genes in Spanish patients. *European journal of dermatology*, 23(5), pp.640–5.
- Caballero, A. et al., 1999. DQB1\*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue antigens*, 54(5), pp.524–6.

- Cai, C. et al., 2015. miR-195 inhibits tumor progression by targeting RPS6KB1 in human prostate cancer. *Clinical cancer research*, 21(21), pp.4922–34.
- Campbell, G.R. et al., 2011. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 69(3), pp.481–92.
- Camporeale, A. & Poli, V., 2012. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in autoimmunity? *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17, pp.2306–26.
- Carton, H. et al., 1997. Risks of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 62(4), pp.329–33.
- Castro, M.A.A. et al., 2007. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse. *Journal of immunology*, 178(7), pp.4351–61.
- Cendrowski, W. et al., 1969. Epidemiological study of multiple sclerosis in western Poland. *European Neurology*, 2(2), pp.90–108.
- Cendrowski, W., 1968. Multiple sclerosis: discordance in three pairs of dizygotic twins. *Journal of medical genetics*, 5(4), pp.266–8.
- Céniat, M.C. et al., 2010. STAT3 locus in inflammatory bowel disease and multiple sclerosis susceptibility. *Genes and immunity*, 11(3), pp.264–8.
- Chen, F. et al., 1999. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical Chemistry*, 45(1), pp.7–17.
- Chen, J.C. et al., 2012. Interleukin-27 and interleukin-12 augment activation of distinct cord blood natural killer cells responses via STAT3 pathways. *Journal of the Formosan Medical Association*, 111(5), pp.275–83.
- Chen, R. et al., 2011. Fine mapping the TAGAP risk locus in rheumatoid arthritis. *Genes and immunity*, 12(4), pp.314–8.
- Chen, Y.Q. et al., 1993. Cloning and expression of cDNA encoding human galactocerebrosidase, the enzyme deficient in globoid cell leukodystrophy. *Human molecular genetics*, 2(11), pp.1841–5.

- Chiang, Y.J. et al., 2000. Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature*, 403(6766), pp.216–20.
- Chih, B. et al., 2012. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nature cell biology*, 14(1), pp.61–72.
- Cho, J.H. & Brant, S.R., 2011. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140(6), pp.1704–12.
- Chrabot, B.S. et al., 2013. Genetic variation near IRF8 is associated with serologic and cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 14(8), pp.471–8.
- Čierny, D. et al., 2015. Genetic variants in interleukin 7 receptor  $\alpha$  chain (IL-7Ra) are associated with multiple sclerosis risk and disability progression in Central European Slovak population. *Journal of neuroimmunology*, 282, pp.80–4.
- Cirulli, E.T. & Goldstein, D.B., 2010. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nature reviews. Genetics*, 11(6), pp.415–25.
- Cocco, E. et al., 2013. Interaction between HLA-DRB1-DQB1 Haplotypes in Sardinian Multiple Sclerosis Population. *PLoS ONE*, 8(4), p.e59790.
- Coenen, M.J.H. et al., 2009. Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Human molecular genetics*, 18(21), pp.4195–203.
- Cohen, D. et al., 1984. Clusters of HLA class 1118 restriction fragments describe allelic series. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(12), pp.7870–7874.
- Cohen, J.C. et al., 2004. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science*, 305(5685), pp.869–72.
- Cohen, J.I., 2000. Epstein-Barr virus infection. *The New England journal of medicine*, 343(7), pp.481–92.
- Colonna, M. et al., 2000. A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunology today*, 21(9), pp.428–31.

- Comabella, M. et al., 2008. Identification of a novel risk locus for multiple sclerosis at 13q31.3 by a pooled genome-wide scan of 500,000 single nucleotide polymorphisms. *PLoS one*, 3(10), p.e3490.
- Comabella, M. et al., 2013. TNFRSF1A polymorphisms rs1800693 and rs4149584 in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 80(22), pp.2010–6.
- Comabella, M. & Montalban, X., 2014. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 13(1), pp.113–26.
- Compston, A., 2006. Making progress on the natural history of multiple sclerosis. *Brain*, 129(Pt 3), pp.561–3.
- Compston, A. et al., 2006. *McAlpine's Multiple Sclerosis 4a* ed. A. Compston, ed., Elsevier Health Sciences.
- Compston, A. & Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *The Lancet*, 372(9648), pp.1502–1517.
- Compston, A. & Coles, A., 2002. Multiple sclerosis. *The Lancet*, 359(9313), pp.1221–1231.
- Compston, D.A., Batchelor, J.R. & McDonald, W.I., 1976. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *The Lancet*, 2(7998), pp.1261–5.
- Confavreux, C. et al., 2014. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet. Neurology*, 13(3), pp.247–56.
- Confavreux, C. & Vukusic, S., 2006. Accumulation of irreversible disability in multiple sclerosis: from epidemiology to treatment. *Clinical neurology and neurosurgery*, 108(3), pp.327–32.
- Corradu, F. et al., 2001. A genome screen for multiple sclerosis in Sardinian multiplex families. *European Journal of Human Genetics*, 9(8), pp.621–626.
- Corrado, L. et al., 2011. Association of the CBLB gene with multiple sclerosis: new evidence from a replication study in an Italian population. *Journal of medical genetics*, 48(3), pp.210–1.

- Cortes, A. & Brown, M. a, 2011. Promise and pitfalls of the ImmunoChip. *Arthritis research & therapy*, 13(1), p.101.
- Couturier, N. et al., 2011. Tyrosine kinase 2 variant influences T lymphocyte polarization and multiple sclerosis susceptibility. *Brain*, 134(Pt 3), pp.693–703.
- Craddock, J. & Markovic-Plese, S., 2015. Immunomodulatory therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis: monoclonal antibodies, currently approved and in testing. *Expert review of clinical pharmacology*, 8(3), pp.283–96.
- Cunningham Graham, D.S. et al., 2011. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. *PLoS genetics*, 7(10), p.e1002341.
- Cutolo, M., Pizzorni, C. & Sulli, A., 2011. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmunity reviews*, 11(2), pp.84–7.
- Cybulsky, M.I. et al., 1991. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), pp.7859–63.
- Dalla Rosa, I. et al., 2014. MPV17L2 is required for ribosome assembly in mitochondria. *Nucleic acids research*, 42(13), pp.8500–15.
- Dalton, J.P. et al., 2014. Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in patients with Crohn's disease is unrelated to the presence of single nucleotide polymorphisms rs2241880 (ATG16L1) and rs10045431 (IL12B). *Medical microbiology and immunology*, 203(3), pp.195–205.
- Danoy, P. et al., 2010. Association of variants at 1q32 and STAT3 with ankylosing spondylitis suggests genetic overlap with Crohn's disease. *PLoS genetics*, 6(12), p.e1001195.

- Danoy, P. et al., 2011. Association of variants in MMEL1 and CTLA4 with rheumatoid arthritis in the Han Chinese population. *Annals of the rheumatic diseases*, 70(10), pp.1793–7.
- Le Dantec, C. et al., 2013. Rationale for treating primary Sjögren's syndrome patients with an anti-CD6 monoclonal antibody (Itolizumab). *Immunologic research*, 56(2-3), pp.341–7.
- Dardalhon, V. et al., 2005. CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions. *Journal of immunology*, 175(3), pp.1558–65.
- Davenport, C.B., 1922. Multiple sclerosis from the standpoint of geographic distribution and race. *Arch Neurol Psychiat*, (8), pp.51–60.
- Dickson, S.P. et al., 2010. Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS biology*, 8(1), p.e1000294.
- Dogra, S. et al., 2015. Long-term efficacy and safety of itolizumab in patients with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: A double-blind, randomized-withdrawal, placebo-controlled study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(2), pp.331–333.
- Dominguez-Sola, D. et al., 2007. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*, 448(7152), pp.445–51.
- Dorsey, M.J. et al., 1995. B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene*, 11(11), pp.2255–65.
- Druey, K.M. et al., 1996. Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature*, 379(6567), pp.742–6.
- Duan, S. et al., 2014. Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neuroscience letters*, 570, pp.108–13.
- Dubinsky, M.C. et al., 2013. Multidimensional prognostic risk assessment identifies association between IL12B variation and surgery in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 19(8), pp.1662–70.



- Dubois, P.C.A. et al., 2010. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature genetics*, 42(4), pp.295–302.
- Dudziak, K. et al., 2008. Transcription factor HNF1beta and novel partners affect nephrogenesis. *Kidney international*, 74(2), pp.210–7.
- Durbin, R.M. et al., 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), pp.1061–73.
- Dutta, A. et al., 2014. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor gene 2DL1 and its HLA-C2 ligand with family history of cancer in oral squamous cell carcinoma. *Immunogenetics*, 66(7-8), pp.439–48.
- Dutta, R. et al., 2006. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Annals of neurology*, 59(3), pp.478–89.
- Dutta, R. & Trapp, B.D., 2007. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology*, 68(Supplement 3), pp.S22–S31.
- Dyment, D.A. et al., 2008. A genome scan in a single pedigree with a high prevalence of multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(2), pp.158–162.
- Dyment, D.A. et al., 2002. A multigenerational family with multiple sclerosis. *Brain*, 125(Pt 7), pp.1474–1482.
- Dyment, D.A. et al., 2005. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Human molecular genetics*, 14(14), pp.2019–26.
- Dyment, D.A. et al., 2012. Exome sequencing identifies a novel multiple sclerosis susceptibility variant in the TYK2 gene. *Neurology*, 79(5), pp.406–411.
- Ebers, G.C. et al., 1996. A full genome search in multiple sclerosis. *Nature genetics*, 13(4), pp.472–6.
- Ebers, G.C. et al., 1986. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *The New England journal of medicine*, 315(26), pp.1638–42.

- Ebers, G.C. et al., 2000. Conjugal multiple sclerosis: Population-based prevalence and recurrence risks in offspring. *Annals of Neurology*, 48(6), pp.927–931.
- Ebers, G.C., Sadovnick, A.D. & Risch, N.J., 1995. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*, 377(6545), pp.150–1.
- Edwards, A. et al., 1990. Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics*, 6(4), pp.593–608.
- Edwards, A. & Caskey C, 1991. Closure strategies for random DNA sequencing. *Methods*, 3(1), pp.41–47.
- Eichhorst, H., 1896. Ueber infantile und hereditäre multiple Sklerose. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, 146(2), pp.173–192.
- Eiris, N. et al., 2014. Genetic variation at IL12B, IL23R and IL23A is associated with psoriasis severity, psoriatic arthritis and type 2 diabetes mellitus. *Journal of dermatological science*, 75(3), pp.167–72.
- Elian, M. et al., 1987. HLA associations with multiple sclerosis in Sicily and Malta. *Disease markers*, 5(2), pp.89–99.
- Ellinghaus, D. et al., 2012. Combined analysis of genome-wide association studies for Crohn disease and psoriasis identifies seven shared susceptibility loci. *American journal of human genetics*, 90(4), pp.636–47.
- Ensembl. Disponible en: <http://www.ensembl.org>. Consulta: 28 octubre 2015, 2015. Ensembl.
- Eraksoy, M. et al., 2003. A whole genome screen for linkage in Turkish multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 143(1-2), pp.17–24.
- Evangelou, M. et al., 2014. A method for gene-based pathway analysis using genomewide association study summary statistics reveals nine new type 1 diabetes associations. *Genetic epidemiology*, 38(8), pp.661–70.
- Faitar, S.L. et al., 2005. EVI5 is a novel centrosomal protein that binds to alpha- and gamma-tubulin. *Genomics*, 86(5), pp.594–605.

- Farez, M.F. & Correale, J., 2011. Immunizations and risk of multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Journal of neurology*, 258(7), pp.1197–206.
- Ferland, R.J. et al., 2004. Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in AHI1 in Joubert syndrome. *Nature genetics*, 36(9), pp.1008–13.
- Fernández, O. et al., 2004. DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *Journal of Neurology*, 251(4), pp.440–444.
- Fernández, O. et al., 1986. Epidemiology of multiple sclerosis in the province of Malaga (Spain). A prevalence study. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 1(1), pp.3–5.
- Fernández, O. et al., 2009. HLA class II alleles in patients with multiple sclerosis in the Biscay province (Basque Country, Spain). *Journal of neurology*, 256(12), pp.1977–88.
- Fernández, O. et al., 2008. Multiple sclerosis in Gypsies from southern Spain: prevalence, mitochondrial DNA haplogroups and HLA class II association. *Tissue antigens*, 71(5), pp.426–33.
- Fernández, O. et al., 2012. Multiple sclerosis prevalence in Malaga, Southern Spain estimated by the capture-recapture method. *Multiple Sclerosis*, 18(3), pp.372–6.
- Fernández, O. et al., 1994. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Vélez-Málaga, southern Spain. *Neurology*, 44(3 Pt 1), pp.425–429.
- Festen, E.A.M. et al., 2011. A meta-analysis of genome-wide association scans identifies IL18RAP, PTPN2, TAGAP, and PUS10 as shared risk loci for Crohn's disease and celiac disease. *PLoS genetics*, 7(1), p.e1001283.
- Field, J. et al., 2010. A polymorphism in the HLA-DPB1 gene is associated with susceptibility to multiple sclerosis. *PloS one*, 5(10), p.e13454.

- Field, J. et al., 2015. The MS Risk Allele of CD40 Is Associated with Reduced Cell-Membrane Bound Expression in Antigen Presenting Cells: Implications for Gene Function. *PLoS one*, 10(6), p.e0127080.
- Filippi, A. et al., 2005. The basic helix-loop-helix olig3 establishes the neural plate boundary of the trunk and is necessary for development of the dorsal spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), pp.4377–82.
- Finelli, P.F., 1991. Conjugal multiple sclerosis: a clinical and laboratory study. *Neurology*, 41(8), pp.1320–1.
- Firmbach-Kraft, I. et al., 1990. tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene*, 5(9), pp.1329–36.
- Fisher, R.A., 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection* J. H. Bennett, ed., OUP Oxford.
- Fisniku, L., Brex, P. & Altmann, D., 2008. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*, 131(Pt 3), pp.808–17.
- Fleischmann, R.D. et al., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), pp.496–512.
- Fletcher, J.M. et al., 2009. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *Journal of immunology*, 183(11), pp.7602–10.
- Flicek, P. et al., 2012. Ensembl 2012. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), pp.D84–90.
- Fraser, A., 1995. *The Gypsies* 2nd ed., Wiley-Blackwell.
- Fraser, D. et al., 1973. Pathogenesis of hereditary vitamin-D-dependent rickets. An inborn error of vitamin D metabolism involving defective conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D. *The New England journal of medicine*, 289(16), pp.817–22.

- Ben Fredj, N. et al., 2014. Evaluation of the implication of KIR2DL2 receptor in multiple sclerosis and herpesvirus susceptibility. *Journal of neuroimmunology*, 271(1-2), pp.30–5.
- Fredrikson, S. et al., 1992. Conjugal multiple sclerosis: immunogenetic characterization and analysis of T- and B-cell reactivity to myelin proteins. *Neurology*, 42(3 Pt 1), pp.577–82.
- Freeman, G.J. et al., 1993. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*, 262(5135), pp.909–11.
- French Research Group on Multiple Sclerosis, 1992. Multiple sclerosis in 54 twinships: concordance rate is independent of zygosity. French Research Group on Multiple Sclerosis. *Annals of neurology*, 32(6), pp.724–7.
- Frohman, E.M., Racke, M.K. & Raine, C.S., 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine*, 354(9), pp.942–55.
- Fuchs, P. et al., 1992. Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13. *Genomics*, 13(1), pp.219–24.
- Fukazawa, T. et al., 1999. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *Journal of the neurological sciences*, 166(1), pp.47–52.
- Fulton, J.C. et al., 1999. Familial multiple sclerosis: volumetric assessment in clinically symptomatic and asymptomatic individuals. *Multiple Sclerosis*, 5(2), pp.74–77.
- Fundación Esclerosis Múltiple, 2015. ¿Qué es la esclerosis múltiple?. Disponible en: <http://www.fem.es/page-que-es-lesclerosi-multiple.aspx>. Consulta: 27 agosto 2015.
- Fundación Secretariado Gitano, 1982. Fundación Secretariado Gitano. Disponible en <https://www.gitanos.org>. Consulta: 03 octubre 2015.
- Fusco, C. et al., 2010. KIRs and their HLA ligands in remitting-relapsing multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 229(1-2), pp.232–7.

- Gal, A. et al., 2000. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature genetics*, 26(3), pp.270–1.
- GAMES and the TMSGC, 2003. A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 143(1-2), pp.39–46.
- García, J.R. et al., 1989. Prevalence of multiple sclerosis in Lanzarote (Canary Islands). *Neurology*, 39(2 Pt 1), pp.265–7.
- García-León, J.A. et al., 2011. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Spanish multiple sclerosis patients. *Molecular immunology*, 48(15-16), pp.1896–902.
- García-Martín, E. et al., 2013. Vitamin D3 receptor ( VDR ) gene rs2228570 (Fok1) and rs731236 (Taq1) variants are not associated with the risk for multiple sclerosis: results of a new study and a meta-analysis. *PLoS one*, 8(6), p.e65487.
- Gerhartz, C. et al., 1996. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *The Journal of biological chemistry*, 271(22), pp.12991–8.
- Gharibi, T. et al., 2015. Investigation of IL-21 gene polymorphisms (rs2221903, rs2055979) in cases with multiple sclerosis of Azerbaijan, Northwest Iran. *American journal of clinical and experimental immunology*, 4(1), pp.7–14.
- Ghavimi, R. et al., 2014. Genetic association of rs1520333 G/A polymorphism in the IL7 gene with multiple sclerosis susceptibility in Isfahan population. *Advanced biomedical research*, 3, p.238.
- Gibbons, D.L. et al., 2011. Cutting Edge: Regulator of G protein signaling-1 selectively regulates gut T cell trafficking and colitic potential. *Journal of immunology*, 187(5), pp.2067–71.

- Girard, S.L. et al., 2011. Increased exonic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia. *Nature genetics*, 43(9), pp.860–3.
- Giunta, B., Rezai-Zadeh, K. & Tan, J., 2010. Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 9(2), pp.149–55.
- Glas, J., Seiderer, J., Wagner, J., et al., 2012. Analysis of IL12B gene variants in inflammatory bowel disease. *PloS one*, 7(3), p.e34349.
- Glas, J., Seiderer, J., Czamara, D., et al., 2012. PTGER4 expression-modulating polymorphisms in the 5p13.1 region predispose to Crohn's disease and affect NF-κB and XBP1 binding sites. *PloS one*, 7(12), p.e52873.
- Glenn, J.D. et al., 2014. Mesenchymal stem cells differentially modulate effector CD8+ T cell subsets and exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem cells*, 32(10), pp.2744–55.
- Goris, A. et al., 2015. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis. *Brain*, 138(Pt 3), pp.632–43.
- Goris, A. et al., 2010. Replication of KIF21B as a susceptibility locus for multiple sclerosis. *Journal of medical genetics*, 47(11), pp.775–6.
- Goris, A. et al., 2011. TNFRSF1A coding variants in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 235(1-2), pp.110–2.
- Gorodezky, C. et al., 1986. Immunogenetic profile of multiple sclerosis in Mexicans. *Human immunology*, 16(4), pp.364–74.
- Graham, M. & Adams, J.M., 1986. Chromosome 8 breakpoint far 3' of the c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma 2;8 variant translocation is equivalent to the murine pvt-1 locus. *The EMBO journal*, 5(11), pp.2845–51.
- Granberg, T. et al., 2013. Radiologically isolated syndrome - incidental magnetic resonance imaging findings suggestive of multiple sclerosis, a systematic review. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(3), pp.271–280.

- Granström, A.L. et al., 2014. A novel stop mutation in the EDNRB gene in a family with Hirschsprung's disease associated with multiple sclerosis. *Journal of pediatric surgery*, 49(4), pp.622–5.
- Gregory, S.G. et al., 2007. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature genetics*, 39(9), pp.1083–91.
- Gregory, S.G. et al., 2006. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*, 441(7091), pp.315–21.
- Gresham, D. et al., 2001. Origins and divergence of the Roma (gypsies). *American journal of human genetics*, 69(6), pp.1314–31.
- Grove, J.R. et al., 1991. Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Molecular and cellular biology*, 11(11), pp.5541–50.
- Gyllenberg, A. et al., 2014. Variability in the CIITA gene interacts with HLA in multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 15(3), pp.162–7.
- Gyódi, E. et al., 1981. The HLA antigen distribution in the Gipsy population in Hungary. *Tissue antigens*, 18(1), pp.1–12.
- Habek, M., Brinar, V. V & Borovečki, F., 2010. Genes associated with multiple sclerosis: 15 and counting. *Expert review of molecular diagnostics*, 10(7), pp.857–61.
- Hafler, D.A. et al., 1986. Immunologic responses of progressive multiple sclerosis patients treated with an anti-T-cell monoclonal antibody, anti-T12. *Neurology*, 36(6), pp.777–84.
- Hafler, J.P. et al., 2009. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes and immunity*, 10(1), pp.5–10.
- Haghighi, S. et al., 2006. A linkage study in two families with multiple sclerosis and healthy members with oligoclonal CSF immunopathy. *Multiple Sclerosis*, 12(6), pp.723–730.
- Haines, J.L. et al., 1996. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nature genetics*, 13(4), pp.469–71.



- Haines, J.L. et al., 1998. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Human molecular genetics*, 7(8), pp.1229–34.
- Harbo, H.F. et al., 2004. Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue antigens*, 63(3), pp.237–47.
- Harbo, H.F. et al., 2013. Oligoclonal bands and age at onset correlate with genetic risk score in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(6), pp.660–668.
- Harding, A.E. et al., 1992. Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *Brain*, 115 (Pt 4), pp.979–89.
- Hartmann, F.J. et al., 2014. Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nature communications*, 5, p.5056.
- Hassan, N.J. et al., 2006. CD6 regulates T-cell responses through activation-dependent recruitment of the positive regulator SLP-76. *Molecular and cellular biology*, 26(17), pp.6727–38.
- Hauser, S. & Goodin, D.S., 2011. Multiple Sclerosis and Other Demyelinating Diseases. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Professional Publishing, pp. 1–16.
- Hauser, S. & Oksenberg, J., 2006. The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron*, 52(1), pp.61–76.
- He, Y.W. & Malek, T.R., 1996. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*, 184(1), pp.289–93.
- Heard, R.N. et al., 1989. An allelic cluster of DQ alpha restriction fragments is associated with multiple sclerosis: evidence that a second haplotype may influence disease susceptibility. *Human immunology*, 25(2), pp.111–23.

- Hecker, M. et al., 2015. Susceptibility variants in the CD58 gene locus point to a role of microRNA-548ac in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 763, pp.161–7.
- Hedström, A.K. et al., 2011. Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain*, 134(Pt 3), pp.653–64.
- Hensiek, a. E. et al., 2003. Updated results of the United Kingdom linkage-based genome screen in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 143(1-2), pp.25–30.
- Henske, E.P. et al., 1995. Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1. *Annals of human genetics*, 59(Pt 1), pp.25–37.
- Hillert, J. & Olerup, O., 1993. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,Dw2 haplotype. *Neurology*, 43(1), pp.163–8.
- Hillier, L.W. et al., 2003. The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature*, 424(6945), pp.157–64.
- Hirschfield, G.M. et al., 2009. Primary Biliary Cirrhosis Associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 Variants. *New England Journal of Medicine*, 360(24), pp.2544–2555.
- Hirschhorn, J.N. & Daly, M.J., 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature reviews. Genetics*, 6(2), pp.95–108.
- Hoashi, T. et al., 2005. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *The Journal of biological chemistry*, 280(14), pp.14006–16.
- Hoffjan, S. et al., 2015. Association of TNFAIP3 and TNFRSF1A variation with multiple sclerosis in a German case-control cohort. *International journal of immunogenetics*, 42(2), pp.106–10.

- Hoischen, A. et al., 2010. De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nature genetics*, 42(6), pp.483–5.
- Hollenbach, J. a. & Oksenberg, J.R., 2015. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64, pp.13–25.
- Hong, S.N. et al., 2015. Deep resequencing of 131 Crohn's disease associated genes in pooled DNA confirmed three reported variants and identified eight novel variants. *Gut*, Epub ahead.
- Hoppenbrouwers, I.A. et al., 2008. EVI5 is a risk gene for multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 9(4), pp.334–7.
- Hoppenbrouwers, I.A. et al., 2009. Replication of CD58 and CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis. *Journal of human genetics*, 54(11), pp.676–80.
- Hoppmann, N. et al., 2015. New candidates for CD4 T cell pathogenicity in experimental neuroinflammation and multiple sclerosis. *Brain*, 138(Pt 4), pp.902–17.
- Horton, R. et al., 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews. Genetics*, 5(12), pp.889–99.
- Horváth, R. et al., 2000. Leber's hereditary optic neuropathy presenting as multiple sclerosis-like disease of the CNS. *Journal of neurology*, 247(1), pp.65–7.
- Howard, J.E.F. et al., 2015. Langerhans cell sarcoma: a systematic review. *Cancer treatment reviews*, 41(4), pp.320–31.
- Hu, S. et al., 2014. Association between IL-6-174G/C polymorphism and risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 18(2), pp.127–30.
- Huang, C. et al., 2015. Increased expression of the lncRNA PVT1 is associated with poor prognosis in pancreatic cancer patients. *Minerva medica*, 106(3), pp.143–9.

- Huang, J., Yang, Y., Liang, Z., et al., 2015. Association between the CD24 Ala57Val polymorphism and risk for multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Scientific reports*, 5, p.9557.
- Huang, J. et al., 2008. Human membrane metallo-endopeptidase-like protein degrades both beta-amyloid 42 and beta-amyloid 40. *Neuroscience*, 155(1), pp.258–62.
- Huang, J., Yang, Y., Zhou, F., et al., 2015. Meta-analysis of the IL23R and IL12B polymorphisms in multiple sclerosis. *The International journal of neuroscience*, 126(3), pp.205–2012.
- Huang, J. & Xie, Z.-F., 2012. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and multiple sclerosis risk: a meta-analysis of case-control studies. *Journal of the neurological sciences*, 313(1-2), pp.79–85.
- Huang, Z. et al., 2014. BMI levels with MS Bone mineral density levels in adults with multiple sclerosis: a meta-analysis. *The International journal of neuroscience*, 125(12), pp.904–12.
- Huber, S. et al., 2012. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature*, 491(7423), pp.259–63.
- Hughes, M.R. et al., 1988. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science*, 242(4886), pp.1702–5.
- Hunt, K.A. et al., 2008. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nature genetics*, 40(4), pp.395–402.
- Huo, L. et al., 2015. Novel Association of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genes with EBV-infectious Diseases in Children. *Biomedical and environmental sciences*, 28(4), pp.303–7.
- Huynh, J.L. et al., 2014. Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nature neuroscience*, 17(1), pp.121–30.
- Hyun, J.-W. et al., 2015. Utility of the rio score and modified rio score in korean patients with multiple sclerosis. *PloS one*, 10(5), p.e0129243.

- Ikemizu, S. et al., 1999. Crystal structure of the CD2-binding domain of CD58 (lymphocyte function-associated antigen 3) at 1.8-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), pp.4289–94.
- IMSGC, 2005. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *American journal of human genetics*, 77(3), pp.454–467.
- IMSGC, 2013a. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 45(11), pp.1353–60.
- IMSGC, 2015. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 47(10), pp.1107–13.
- IMSGC, 2010a. Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Human molecular genetics*, 19(5), pp.953–62.
- IMSGC, 2004. Enhancing linkage analysis of complex disorders: An evaluation of high-density genotyping. *Human Molecular Genetics*, 13(17), pp.1943–1949.
- IMSGC, 2010b. IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Genes and immunity*, 11(5), pp.397–405.
- IMSGC, 2013b. MANBA, CXCR5, SOX8, RPS6KB1 and ZBTB46 are genetic risk loci for multiple sclerosis. *Brain*, 136(Pt 6), pp.1778–82.
- IMSGC, 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *New England Journal of Medicine*, 357(9), pp.851–62.
- IMSGC, 2009. The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes. *Genes and immunity*, 10(1), pp.11–4.
- IMSGC, 2011. The genetic association of variants in CD6, TNFRSF1A and IRF8 to multiple sclerosis: a multicenter case-control study. *PloS one*, 6(4), p.e18813.
- IMSGC & WTCCC2, 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476(7359), pp.214–9.

- Inotai, D. et al., 2015. HLA genetic diversity in Hungarians and Hungarian Gypsies: complementary differentiation patterns and demographic signals revealed by HLA-A, -B and -DRB1 in Central Europe. *Tissue Antigens*, 86(2), pp.115–121.
- Iridoy Zulet, M. et al., 2015. Epigenetic changes in neurology: DNA methylation in multiple sclerosis. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, Epub ahead.
- Isobe, N. et al., 2015. An ImmunoChip study of multiple sclerosis risk in African Americans. *Brain*, 138(Pt 6), pp.1518–30.
- Isobe, N. et al., 2013. Genetic risk variants in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology*, 81(3), pp.219–27.
- Izquierdo, G., 2014. Esclerosis múltiple: impacto socioeconómico y en la calidad de vida de los pacientes. *Medicina Clínica*, 143(Supl 3), pp.7–12.
- Izquierdo, G. et al., 2015. Long-term epidemiology of multiple sclerosis in the Northern Seville District. *Acta neurologica Scandinavica*, 132(2), pp.111–7.
- Izumi, K. et al., 2015. Reduced Tyk2 gene expression in  $\beta$ -cells due to natural mutation determines susceptibility to virus-induced diabetes. *Nature communications*, 6, p.6748.
- Izzo, V. et al., 2011. Improving the estimation of celiac disease sibling risk by non-HLA genes. *PloS one*, 6(11), p.e26920.
- De Jager, P.L., Jia, X., et al., 2009. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature genetics*, 41(7), pp.776–82.
- De Jager, P.L., Baecher-Allan, C., et al., 2009. The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13), pp.5264–9.
- Jakkula, E. et al., 2010. Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. *American journal of human genetics*, 86(2), pp.285–91.

- Jana, M. et al., 2014. Interleukin-12 (IL-12), but not IL-23, induces the expression of IL-7 in microglia and macrophages: implications for multiple sclerosis. *Immunology*, 141(4), pp.549–63.
- Jelčić, I. et al., 2012. Killer immunoglobulin-like receptor locus polymorphisms in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 18(7), pp.951–8.
- Jernås, M. et al., 2013. MicroRNA regulate immune pathways in T-cells in multiple sclerosis (MS). *BMC immunology*, 14, p.32.
- Jersild, C., Svejgaard, A. & Fog, T., 1972. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*, 1(7762), pp.1240–1.
- Jorde, L.B., 2000. Linkage Disequilibrium and the Search for Complex Disease Genes. *Genome Research*, 10(10), pp.1435–1444.
- Joshi, S. et al., 2011. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Molecular and cellular biology*, 31(17), pp.3653–69.
- Joutel, A. & Tournier-Lasserre, E., 1998. Notch signalling pathway and human diseases. *Seminars in cell & developmental biology*, 9(6), pp.619–25.
- Junker, A. et al., 2009. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain*, 132(12), pp.3342–3352.
- Jurewicz, A. et al., 2014. High CD6 and low chemokine receptor expression on peripheral blood lymphocytes correlates with MRI gadolinium enhancement in MS. *Journal of neuroimmunology*, 276(1-2), pp.187–94.
- Kaimen-Maciel, D.R. et al., 2009. HLA-DRB1\* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. *Molecular medicine reports*, 2(6), pp.993–8.
- Kakugawa, K. et al., 2009. A novel gene essential for the development of single positive thymocytes. *Molecular and cellular biology*, 29(18), pp.5128–35.

- Kalaydjieva, L. et al., 1999. A Founder Mutation in the GK1 Gene Is Responsible for Galactokinase Deficiency in Roma (Gypsies). *The American Journal of Human Genetics*, 65(5), pp.1299–1307.
- Kalaydjieva, L. et al., 1996. Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nature Genetics*, 14(2), pp.214–217.
- Kalaydjieva, L. et al., 2000. N-myc Downstream-Regulated Gene 1 Is Mutated in Hereditary Motor and Sensory Neuropathy–Lom. *The American Journal of Human Genetics*, 67(1), pp.47–58.
- Kalaydjieva, L., Gresham, D. & Calafell i Majó, F., 2001. Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. *BMC medical genetics*, 2(5), pp.1–13.
- Kálmán, B. et al., 1991. Sclerosis multiplex in gypsies. *Acta neurologica Scandinavica*, 84(3), pp.181–5.
- Kálmán, B. & Toldy, E., 2014. Genomic binding sites and biological effects of the vitamin D-VDR complex in multiple sclerosis. *Neuromolecular medicine*, 16(2), pp.265–79.
- Kang, H. & Shin, J.-H., 2014. Repression of rRNA transcription by PARIS contributes to Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 73C, pp.220–228.
- Karakas Celik, S. et al., 2014. Interleukin 18 gene polymorphism is a risk factor for multiple sclerosis. *Molecular biology reports*, 41(3), pp.1653–8.
- Karni, A. et al., 1999. Evidence for the genetic role of human leukocyte antigens in low frequency DRBI\*1501 multiple sclerosis patients in Israel. *Multiple Sclerosis*, 5(6), pp.410–415.
- Katz Sand, I.B. & Lublin, F.D., 2013. Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Continuum*, 19(4), pp.922–43.
- Kawabe, T. et al., 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 1(3), pp.167–78.



- Kawashima, H. & Kurokawa, K., 1983. Unique hormonal regulation of vitamin D metabolism in the mammalian kidney. *Mineral and electrolyte metabolism*, 9(4-6), pp.227–35.
- Kemppinen, A. et al., 2014. Exome sequencing in single cells from the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 20(12), pp.1564–8.
- Kenealy, S.J. et al., 2004. A second-generation genomic screen for multiple sclerosis. *American journal of human genetics*, 75(6), pp.1070–8.
- Khankhanian, P. et al., 2015. Genetic contribution to multiple sclerosis risk among Ashkenazi Jews. *BMC medical genetics*, 16, p.55.
- Khoo, T.K., 2011. Parkin inactivation via PARIS (ZNF746) may lead to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 26(5), p.772.
- Kim, E.H. et al., 2014. Bach2 regulates homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells and protects against fatal lung disease in mice. *Journal of immunology*, 192(3), pp.985–95.
- Kim, J.Y. et al., 2014. CD58 polymorphisms associated with the risk of neuromyelitis optica in a Korean population. *BMC neurology*, 14, p.57.
- Kinnunen, E. et al., 1988. Genetic susceptibility to multiple sclerosis. A co-twin study of a nationwide series. *Archives of neurology*, 45(10), pp.1108–11.
- Kirby, A.C. et al., 1995. Expression of lymphocyte function-associated antigen 3 in oral lichen planus. *Oral diseases*, 1(4), pp.193–7.
- Kivisild, T. et al., 1999. Deep common ancestry of Indian and western-Eurasian mitochondrial DNA lineages. *Current biology*, 9(22), pp.1331–4.
- Klein, J. & Sato, A., 2000. The HLA system. First of two parts. *New England Journal of Medicine*, 343(10), pp.702–709.
- Knevel, R. et al., 2013. Association of variants in IL2RA with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 65(7), pp.1684–93.

- Koboldt, D.C. et al., 2009. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*, 25(17), pp.2283–5.
- Koch-Henriksen, N. & Hyllested, K., 1988. Epidemiology of multiple sclerosis: incidence and prevalence rates in Denmark 1948-64 based on the Danish Multiple Sclerosis Registry. *Acta neurologica Scandinavica*, 78(5), pp.369–80.
- Kofler, D.M. et al., 2011. The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4+ T cell proliferation. *Journal of immunology*, 187(6), pp.3286–91.
- Komano, J. et al., 1999. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *Journal of virology*, 73(12), pp.9827–31.
- Kong, R. et al., 2015. Long noncoding RNA PVT1 indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes cell proliferation through epigenetically regulating p15 and p16. *Molecular cancer*, 14, p.82.
- Konjević, G., Vuletić, A. & Mirjačić Martinović, K., 2015. Natural killer cell receptors: alterations and therapeutic targeting in malignancies. *Immunologic research*, Epub ahead.
- Kreft, K.L. et al., 2014. Abundant kif21b is associated with accelerated progression in neurodegenerative diseases. *Acta neuropathologica communications*, 2, p.144.
- Krüger, S. et al., 2003. Identification of a naturally processed HLA-DR-restricted T-helper epitope in Epstein-Barr virus nuclear antigen type 1. *Journal of immunotherapy*, 26(3), pp.212–21.
- Krupnik, V.E. et al., 1999. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*, 238(2), pp.301–13.
- Kuhle, J. et al., 2015. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Multiple Sclerosis Journal*, 21(8), pp.1013–24.

- Kuhlmann, T. et al., 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*, 125(Pt10), pp.2202–12.
- Kümpfel, T. & Hohlfeld, R., 2009. Multiple sclerosis. TNFRSF1A, TRAPS and multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 5(10), pp.528–9.
- Kuokkanen, S. et al., 1997. Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families. *American journal of human genetics*, 61(6), pp.1379–87.
- Kurdi, A. et al., 1977. Different B lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis in Arabs and North Europeans. *Lancet*, 1(8022), pp.1123–5.
- Kurreeman, F.A.S. et al., 2012. Use of a multiethnic approach to identify rheumatoid- arthritis-susceptibility loci, 1p36 and 17q12. *American journal of human genetics*, 90(3), pp.524–32.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), pp.1444–1452.
- Kutzelnigg, A. et al., 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 128(Pt11), pp.2705–12.
- Kwon, O.J. et al., 1999. HLA Class II Susceptibility to Multiple Sclerosis Among Ashkenazi and Non-Ashkenazi Jews. *Archives of Neurology*, 56(5), p.555.
- de la Chapelle, A. & Wright, F.A., 1998. Linkage disequilibrium mapping in isolated populations: the example of Finland revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), pp.12416–23.
- de la Salle C, Schwartz A, Baas MJ, Lanza F, C.J., 1995. Detection by PCR and HphI restriction analysis of a splice site mutation at the 5' end of intron 15 of the platelet GPIIb (alpha IIb integrin) gene responsible for Glanzmann's thrombasthenia type I in Gypsies originating from the Strasbourg area. *Thromb Haemost*, 74, pp.990–1.

- Laaksonen, H. et al., 2014. The multiple sclerosis risk gene IL2RA2 contributes to a more severe murine autoimmune neuroinflammation. *Genes and immunity*, 15(7), pp.457–65.
- Laaksonen, M. et al., 2002. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis—a Finnish family study. *Journal of neuroimmunology*, 122(1-2), pp.140–5.
- Lacle, M.M. et al., 2015. Chromosome 17 copy number changes in male breast cancer. *Cellular oncology*, 38(3), pp.237–45.
- Lai, L. & Goldschneider, I., 2001. Cutting edge: Identification of a hybrid cytokine consisting of IL-7 and the beta-chain of the hepatocyte growth factor/scatter factor. *Journal of immunology*, 167(7), pp.3550–4.
- Lander, E. & Botstein, D., 1987. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, 236(4808), pp.1567–1570.
- Lander, E. & Kruglyak, L., 1995. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature genetics*, 11(3), pp.241–7.
- Lasa, A. et al., 1998. Severe limb girdle muscular dystrophy in Spanish gypsies: further evidence for a founder mutation in the  $\gamma$ -sarcoglycan gene. *European Journal of Human Genetics*, 6(4), pp.396–399.
- Launonen, V., 2005. Mutations in the human LKB1/STK11 gene. *Human mutation*, 26(4), pp.291–7.
- Lee, C.H. et al., 2006. Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *The Journal of experimental medicine*, 203(1), pp.63–72.
- Lee, M. et al., 2015. IL-7 receptor deletion ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Diabetologia*, 58(10), pp.2361–70.
- Leikfoss, I.S. et al., 2015. Multiple Sclerosis Risk Allele in CLEC16A Acts as an Expression Quantitative Trait Locus for CLEC16A and SOCS1 in CD4+ T Cells. *PLoS one*, 10(7), p.e0132957.

- Leone, M.A. et al., 2013. Association of genetic markers with CSF oligoclonal bands in multiple sclerosis patients. *PloS one*, 8(6), p.e64408.
- Lessard, C.J. et al., 2012. Identification of IRF8, TMEM39A, and IKZF3-ZPBP2 as susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in a large-scale multiracial replication study. *American journal of human genetics*, 90(4), pp.648–60.
- Li, H. et al., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), pp.2078–9.
- Li, S.-W. et al., 2014. Single-nucleotide polymorphisms of IRF8 gene are associated with systemic lupus erythematosus in Chinese Han population. *International journal of immunogenetics*, 41(2), pp.112–8.
- Liao, J. et al., 2012. CD40L demethylation in CD4(+) T cells from women with rheumatoid arthritis. *Clinical immunology*, 145(1), pp.13–8.
- Libioulle, C. et al., 2007. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS genetics*, 3(4), p.e58.
- Lill, C.M. et al., 2014. Assessment of microRNA-related SNP effects in the 3' untranslated region of the IL22RA2 risk locus in multiple sclerosis. *Neurogenetics*, 15(2), pp.129–34.
- Lin, J.D. et al., 2015. Association of IRF8 gene polymorphisms with autoimmune thyroid disease. *European journal of clinical investigation*, 45(7), pp.711–9.
- Lin, M.W. et al., 2012. Differentiating patterns of oligoclonal banding in the cerebrospinal fluid improves diagnostic utility for multiple sclerosis. *Pathology*, 44(3), pp.248–250.
- Lin, X. et al., 2015. Functional relevance for multiple sclerosis-associated genetic variants. *Immunogenetics*, 67(1), pp.7–14.
- Lincoln, M.R. et al., 2009. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), pp.7542–7.

- Lindén, M. et al., 2013. Multiple sclerosis risk genotypes correlate with an elevated cerebrospinal fluid level of the suggested prognostic marker CXCL13. *Multiple sclerosis journal*, 19(7), pp.863–870.
- Link, H. & Huang, Y.-M., 2006. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *Journal of Neuroimmunology*, 180(1-2), pp.17–28.
- Liu, B. et al., 2012. Serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis: a meta-analysis. *Neurological research*, 34(2), pp.163–71.
- Liu, E., Liu, Z. & Zhou, Y., 2015. Carboplatin-docetaxel-induced activity against ovarian cancer is dependent on up-regulated lncRNA PVT1. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(4), pp.3803–10.
- Liu, J. & Zhang, H.-X., 2014. CTLA-4 gene and the susceptibility of multiple sclerosis: an updated meta-analysis study including 12,916 cases and 15,455 controls. *Journal of neurogenetics*, 28(1-2), pp.153–63.
- Liu, M. et al., 2014. Association of IL-23 and its receptor gene single-nucleotide polymorphisms with multiple sclerosis in Chinese southern population. *The International journal of neuroscience*, 124(12), pp.904–7.
- Liu, P.T. et al., 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311(5768), pp.1770–3.
- Lord, D. et al., 1990. The inheritance of MS susceptibility. *Irish journal of medical science*, 159 Suppl, pp.1–20.
- Lorentzen, A.R. et al., 2009. Killer immunoglobulin-like receptor ligand HLA-Bw4 protects against multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 65(6), pp.658–66.
- Lowther, D.E. & Hafler, D.A., 2012. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunological reviews*, 248(1), pp.156–69.
- Lu, F. et al., 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 177(2), pp.95–103.

- Lu, J.Q. et al., 2013. The regulation of reactive changes around multiple sclerosis lesions by phosphorylated signal transducer and activator of transcription. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 72(12), pp.1135–44.
- Lublin, F.D. et al., 2014. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), pp.1–9.
- Lublin, F.D. & Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), pp.907–11.
- Lundmark, F., Duvefelt, K., Iacobaeus, E., et al., 2007. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nature genetics*, 39(9), pp.1108–13.
- Lundmark, F., Duvefelt, K. & Hillert, J., 2007. Genetic association analysis of the interleukin 7 gene (IL7) in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 192(1-2), pp.171–3.
- Lünemann, J.D. et al., 2007. Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *Journal of virology*, 81(13), pp.6777–84.
- Lunny, C., Knopp-Sihota, J.A. & Fraser, S.N., 2013. Surgery and risk for multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *BMC neurology*, 13, p.41.
- Lunny, C.A., Fraser, S.N. & Knopp-Sihota, J.A., 2014. Physical trauma and risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of the neurological sciences*, 336(1-2), pp.13–23.
- Lynch, S. et al., 1990. MRI in familial multiple sclerosis. *Neurology*, 40(6), pp.900–3.
- Mackay, R.P. & Myrianthopoulos, N.C., 1958. Multiple sclerosis in twins and their relatives; preliminary report on a genetic and clinical study. *A.M.A. archives of neurology and psychiatry*, 80(6), pp.667–74.

- Mackay, R.P. & Myrianthopoulos, N.C., 1966. Multiple sclerosis in twins and their relatives. *Archives of neurology*, 15(5), pp.449–62.
- Mahad, D. et al., 2009. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain*, 132(Pt 5), pp.1161–74.
- Mahad, D., Lassmann, H. & Turnbull, D., 2008. Review: Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology*, 34(6), pp.577–89.
- Mallada, J., 1999. Epidemiology of multiple sclerosis in Spain. Prevalence and incidence data. *Revista de neurologia*, 29(9), pp.864–7.
- Malmeström, C. et al., 2013. Serum levels of LIGHT in MS. *Multiple Sclerosis*, 19(7), pp.871–6.
- Malyarchuk, B.A. et al., 2006. Mitochondrial DNA diversity in the Polish Roma. *Annals of human genetics*, 70(Pt 2), pp.195–206.
- Mamutse, G. et al., 2008. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with reduced disability in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 14(9), pp.1280–3.
- Manouchehrinia, A. et al., 2013. Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain*, 136(Pt 7), pp.2298–304.
- Maña, P. et al., 2013. LIGHT (TNFSF14/CD258) is a decisive factor for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*, 191(1), pp.154–63.
- Mao, M. et al., 2004. T lymphocyte activation gene identification by coregulated expression on DNA microarrays. *Genomics*, 83(6), pp.989–99.
- Mao, P. & Reddy, P.H., 2010. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochimica et biophysica acta*, 1802(1), pp.66–79.
- Marroqui, L. et al., 2014. BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2. *Diabetes*, 63(7), pp.2516–27.



- Marroqui, L. et al., 2015. TYK2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates apoptosis and the innate immune response in human pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*, 64(11), pp.3808–17.
- Marrosu, M. et al., 2002. Genetic factors and the founder effect explain familial MS in Sardinia. *Neurology*, 58, pp.283–288.
- Marrosu, M.G. et al., 2001. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Human Molecular Genetics*, 10(25), pp.2907–2916.
- Marrosu, M.G. et al., 1998. DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. *Human molecular genetics*, 7(8), pp.1235–7.
- Marrosu, M.G. et al., 1992. HLA-DQB1 genotype in Sardinian multiple sclerosis: evidence for a key role of DQB1 \*0201 and \*0302 alleles. *Neurology*, 42(4), pp.883–6.
- Marrosu, M.G. et al., 1997. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *American journal of human genetics*, 61(2), pp.454–7.
- Marszalek, J.R. et al., 1999. Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *The Journal of cell biology*, 145(3), pp.469–79.
- Martín, R. et al., 1988. Prevalence of multiple sclerosis in Spain. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 3(4), pp.166–7.
- Martinelli-Boneschi, F. et al., 2012. A genome-wide association study in progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 18(10), pp.1384–1394.
- Matesanz, F. et al., 2015. A functional variant that affects exon-skipping and protein expression of SP140 as genetic mechanism predisposing to multiple sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 24(19), pp.5619–27.
- Matesanz, F. et al., 2012. Genome-wide association study of multiple sclerosis confirms a novel locus at 5p13.1. *PloS one*, 7(5), p.e36140.

- Matsumoto-Taniura, N. et al., 1996. Identification of novel M phase phosphoproteins by expression cloning. *Molecular biology of the cell*, 7(9), pp.1455–69.
- Mauri, D.N. et al., 1998. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*, 8(1), pp.21–30.
- Mc Guire, C. et al., 2013. Paracaspase MALT1 deficiency protects mice from autoimmune-mediated demyelination. *Journal of immunology*, 190(6), pp.2896–903.
- Mc Guire, C. et al., 2014. Pharmacological inhibition of MALT1 protease activity protects mice in a mouse model of multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 11, p.124.
- McAlpine, D., Compston, N.D. & Lumsden, C.E., 1955. *Multiple Sclerosis* Livingstone, ed., Livingstone.
- McElroy, C.A., Dohm, J.A. & Walsh, S.T.R., 2009. Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7Ralpha complex. *Structure*, 17(1), pp.54–65.
- McKenna, A. et al., 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research*, 20(9), pp.1297–303.
- Mechelli, R. et al., 2015. Epstein-Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. *Neurology*, 84(13), pp.1362–8.
- Mendel, G., 1866. Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verh. Natur-forsch. Ver. Brünn*, 4, pp.3–47.
- Menezes, S.M. et al., 2014. CD80+ and CD86+ B cells as biomarkers and possible therapeutic targets in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 11, p.18.
- Mero, I.-L. et al., 2010. A rare variant of the TYK2 gene is confirmed to be associated with multiple sclerosis. *European Journal of Human Genetics*, 18(4), pp.502–4.

- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics*, 11(1), pp.31–46.
- Miao, T. et al., 2013. Early growth response gene-2 controls IL-17 expression and Th17 differentiation by negatively regulating Batf. *Journal of immunology*, 190(1), pp.58–65.
- Michels, M. et al., 2015. CD40-CD40 Ligand Pathway Is a Major Component of Acute Neuroinflammation and Contributes to Long-term Cognitive Dysfunction after Sepsis. *Molecular medicine*, 21(1), pp.219–26.
- Michels-van Amelsfort, J.M.R., Walter, G.J. & Taams, L.S., 2011. CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic sclerosis and other rheumatic diseases. *Expert review of clinical immunology*, 7(4), pp.499–514.
- Milanov, I., Topalov, N. & Kmetski, T., 1999. Prevalence of multiple sclerosis in Gypsies and Bulgarians. *Neuroepidemiology*, 18(4), pp.218–222.
- Miller, D. et al., 2008. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Multiple Sclerosis*, 14(9), pp.1157–1174.
- Mirea, L. et al., 2013. Relationship of mode of conception and sex concordance with mortality/morbidity in preterm twins. *Twin research and human genetics*, 16(5), pp.985–93.
- Miró, J. et al., 1983. Multiple sclerosis in Cantabria. Retrospective study of 30 cases. *Revista clínica española*, 175(3-4), pp.153–6.
- MitoTool, 2015. MitoTool. Disponible en: <http://www.mitotool.org/>. Consulta: 5 diciembre 2015.
- Miyamoto, K. et al., 1997. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular endocrinology*, 11(8), pp.1165–79.
- Modin, H. et al., 2003. Genome-wide linkage screen of a consanguineous multiple sclerosis kinship. *Multiple Sclerosis*, 9(2), pp.128–134.
- Modrego Pardo, P.J. et al., 1997. Prevalence of multiple sclerosis in the province of Teruel, Spain. *Journal of neurology*, 244(3), pp.182–5.

- Mommaas, M. et al., 1994. Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules. *The Journal of investigative dermatology*, 103(6), pp.807–10.
- Momozawa, Y. et al., 2011. Resequencing of positional candidates identifies low frequency IL23R coding variants protecting against inflammatory bowel disease. *Nature genetics*, 43(1), pp.43–7.
- Monteiro, L. et al., 2011. Association between allergies and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Acta neurologica Scandinavica*, 123(1), pp.1–7.
- Montomoli, C. et al., 2002. Multiple sclerosis recurrence risk for siblings in an isolated population of Central Sardinia, Italy. *Genetic epidemiology*, 22(3), pp.265–71.
- Morar, B. et al., 2004. Mutation history of the roma/gypsies. *American journal of human genetics*, 75(4), pp.596–609.
- Moretta, L. et al., 2006. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Seminars in immunology*, 18(3), pp.151–8.
- Motulsky, A.G., 1995. Jewish diseases and origins. *Nature genetics*, 9(2), pp.99–101.
- Mowry, E.M. et al., 2013. Multiple sclerosis susceptibility genes: associations with relapse severity and recovery. *PloS one*, 8(10), p.e75416.
- Mowry, E.M. et al., 2012. Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 72(2), pp.234–240.
- Mullen, S. a et al., 2009. A neurologist's guide to genome-wide association studies. *Neurology*, 72(6), pp.558–65.
- Multiple Sclerosis International Federation, 2013. Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. Disponible en: <http://www.msif.org/about-us/advocacy/atlas/>. Consulta: 10 agosto 2015.
- Mumford, C.J. et al., 1994. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology*, 44(1), pp.11–5.

- Munger, K.L. et al., 2006. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 296(23), pp.2832–8.
- Murray, T.J., 2009. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *Journal of the neurological sciences*, 277 Suppl, pp.S3–8.
- Musone, S.L. et al., 2008. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 40(9), pp.1062–4.
- Naghbalhossaini, F. et al., 2015. Association Between MTHFR Genetic Variants and Multiple Sclerosis in a Southern Iranian Population. *International journal of molecular and cellular medicine*, 4(2), pp.87–93.
- Naito, S. et al., 1978. HLA and Japanese MS. *Tissue antigens*, 12(1), pp.19–24.
- Naito, S. et al., 1972. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue antigens*, 2(1), pp.1–4.
- Nakajima, D. et al., 2002. Construction of expression-ready cDNA clones for KIAA genes: manual curation of 330 KIAA cDNA clones. *DNA research*, 9(3), pp.99–106.
- Narooie-Nejad, M., Moossavi, M., Torkamanzehi, A. & Moghtaderi, A., 2015. Positive association of vitamin D receptor gene variations with multiple sclerosis in South East Iranian population. *BioMed research international*, 2015, p.427519.
- Narooie-Nejad, M., Moossavi, M., Torkamanzehi, A., Moghtaderi, A., et al., 2015. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and the Risk of Multiple Sclerosis in South Eastern of Iran. *Journal of molecular neuroscience*, 56(3), pp.572–6.
- Navarro-Hernández, R.E. et al., 2009. Expression of ICAM1 and VCAM1 serum levels in rheumatoid arthritis clinical activity. Association with genetic polymorphisms. *Disease markers*, 26(3), pp.119–26.

- Nesheva, D., 2014. Aspects of ancient mitochondrial DNA analysis in different populations for understanding human evolution. *Balkan journal of medical genetics*, 17(1), pp.5–14.
- Neuhaus, E. et al., 2015. Face processing among twins with and without autism: social correlates and twin concordance. *Social cognitive and affective neuroscience*, 11(1), pp.44–54.
- Ng, S.B. et al., 2010. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature genetics*, 42(1), pp.30–5.
- Nischwitz, S. et al., 2010. Evidence for VAV2 and ZNF433 as susceptibility genes for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 227(1-2), pp.162–166.
- Nischwitz, S. et al., 2015. MS susceptibility is not affected by single nucleotide polymorphisms in the MMP9 gene. *Journal of neuroimmunology*, 279, pp.46–9.
- O'Connor, A.M., Crawley, A.M. & Angel, J.B., 2010. Interleukin-7 enhances memory CD8(+) T-cell recall responses in health but its activity is impaired in human immunodeficiency virus infection. *Immunology*, 131(4), pp.525–36.
- O'Connor, P. et al., 2011. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 365(14), pp.1293–303.
- O'Roak, B.J. et al., 2011. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature genetics*, 43(6), pp.585–9.
- Okamura, T. et al., 2009. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), pp.13974–9.
- Oksenberg, J.R. et al., 2004. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *American journal of human genetics*, 74(1), pp.160–7.

- Oksenberg, J.R. et al., 2008. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 9(7), pp.516–526.
- Oksenberg, J.R. & Baranzini, S.E., 2010. Multiple sclerosis genetics—is the glass half full, or half empty? *Nature Reviews Neurology*, 6(8), pp.429–437.
- Okuda, D.T. et al., 2009. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: The radiologically isolated syndrome. *Neurology*, 72(9), pp.800–805.
- Okuda, D.T. et al., 2014. Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PloS one*, 9(3), p.e90509.
- Olerup, O. et al., 1987. Genomic HLA-typing by RFLP-analysis using DR beta and DQ beta cDNA probes reveals normal DR-DQ linkages in patients with multiple sclerosis. *Tissue antigens*, 30(3), pp.135–8.
- Olerup, O. & Hillert, J., 1991. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue antigens*, 38(1), pp.1–15.
- Olsen, N.K. et al., 1995. Leber's hereditary optic neuropathy associated with a disorder indistinguishable from multiple sclerosis in a male harbouring the mitochondrial DNA 11778 mutation. *Acta neurologica Scandinavica*, 91(5), pp.326–9.
- Al Omar, S.Y. et al., 2015. The Relationship Between Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors and HLA-C Polymorphisms in Colorectal Cancer in a Saudi Population. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 19(11), pp.617–22.
- Ortiz, M. a. et al., 2015. Influence of the LILRA3 Deletion on Multiple Sclerosis Risk: Original Data and Meta-Analysis. *Plos One*, 10(8), p.e0134414.
- Otaegui, D. et al., 2004. Mitochondrial haplogroups in Basque multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*, 10(5), pp.532–5.
- Otero-Romero, S. et al., 2013. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Multiple Sclerosis*, 19(2), pp.245–8.

- Ottoboni, L. et al., 2013. Clinical relevance and functional consequences of the TNFRSF1A multiple sclerosis locus. *Neurology*, 81(22), pp.1891–9.
- Ouimet, T. et al., 2000. Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(3), pp.565–70.
- Ouyang, P., 2009. SRrp37, a novel splicing regulator located in the nuclear speckles and nucleoli, interacts with SC35 and modulates alternative pre-mRNA splicing in vivo. *Journal of cellular biochemistry*, 108(1), pp.304–14.
- Oyake, T. et al., 1996. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Molecular and cellular biology*, 16(11), pp.6083–95.
- de Pablo, R. et al., 1992. Distribution of HLA antigens in Spanish Gypsies: a comparative study. *Tissue antigens*, 40(4), pp.187–96.
- Pálffy, G., Gyódi, E. & Petrányi, G., 1986. Multiple sclerosis in 3 gipsy and 2 partly gipsy subjects (a clinical and immunogenetic study). *Acta medica Hungarica*, 43(1), pp.31–7.
- Pandit, L. et al., 2011. Evaluation of the established non-MHC multiple sclerosis loci in an Indian population. *Multiple Sclerosis*, 17(2), pp.139–43.
- Papadopoulou, L.C. et al., 1999. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nature genetics*, 23(3), pp.333–7.
- Paraboschi, E.M. et al., 2014. Functional variations modulating PRKCA expression and alternative splicing predispose to multiple sclerosis. *Human molecular genetics*, 23(25), pp.6746–61.
- Parham, P., 2005. Influence of KIR diversity on human immunity. *Advances in experimental medicine and biology*, 560, pp.47–50.



- Parham, P. & Moffett, A., 2013. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction and human evolution. *Nature reviews. Immunology*, 13(2), pp.133–44.
- Park, T.-J. et al., 2013. Associations of CD6, TNFRSF1A and IRF8 polymorphisms with risk of inflammatory demyelinating diseases. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39(5), pp.519–30.
- Parnell, G.P. et al., 2014. The autoimmune disease-associated transcription factors EOMES and TBX21 are dysregulated in multiple sclerosis and define a molecular subtype of disease. *Clinical immunology*, 151(1), pp.16–24.
- Passarge, E., 2007. *Color Atlas of Genetics 2nd edition* 3era ed., Thieme.
- Patsopoulos, N. a et al., 2013. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS genetics*, 9(11), p.e1003926.
- Patsopoulos, N.A. et al., 2011. Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Annals of Neurology*, 70(6), pp.897–912.
- Pearce, E.L. et al., 2003. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*, 302(5647), pp.1041–3.
- Pedchenko, T. V et al., 2005. Inducible binding of PU.1 and interacting proteins to the Toll-like receptor 4 promoter during endotoxemia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 289(3), pp.L429–37.
- Peng, Y. et al., 2010. A novel role for protein inhibitor of activated STAT (PIAS) proteins in modulating the activity of Zimp7, a novel PIAS-like protein, in androgen receptor-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry*, 285(15), pp.11465–75.
- Perdigones, N. et al., 2010. Evidence of epistasis between TNFRSF14 and TNFRSF6B polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 62(3), pp.705–10.

- Perga, S. et al., 2015. Anti-inflammatory genes associated with multiple sclerosis: a gene expression study. *Journal of neuroimmunology*, 279, pp.75–8.
- Petzold, A., 2013. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 262(1-2), pp.1–10.
- Pfeifer, D. et al., 2000. The SOX8 gene is located within 700 kb of the tip of chromosome 16p and is deleted in a patient with ATR-16 syndrome. *Genomics*, 63(1), pp.108–16.
- Picard Tools, 2015. Picard Tools. Disponible en: <http://broadinstitute.github.io/picard/>. Consulta: 3 noviembre 2015.
- Piccolo, F., 1996. A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Human Molecular Genetics*, 5(12), pp.2019–2022.
- Piédavent-Salomon, M. et al., 2015. Multiple sclerosis associated genetic variants of CD226 impair regulatory T cell function. *Brain*, 138(Pt 11), pp.3263–74.
- Pierce, A.M. & Keating, A.K., 2014. TAM receptor tyrosine kinases: expression, disease and oncogenesis in the central nervous system. *Brain research*, 1542, pp.206–20.
- Pigard, N. et al., 2009. Therapeutic activities of intravenous immunoglobulins in multiple sclerosis involve modulation of chemokine expression. *Journal of neuroimmunology*, 209(1-2), pp.114–20.
- Pihlaja, H. et al., 2003. Linkage disequilibrium between the MBP tetranucleotide repeat and multiple sclerosis is restricted to a geographically defined subpopulation in Finland. *Genes and immunity*, 4(2), pp.138–46.
- Pina, M.A. et al., 1998. Prevalence of multiple sclerosis in the sanitary district of Calatayud, Northern Spain: is Spain a zone of high risk for this disease? *Neuroepidemiology*, 17(5), pp.258–264.

- Pitti, R.M. et al., 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, 396(6712), pp.699–703.
- Pittock, S.J. et al., 2004. Change in MS-related disability in a population-based cohort: a 10-year follow-up study. *Neurology*, 62(1), pp.51–9.
- Plasilova, M. et al., 1999. Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *Journal of medical genetics*, 36(4), pp.290–294.
- Plasilova, M. et al., 1998. Linkage of Autosomal Recessive Primary Congenital Glaucoma to the GLC3A Locus in Roms (Gypsies) from Slovakia. *Human Heredity*, 48(1), pp.30–33.
- Plaza-Izurietá, L. et al., 2011. Revisiting genome wide association studies (GWAS) in coeliac disease: replication study in Spanish population and expression analysis of candidate genes. *Journal of medical genetics*, 48(7), pp.493–6.
- Polman, C.H. et al., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, 69(2), pp.292–302.
- PolyPhen, 2015. PolyPhen. Disponible en: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Consulta: 28 octubre 2015.
- Popadic, S. et al., 2015. TNF, IL12B, and IFNG Gene Polymorphisms in Serbian Patients with Psoriasis. *Annals of dermatology*, 27(2), pp.128–32.
- Poser, C.M. et al., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of neurology*, 13(3), pp.227–31.
- Poser, C.M., 1994. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay. *Annals of neurology*, 36 Suppl 2, pp.S231–43.
- Prager, M., Büttner, J. & Büning, C., 2014. PTGER4 modulating variants in Crohn's disease. *International journal of colorectal disease*, 29(8), pp.909–15.

- Pratt, R.T.C., Compston, N.D. & McAlpine, D., 1951. The familial incidence of disseminated sclerosis and its significance. *Brain*, 74(2), pp.191–232.
- Pritchard, J. & Cox, N., 2002. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant ... or not? *Human Molecular Genetics*, 11(20), pp.2417–2423.
- Purcell, S., Cherny, S.S. & Sham, P.C., 2003. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*, 19(1), pp.149–150.
- Qiang, Q. et al., 2012. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms predispose susceptibility to Epstein-Barr virus associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Chinese children. *Microbiology and immunology*, 56(6), pp.378–84.
- Qiu, W. et al., 2013. The influence of non-HLA gene polymorphisms and interactions on disease risk in a Western Australian multiple sclerosis cohort. *Journal of neuroimmunology*, 261(1-2), pp.92–7.
- Qiu, Z.X. et al., 2013. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases: a meta-analysis. *Human immunology*, 74(2), pp.249–55.
- Quelvennec, E. et al., 2003. Genetic and functional studies in multiple sclerosis patients from Martinique attest for a specific and direct role of the HLA-DR locus in the syndrome. *Tissue Antigens*, 61(2), pp.166–171.
- Quintana-Murci, L. et al., 1999. Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa. *Nature genetics*, 23(4), pp.437–41.
- Quintana-Murci, L. et al., 2004. Where west meets east: the complex mtDNA landscape of the southwest and Central Asian corridor. *American journal of human genetics*, 74(5), pp.827–45.
- Ramagopalan, S. V, Anderson, C., et al., 2007. Genomewide study of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 357(21), pp.2199–200; author reply 2200–1.

- Ramagopalan, S. V et al., 2011. Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 70(6), pp.881–6.
- Ramagopalan, S. V, Morris, A.P., et al., 2007. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS genetics*, 3(9), pp.1607–13.
- Ramagopalan, S. V & Ebers, G.C., 2009. Epistasis: multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Neurology*, 72(6), pp.566–567.
- Ramagopalan, S. V. et al., 2009. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genetics*, 5(2), pp.1–6.
- Ramal, L.M. et al., 2001. HLA class II allele distribution in the Gypsy community of Andalusia, southern Spain. *Tissue Antigens*, 57(2), pp.138–143.
- Ramanujam, R. et al., 2011. Utilizing twins concordance rates to infer the predisposition to myasthenia gravis. *Twin research and human genetics*, 14(2), pp.129–36.
- Ramasamy, A. et al., 2014. Genetic evidence for a pathogenic role for the vitamin D3 metabolizing enzyme CYP24A1 in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders*, 3(2), pp.211–219.
- Rani, R., Fernandez-Viña, M. a & Stastny, P., 1998. Associations between HLA class II alleles in a North Indian population. *Tissue antigens*, 52(1), pp.37–43.
- Rao, S.M. et al., 1991. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning. *Neurology*, 41(5), pp.692–6.
- Raychaudhuri, S. et al., 2008. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nature genetics*, 40(10), pp.1216–23.
- Reeves, R.H. et al., 1997. The costimulatory genes Cd80 and Cd86 are linked on mouse chromosome 16 and human chromosome 3. *Mammalian genome*, 8(8), pp.581–2.
- Reich, D.E. & Lander, E.S., 2001. On the allelic spectrum of human disease. *Trends in Genetics*, 17(9), pp.502–510.

- Reif, K. et al., 2002. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*, 416(6876), pp.94–9.
- Reinthaler, E. et al., 2014. No evidence for a role of rare CYP27B1 variants in Austrian multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*, 20(3), pp.391–2.
- Richards, M. et al., 1998. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Annals of Human Genetics*, 62(3), pp.241–260.
- Richards, M. et al., 2000. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *American journal of human genetics*, 67(5), pp.1251–76.
- Río, J. et al., 2006. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Annals of neurology*, 59(2), pp.344–52.
- Río, J., Castelló, J., et al., 2009. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Multiple Sclerosis*, 15(7), pp.848–53.
- Río, J., Comabella, M. & Montalban, X., 2009. Predicting responders to therapies for multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 5(10), pp.553–60.
- Riordan-Eva, P. & Harding, A.E., 1995. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *Journal of medical genetics*, 32(2), pp.81–7.
- Rioux, J.D. et al., 2009. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), pp.18680–5.
- Risch, N. et al., 1995. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nature genetics*, 9(2), pp.152–9.
- Risch, N., 1990a. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *American journal of human genetics*, 46(2), pp.222–8.

- Risch, N., 1990b. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. *American journal of human genetics*, 46(2), pp.229–41.
- Risch, N. & Merikangas, K., 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273(5281), pp.1516–7.
- Roberts, D.F., 1991. Consanguinity and multiple sclerosis in Orkney. *Genetic epidemiology*, 8(3), pp.147–51.
- Roberts, D.F. & Bates, D., 1982. The genetic contribution to multiple sclerosis. Evidence from North-East England. *Journal of the neurological sciences*, 54(2), pp.287–93.
- Roberts, D.F., Roberts, M.J. & Poskanzer, D.C., 1979. Genetic analysis of multiple sclerosis in Orkney. *Journal of epidemiology and community health*, 33(4), pp.229–35.
- Roberts, D.F., Roberts, M.J. & Poskanzer, D.C., 1983. Genetic analysis of multiple sclerosis in Shetland. *Journal of epidemiology and community health*, 37(4), pp.281–5.
- Roberts, T., Chernova, O. & Cowell, J.K., 1998. NB4S, a member of the TBC1 domain family of genes, is truncated as a result of a constitutional t(1;10)(p22;q21) chromosome translocation in a patient with stage 4S neuroblastoma. *Human molecular genetics*, 7(7), pp.1169–78.
- Robertson, N. et al., 1995. Multiple sclerosis in the north Cambridgeshire districts of East Anglia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 59(1), pp.71–6.
- Robertson, N.P. et al., 1997. Offspring recurrence rates and clinical characteristics of conjugal multiple sclerosis. *Lancet*, 349(9065), pp.1587–90.
- Rodriguez, P.C. et al., 2012. A clinical exploratory study with itolizumab, an anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis. *Results in immunology*, 2, pp.204–11.

- Rogers, T. et al., 2000. A Novel Locus for Autosomal Recessive Peripheral Neuropathy in the EGR2 Region on 10q23. *The American Journal of Human Genetics*, 67(3), pp.664–671.
- Romeo, M. et al., 2015. Validation of 1-year predictive score of long-term response to interferon- $\beta$  in everyday clinical practice multiple sclerosis patients. *European Journal of Neurology*, 22(6), pp.973–980.
- Romero-Pinel, L. et al., 2010. Epistasis between HLA-DRB1 parental alleles in a Spanish cohort with multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 298(1-2), pp.96–100.
- Rooney, I.A. et al., 2000. The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), pp.14307–15.
- Rose, J.W. et al., 2004. Treatment of multiple sclerosis with an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody. *Annals of neurology*, 56(6), pp.864–7.
- Rose, J.W. & Carlson, N.G., 2007. Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Continuum Lifelong Learning Neurol*, 13(5), pp.35–62.
- Ross, J.P. et al., 2014. Analysis of CYP27B1 in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 266(1-2), pp.64–6.
- Roth, M.P. et al., 1994. Gender distributions in parents and children concordant for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*, 13(5), pp.211–5.
- Rothlin, C. V et al., 2007. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*, 131(6), pp.1124–36.
- Roura, E. et al., 2015. A toolbox for multiple sclerosis lesion segmentation. *Neuroradiology*, 57(10), pp.1031–43.
- Roychoudhuri, R. et al., 2013. BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. *Nature*, 498(7455), pp.506–10.
- Rubio, J.P. et al., 2002. Genetic dissection of the human leukocyte antigen region by use of haplotypes of Tasmanians with multiple sclerosis. *American journal of human genetics*, 70(5), pp.1125–37.



- Rubio, J.P. et al., 2008. Replication of KIAA0350, IL2RA, RPL5 and CD58 as multiple sclerosis susceptibility genes in Australians. *Genes and immunity*, 9(7), pp.624–30.
- Rudick, R. a et al., 2006. Significance of T2 lesions in multiple sclerosis: A 13-year longitudinal study. *Annals of neurology*, 60(2), pp.236–42.
- Rueckert, D. et al., 1999. Nonrigid registration using free-form deformations: application to breast MR images. *IEEE transactions on medical imaging*, 18(8), pp.712–21.
- Ruiz-Ezquerro, J.J. et al., 1988. Epidemiología de la esclerosis múltiple (Salamanca y Zamora). *Neurología (Barcelona, Spain)*, 3, p.Suplemento.
- Ruyssen-Witrand, A. et al., 2014. Association of IL-2RA and IL-2RB genes with erosive status in early rheumatoid arthritis patients (ESPOIR and RMP cohorts). *Joint, bone, spine*, 81(3), pp.228–34.
- Ryan, B.M. et al., 2014. An analysis of genetic factors related to risk of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Cancer epidemiology*, 38(5), pp.583–90.
- Ryan, E.J. et al., 2002. Dendritic cell-associated lectin-1: a novel dendritic cell-associated, C-type lectin-like molecule enhances T cell secretion of IL-4. *Journal of immunology*, 169(10), pp.5638–48.
- Sadovnick, A.D. et al., 1993. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Annals of neurology*, 33(3), pp.281–5.
- Sadovnick, A.D. et al., 1996. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. *Lancet*, 347(9017), pp.1728–1730.
- Sadovnick, A.D., 1994. Genetic epidemiology of multiple sclerosis: a survey. *Annals of neurology*, 36 Suppl 2, pp.S194–203.
- Sadovnick, A.D. & Baird, P.A., 1988. The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology*, 38(6), pp.990–1.
- Sadovnick, A.D., Baird, P.A. & Ward, R.H., 1988. Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *American journal of medical genetics*, 29(3), pp.533–41.

- Sadovnick, A.D., Heltberg, A. & Holm, N., 1982. Concordance In Twins And Recurrence In Sibships In Multiple Sclerosis. *Lancet*, 319(8280), p.1068.
- Sakaguchi, S. et al., 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*, 10(7), pp.490–500.
- Sakaguchi, S. et al., 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), pp.775–87.
- Salzer, J. & Sundström, P., 2013. Timing of cigarette smoking as a risk factor for multiple sclerosis. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 6(3), p.205.
- Sanger, F. & Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), pp.441–8.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp.5463–7.
- Sanna, S. et al., 2010. Variants within the immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nature genetics*, 42(6), pp.495–7.
- Santiago, J.L. et al., 2008. Study of the association between the CAPSL-IL7R locus and type 1 diabetes. *Diabetologia*, 51(9), pp.1653–8.
- Der Sarkissian, C. et al., 2015. Ancient genomics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 370(1660), p.20130387.
- Saruhan-Direskeneli, G. et al., 1997. HLA-DR and -DQ associations with multiple sclerosis in Turkey. *Human immunology*, 55(1), pp.59–65.
- Sasahara, K. et al., 2000. Molecular cloning and expression analysis of a putative nuclear protein, SR-25. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(2), pp.444–50.
- Sawcer, S. et al., 1996. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nature genetics*, 13(4), pp.464–8.
- Sawcer, S., 2006. A new era in the genetic analysis of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*, 19(3), pp.237–41.

- Sawcer, S., 2008. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain*, 131(12), pp.3118–3131.
- Sawcer, S., Franklin, R.J.M. & Ban, M., 2014. Multiple sclerosis genetics. *Lancet neurology*, 13(7), pp.700–709.
- Scalfari, A. et al., 2010. The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*, 133(7), pp.1914–1929.
- Schapira, K., Poskanzer, D.C. & Miller, H., 1963. Familial and conjugal multiple sclerosis. *Brain*, 86, pp.315–32.
- Schena, M. et al., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), pp.467–70.
- Schiffmann, S. et al., 2014. PGE2/EP4 signaling in peripheral immune cells promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochemical pharmacology*, 87(4), pp.625–35.
- Schlingmann, K.P. et al., 2011. Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. *The New England journal of medicine*, 365(5), pp.410–21.
- Schönbeck, U. & Libby, P., 2001. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cellular and molecular life sciences*, 58(1), pp.4–43.
- Schwarz, A. et al., 2012. 1,25-dihydroxyvitamin D exerts similar immunosuppressive effects as UVR but is dispensable for local UVR-induced immunosuppression. *The Journal of investigative dermatology*, 132(12), pp.2762–9.
- Sellebjerg, F. et al., 2012. FOXP3, CBLB and ITCH gene expression and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression on CD4(+) CD25(high) T cells in multiple sclerosis. *Clinical and experimental immunology*, 170(2), pp.149–55.
- Sempere, A.P. et al., 1995. Multiple sclerosis in Spain. *Neurology*, 45(1), p.202.

- Senapati, S. et al., 2015. Evaluation of European coeliac disease risk variants in a north Indian population. *European Journal of Human Genetics*, 23(4), pp.530–5.
- Shahijanian, F. et al., 2014. The CYP27B1 variant associated with an increased risk of autoimmune disease is underexpressed in tolerizing dendritic cells. *Human molecular genetics*, 23(6), pp.1425–34.
- Sharma, M. et al., 2003. hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *The EMBO journal*, 22(22), pp.6101–14.
- Sheng, Y.-J. et al., 2015. Association analyses confirm five susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in the Han Chinese population. *Arthritis research & therapy*, 17, p.85.
- Sherry, S.T., Ward, M. & Sirotkin, K., 1999. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome research*, 9(8), pp.677–679.
- Shibuya, A. et al., 1996. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*, 4(6), pp.573–81.
- Shin, J.-H. et al., 2011. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 $\alpha$  contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*, 144(5), pp.689–702.
- Shrem, O.B., 2003. Estudio de pacientes asintomáticos de esclerosis múltiple familiar mediante resonancia magnética. *Revista de Neurología*, 37(9), pp.811–814.
- Simoni, L. et al., 2000. Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe. *American journal of human genetics*, 66(1), pp.262–78.
- Simpson, S. et al., 2010. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 68(2), pp.193–203.
- Simpson, S. et al., 2011. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 82(10), pp.1132–41.

- Simpson, S., Taylor, B. V. & van der Mei, I., 2015. The role of epidemiology in MS research: Past successes, current challenges and future potential. *Multiple Sclerosis*, 21(8), pp.969–977.
- Smith, D.J. & Lusk, A.J., 2002. The allelic structure of common disease. *Human molecular genetics*, 11(20), pp.2455–2461.
- Smolders, J. et al., 2008. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 14(9), pp.1220–4.
- Smolders, J. et al., 2009. The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews*, 8(7), pp.621–6.
- Sokolova, E.A. et al., 2013. Association of SNPs of CD40 gene with multiple sclerosis in Russians. *PloS one*, 8(4), p.e61032.
- Soleimanpour, S.A. et al., 2014. The diabetes susceptibility gene Clec16a regulates mitophagy. *Cell*, 157(7), pp.1577–90.
- Sormani, M.P. et al., 2011. Magnetic resonance imaging as surrogate for clinical endpoints in multiple sclerosis: data on novel oral drugs. *Multiple Sclerosis*, 17(5), pp.630–3.
- Sormani, M.P. et al., 2013. Refining response to treatment as defined by the Modified Rio Score. *Multiple Sclerosis*, 19(9), pp.1246–7.
- Sormani, M.P. & De Stefano, N., 2013. Defining and scoring response to IFN- $\beta$  in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 9(9), pp.504–12.
- Sosa Enríquez, M. et al., 1983. Multiple sclerosis in the province of Las Palmas. *Archivos de neurobiología*, 46(3), pp.161–6.
- Sospedra, M. & Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology*, 23, pp.683–747.
- Staden, R., 1979. A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic acids research*, 6(7), pp.2601–10.
- Stahl, E.A. et al., 2010. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics*, 42(6), pp.508–14.

- Stangel, M. et al., 2013. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 9(5), pp.267–76.
- Stazi, M.A. et al., 2002. The Italian Twin Project: from the personal identification number to a national twin registry. *Twin research*, 5(5), pp.382–6.
- Steckley, J.L. et al., 2000. Genetic analysis of vitamin D related genes in Canadian multiple sclerosis patients. Canadian Collaborative Study Group. *Neurology*, 54(3), pp.729–32.
- Stojković, L. et al., 2014. The gender-specific association of CXCL16 A181V gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis, and its effects on PBMC mRNA and plasma soluble CXCL16 levels: preliminary findings. *Journal of neurology*, 261(8), pp.1544–51.
- Stürner, K.H. et al., 2014. A multiple sclerosis-associated variant of CBLB links genetic risk with type I IFN function. *Journal of immunology*, 193(9), pp.4439–47.
- Sugimoto, Y. & Narumiya, S., 2007. Prostaglandin E receptors. *The Journal of biological chemistry*, 282(16), pp.11613–7.
- Sun, M. et al., 2013. Inflammatory factors gene polymorphism in recurrent oral ulceration. *Journal of oral pathology & medicine*, 42(7), pp.528–34.
- Sundqvist, E. et al., 2010. Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *European Journal of Human Genetics*, 18(12), pp.1349–52.
- Suo, Z. et al., 1998. Alzheimer's beta-amyloid peptides induce inflammatory cascade in human vascular cells: the roles of cytokines and CD40. *Brain research*, 807(1-2), pp.110–7.
- Suter, M.A., Anders, A.M. & Aagaard, K.M., 2012. Maternal smoking as a model for environmental epigenetic changes affecting birthweight and fetal programming. *Molecular Human Reproduction*, 19(1), pp.1–6.
- Swaminathan, B. et al., 2013. Fine mapping and functional analysis of the multiple sclerosis risk gene CD6. *PloS one*, 8(4), p.e62376.

- Swaminathan, B. et al., 2010. Validation of the CD6 and TNFRSF1A loci as risk factors for multiple sclerosis in Spain. *Journal of neuroimmunology*, 223(1-2), pp.100–3.
- Sweeney, V.P., Sadovnick, A.D. & Brandeys, V., 1986. Prevalence of multiple sclerosis in British Columbia. *The Canadian journal of neurological sciences*, 13(1), pp.47–51.
- Tajiri, T. et al., 2010. Concordance for neuroblastoma in monozygotic twins: case report and review of the literature. *Journal of pediatric surgery*, 45(12), pp.2312–6.
- Tajouri, L. et al., 2005. Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population. *Journal of neurogenetics*, 19(1), pp.25–38.
- Takács, K. et al., 1990. Association between the lack of HLA-DQw6 and the low incidence of multiple sclerosis in Hungarian Gypsies. *Immunogenetics*, 31(5-6), pp.383–5.
- Tan, Y. et al., 2015. CD24: from a Hematopoietic Differentiation Antigen to a Genetic Risk Factor for Multiple Autoimmune Diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*, Epub ahead.
- Tanaka, T. et al., 1999. cDNA cloning and expression of rat homeobox gene, Hex, and functional characterization of the protein. *The Biochemical journal*, 339 (Pt 1), pp.111–7.
- Tao, T. et al., 2014. Loss of SNAIL inhibits cellular growth and metabolism through the miR-128-mediated RPS6KB1/HIF-1 $\alpha$ /PKM2 signaling pathway in prostate cancer cells. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(9), pp.8543–50.
- Terasaki, P.I. & Mickey, M.R., 1976. A single mutation hypothesis for multiple sclerosis based on the HL-A system. *Neurology*, 26(6 (Pt 2)), pp.56–8.
- Terasaki, P.I. & Rich, N., 1964. Quantitative determination of antibody and complement directed against lymphocytes. *Journal of immunology*, 92, pp.128–38.

- Thangaraj, K. et al., 2006. In situ origin of deep rooting lineages of mitochondrial Macrohaplogroup "M" in India. *BMC genomics*, 7, p.151.
- The International HapMap Consortium, 2003. The International HapMap Project. *Nature*, 426(6968), pp.789–96.
- The MHC sequencing consortium, 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*, 401(6756), pp.921–3.
- Theodoratou, E. et al., 2014. Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *British Medical Journal*, 348, p.g2035.
- Thorpe, J. & Mumford, C., 1994. British Isles survey of multiple sclerosis in twins: MRI. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 57, pp.491–496.
- Thums, K., 1951. Einelige Zwillinge Mit Konkordanter Multiplen Sklerose. *Wiener Z Nervenheilk*, 4, pp.173–203.
- Tienari, P.J. et al., 1992. Familial multiple sclerosis: MRI findings in clinically affected and unaffected siblings. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 55(10), pp.883–6.
- Tienari, P.J. & Hohlfeld, R., 2013. TNFRSF1A in multiple sclerosis: a tale of soluble receptors and signaling cascades. *Neurology*, 81(22), pp.1886–8.
- Tintore, M. et al., 2015. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*, 138(7), pp.1863–74.
- Tintore, M. et al., 2007. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*, 70(13 (Pt 2)), pp.1079–1083.
- Tintoré, M. et al., 2006. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology*, 67(6), pp.968–72.
- Tizaoui, K. et al., 2015. Association between vitamin D receptor polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Cellular & molecular immunology*, 12(2), pp.243–52.



- Todd, J.A. et al., 2007. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nature genetics*, 39(7), pp.857–64.
- Tola, M.A. et al., 1998. Impact of fatigue in multiple sclerosis: study of a population-based series in Valladolid. *Revista de neurologia*, 26(154), pp.930–3.
- Toledo-Rodriguez, M. et al., 2010. Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. *American journal of medical genetics*, 153B(7), pp.1350–4.
- Torbati, S. et al., 2015. Association of CD58 Polymorphism with Multiple Sclerosis and Response to Interferon  $\beta$  Therapy in A Subset of Iranian Population. *Cell journal*, 16(4), pp.506–13.
- Torkildsen, Ø. et al., 2008. Vitamin D-dependent rickets as a possible risk factor for multiple sclerosis. *Archives of neurology*, 65(6), pp.809–11.
- La Torre, D. et al., 2009. Human leukocyte antigen frequency in human high-grade gliomas: a case-control study in Sicily. *Neurosurgery*, 64(6), pp.1082–8; discussion 1088–9.
- Traboulsee, A.L. et al., 2014. Genetic variants in IL2RA and IL7R affect multiple sclerosis disease risk and progression. *Neurogenetics*, 15(3), pp.165–9.
- Tran, M., Bhargava, R. & MacDonald, I.M., 2001. Leber hereditary optic neuropathy, progressive visual loss, and multiple-sclerosis-like symptoms. *American Journal of Ophthalmology*, 132(4), pp.591–593.
- Tran, T. et al., 2010. Interferon $\beta$ -1b Induces the Expression of RGS1 a Negative Regulator of G-Protein Signaling. *International journal of cell biology*, 2010, p.529376.
- Tran-Viet, K.-N. et al., 2013. Mutations in SCO2 are associated with autosomal-dominant high-grade myopia. *American journal of human genetics*, 92(5), pp.820–6.

- Tranah, G.J. et al., 2015. Mitochondrial DNA sequence variation in multiple sclerosis. *Neurology*, 85(4), pp.325–30.
- Trapp, B.D. et al., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 338(5), pp.278–285.
- Trynka, G. et al., 2009. Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut*, 58(8), pp.1078–83.
- Tseng, Y.-Y. et al., 2014. PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature*, 512(7512), pp.82–6.
- Tyers, M. et al., 1988. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature*, 333(6172), pp.470–3.
- Unión Romani., 2015. Unión Romani. Disponible en: [http://www.unionromani.org/asosdir\\_es.htm](http://www.unionromani.org/asosdir_es.htm). Consulta: 6 diciembre 2015.
- Uren, A.G. et al., 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular cell*, 6(4), pp.961–7.
- Uria, D.F. et al., 1991. Epidemiology of multiple sclerosis in Asturias. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 6(2), pp.41–5.
- Uria, D.F., 2000. HLA and multiple sclerosis. Studies of a spanish population. *Revista de neurologia*, 31(11), pp.1066–70.
- Uria, D.F. et al., 1997. Multiple sclerosis in Gijon health district, Asturias, northern Spain. *Acta Neurologica Scandinavica*, 96(6), pp.375–379.
- Utz, U. et al., 1993. Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlates with multiple sclerosis. *Nature*, 364(6434), pp.243–7.
- Valladeau, J. et al., 2002. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *Journal of immunology*, 168(2), pp.782–92.
- Valladeau, J. et al., 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*, 12(1), pp.71–81.

- Valverde, S., Oliver, A. & Lladó, X., 2014. A white matter lesion-filling approach to improve brain tissue volume measurements. *NeuroImage. Clinical*, 6, pp.86–92.
- Van-Bergen, J. et al., 2009. Functional killer Ig-like receptors on human memory CD4+ T cells specific for cytomegalovirus. *Journal of immunology*, 182(7), pp.4175–82.
- Van-de-Vosse, E. et al., 2013. IL-12R $\beta$ 1 deficiency: mutation update and description of the IL12RB1 variation database. *Human mutation*, 34(10), pp.1329–39.
- Van-den-Elsen, P.J. et al., 2014. The epigenetics of multiple sclerosis and other related disorders. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 3(2), pp.163–175.
- Van-der-Mei, I.A.F. et al., 2011. Individual and joint action of environmental factors and risk of MS. *Neurologic clinics*, 29(2), pp.233–55.
- Van-Luijn, M.M. et al., 2015. Multiple sclerosis-associated CLEC16A controls HLA class II expression via late endosome biogenesis. *Brain*, 138 (Pt 6), pp.1531–47.
- Vandenbroeck, K. et al., 2012. A cytokine gene screen uncovers SOCS1 as genetic risk factor for multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 13(1), pp.21–8.
- Varadé, J. et al., 2012. Replication study of 10 genes showing evidence for association with multiple sclerosis: validation of TMEM39A, IL12B and CBLB [correction of CLBL] genes. *Multiple Sclerosis*, 18(7), pp.959–65.
- Vartdal, F. et al., 1989. Patients with multiple sclerosis carry DQB1 genes which encode shared polymorphic amino acid sequences. *Human immunology*, 25(2), pp.103–10.
- Veldhuisen, B. et al., 1997. A Spectrum of Mutations in the Second Gene for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (PKD2). *The American Journal of Human Genetics*, 61(3), pp.547–555.

- Vella, A. et al., 2005. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *American journal of human genetics*, 76(5), pp.773–9.
- Venter, J.C. et al., 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), pp.1304–51.
- Villar, L.M. et al., 2005. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Archives of neurology*, 62(4), pp.574–7.
- Virtaneva, K.I. et al., 1993. The genes for CD37, CD53, and R2, all members of a novel gene family, are located on different chromosomes. *Immunogenetics*, 37(6), pp.461–5.
- Vissers, L.E.L.M. et al., 2010. A de novo paradigm for mental retardation. *Nature Genetics*, 42(12), pp.1109–1112.
- Vivier, E. et al., 2012. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), pp.239–252.
- Wadia, N.H., Trikannad, V.S. & Krishnaswamy, P.R., 1980. Association of HLA-B12 with multiple sclerosis in India. *Tissue antigens*, 15(1), pp.90–3.
- Wagner, M., Bilinska, M., et al., 2014. ALCAM and CD6-multiple sclerosis risk factors. *Journal of neuroimmunology*, 276(1-2), pp.98–103.
- Wagner, M., Wisniewski, A., et al., 2014. Investigation of gene-gene interactions between CD40 and CD40L in Polish multiple sclerosis patients. *Human immunology*, 75(8), pp.796–801.
- Wahlund, S., 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Zusammensetzung Von Populationen*, XI, pp.65–106.
- Wallace, C. et al., 2012. Statistical colocalization of monocyte gene expression and genetic risk variants for type 1 diabetes. *Human molecular genetics*, 21(12), pp.2815–24.
- Wallich, R. et al., 1998. Gene structure, promoter characterization, and basis for alternative mRNA splicing of the human CD58 gene. *Journal of immunology*, 160(6), pp.2862–2871.

- Wang, J.Q. et al., 2004. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry*, 279(44), pp.45626–33.
- Wang, X. et al., 2014. Alternative expression pattern of MALT1-A20-NF- $\kappa$ B in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of immunology research*, 2014, p.492872.
- Wang, X. et al., 2015. IL12p40 regulates functional development of human CD4+ T cells: enlightenment by the elevated expressions of IL12p40 in patients with inflammatory bowel diseases. *Medicine*, 94(10), p.e613.
- Wang, X. et al., 2002. Novel gene mutations in patients with 1 $\alpha$ -hydroxylase deficiency that confer partial enzyme activity in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(6), pp.2424–30.
- Wang, Z. et al., 2014. Association between STAT3 gene polymorphisms and Crohn's disease susceptibility: a case-control study in a Chinese Han population. *Diagnostic pathology*, 9, p.104.
- Weber, F. et al., 2008. IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations. *Genes and immunity*, 9(3), pp.259–63.
- Wegner, M. et al., 2015. Association investigation of BACH2 rs3757247 and SOD2 rs4880 polymorphisms with the type 1 diabetes and diabetes long-term complications risk in the Polish population. *Biomedical reports*, 3(3), pp.327–332.
- Weinshenker, B. & Tienari, P.J., 2013. TNFRSF1A polymorphisms and MS: statistical signals transform into pathogenetic mechanisms. *Neurology*, 80(22), pp.2002–3.
- Wenger, D.A. et al., 2000. Krabbe disease: genetic aspects and progress toward therapy. *Molecular genetics and metabolism*, 70(1), pp.1–9.
- Westin, E.H. et al., 1982. Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(7), pp.2194–8.

- Wieczorek, S. et al., 2009. Novel association of the CD226 (DNAM-1) Gly307Ser polymorphism in Wegener's granulomatosis and confirmation for multiple sclerosis in German patients. *Genes and immunity*, 10(6), pp.591–5.
- Wikstrom, J., 1994. *Multiple Sclerosis in Finland: evidence of uneven geographic distribution increasing frequency and high familial occurrence* 1st ed. A. Leuchtturm-Verlag, ed., Germany: Leuchtturm-Verlag, Alsbach.
- Willer, C.J. et al., 2007. A genome-wide scan in forty large pedigrees with multiple sclerosis. *Journal of Human Genetics*, 52(12), pp.955–962.
- Willer, C.J. et al., 2003. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), pp.12877–12882.
- Williams, A. et al., 1980. Multiple sclerosis in twins. *Neurology*, 30(11), pp.1139–47.
- Williams, S.K. et al., 2014. Antibody-mediated inhibition of TNFR1 attenuates disease in a mouse model of multiple sclerosis. *PloS one*, 9(2), p.e90117.
- World Medical Association, 2013. World Medical Association. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. Disponible en: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html.pdf>. Consulta: 11 septiembre 2015.
- WTCCC, 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145), pp.661–78.
- Wucherpfennig, K.W. et al., 1992. Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), pp.4588–92.
- Xie, M. et al., 2008. The detection of sLFA-3 in plasma of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Clinical and Experimental Medicine*, 9(1), pp.67–71.

- Xu, X.H. & McFarlin, D.E., 1984. Oligoclonal bands in CSF: twins with MS. *Neurology*, 34(6), pp.769–74.
- Yang, R. et al., 1995. Mutational effects on the p16INK4a tumor suppressor protein. *Cancer research*, 55(12), pp.2503–6.
- Yang, S.K. et al., 2015. Immunochip analysis identification of 6 additional susceptibility loci for Crohn's disease in Koreans. *Inflammatory bowel diseases*, 21(1), pp.1–7.
- Yang, X. et al., 2014. Association of KIF21B genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis in a Chinese Han population of Shandong Province. *Clinical rheumatology*, 34(10), pp.1729–36.
- Yeo, T.W. et al., 2007. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 61(3), pp.228–36.
- Yeung, D.T. et al., 2015. KIR2DL5B genotype predicts outcomes in CML patients treated with response directed sequential imatinib / nilotinib strategy. *Blood*, 126(25), pp.2720–3.
- Yi, C.H. et al., 1999. Identification, mapping, and phylogenomic analysis of four new human members of the T-box gene family: EOMES, TBX6, TBX18, and TBX19. *Genomics*, 55(1), pp.10–20.
- Yoshida, Y. et al., 2014. The transcription factor IRF8 activates integrin-mediated TGF- $\beta$  signaling and promotes neuroinflammation. *Immunity*, 40(2), pp.187–98.
- Yoshimura, S. et al., 2012. Genetic and infectious profiles of Japanese multiple sclerosis patients. *PloS one*, 7(11), p.e48592.
- You, Y. et al., 2015. Autoimmune risk loci of IL12RB2, IKZF1, XKR6, TMEM39A and CSK in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens*, 85(3), pp.200–3.
- Yu, K.Y. et al., 1999. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 274(20), pp.13733–6.

- Yuan, M. et al., 2015. Four FCRL3 Gene Polymorphisms (FCRL3\_3, \_5, \_6, \_8) Confer Susceptibility to Multiple Sclerosis: Results from a Case-Control Study. *Molecular neurobiology*, Epub ahead.
- Zhang, J. et al., 2014. Correlation between TMEM39A gene polymorphism and systemic lupus erythematosus in Chinese Han patients. *Journal of Southern Medical University*, 34(4), pp.556–9.
- Zhang, X. et al., 2013. CD40 mediates downregulation of CD32B on specific memory B cell populations in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology*, 190(12), pp.6015–22.
- Zhang, X.W. et al., 2015. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance. *Biochemical and biophysical research communications*, 462(3), pp.227–32.
- Zhang, Y., Brady, M. & Smith, S., 2001. Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 20(1), pp.45–57.
- Zhang, Y., Ni, H.-J. & Cheng, D.-Y., 2013. Prognostic value of phosphorylated mTOR/RPS6KB1 in non- small cell lung cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 14(6), pp.3725–8.
- Zhao, C. et al., 2001. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell*, 105(5), pp.587–97.
- Zhu, Y., He, Z.-Y. & Liu, H.-N., 2011. Meta-analysis of the relationship between homocysteine, vitamin B<sub>12</sub>, folate, and multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 18(7), pp.933–8.
- Zhuang, J.-C. et al., 2015. Variants of CYP27B1 are associated with both multiple sclerosis and neuromyelitis optica patients in Han Chinese population. *Gene*, 557(2), pp.236–9.
- Zoledziwska, M. et al., 2009. Variation within the CLEC16A gene shows consistent disease association with both multiple sclerosis and type 1 diabetes in Sardinia. *Genes and immunity*, 10(1), pp.15–7.



- Zuo, X. et al., 2015. Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis. *Nature communications*, 6, p.6793.
- Zuvich, R.L. et al., 2010. Genetic variation in the IL7RA/IL7 pathway increases multiple sclerosis susceptibility. *Human genetics*, 127(5), pp.525–35.

## **8. ANEXOS**



## **8.1. ANEXO 1: Escala ampliada de discapacidad de Kurtzke (EDSS)** (traducida de Kurtzke 1983).

### ***SISTEMAS FUNCIONALES (SF)***

#### **Piramidal**

0. Normal.
1. Signos anormales sin discapacidad.
2. Discapacidad mínima.
3. Paraparesia o hemiparesia leve o moderada. Monoparesia grave.
4. Paraparesia o hemiparesia grave. Monoplejía o tetraparesia moderada.
5. Paraplejía o hemiplejía. Tetraparesia severa.
6. Tetraplejía.

#### **Cerebelo**

0. Normal.
1. Signos anormales sin discapacidad.
2. Ataxia leve.
3. Ataxia moderada de las extremidades o del tronco.
4. Ataxia severa de todas las extremidades.
5. Incapaz de realizar movimientos coordinados por ataxia.

#### **Tronco del encéfalo**

0. Normal.
1. Solamente signos.
2. Nistagmos moderado o cualquier otro tipo de discapacidad.
3. Nistagmos severo, parálisis extraocular severa o moderada discapacidad debida a otros pares craneales.
4. Disartria severa o cualquier otro tipo de discapacidad.
5. Incapacidad para tragar o hablar.

**Sensibilidad**

0. Normal.
1. Alteración de la sensibilidad vibratoria o grafestesia en 1 o 2 extremidades.
2. Disminución leve de la sensibilidad táctil, dolorosa o de la posicional y/o disminución leve de la vibratoria en una o dos extremidades, o de la vibratoria o grafestesia en 3 ó 4 extremidades.
3. Id. moderada, incluida alteración propioceptiva en 3 ó 4 extremidades.
4. Id. intensa, o bien grave alteración propioceptiva en más de 2 extremidades.
5. Pérdida de la sensibilidad en 1 ó 2 extremidades o bien disminución moderada de la sensibilidad táctil o dolorosa y/o pérdida de la sensibilidad posicional en más de 2 extremidades.
6. Pérdida de sensibilidad prácticamente total por debajo de la cabeza.

**Vejiga e intestino**

0. Función normal.
1. Ligero goteo al inicio de la micción, urgencia miccional o retención urinaria. Estreñimiento leve sin incontinencia.
2. Moderado goteo al inicio de la micción, urgencia miccional, retención urinaria o incontinencia urinaria poco frecuente. Estreñimiento moderado sin incontinencia.
3. Incontinencia urinaria o fecal de menos de 1 episodio semanal.
4. Incontinencia urinaria o fecal de varios episodios semanales pero no diarios.
5. Incontinencia urinaria o fecal diaria.
6. Pérdida total del control urinario o fecal.

**Visión**

0. Normal.
1. Escotoma con agudeza visual (corregida) superior a 20/30.
2. El ojo peor con un escotoma de agudeza entre 30/30 y 20/59.
3. El ojo peor (por escotoma o alteración de campo) con agudeza máxima entre 20/60 y 20/99.
4. Id. entre 20/100 y 20/200; o bien igual que un grado 3 además de una máxima agudeza en el mejor ojo de 20/60 o inferior.
5. Id. en el ojo peor con agudeza inferior a 20/200; o bien igual que un grado 4 además de una máxima agudeza en el ojo mejor de 20/60 o inferior.
6. Grado 5 además de una máxima agudeza visual en el ojo mejor de 20/60 o inferior.

**Funciones mentales**

0. Normal.
1. Únicamente alteración del estado de ánimo (no afecta al EDSS).
2. Ligera alteración cognitiva.
3. Moderada alteración cognitiva.
4. Marcada alteración cognitiva.
5. Demencia.

**EDSS**

- 0 Examen neurológico normal (todos los SF son de cero).
- 1.0 Ninguna discapacidad, signos mínimos en un SF (grado 1).
- 1.5 Ninguna discapacidad, signos mínimos en más de un SF (más de un SF con grado 1). Excluye función mental grado 1.
- 2.0 Mínima discapacidad en un SF (un SF grado 2, el resto 0 o 1).
- 2.5 Mínima discapacidad en dos SF (dos SF grado 2, el resto 0 o 1).
- 3.0 Moderada discapacidad en un SF (un SF grado 3, el resto 0 o 1) o leve discapacidad en tres o cuatro SF (tres o cuatro SF grado 2, el resto 0 o 1) aunque plenamente ambulante.
- 3.5 Totalmente ambulante pero con moderada discapacidad en un SF (un SF grado 3) y uno o dos SF grado 2; o dos SF grado 3 (el resto 0 o 1); o cinco SF grado 2 (el resto 0 o 1).
- 4.0 Completamente ambulante sin ayuda, autosuficiente durante 12 horas diarias pese a una discapacidad relativamente grave consistente en un SF grado 4 (el resto 0 o 1) o combinaciones de grados menores excediendo los límites de los grados previos. Capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.
- 4.5 Completamente ambulante sin ayuda, autosuficiente la mayor parte del día, capaz de trabajar durante la jornada completa pero tiene ciertas limitaciones para una actividad plena, o bien requiere un mínimo de ayuda. El paciente tiene una discapacidad relativamente grave, por lo general consistente en un SF grado 4 (el resto 0 o 1), o combinaciones de grados menores excediendo los límites de los grados previos. Capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 300 metros.
- 5.0 Ambulante, capaz de caminar sin ayuda o descanso 200 metros; discapacidad suficientemente grave como para impedir las actividades de la vida diaria (por ejemplo, trabajar una jornada completa sin medidas especiales). Los equivalentes habituales son un SF grado 5 (el resto 0 o 1), o combinaciones de grados menores, generalmente excediendo las especificaciones del apartado 4.0.
- 5.5 Capaz de caminar 100 metros sin ayuda ni descanso, discapacidad suficientemente grave como para impedir las actividades de la vida diaria que incluyan el día completo. Los equivalentes habituales son un SF grado 5 (el resto 0 o 1), o combinaciones de grados menores, generalmente excediendo las especificaciones del apartado 4.0.
- 6.0 Requiere ayuda unilateral intermitente o constante (bastón, muleta) para caminar 100 metros, sin o con descanso. Los equivalentes habituales son combinaciones de más de dos SF grado 3.
- 6.5 Necesita ayuda bilateral constante (bastones, muletas) para caminar 20 metros sin descanso. Equivale a combinaciones de más de dos SF grado 3+.

- 7.0 Incapaz de caminar más de 5 metros, incluso con ayuda. Básicamente dependiente de la silla de ruedas. Capaz de trasladarse en la silla de ruedas unas 12 horas al día. Equivale a combinaciones de dos o más SF grado 4+ y muy raramente grado 5 en el SF piramidal.
- 7.5 Incapaz de caminar más de unos pasos. Básicamente dependiente de la silla de ruedas; puede necesitar ayuda para trasladarse con la silla de ruedas; es capaz de mover las ruedas de una silla estándar, pero no puede hacerlo durante todo el día; puede necesitar una silla motorizada. Equivale a combinaciones de más de un SF grado 4+.
- 8.0 Básicamente limitado a la cama o a una silla de ruedas, aunque puede mantenerse fuera de la cama gran parte del día; es capaz de realizar gran parte de las funciones de auto-cuidado personal; generalmente conserva el uso efectivo de las extremidades superiores. Equivale a combinaciones de varios SF grado 4+.
- 8.5 Básicamente confinado en cama la mayor parte del día, puede utilizar parcialmente las extremidades superiores y realizar algunas funciones de auto-cuidado personal. Equivale a combinaciones de varios SF grado 4+.
- 9.0 Paciente postrado en la cama; puede comunicarse y comer. Equivale a combinaciones de varios grados 4+ en la mayor parte de los SF.
- 9.5 Paciente totalmente imposibilitado; incapaz de comunicarse ni comer. Equivale a combinaciones de varios grados 4+ en casi todos los SF.
- 10 Defunción por EM.



**8.2. ANEXO 2: Criterios de Barkhof** (traducidos de Barkhof et al. 1997).

- $\geq 9$  lesiones hiperintensas en T2 o  $\geq 1$  lesión en T1 realizada con Gadolinio.
- $\geq 3$  lesiones periventriculares.
- $\geq 1$  lesión infratentorial.
- $\geq 1$  lesión yuxtacortical.

### 8.3. ANEXO 3: Consentimiento informado para los sujetos incluidos en el estudio.



#### CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN

ESTUDIO: EMGypsy

INVESTIGADOR: René Robles Cedeño  
 Unidad de Neuroinmunología y Esclerosis Múltiple  
 Servicio de Neurología  
 Hospital Universitario Dr. Josep Trueta  
 Avda. de França s/n  
 17007- Girona

---

Apellidos: .....

Nombre: ..... Fecha:.....

Código: .....

---

#### 1. INFORMACIÓN AL SUJETO PARTICIPANTE

##### 1.1. INFORMACIÓN GENERAL

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio que está llevando a cabo la Unidad de Neuroinmunología y Esclerosis Múltiple del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta, al cual se le invita a participar. El estudio ha sido ya revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de este hospital.

La colaboración que le solicitamos consiste en un examen clínico neurológico, una resonancia magnética tanto cerebral como medular y la recogida de una muestra de sangre, pero ante todo, necesitamos su consentimiento libre y voluntario. Por eso queremos proporcionarle la información correcta y suficiente por que pueda valorar si quiere o no participar en el estudio. Por tanto, lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Puede consultar la decisión con las personas que considere oportunas.

## 1.2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Tiene que saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por eso se altere la relación con su médico ni se produzca ningún perjuicio en su tratamiento.

En cualquier momento puede solicitar información complementaria al René Robles Cedeño o en su caso al Dr. Lluís Ramió i Torrentà mediante el teléfono: 972 940 200 extensión: 2661 o a [uniem.girona.ics@gencat.cat](mailto:uniem.girona.ics@gencat.cat)

## 1.3. DESCRIPCIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

Usted está siendo estudiado (a) porque pertenece a una extensa familia en la cual hemos observado una alta prevalencia de una de las principales enfermedades inflamatorias desmielinizantes del sistema nervioso central, llamada Esclerosis Múltiple. La causa de dicha enfermedad es desconocida hasta la fecha y aunque existe cierta predisposición genética, hasta ahora no se ha podido identificar ningún gen o grupos de genes que expliquen en su totalidad esta predisposición. Por eso, nuestro objetivo es llevar a cabo un extenso estudio clínico, radiológico y genético sobre la Esclerosis Múltiple para tratar de identificar nuevos factores que puedan explicar la heredabilidad de la enfermedad.

Para cualquier estudio científico no solo se necesita la valoración clínica y/o radiológica, sino también la extracción de muestras biológicas para poder confirmar la especificidad de los resultados obtenidos. Es por eso, que le pedimos su consentimiento para recoger toda esta información además de la realización de una resonancia magnética y una extracción de sangre a partir de la cual obtendremos suero, plasma y material para estudios genéticos. Estas muestras serán debidamente procesadas y guardadas. El material biológico no utilizado en este estudio, se almacenará para utilizarlo en futuros estudios si aparecen nuevos datos sobre esta enfermedad o nuevas técnicas de análisis y diagnóstico, tanto en nuestro centro como por terceros, siempre con el visto bueno de la Unidad de Neuroinmunología y Esclerosis Múltiple y del Comité Ético de Investigación Clínica.

## 1.4. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTOS

La muestra se obtendrá mediante una extracción de sangre rutinaria con el riesgo asociado a toda extracción (por ejemplo, dolor de menor importancia, hematoma, infección).

Las muestras obtenidas serán etiquetadas con un código para mantener la confidencialidad del sujeto participante en el estudio. Por la Ley de Biomedicina del 2007 (ley 14/2007 de Investigación Biomédica) la muestra sobrante del estudio será utilizada para futuros proyectos relacionados con este proyecto o bien destruida, según su voluntad.

## 1.5. BENEFICIOS

Probablemente usted no reciba ningún beneficio directo con su participación en este proyecto, pero sí la satisfacción de haber colaborado en un proyecto de investigación que puede mejorar el bienestar y el tratamiento a pacientes afectados de Esclerosis Múltiple. Cualquier hallazgo que se pueda aplicar al curso de su enfermedad, le será indicado.

Usted tiene derecho a conocer los resultados de los estudios que se obtengan a partir del análisis de las muestras dadas. Y también tiene derecho a la no información de estos resultados.

En el caso de resultados genéticos relevantes para usted o su familia nos comprometemos a ofrecerle consejo genético.

## 1.6. CONFIDENCIALIDAD

Los datos recogidos serán estrictamente confidenciales. Sólo se autorizará para la recogida de datos de su historial médico a personas sometidas al secreto profesional siempre con el previo conocimiento del Dr. Lluís Ramió i Torrentà. Las muestras serán codificadas para respetar el anonimato. En ningún caso su nombre aparecerá en la publicación de los resultados.

Su privacidad está protegida por las leyes nacionales (LO15/1999, LGC5/2002 y por la ley 14/2007 de Investigación Biomédica) y europea (95/46/CE). Estas leyes ayudan a los investigadores a evitar accesos involuntarios a información que podría exponer a los pacientes o a sus familias a efectos adversos económicos, legales, psicológicos y/o sociales.

De acuerdo con la ley LO15/1999, usted puede ejercer su derecho en el acceso, modificación, oposición y cancelación de sus datos. Y también puede solicitar la destrucción de sus muestras.

## 1.7. COMPENSACIÓN ECONÓMICA

La donación y la utilización de muestras biológicas humanas son gratuitas. Por lo tanto, por su participación en el estudio no recibirá ninguna compensación económica.

En el supuesto de que se produjera un desarrollo comercial de los conocimientos generados, los posibles beneficios que se podrían recibir irían íntegramente a cubrir los objetivos científicos del grupo de investigación.

Firmando este consentimiento usted renuncia a los derechos sobre cualquier uso comercial con la información o muestras que usted está cediendo.

## 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo .....

- He leído la hoja informativa que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con (nombre del investigador).....
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que las muestras obtenidas serán etiquetadas con un código para mantener la confidencialidad de mis datos y que, de acuerdo con la Ley de Biomedicina de 2007 (ley 14/2007 de Investigación Biomédica) la muestra sobrante del estudio será utilizada por futuros proyectos relacionados con este proyecto o con su enfermedad o bien destruida, según mi voluntad.
- Comprendo que puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto altere mi asistencia sanitaria.

¿Accede a que el investigador principal del proyecto (René Robles Cedeño) pueda contactar con usted en un futuro si lo considera oportuno?

Sí

No

¿Y libremente expresa su conformidad para participar en el estudio mediante la realización de un examen neurológico, de una resonancia magnética craneal y medular además de la donación de una muestra de sangre para estudios genéticos?

Sí

No

Permito que mis muestras sean utilizadas en investigaciones futuras relacionadas con la enfermedad por el grupo o por terceros.

Permito la utilización de las muestras en proyectos futuros y/o por terceros

No permito la utilización de las muestras en futuros proyectos y/o por terceros

Firma del sujeto:

Firma del investigador:

Fecha: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Fecha: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Firma de los padres o tutores en caso de menor de edad:

Fecha: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

## 8.5. ANEXO 4: Protocolo de realización de la RM

Los estudios de RM se realizarán en el Instituto de Diagnóstico por la Imagen (IDI) del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta con un equipo de 1,5 Teslas marca Philips®, modelo Intera (release12) implementado con las actualizaciones más avanzadas. Las exploraciones se realizarán con la antena de cabeza emisora-receptora de radiofrecuencia. La exploración tendrá una duración estimada de 40 minutos.

### Preparación:

El paciente se colocará de la manera más confortable sobre la camilla del equipo de RM en posición decúbito supino, la unión nasofrontal se situará en el centro de la antena que se llevará al isocentro del imán. Una vez en el interior se obtendrán unas imágenes de baja resolución en los tres planos del espacio (sagital, axial y coronal). A partir del plano coronal se registrará una imagen de alta resolución del plano sagital medio ponderada en T1 que será utilizada como referencia para obtener una imagen oblicua axial ponderada en T1 para que todos los participantes sean estudiados con un posicionamiento similar y para facilitar el reposicionamiento en los estudios de control.

### RM cerebral:

Una vez obtenida la imagen axial de referencia, se iniciará la adquisición de imágenes de alta resolución con diferentes ponderaciones. Se practicará una secuencia spin-echo (SE) ponderada en T1 y otra turbo spin-echo ponderada en T2 y densidad protónica (DP). Se realizarán también secuencias FLAIR. Posteriormente se repetirá la secuencia SE ponderada en T1 entre 5-20 minutos tras la administración de contraste paramagnético (gadolinio-DTPA) por vía intravenosa a dosis de 0,1 mmol/Kg. Las diferentes imágenes se registrarán con cortes de 6 mm, que permitirán una cobertura anatómica completa de todo el cráneo. Se utilizarán matrices rectangulares con un campo de visión de 250 mm que obtendrán píxeles cuadrados de 1 x 1 mm.

Técnica de RM cerebral:

- a. Secuencias de localización utilizando técnica de reposicionamiento.
- b. Secuencia transversal SE ponderada en DP y T2 obtenida con técnica fast/turbo.
- c. Secuencia transversal fast-FLAIR (altamente recomendable en el diagnóstico inicial y opcional en los estudios de seguimiento).
- d. Secuencia transversal ponderada en T1 con técnica SE convencional.
- e. Secuencia sagital fast-FLAIR (opcional en los estudios de seguimiento)\*.
- f. Secuencia transversal ponderada en T1 con técnica SE convencional tras inyección endovenosa de contraste paramagnético\*\*.

Grosor de corte = 6 mm.

Resolución en plano = 1 x 1 mm

Orientación = oblicua transversal (línea subcallosa)

Secuencia DP TE < 30m s; T2 TE > 80 ms

\*La secuencia sagital fast-FLAIR puede obtenerse inmediatamente después de la administración de contraste (se aprovecha el tiempo de espera requerido para la obtención de la secuencias T1 con contraste).

\*\*La secuencia T1 con contraste debe realizarse 5-10 minutos después de su administración intravenosa.

PARÁMETROS	Densidad protónica	T2	T1	FLAIR	T1 Gadolinio
Tipo de secuencia	SE o Fast SE	SE o Fast SE	SE	Fast FLAIR	SE
TR (ms)	2800-4000	2800-4000	450-650	8000-12000	450-650
TE (ms)	14-20	80-120	<25	80-120	<25
TI (ms)	-	-	-	2200-2800	-
Orientación	Axial	Axial	Axial	Sagital/Axial	Axial
Número de cortes	20	20	20	20	20
Adquisiciones	2	2	1-2	2	2
FOV (mm)	250 x 250	250 x 250	250 x 250	250 x 250	250 x 250
Matriz adquisición	256 x 256	256 x 256	256 x 256	256 x 256	256 x 256
Grosor (mm)	6mm	6 mm	6 mm	6 mm	6 mm
Gap (mm)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Compensación de flujo	Opcional	Opcional	No	Si	Si
Gadolinio				Puede obtenerse tras administración de Gadolinio	(0.2 cc/kg) Adq: 5-20 min. tras inyección de Gadolinio

Técnica de RM espinal:

- a. Secuencias de localización.
- b. Secuencia sagital ponderada en T1 con técnica SE convencional.
- c. Secuencia sagital ponderada en STIR/T2 obtenida con técnica fase SE.
- d. Secuencia transversal ponderada en T1 obtenida con SE convencional sobre la lesión en la que se identifica realce en la secuencia sagital T1.
- e. Secuencia transversal ponderada en T2 obtenida con técnica eco de gradiente (EG) (segmento cervical) o con eco largo obtenida con técnica Fast (segmento dorsal) sobre la lesión/es identificadas (o sospechosas) en la secuencia sagital T2, o bien sobre el segmento medular en el que existe alta sospecha clínica de lesión.

Grosor de corte = 3mm. Resolución en plano = 1 x 1 mm

Bobinas = "phase-Array" de columna

Secuencia T2 de doble eco; eco corto < 30ms; eco largo >80 ms

Las secuencias en plano sagital deben abarcar toda la extensión medular. De forma adicional pueden realizarse secuencias con campos de visión reducidos para estudios de segmentos medulares con alta sospecha clínica de lesión o para confirmar lesiones no bien definidas identificadas en la secuencia holomedular.

PARÁMETROS	STIR	T2	T1	T2 (axial cervical)	T2 (axial dorsal)	T1 Gadolinio
<b>Tipo de secuencia</b>	Fast SE	Fast SE	SE	EG	Fast SE	SE
<b>TR (ms)</b>	1829	2800-4000	450-650	700-900	2800-4000	450-650
<b>TE (ms)</b>	10	80-120	<25	20-30	80-120	<25
<b>Orientación</b>	Sagital	Sagital	Sagital	Axial	Axial	Sagital/Axial
<b>Número de cortes</b>	13	11	11	variable	variable	variable
<b>Adquisiciones</b>	3	2-4	2	2	2	2
<b>FOV (mm)</b>	300x400	300x400	300x400	250 x 250	180 x 180	variable
<b>Matriz adquisición</b>	256X256	256X256	256X256	256 x 256	256 x 256	256 x 256
<b>Grosor (mm)</b>	3 mm	3 mm	3 mm	3 mm	3 mm	3 mm
<b>Gap (mm)</b>	0,3	0,3	0,3	variable	variable	0/variable
<b>Gadolinio</b>						(0.2 cc/kg) Adq: 5-20 min. tras inyección



