



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias Médicas

**"DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO HLA-DR15 (2)  
EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE"**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Médicas

**Presenta:**

Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea

**Dirigido por:**

Dr. Julio Granados Arriola

**SINODALES**

Dr. Julio Granados Arriola  
Presidente

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreira  
Secretario

Dr. Guillermo Enrique Leo Amador  
Vocal

Dr. Agustín de la Isla León  
Suplente

M en C. Rocío Arellano Jiménez  
Suplente

Méd. Esp. Benjamín Moreno Pérez  
Director de la Facultad de Medicina

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Sergio Quesada Aldana  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Septiembre, 2004  
México

**BIBLIOTECA CENTRAL UAO**

No. Adq. HS1094

No. Título \_\_\_\_\_

Clas TS

616.834

-222d

\_\_\_\_\_

## RESUMEN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), caracterizada generalmente por un patrón inicial de exacerbaciones y remisiones cíclicas, evolucionando a un curso crónico progresivo. A pesar que la EM es una de las enfermedades neurológicas más comunes, es una entidad de la cual, la causa y la patogénesis son desconocidas. Se observa con mayor frecuencia en personas que portan el antígeno HLA-DR15, por lo cual se presume que las personas que portan este antígeno son más susceptibles para padecer EM. El objetivo de este trabajo es determinar dicho antígeno en mestizos mexicanos con diagnóstico de EM clínico y por resonancia magnética. Material y Métodos: se determinó el antígeno HLA-DR15 con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 8 sujetos con EM. También se determinó: edad, sexo, lugar de nacimiento y tiempos de residencia, antecedentes familiares de EM, años de vivir en el lugar actual de residencia, viajes, educación, nivel socioeconómico. Resultados: Los pacientes estudiados fueron 6 mujeres y 2 hombres, de medio socioeconómico medio. Nadie tuvo antecedentes familiares de EM. Todos han vivido en ciudades del país, ninguno vivió fuera del país durante su infancia, y provienen de latitudes que no corresponden a las áreas de alta prevalencia para la MS. En cuanto a los antígenos HLA-II, sólo 2 de los 8 pacientes portan el antígeno DR15 (2).

**(Palabras clave:** esclerosis múltiple, antígenos leucocitarios humanos)

## **SUMMARY**

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disorder of the central nervous system (CNS) characterized generally by an initial pattern of relapsed and cyclic remissions, developing into a progressive chronic course. Although MS is one of the most common neurological diseases, its cause and pathogenesis are unknown. It is known that people who carry antigen HLA-DR15 (2) are more susceptible to suffer MS. The aim of this project is to determine the antigen in hybrid Mexicans by MS clinic diagnosis and magnetic resonance. Material and Methods: The antigen HLA-DR15 was determined in eight people with MS using Polymerase Chain Reaction (PCR). Also it was determined: age, sex, birth place and time of residence, family precedents with MS, the years living in their actual address, education, economic class and social status. Results: People who participated in this study were 6 females and 2 males, of middle class. No one had family precedents with MS. Everyone had lived in Mexico and no one comes from latitudes of high MS. The antigens HLA-II DR15 were found in two of the eight patient analyzed.

**(Key words:** multiple sclerosis, human leukocyte antigen)

**Dedicatoria:**

**A Dios**

**A mi adorada familia: Juan José, Juanis, Yancy**

**A mis padres: Arturo, Lupita, Pillis**

**A mis amigos**

**A mis maestros**

**Gracias**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar tengo que agradecer el gran apoyo y colaboración del Dr. Julio Granados Arriola. A pesar de ser una persona extremadamente ocupada y con tanta responsabilidad, me ofreció su apoyo y aceptó ser mi director. Sin él, no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Miles y miles de veces le di lata, y él siempre estuvo en gran disposición de ayudarme, de enseñarme. Gracias doctor, nunca lo olvidaré.

También agradezco profundamente al Dr. Carlos Sosa Ferreira, también una persona sumamente ocupada, con un cargo administrativo de muchísima responsabilidad, sin embargo, siempre que le he pedido ayuda, me ha otorgado su apoyo desinteresado. Gracias Charlie por contar siempre contigo.

# INDICE

## Página

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
Historia Natural de la Enfermedad	3
Epidemiología	5
Aspectos Genéticos	7
Patogénesis propuesta para explicar la EM	10
Neuropatología	20
Cuadro Clínico	23
Clasificación de la enfermedad	25
Diagnóstico	27
Tratamiento	29
III. METODOLOGÍA	31
Extracción del DNA de células mononucleares	31
Tipificación de los genes del sistema HLA	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
DISCUSIÓN	39
LITERATURA CITADA	41
APENDICE	46

Criterios diagnósticos de la EM Criterios de Shumacher (1965)	47
Criterios de Poser (1983)	48
Criterios de Paty	49
Criterios de Mc Donald, et al.	50
Multiple Sclerosis Kurtzke disability status scale	51
Expanded Disability Status Scale (EDSS) de Kurtzke	52
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	56

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
4.1	Características Descriptivas de los Pacientes de Estudio	36
4.2	Resultados observados en los pacientes respecto a la enfermedad	38

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
2.1	Distribución mundial de la EM	6
2.2	Inmunopatogénesis propuesta para la Esclerosis Múltiple	12
2.3	Persistencia del infiltrado inflamatorio debido a la persistencia de la señal antigénica.	14
2.4	En las lesiones inflamatorias activas de la EM	16
2.5	Las células T autorreactivas atraviesan la barrera hematoencefálica	18
3.1	Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6	34

## I. INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es la enfermedad inflamatoria desmielinizante más común del sistema nervioso central (SNC), caracterizada generalmente por un patrón inicial de exacerbaciones y remisiones cíclicas, evolucionando a un curso crónico progresivo. La característica de esta enfermedad, es la producción de "placas", en las cuales se produce la destrucción de la mielina. (Compston, 1992, 2002; Frohman, 2003). En fase tardía se caracteriza por múltiples áreas de desmielinización o placas en la sustancia blanca del SNC. (French, 1994; Noseworthy, 2002)

La EM se presenta en aproximadamente 350,000 individuos en los Estados Unidos, y en más de un millón de personas en todo el mundo. La incidencia es de 12 por 100,000 habitantes. (Hawker, 2004)

La EM es una enfermedad neurológica de personas jóvenes, conduciéndolas a una incapacidad importante en el 50% de los casos (Prat, 2002). La EM típicamente se presenta entre los 18 y 45 años, aunque el verdadero inicio de la enfermedad es anterior a los síntomas iniciales en la mayoría de los individuos (Anderson, 1992).

A pesar que la EM es una de las enfermedades neurológicas más comunes, es una entidad de la cual, la causa y la patogénesis son desconocidas, pero la composición de las placas, la base inmunogenética, la respuesta al tratamiento con inmunomoduladores e inmunosupresores, y los datos obtenidos de modelos animales, apoyan que la EM es una enfermedad autoinmune mediada por células T CD4+ específicas de mielina. Resultados de investigaciones de ensayos clínicos en fase II con un ligando peptídico alterado (APL) de la proteína básica de mielina (MBP) lo cual exacerba significativamente la enfermedad en algunos pacientes, provee la evidencia más directa del papel en la patogénesis de las células T mielina-específicas. La heterogeneidad del curso clínico, de la imagen de la

resonancia magnética (MRI), y de los patrones patológicos, dificultan considerablemente los estudios inmunopatogénicos. (Prat, 2002)

En el estudio realizado por Oscar González y Julio Sotelo sobre la frecuencia de EM en nuestro país, demostró que ha aumentado significativamente a partir de 1987, ya que en los años anteriores la EM era una enfermedad relativamente rara. (González, 1995)

Se ha publicado que los pacientes que padecen EM portan cierto antígeno del complejo principal de histocompatibilidad, específicamente se refieren al HLA-DR15 (DR2). (Hogancamp, 1997). El estudio hecho por Alvarado-de la Barrera y cols., en mestizos mexicanos reportó que los haplotipos encontrados con mayor frecuencia fueron el DR2-DQ6 y el DR3-DQ2. La frecuencia genética de estos haplotipos en la población general mexicana es consistentemente baja. Una alta proporción de los pacientes tenían ascendencia blanca. Así, la alta frecuencia de los alelos antes mencionados entre los pacientes estudiados, sugiere que tienen mezcla con poblaciones blancas. (Alvarado-de la Barrera, 2000). Por tal motivo es interesante estudiar a los pacientes mestizos mexicanos que padecen esta enfermedad en la Ciudad de Querétaro, ya que también ha habido un incremento significativo del número de pacientes en los hospitales generales, observar si portan los mismos antígenos, y así poder hablar de un factor común entre la población para padecer EM, ya que en la medida que se conozca mejor la inmunogénesis de esta enfermedad, se desarrollarán tratamientos racionales destinados a oponerse a su patología.

Este trabajo describe la genética del sistema HLA en los pacientes con EM de la ciudad de Querétaro.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Un neurólogo francés del Salpêtrière en París, Jean Martin Charcot, fue el primero en describir la esclerosis múltiple (EM) en 1868, al observar la acumulación de células inflamatorias con distribución perivascular dentro de la sustancia blanca del cerebro y de la médula espinal en pacientes con episodios intermitentes de disfunción neurológica. Esto condujo al término de esclerosis en placas diseminadas o esclerosis múltiple. (Hafler, 2004)

La capa de mielina protege las fibras nerviosas de la misma manera como la cubierta aislante a un alambre eléctrico, el cual previene un corto circuito con otros alambres cercanos. Así, la mielina evita que los impulsos nerviosos puedan comportarse de igual manera. Los recién nacidos, carecen del control motor fino debido a que la gran mayoría de sus axones están aún sin mielinizar al momento del nacimiento. Aunque el proceso se lleva más de 10 años en completarse, el grueso de la mielinización ocurre durante la etapa fetal y durante la infancia. Algunas enfermedades degenerativas, como la esclerosis múltiple (EM), causa destrucción de la mielina. Esto provoca pérdida del control de los movimientos o ataxia.

La EM es la enfermedad desmielinizante más común en humanos, afectando a más de 30 personas por cada 100,000 habitantes en las áreas de alta prevalencia. El rasgo característico de la EM es la "placa" en la sustancia blanca, la cual representa un área focal de desmielinización. Estas lesiones están dispersas a través de todo el SNC, con predilección por los nervios ópticos, tallo cerebral, médula espinal y sustancia blanca periventricular. (Compston 1992, 2002; Lucchinetti, 1997; Noseworthy, 2000; O'Connor, 2002; Prat, 2002)

### Historia Natural de la Enfermedad

Edad de inicio: La media de la edad de inicio de la EM es aproximadamente de 30 años, y el pico de inicio es entre los 23 y 24 años de edad. Aproximadamente el 70% de los casos comienzan entre los 20 y 40 años de edad, con el 10% iniciando a una edad más temprana y el 20% iniciando después. Observar la enfermedad en

individuos antes de los 15 años o después de los 50 años es raro. Sin embargo, la EM se ha observado en niños de 15 meses de edad y ocasionalmente se ha desarrollado en sujetos en la sexta o séptima década de su vida. (O'Connor, 2002; Boiko, 2002; Prat, 2002)

Los estudios sobre la historia natural de la EM realizados han mostrado que los pacientes presentan deterioración neurológica progresiva. En 10 años de sufrir la enfermedad, aproximadamente el 50% de estos pacientes requerirá del uso de un bastón para poder deambular con seguridad. En el mismo periodo de tiempo el 15% requerirá del uso de silla de ruedas.

Se identificado factores de riesgo pronósticos favorables y desfavorables que pueden influir en el nivel de discapacidad durante la primera década del proceso de la enfermedad. Específicamente, aunque la EM es más común en mujeres (aproximadamente en una relación 3:1), parece ser más favorable ser mujer. Otros factores favorables incluyen ataques poco frecuentes, síntomas sensoriales contra motores, recuperación de los eventos neurológicos y bajo nivel de incapacidad de los 5 a 7 años de padecer la enfermedad. A pesar de estos factores potencialmente favorables, la capacidad prospectiva para predecir cuáles pacientes continuarán teniendo un curso limitado de la actividad de la enfermedad con una baja discapacidad en el transcurso del tiempo, actualmente no es posible. De hecho, después de 25 años del diagnóstico, cerca del 90% de los pacientes con EM presentan la forma progresiva de la enfermedad, la cual puede estar caracterizada por una substancial discapacidad. (Weinshenker, 1989; Noseworthy, 2000)

Una observación importante ha sido que el número de exacerbaciones que aparecen durante la fase más temprana del proceso de la enfermedad puede fuertemente influenciar el momento de inicio de la discapacidad. De esta manera, la iniciativa del tratamiento temprano tiene que enfocarse en la capacidad de identificar y tratar a tales pacientes en el punto más temprano posible del proceso de la enfermedad. (Confavreux, 2000, 2002)

El promedio esperado de vida es de 25 años después del inicio de la enfermedad, falleciendo la mayoría de los pacientes por causas no relacionadas con la misma.

El pronóstico es relativamente bueno cuando los síntomas sensoriales o visuales dominan el curso de la EM en adultos, y cuando hay recuperación completa de los episodios individuales. Este patrón es más frecuente en mujeres jóvenes. Contrariamente, el compromiso motor, especialmente cuando la coordinación o el balance están alterados, tiene un pronóstico menos positivo. Las recaídas frecuentes y prolongadas con recuperación incompleta al inicio y en cortos intervalos entre el episodio inicial y la primera recaída tienen rasgos de pronóstico adverso, pero el determinante principal de la discapacidad es el inicio de la fase progresiva. (Compston, 2002)

### Epidemiología

La concordancia incompleta en gemelos monocigóticos (31%), sugiere un importante papel de los factores ambientales sobre un fondo genético en el desarrollo de la enfermedad. Estudios epidemiológicos han evidenciado un factor ambiental adicional como un componente en el proceso de la enfermedad. Por ejemplo, las recaídas de la EM están frecuentemente asociadas con infecciones virales comunes.

Se ha señalado también, que la EM tiene una etiología infecciosa, así como otras enfermedades desmielinizantes semejantes. Sin embargo, los agentes infecciosos dirigen más bien la respuesta inmune contra autoantígenos y pueden inducir la enfermedad bajo circunstancias especiales, por lo cual no se puede implicar a un virus exclusivamente en el caso de EM. Estudios epidemiológicos han correlacionado infecciones virales con exacerbación de la EM y han demostrado que la prevalencia de la enfermedad aumenta conforme se incrementa la latitud. Por lo anterior, la frecuencia de esta enfermedad varía de forma considerable en diversas

partes del mundo. La zona de más riesgo la constituye el Norte de Europa Occidental y de los Estados Unidos. La enfermedad es rara entre las latitudes 30° Norte y 30° Sur, es decir cerca del ecuador. La frecuencia de la EM aumenta a una latitud de 40° Norte, por lo que la enfermedad es frecuente en Norteamérica, intermedia en Europa y baja en Asia. La escasa frecuencia de esta enfermedad en Japón y Asia en general se ha relacionado con el carácter excepcional, entre los habitantes de estas áreas, de ciertos antígenos de histocompatibilidad con los que la enfermedad parece asociarse. (Figura 2.1). Otro dato epidemiológico interesante, se refiere a la propensión a adquirir la enfermedad en personas que emigran de zonas de alto riesgo a zonas de bajo riesgo y viceversa. Se ha comprobado que si el individuo emigra después de los 15 años, estará sujeto al mismo riesgo que prevalecía en el país de origen, pero si la emigración ocurre antes de aquella edad, la persona adquiere el riesgo propio del país al que ha emigrado. Estos hallazgos implican que hay factores ambientales decisivos en la etiología y patogenia de la EM. (Hernández, 2000; Prat, 2002)

### Distribución mundial de la Esclerosis Múltiple

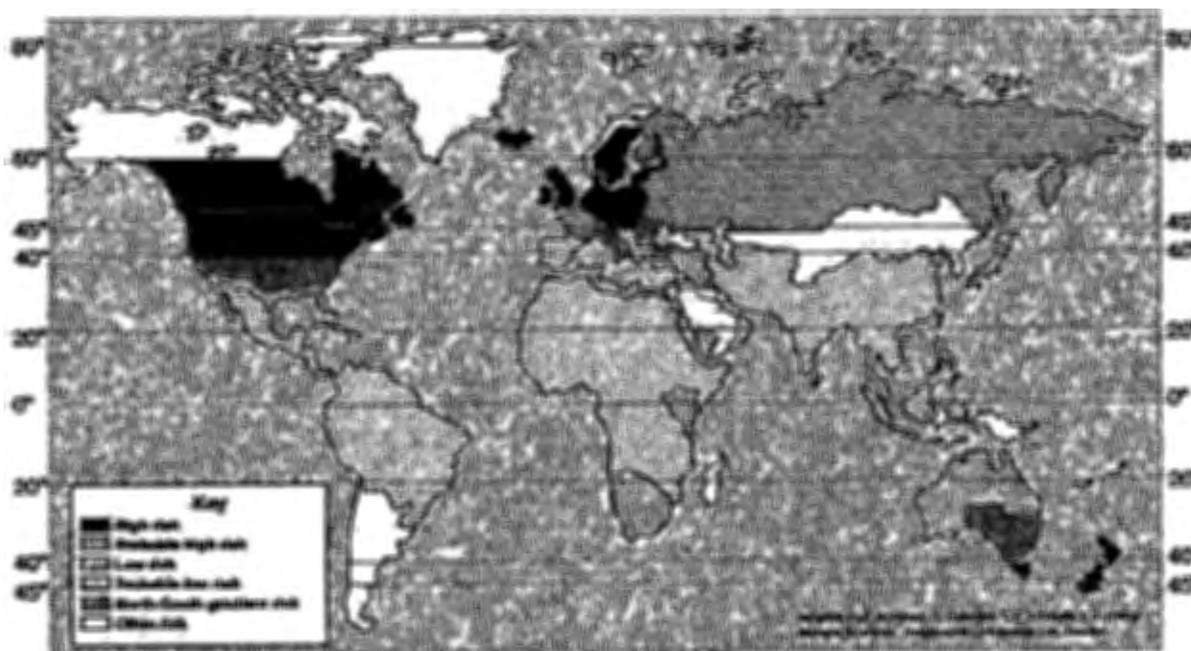


Figura 2.1. Distribución mundial de la EM. En rojo las áreas de alto riesgo, morado las de probable alto riesgo, beige bajo riesgo, crema probable bajo riesgo, verde en riesgo y blanco otro riesgo.

La EM en las islas de Faroes, ha producido cuatro epidemias sucesivas comenzando en 1943; la enfermedad parece haber sido introducida por tropas británicas que ocuparon la isla por 5 años en 1940, ya que antes de esta fecha la EM no existía en estas islas, y ha permanecido localizada geográficamente dentro de éstas por más de medio siglo. Por la manera como fue introducida, se presume que tuvo que ser una infección y se ha llamado afección primaria de la esclerosis múltiple, la cual tiene como características: a) requiere de una exposición prolongada, b) una edad limitada de susceptibilidad, y c) una incubación prolongada. Lo anterior puede conducir a una EM con manifestaciones clínicas neurológicas, o en muchos otros casos puede ser asintomática. Se cree que la EM clínica, es una salida rara, tardía de una enfermedad infecciosa específica, pero desconocida, adquirida durante la adolescencia o la juventud, la cual puede ser causada por un retrovirus no identificado. (Hernández, 2000; Compston, 2002; Prat, 2002; Buntinx, 2002)

### Aspectos Genéticos

La prevalencia de la EM varía significativamente, dependiendo de la base genética del paciente. La EM tiene una alta prevalencia en los caucásicos, pero se observa rara vez en Africanos y Asiáticos. Aún en áreas de alta prevalencia de esta enfermedad, estos grupos étnicos están en un riesgo mucho menor. El riesgo de desarrollar EM es mayor en familiares de primer grado, comparados con la población general, alrededor del 15% de los pacientes tiene un familiar afectado y las diferencias en la concordancia clínica entre gemelos dicigóticos (30-50%), contra gemelos monocigóticos (5%), definitivamente apoyan la implicación de los factores genéticos en la etiología de la enfermedad. Aunque múltiples estudios han demostrado fuertemente la base genética de la EM, detectar los genes específicos involucrados, no ha sido posible. La mayoría de los estudios sobre la susceptibilidad para la EM, asumen que, aunque no llena todos los criterios, es una enfermedad autoinmune provocada por una respuesta inmune anormal hacia un autoantígeno(s) aún no identificado de la mielina del SNC. Más aún, estas investigaciones moleculares no han proveído de manera consistente la localización de los genes,

excepto para los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, de las siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*), en especial del complejo clase II, los cuales participan en la presentación de antígenos al linfocito T cooperador ( $T_H$ ). También se ha descrito que los alelos de las MHC clase I han contribuido a la susceptibilidad de la enfermedad, aunque las asociaciones son mucho más débiles. Resultados de mapeos genómicos subrayan la complejidad de la genética de la EM, además del hecho de que no haya un locus único que contribuya significativamente al riesgo familiar. (Buntinx, 2002)

El papel de los factores genéticos es aún más complejo, ya que parecen estar involucrados no sólo en la manifestación de la enfermedad, sino también en su curso clínico.

De lo anterior se infiere que la EM es una enfermedad autoinmune mediada por células T desencadenada por agentes exógenos desconocidos, tales como virus o bacterias, en individuos con una base genética específica. Existe además una asociación entre la EM y marcadores HLA específicos, al menos en las poblaciones de Norteamérica y norte de Europa. La asociación entre EM y un determinante del complejo principal de histocompatibilidad se describió por primera vez en 1972 y se ha comprobado que en Norteamérica el 55% de los pacientes afectados poseen el gen DR2, lo que contrasta con el 18% entre la población general. Actualmente, los trabajos de Ohashi y colaboradores indican que hay asociación entre la EM y HLA-DR2, 15. Por otro lado, Alvarado-De la Barrera y cols., encontraron el tipo de alelos más frecuentes en mestizos mexicanos sanos, siendo DR8, DR7 y DR4. En 15 de 17 pacientes con EM en mestizos mexicanos, detectaron la presencia del alelo DR2 o DR3. (Gorodezky, 1986; Ohashi 1995; Hogancamp, 1997; Alvarado-de la Barrera 2000; Noseworthy, 2000; Martino, 2002; Prat, 2002; Buntinx, 2002)

La EM es causada por una interacción de los genes con el medio ambiente. A diferencia de otras enfermedades complejas, los pedigrees mendelianos no han

demostrado evidencia de que sea heredable; la EM parece ser genuinamente poligénica. (Compston, 2002; Dyment, 2004)

Las enfermedades complejas se caracterizan por: agregación familiar, pero con una alta proporción de casos esporádicos; ausencia de patrón mendeliano de herencia; reducida penetrancia; fenocopias; heterogeneidad etiológica; y heterogeneidad genética (locus y alélica). (Dyment, 2004)

Los genes responsables del complejo rasgo, no son productos aberrantes de genes mutados, sino genes polimórficos normales. Actúan independientemente o a través de epistasis, y cada polimorfismo puede realizar un pequeño efecto contributorio sobre alguna estructura aún no definida o sobre alguna función fisiológica. Los genes de la susceptibilidad pueden identificarse por asociación o linaje o ambas, mapeando tanto regiones candidatas como sistemáticamente el genoma completo. Investigaciones extensivas han identificado unas cuantas regiones candidatas. Resultados de estudios de población sugieren una asociación entre los alelos HLA-II DR15 y DQ6 y los genes del TNF- $\alpha$ . (Hogancamp, 1997)

En el estudio llevado a cabo por Hensiek y cols, encontraron lo siguiente: 59% de los pacientes tenían uno o más alelos HLA DR15 (DR2). La EM fue diagnosticada a una edad más temprana en pacientes con HLA DR15 (30.3 vs 32.3 años,  $p=0.001$ ), y más mujeres que hombres tienen este fenotipo (66% vs 55%,  $p=0.01$ ). HLA DR15 fue relacionado con el sexo femenino y edad de diagnóstico por análisis de regresión, pero no con el subgrupo clínico, historia de enfermedades autoinmunes, historia familiar de EM o progresión de la enfermedad; tampoco se relacionó con la incapacidad o los marcadores de laboratorio de la EM.

En estos resultados, los autores están de acuerdo con otros muchos estudios que sugieren que el fenotipo HLA DR15 afecta la susceptibilidad a EM, así como su aparición a edad más temprana, pero no su curso. (Hensiek, 2002; Martino, 2002)

La EM no puede ser explicada sobre la base de genética de población exclusivamente. (Hogancamp, 1997)

### Patogénesis Propuesta para Explicar la EM

El proceso de la enfermedad en la EM se enfoca a las áreas mielinizadas del cerebro y de la médula espinal. La patología de la EM se distingue de otras enfermedades inflamatorias del SNC por la presencia de grandes placas multifocales escleróticas con cicatrización por células gliales. Los estudios histopatológicos han mostrado que la desmielinización y la inflamación involucran células B, células T, macrófagos y células activadas de la microglia, lo cual constituye el marco característico de las lesiones agudas de la EM.

Las proteínas de la mielina, oligodendrocitos y neuronas son los posibles blancos de la respuesta inmune en la EM. La mielina sintetizada por los oligodendrocitos, consiste en 20-30% de proteína y 70-80% de lípidos, la cual puede contener los autoantígenos candidatos que provocan la respuesta patógena autoinmune. La proteína citoplásmica básica de mielina (MBP) y la proteína altamente hidrofóbica proteolipídica (PLP) son las dos proteínas más abundantes de la mielina, comprendiendo aproximadamente el 80% de las proteínas de la mielina del SNC. Otras proteínas menores, tales como la glicoproteína del oligodendrocito (MOG) y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), pueden ser también importantes en la formación y estabilidad de la estructura de la mielina. Otros antígenos recientemente descritos de los oligodendrocitos incluyen la proteína básica del oligodendrocito (MOBP), proteína oligodendrocito específica (OSP),  $\alpha\beta$  cristalina y S100 $\beta$ .

Las proteínas de la mielina fueron identificadas como los antígenos causantes de la enfermedad en el modelo animal de encefalitis experimental autoinmune (EAE), la cual es mediada principalmente por células T que secretan citocinas de las células T<sub>H</sub>1, tales como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-

2), linfotoxina y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). En contraste las células T<sub>H2</sub>, que secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 podrían proteger a los animales de la enfermedad. Muchos reportes han demostrado la presencia y status aumentado de las células T reactivas a la mielina en la sangre y LCR de los pacientes con EM.

En general, la EM está asociada con el desequilibrio de las citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , linfotoxina e IL-12) y las citocinas que regulan la respuesta inmune (el factor transformador del crecimiento [TGF- $\beta$ ] e IL-10). Hay mayor secreción de TNF- $\alpha$  y linfotoxina en las exacerbaciones clínicas y de TGF- $\beta$  e IL-10, en las remisiones.

Debido a que los linfocitos T autorreactivos a la mielina y los autoanticuerpos contra ella son parte del repertorio de células T y anticuerpos en pacientes con EM así como en personas sanas, (pero los individuos sanos poseen células T autorreactivas a la mielina, normalmente controladas por las células T supresoras), la pregunta obligada es, ¿cómo las células T reactivas a la mielina son activadas en la EM? Hay varias hipótesis:

La primera: *La activación espectadora*, postula que las células autorreactivas a la mielina son activadas en ambientes proinflamatorios que ocurren en algún órgano cuando éste es infectado (por ejemplo, por un virus). Bajo estas circunstancias, las citocinas proinflamatorias provocan un incremento en la presentación antigénica al aumentar la expresión de las moléculas del MHC y de moléculas coestimuladoras que presumiblemente reducen el umbral de activación.

La segunda: *Mimetismo molecular*, sugiere que el péptido (el factor del medio ambiente), presentado en la hendidura de las moléculas clase II específicas (un componente de riesgo heredado), es inmunológicamente indistinguible del autoantígeno y, de ahí que una respuesta apropiada a la infección genera una inflamación inapropiada contra algún componente de la unidad oligodendrocito-mielina. En común con todas las enfermedades autoinmunes órgano-específicas.

Este defecto sistémico resulta no de un ataque sustentado autoinmune del órgano blanco entero, sino más bien, en lesiones inflamatorias que son segregadas temporal y espacialmente (Lucchinetti 1997; Martino, 1999, 2002; Slavin 2001; Wucherpfennig, 2001).

La tercera y última: Las células T también pueden ser activadas por *superantígenos* microbianos, lo cual causa proliferación rápida y masiva de células y liberación de citocinas. Después del daño inicial al tejido del SNC por las células T autorreactivas, la liberación de antígenos de la mielina puede promover respuestas inmunes adicionales a los epítomos de la mielina, iniciando una cascada de eventos que pueden culminar en la enfermedad crónica. Figura 1. (Markovic-Plese 2001; Buntinx, 2002; Compston, 2002; Hawker, 2004)

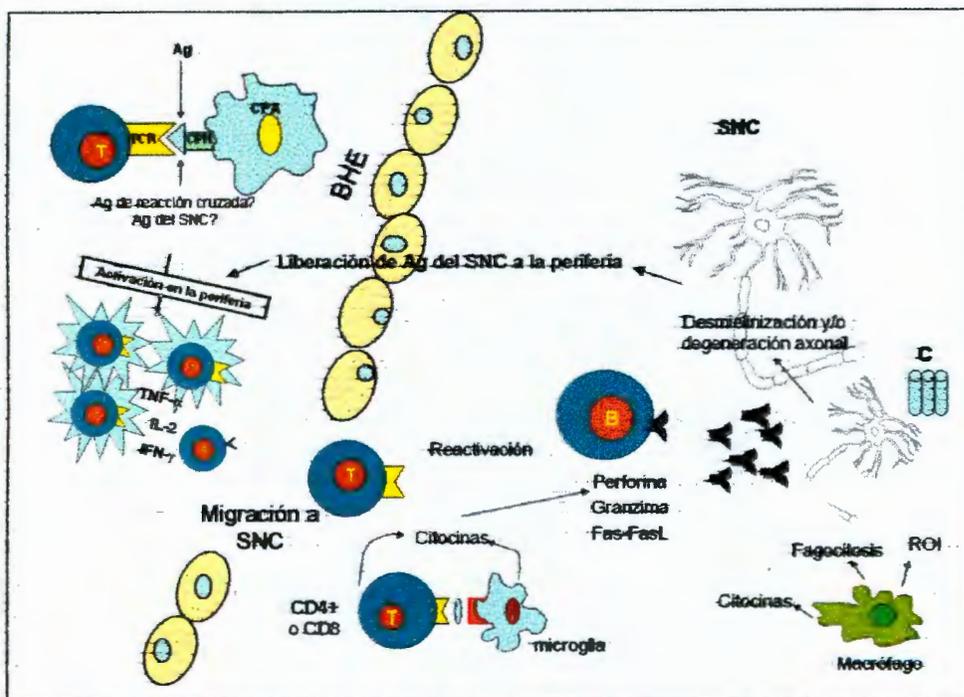
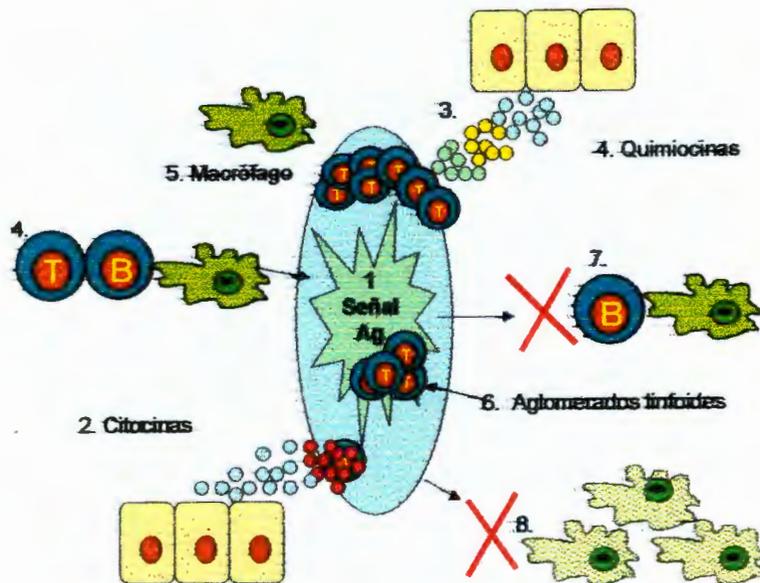


Figura 2.2. Inmunopatogénesis propuesta para la EM, en donde se observa la activación de las células T, por un antígeno desconocido, se activan, migran al SNC atravesando la barrera hematoencefálica, llegan células B productoras de anticuerpos contra la mielina, se activa el complemento, los fagocitos producen sustancias inflamatorias, hay salida de autoantígenos del SNC a la periferia, lo que ocasiona más activación de células T, lo que conduce a una inflamación crónica.

Las áreas desmielinizadas en el SNC de los pacientes con EM están caracterizadas por infiltrados inflamatorios que contienen células T sanguíneas reactivas a la mielina, células B que secretan anticuerpos contra componentes de la mielina, y una multitud de células efectoras mononucleares no específicas. Esta descripción patogénica ha llevado a la conclusión de que la EM es una enfermedad inflamatoria, autoinmune, desmielinizante del SNC. Desde el punto de vista inmunológico, la inflamación crónica en la EM puede ser un proceso inflamatorio con una fase de resolución alterada. La persistencia de los infiltrados inflamatorios en el SNC pueden ser causados por antígenos que persisten largo tiempo. Aunque muchos virus han sido implicados como posibles antígenos de peligro en la EM, no hay evidencia definitiva que estos patógenos jueguen tal papel.

La inflamación crónica en la EM resulta de la producción *in-situ* de factores inhibidores de la migración y de factores de supervivencia que evitan que las células inflamatorias sanguíneas que han invadido el SNC se retiren o mueran. La depuración de células inflamatorias normalmente ocurre por emigración o por apoptosis *in-situ*. Las citocinas inflamatorias primarias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) y las quimiocinas con actividad inhibidora de la migración, han sido encontradas en las placas activas de la EM. Esto provoca que las células mononucleares se acumulen y persistan en el SNC. En un paciente típico con EM, los linfocitos y monocitos predominan en los infiltrados perivasculares dentro de las placas desmielinizadas, pero también pueden encontrarse en las materias blanca y gris normales y en los espacios meníngeos. (Fig. 2.2) (Compston, 2002; Hawker, 2004)

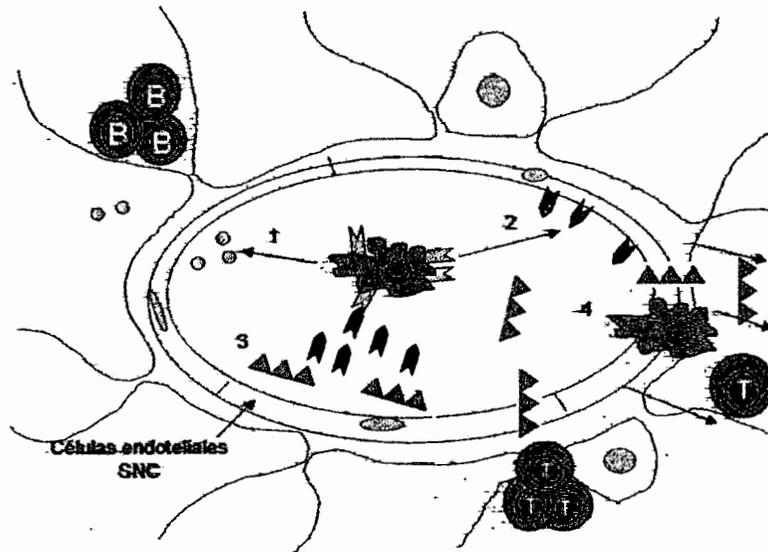


**Figura 2.3. Persistencia del infiltrado inflamatorio debido a la persistencia de la señal antigénica** (1) la cual es la clave del evento. Producción *in-situ* de citoquinas pro-inflamatorias ( $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$  e  $IL-1$ ) (2); producción de quimiocinas (3); las células gliales es el paso subsecuente en la inducción de la persistente acumulación de células mononucleares sanguíneas en el SNC. Las células T mielina-específicas, células B y macrófagos (4) son las células mononucleares más comúnmente involucradas. *In-situ* ocurre la división de las células inflamatorias. (5) Agregados linfocitarios ectópicos de células gliales así como de células dendríticas se desarrollan. (6) Las células mononucleares infiltrantes del SNC son incapaces de emigrar (7) o de morir por apoptosis (8) en el SNC inflamado.

Sin embargo se desconoce si hay una selección parcial de las células efectoras que logran entrar al SNC. Tal selectividad podría deberse a las células endoteliales cerebrales en la barrera hematoencefálica (BHE), aunque las células gliales que también producen factores que regulan la permeabilidad de la barrera o actúan como células presentadoras de antígeno (CPA), también podrían contribuir. Las células endoteliales cerebrales, como parte integral de la BHE, se cree que regulan el tráfico de las células inmunes entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR). Las células endoteliales cerebrales y las "tight junctions" entre ellas son los componentes más importantes de la BHE (figura 2.3). En los pacientes con EM, se observan "tight junctions" endoteliales anormales que se encuentran no sólo en las lesiones activas sino también en los microvasos microscópicamente inflamados en la materia blanca que de otra forma parece normal. La disfunción endotelial en la EM

ha sido apoyada debido a la detección de micropartículas liberadas de las células endoteliales durante las recaídas de la enfermedad. Hasta qué punto la ruptura de la BHE influye en la desmielinización y el daño axonal durante la patogénesis de la EM no está claro. (Martino, 2002)

La entrada continua de células mononucleares hacia el cerebro a través de la BHE dañada y la pérdida de la depuración de estas células causan el desarrollo de agregados atípicos ectópicos linfoides. Como consecuencia, las células locales inmunes (principalmente astrocitos y células de la microglia) son activadas, lo cual, junto con mediadores secundarios de la inflamación, producen la etapa de reacción inmune específica contra el SNC. La microglia activada actúa como fagocitos, endocitando fragmentos de mielina en las etapas tempranas de la desmielinización, y como CPA. Los agregados linfoides ectópicos contienen células dendríticas y células gliales, las cuales quizá intervengan en la acumulación continua de células mononucleares de la periferia. La acumulación de leucocitos dentro del SNC provoca finalmente hiperplasia, desmielinización, pérdida axonal y cicatrización por astrocitos. Muchos mecanismos efectores finales en la patogénesis de la EM pueden estar involucrados en el proceso del daño de la mielina, estos incluyen fagocitosis de la mielina mediada por los macrófagos y secreción de anticuerpos contra la mielina, citocinas tóxicas para la mielina y derivados de óxido nítrico. (Martino, 2002)



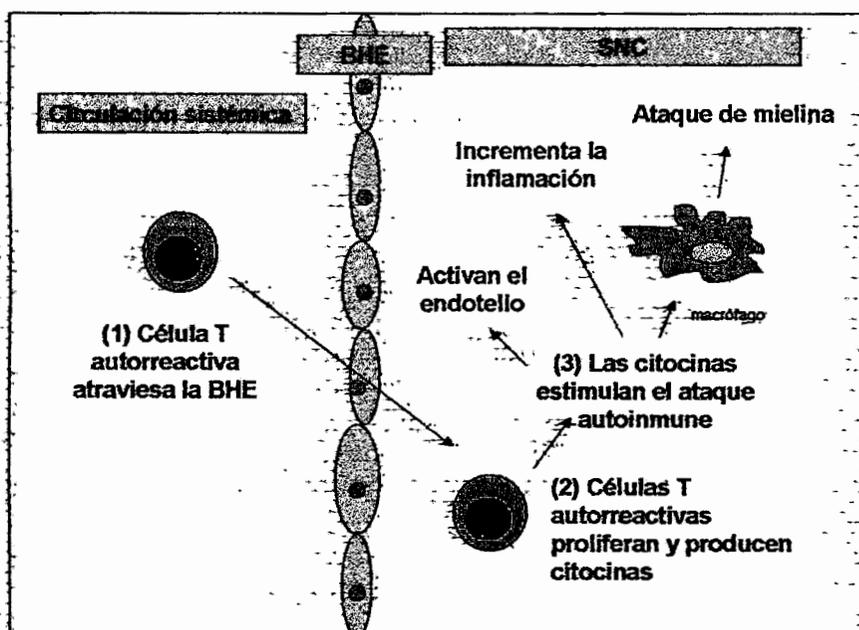
**Figura 2.4.** En las lesiones inflamatorias activas de la EM, las células endoteliales de los microvasos cerebrales, liberan quimiocinas (1) y expresan moléculas de adhesión (2) sobre su superficie celular para regular el tráfico de las células mononucleares inflamatorias (macrófagos) a través de la barrera hemato-encefálica (BHE). La expresión en la superficie celular de moléculas de adhesión es seguida de la liberación de moléculas de adhesión solubles (3). Las metaloproteinasas (MMPs)(4) están implicadas en la degeneración de la matriz extracelular, abriendo la BHE, destruyendo la mielina, degradando las moléculas de la superficie celular, por lo que probablemente estén involucradas en la mayoría de los pasos patogénicos de la EM. Moléculas solubles de adhesión son liberadas por las células endoteliales en la BHE lo cual puede tener efectos de regulación del proceso de la enfermedad y puede representar un proceso natural limitante del proceso inflamatorio.

Aunque la inflamación parece tener un papel crucial en la desmielinización y en la pérdida axonal en las fases tempranas de la EM, evidencias recientes sugieren que la inflamación no es exclusivamente dañina. En ratones con EAE, un modelo animal de EM, se observó que mejoraban con la producción de IFN- $\gamma$ , que provoca la apoptosis en las células T asociado con el receptor I del TNF- $\alpha$ , y que las células T pueden inducir a la microglia a secretar IL-12, una interleucina inhibidora de la prostaglandina E2, limitando el proceso inflamatorio. Los macrófagos pueden promover la remielinización al fagocitar los residuos de mielina, al secretar TNF- $\alpha$ , lo cual puede directamente promover la proliferación de los precursores de los oligodendrocitos por la señalización del receptor II del TNF. Finalmente los anticuerpos contra los antígenos de la mielina también pueden promover la

remielinización induciendo la proliferación del oligodendrocito uniéndose a moléculas específicas de la superficie celular.

El papel de la inflamación en la EM es más complejo de lo que previamente se pensó, sin embargo aún se desconocen los mecanismos moleculares exactos o los factores locales que están relacionados con la naturaleza y persistencia de la señal antigénica responsable así como las bases genéticas del huésped que regulan los diferentes aspectos de la inflamación durante la desmielinización autoinmune del SNC.

La falla de regulación, conduce a proliferación, activación y entrada a la circulación de las células T autorreactivas; las cuales expresan moléculas de adhesión e inducen cambios recíprocos en el endotelio, permitiendo el acceso a través de la barrera hematoencefálica hacia el SNC. Ahí, las células T activadas, reencuentran el antígeno y activan a la microglia (los macrófagos del SNC), los cuales, en turno, expresan moléculas de clase II, re-presentan el antígeno a las células T, y asientan un medio inflamatorio, el cual provoca un infiltrado rico en células T activadas y microglia con algunos neutrófilos. (Figura 4) (Lucchinetti, 1997; O'Connor, 2002; Hemmer, 2002; Hawker, 2004).



**Figura 25:** Las células T autorreactivas atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE), proliferan y liberan citocinas que provocan atracción de células inflamatorias, activación de las células gliales, activación del endotelio y ataque a la mielina.

Se liberan mediadores tóxicos inflamatorios, provocando la ruptura de la barrera hematoencefálica, lo cual conduce a daño axonal y de la glia. El óxido nítrico puede actuar directamente sobre los axones hipomielinizados, bloqueando transitoriamente la conducción e incrementando reversiblemente el déficit previamente alcanzado de las vías comprometidas. Conforme se resuelve la inflamación aguda, ya no hay producción de óxido nítrico, el cual induce el bloqueo fisiológico de la conducción. Los síntomas también mejoran conforme las vías sobrevivientes funcionales se reorganizan tanto a nivel celular como del sistema. Todos estos mecanismos se conjuntan para la fase de remisión temprana en la enfermedad. Pero el tejido vulnerable es fácilmente expuesto de nuevo. Cuando se conjuntan estos mecanismos con frecuencia, el óxido nítrico causa cambios estructurales en los axones (de ahí que sean irreversibles).

Las citoquinas y los factores promotores del crecimiento liberados por los astrocitos reactivos y la microglia como parte del proceso inflamatorio agudo,

promueven la remielinización endógena. Sin embargo, al avanzar el tiempo, la reactividad de los astrocitos sellan la lesión y la gliosis provoca una barrera física para continuar con la remielinización, reduciendo la capacidad de disminuir los déficit acumulados, y marcando una transición a la etapa de déficit persistente.

La mayoría de la pérdida axonal se observa en la EM progresiva. Se propone que la axonopatía crónica no es debida directamente a la inflamación, sino que resulta de la pérdida del soporte trófico normalmente proveído a los axones por la mielina o la glia, actuando directamente o a través del mantenimiento de la actividad eléctrica, o ambas. De esta manera, la degeneración axonal crónica puede lentamente incrementar el déficit clínico, conduciendo a la progresión de la enfermedad. (Lucchinetti 1997).

Estudios en humanos de los requerimientos coestimulatorios de las células T autorreactivas, dos grupos han demostrado recientemente que las células específicas de la proteína básica de mielina (MBP) exhiben disminución del requerimiento coestimulatorio de CD28 en pacientes con EM cuando se comparan con los controles normales. Usando células transfectadas de ovario de hámster chino (CHO) CD80 y CD86 como células presentadoras de antígeno, se encontró que las clonas de células T reactivas a MBP de los individuos normales requieren coestimulación B7, mientras que las clonas reactivas-MBP de los pacientes con EM, proliferan en ausencia de coestimulación B7. Otros investigadores reportaron que la adición de anti-CD28 o CTLA-4 previenen la proliferación Ig MBP-específica en controles normales, pero no en pacientes con EM. Los autores concluyeron que las células CD4+ reactivas-MBP se expanden en la ausencia de la coestimulación mediada por CD28/B7, debido a su activación previa *in vivo* y a la memoria inmunológica.

Otros hallazgos que favorecen la inmunopatogénesis en la EM:

- a) aumento de la producción del IgG en el SNC,
- b) disminución en la sangre periférica de los linfocitos supresores, y

c) acumulación de células T y de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) en las lesiones activas de EM, macrófagos antígeno positivo, a menudo cerca de las células MHC-II y de las células endoteliales. En este proceso, las citocinas, como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), pueden estar involucradas. Los linfocitos T activados juegan un importante papel en la patogénesis de la EM. Estas células T secretan citocinas pro y antiinflamatorias. Foroozan Mokhtarian, et al., encontraron que las células T producen más citocinas pro-inflamatorias, Il-2, IFN- $\gamma$  e IFN- $\gamma$ -linfotóxina y menos citocinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$  durante 2 a 4 semanas en cultivo, en comparación con las células T normales. (Compston, 1992; Lucchinetti, 1997).

Algunos de los hallazgos inmunológicos más importantes en la EM, es que los linfocitos T supresores desaparecen de la sangre poco antes o al momento antes del inicio de un ataque clínico de la enfermedad y retornan a sus niveles normales con la remisión de los síntomas. El nivel del ácido linoleico se ha encontrado en el suero de los pacientes con EM, significativamente disminuido. Hay evidencia de que este ácido tiene participación en la regularización de la inmunidad celular participando en la inmunosupresión. (Slavin 2001; Hemmer, 2002).

### Neuropatología

Parece que ya fue descrito todo acerca de la neuropatología de las enfermedades desmielinizantes, hace más de un siglo después de las descripciones clásicas de las lesiones que involucraban selectivamente o predominantemente la mielina en el SNC o periférico por Carswell (1838), Cruveilhier (1829-1842), Charcot (1868), Schilder (1912), Dawson (1916) y otros (Compston, 1992). Sin embargo la significancia de estas descripciones y los mecanismos de las lesiones aún permanecen poco claros. Por ejemplo Charcot, en su famoso papel, señaló con gran precisión la desaparición de la vaina de mielina con la preservación de los axones en la placa, y la forma de demarcación del área de desmielinización en el margen de la

placa. Sin embargo, hasta ahora ninguna buena explicación se ha ofrecido para esta desmielinización focal diseminada. (Compston, 1992; Lucchinetti 1997).

En la médula espinal y en el cerebro, la oligodendroglía son las células formadoras y manutentoras de la mielina. Los lípidos y proteínas necesarios para el crecimiento, mantenimiento y regeneración de la mielina son sintetizados en el pericarion y son transportados a lo largo de microtúbulos en procesos delgados oligodendrogliales que terminan en el exterior, interior y márgenes paranodales de cada segmento de mielina. Estos segmentos de mielina son membranas compactas espirales, y sus dimensiones son reguladas por los axones que recubren.

La desmielinización está caracterizada por la producción de una capa anormal e inestable de mielina; asociada frecuentemente con hipomielinización (pasividad en la formación de mielina), la cual es debida a alteraciones metabólicas. La desmielinización es la destrucción de la mielina aparentemente normal. Ésta es habitualmente seguida por remielinización. La desmielinización es mediada por células y afecta las capas de mielina por una razón desconocida. Las causas de las placas multifocales y claramente demarcadas, así como el desvanecimiento del proceso de remielinización en los bordes de las placas, aún no están claras. (Lucchinetti, 1997; Racke, 2000.)

Las enfermedades primarias desmielinizantes con cambios inflamatorios son enfermedades intrigantes; de hecho, numerosas variedades de lesiones son vistas: además de las placas normales, tenemos que considerar cicatrices, placas crónico-activas, remielinización, placas concéntricas o hasta necróticas.

Linfocitos y células mononucleares aparentemente escapan del sistema circulatorio y penetran a la sustancia del SNC, destruyendo su mielina, dando como resultado un área de desmielinización que constituye una placa. Las lesiones de la EM, consisten en áreas diseminadas de destrucción de mielina en el SNC, dentro de las cuales los cilindroejes permanecen intactos. La clásica placa crónico-activa es

redonda y está claramente demarcada del así llamado tejido normal, sobre secciones del cerebro. El límite entre la mielina histológicamente normal y la destruida, a menudo es muy preciso, o bien puede corresponder a una capa delgada de mielina antes de que el cilindroje quede descubierto. Es posible que algunas zonas sólo muestren destrucción parcial de la mielina. Las lesiones varían de tamaño, de 1 mm a varios centímetros de diámetro, y aparecen en cualquier parte del cerebro, nervios ópticos y médula espinal. A pesar de que las placas pueden aparecer en cualquier parte del SNC donde hay mielina, se ha observado predilección por los nervios ópticos, las regiones periventriculares del cerebro y la médula espinal cervical. La mayor parte de las placas o todas ellas, se desarrollan cerca de los vasos sanguíneos.

El examen microscópico de la placa, muestra una genuina desmielinización con conservación axonal. Sin embargo son frecuentes algún encogimiento por el envejecimiento y rarefacciones de los axones, así como algunas irregularidades de éstos.

Dentro de las placas desaparecen los oligodendrocitos. Los astrocitos proliferan y llenan gran parte de la cavidad que dejan la mielina y la oligodendroglia, formando una cicatriz que condujo al término "esclerosis" de la EM. Ello da lugar a zonas que se sienten firmes a la palpación o a la sección y a placas que es posible observar en zonas deprimidas durante las autopsias.

Cerca y dentro de las placas de la EM, se agrupan células perivasculares y mononucleares. También existen macrófagos que engloban los productos de desintegración de la mielina. Parece que las células plasmáticas sintetizan mucha de la abundante gammaglobulina que se encuentra en el interior y alrededor de las placas y en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

También las superficies exteriores de las capas de mielina no están cubiertas del citoplasma de las células gliales, como lo están en el sistema nervioso periférico. En lugar de eso, están en contacto con otras capas de mielina, con la membrana de otras células gliales y neuronas, o con el compartimiento extracelular. Así las capas de mielina del sistema nervioso central, son más vulnerables al daño severo que las del sistema nervioso periférico debido a:

- 1) los metabolitos de oxígeno, mediadores lípidos, toxinas, virus, células inflamatorias, citocinas y otras sustancias dañinas pueden actuar directamente con las capas de mielina;
- 2) la cantidad de membrana de mielina mantenida por cada oligodendrocito es grande; y,
- 3) los procesos delgados de oligodendrocitos que transportan sustancias requeridas para el mantenimiento de las capas son probablemente también fácilmente dañados, su alteración puede interrumpir el transporte y detener la producción de mielina. La desmielinización también ocurre cuando los axones son dañados o seccionados transversalmente por un proceso denominado degeneración walleriana. (Compston 1992, 2002; French-Constant, 1994; Wucherpfennig, 2001; Slavin, 2001; Halfpenny, 2002; Frohman, 2003)

### Cuadro Clínico

Los síntomas de esta enfermedad se atribuyen al bloqueo de la conducción de las fibras afectadas en el seno de una placa.

La conducción nerviosa todavía es posible en los axones en los que la desmielinización no es completa; sin embargo, estas fibras parcialmente afectadas pueden ver alterado su funcionamiento de forma transitoria por cambios químicos.

El cuadro clínico se caracteriza por la multiplicidad de los síntomas y su tendencia a variar de naturaleza y gravedad a lo largo del curso de la enfermedad,

reflejando la evolución temporal y la distribución multifocal de los cambios patológicos.

Los síntomas motores son probablemente los más frecuentes al comienzo de la enfermedad. El paciente puede quejarse de que arrastra una pierna al caminar o que ha perdido fuerza en una mano, o bien referir sensaciones de fatiga, pesadez o rigidez en las piernas, tropiezos o caídas frecuentes. Los trastornos sensitivos (adormecimientos, parestesias) son también muy frecuentes y en general se refieren a la afección de los cordones posteriores de la médula espinal. A veces los enfermos refieren sensaciones en banda o en cinturón alrededor del tronco o de una extremidad; otras veces se trata de parestesias distales que simulan una afección del cerebelo y sus conexiones, los cuales pueden ser responsables de inestabilidad al caminar, incoordinación o torpeza de los movimientos delicados de las manos y trastornos del lenguaje en forma de disartria atáxica. La pérdida brusca de la agudeza visual debida a un episodio de neuritis óptica, ocurre en, al menos el 25% de los pacientes de EM; suele ser unilateral, aparecer en el curso de horas o días junto a un cierto grado de dolor ocular o remitir de forma espontánea al cabo de unas semanas. Los trastornos de los esfínteres rectal y vesical son frecuentes, sobre todo los últimos, que incluso pueden ser el primer síntoma de la enfermedad. La disfunción vesical con frecuencia conduce a infecciones urinarias recurrentes. En el varón se acompaña a menudo de impotencia sexual. Los síntomas mentales son frecuentes en la EM; la depresión mental es un hallazgo tan común como la euforia inapropiada, síntoma considerado característico de esta enfermedad. En casos avanzados, el paciente puede presentar una demencia franca y no son infrecuentes los episodios incontrolables de risa o llanto espasmódico.

Los pacientes que sufren de EM clínicamente definitiva, de acuerdo con los criterios de Poser (anexo 2), apoyados en la utilización de métodos estandarizados, sufren trastornos depresivos. La depresión no se relaciona con la edad, sexo, duración de la enfermedad, status de incapacidad o con los resultados de la valoración cognoscitiva. No hay tampoco relación entre el grado de depresión y las

diferentes medidas de resonancia magnética, así como tampoco la presencia o ausencia de gadolino. La fatiga tampoco se relaciona con la resonancia magnética del tallo cerebral ni del mesencéfalo.

Debido a que las lesiones en la EM pueden ocurrir en muchas partes diferentes del SNC, el cuadro clínico puede incluir una gran variedad de síntomas y signos. Paty y Ebers estimaron la frecuencia de los síntomas observados en las clínicas de las Universidades de British Columbia y la de Western Ontario en Canadá. De acuerdo a esta lista, se observaron los siguientes signos y síntomas en más del 50% de los pacientes: cambios cognitivos (70%), euforia (60%), depresión (54%), fatiga (80%), neuritis óptica (65%), atrofia óptica (77%), pérdida de las fibras nerviosas de la retina (80%), nistagmus (85%), vértigo (50%), disartria (50%), ataxia (50%), pérdida sensorial (90%, más frecuente en piernas), aumento de los reflejos tendinosos profundos (90%), debilidad en las piernas (90%), espasticidad (90%), espasmos flexores (50%), calambres (50%), amiotrofia (50%), alteraciones vesicales (80%) y alteraciones sexuales ((50% en mujeres y 75% en hombres). (O'Connor 2002; Noseworthy, 2000)

### Clasificación de la Enfermedad

La EM ha sido clasificada en una variedad de subtipos que reflejan las diferencias distintivas en los factores genéticos e inmunológicos que determinan una diversidad de mecanismos de la enfermedad. Actualmente se reconocen 5 formas básicas de la enfermedad, aunque no hay un consenso general para las mismas:

1. **Benigna:** aproximadamente 15% de los casos, su inicio es súbito, con una o dos exacerbaciones moderadas con remisiones completas o casi completas y que no dejan secuela.
2. **Exacerbación-remisión, (R-R):** Episodios claramente definidos de exacerbación de la enfermedad con total recuperación o con secuelas de déficit residual

después de la recuperación; los periodos entre las recaídas se caracterizan por ausencia de progresión de la enfermedad.

3. **Primaria-Progresiva, (P-P):** El elemento esencial es un empeoramiento gradual continuo con fluctuaciones menores sin presentarse periodos distintivos de exacerbación. Aunque se requiere la progresión, se reconoce que tal progresión a una tasa constante a lo largo de la enfermedad no ocurre.
4. **Secundaria-Progresiva, (S-P):** Se observa en pacientes que inicialmente presentan la forma R-R que siguen un curso de progresión con o sin recaídas ocasionales, remisiones mínimas y estancamiento. Sin embargo, una vez que las recaídas inician progresivamente a empeorar, el paciente ha cambiado de la forma RR a la forma SP.
5. **Exacerbación-Progresión, (R-P):** Es una forma clínica importante de la EM caracterizada por una combinación de exacerbación y progresión, aunque no hay un consenso para definir esta forma. Algunos utilizan este término para definir pacientes que no se recuperan de una exacerbación (y que cabrían en la definición RR). Otros lo utilizan para describir pacientes RR que tienen una forma SP. Un grupo menor indican que la mejor definición incluye pacientes con enfermedad progresiva que inicia con episodios agudos de empeoramiento. Lublin considera que debe ser olvidada esta forma de clasificación de la enfermedad.
6. **Progresiva-Exacerbación (P-R):** forma progresiva de la enfermedad desde su inicio, con claras fases agudas de exacerbaciones, con o sin recuperación total; los periodos entre las exacerbaciones se caracterizan por progresión continua. (Lublin, 1996)
7. **Maligna**, menos del 5%, inicio súbito, muy grave y potencialmente fatal, en pocos meses o años y con alteraciones tempranas.(Lublin,1996; Frohman, 2003 a, b)

El curso clínico de la EM es variable. Los factores que pronostican un curso maligno en el momento del diagnóstico incluyen: la edad avanzada, el sexo masculino y un síndrome cerebeloso o déficit motor de tipo insidioso como su primer síntoma. Esta enfermedad puede presentar períodos de remisión y períodos de

exacerbación, puede remitir y recaer con acumulación progresiva de deficiencias, o puede tener un curso crónico progresivo. El último patrón es más frecuente en individuos mayores de 40 años. La forma más característica y frecuente de la EM es la que cursa en brotes constituidos por cualquiera de los síntomas y signos descritos anteriormente, aislados o en combinaciones diversas. En un brote agudo de la enfermedad, los síntomas y signos comienzan a menudo en forma focal y progresan en cuestión de horas o días. Al principio, cada exacerbación o brote, puede durar días, semanas o meses, suele seguirse de una remisión más o menos completa que puede incluso durar décadas.

El pronóstico individual se torna difícil debido a la extraordinaria variabilidad del curso clínico. La EM raras veces acorta la vida del paciente, en general al cabo de 15 años de evolución, el 30% de los enfermos pueden llevar una vida independiente y activa laboralmente y alrededor del 50% requieren algún tipo de asistencia para deambular. Se considera que la ausencia de capacidad funcional a los 5 años de evolución de la enfermedad suele ser predictivo de un curso benigno para los siguientes 10 años de la misma. Otros factores pronósticos favorables incluyen el comienzo temprano y un curso en brotes. Por el contrario, un comienzo tardío (40 años o más) y un curso progresivo entrañan peor pronóstico. (Lublin, 1996; Frohman, 2003)

### Diagnóstico

No existen pruebas diagnósticas específicas para la EM, que se diagnostica en función de la aparición de síntomas y signos indicativos de lesiones múltiples del SNC y de brote de actividad clínica seguidos de fase de remisión. El diagnóstico de la EM es clínico; los criterios diagnósticos actualmente más utilizados se apoyan en los datos clínicos, de imagen y del LCR y clasifica los diagnósticos de EM como definida, probable y posible.

Un panel internacional sobre el diagnóstico de la EM publicó los nuevos criterios diagnósticos para la EM (Criterios de Mc Donald, anexo 4). Estos criterios se enfocan en la demostración objetiva de la diseminación de lesiones en el tiempo y espacio. Las herramientas diagnósticas paraclínicas, principalmente la resonancia magnética (MRI), han sido integrados a estos criterios con la finalidad de facilitar el diagnóstico en pacientes con EM con síndromes aislados clínicamente sugestivos de EM. En estos pacientes con un ataque y evidencia clínica objetiva de una lesión, la demostración de diseminación de las lesiones tanto en tiempo como en espacio es necesaria para hacer el diagnóstico de EM. Los criterios existentes de Poser et al (anexo 2), requieren la ocurrencia de un segundo ataque clínico para llenar los criterios de EM clínicamente definida. En contraste, los nuevos criterios permiten la ocurrencia de lesiones en la MRI para llenar los requisitos de diseminación en tiempo y en espacio. Diferentes criterios radiológicos se han desarrollado en el pasado para lo cual las anomalías en la MRI pueden ser clasificadas de acuerdo a la fuerza con lo cual sugieren el diagnóstico de EM. Este panel acordó que los criterios estrictos para las anomalías de la MRI deben ser seguidas para establecer un diagnóstico de EM. Entre los criterios disponibles, el panel seleccionó los cuatro criterios modelo dicotómicos de MRI de Barkhof para demostrar la diseminación en espacio (realce de gadolinium, lesiones yuxtacorticales, infratentoriales y periventriculares). También se decidió que los pacientes con anomalías en el LCR (detección de bandas oligoclonales o aumento en el índice de IgG) y la presencia de dos o más lesiones era suficiente para demostrar la diseminación en espacio. También se asentó que nuevas lesiones T2 o realizadas por gadolinium, aparecen al menos 3 meses después del inicio del evento clínico por lo que podrían satisfacer los criterios por MRI de diseminación en tiempo. (Poser, 1983; Tintoré, 2003; Forman, 2003). Resumiendo, el diagnóstico de la EM se basa en:

- a) demostrar lesiones focales dispersas en el tiempo y en el espacio dentro de la sustancia blanca del SNC, y
- b) descartar para ellas otros posibles diagnósticos.

## Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad debe ir encaminado tanto al proceso patológico primario como a los síntomas secundarios o complicaciones. Una amplia variedad de medicamentos proveen mejoría sintomática, pero ninguna altera la historia natural de la enfermedad. El tratamiento de la enfermedad de fondo es más difícil debido al poco conocimiento sobre la patogénesis de la placa de la EM.

Para el futuro inmediato, las drogas ABC, Avonex (beta-interferón-1 $\alpha$ ), Betaseron (beta-interferón-1 $\beta$ ), y Copaxone (glatiramer acetato), dominarán el tratamiento de la EM. Estos agentes profilácticos reducen la frecuencia y severidad de los síntomas de la EM pero a un precio considerable de toxicidad y costo. El papel de estas nuevas drogas y su uso óptimo es controversial.

En primer lugar, estas drogas parecen ser muy similares. Grandes esfuerzos se han hecho para observar las diferencias entre estas drogas, pero las recomendaciones de la supremacía de una sobre las otras es cuestión de opinión más que de hecho. Aún no hay ninguna comparación directa verdadera que permita comprobar la superioridad de una droga sobre la otra.

Segundo, la efectividad de estas drogas disminuye en los pacientes en una enfermedad avanzada o progresiva. Estas drogas tienen poco efecto para prevenir el avance de la discapacidad una vez que los pacientes han entrado a la fase secundaria progresiva de la enfermedad. A pesar de que pueden reducir las recaídas, no pueden de manera significativa enlentecer el progreso de la discapacidad en la EM progresiva.

Tercero, estos medicamentos consistentemente minimizan las recaídas siempre que se administren en fases tempranas de la enfermedad. El estudio hecho por Champs demostró que los pacientes tratados de manera temprana con beta

interferón  $1\alpha$ , se retrasaba el desarrollo subsecuente de los síntomas (progresión a EM clínicamente definida) por aproximadamente 1 año, demostrando la capacidad de la droga de retardar la historia natural de la enfermedad. Estos hallazgos dan soporte a la recomendación del inicio temprano del tratamiento en pacientes con EM o aún en aquéllos con alto riesgo para la enfermedad. (Rolak, 2001)

Se identifican cuatro características de las lesiones de la EM que pueden ser susceptibles de tratamiento: 1) inflamación, 2) desmielinización con infiltración de macrófagos, 3) proliferación de astrocitos y cicatrización y 4) alteración de la conducción eléctrica dentro del SNC. Los quimioterápicos inmunosupresores que están comúnmente bajo investigación incluyen corticoesteroides, ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina, interferón y copolimar 1.

Algunos estudios sugieren que una pequeña dosis de metotrexato y cladribine podrían tener efectos benéficos en el curso de la enfermedad en pacientes con un progreso crónico de EM, la primera probablemente siendo menos tóxica. Desafortunadamente las perspectivas terapéuticas para pacientes con progreso primario de EM son menos prometedoras en el presente. Muchos estudios sugieren que el 4-aminopiridina y tizanidina tienen un potencial terapéutico para el tratamiento sintomático, el primer tratamiento para mejorar las deficiencias neurológicas, y el segundo para aliviar algunos problemas de espasticidad. (Rolak, 2001; Frohman, 2003; Hawker, 2004)

### III. METODOLOGÍA

Este estudio se realizó en pacientes con esclerosis múltiple de la ciudad de Querétaro, pertenecientes a la Sociedad Queretana de Esclerosis Múltiple.

Es un estudio de tipo descriptivo, transversal.

El estudio de la determinación del antígeno DR15 (2), se realizó en el laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

#### Extracción del DNA de las células mononucleares.

Lo primero que se realizó fue la extracción de DNA de las células mononucleares de sangre periférica, del portador de EM. Esto se hizo mediante la técnica de “**Salting out**” (extracción salina) para extracción de DNA humano, que a continuación se describe:

#### *Principio:*

Este procedimiento evita el uso de fenol y cloroformo utilizando altas concentraciones de sal para remover las proteínas. Es rápido, seguro y barato. El promedio de la cantidad obtenida es similar al obtenido con el procedimiento de extracción fenol-cloroformo y la calidad del DNA es excelente.

#### *Tiempo requerido:*

2 días

#### *Soluciones especiales:*

Solución saturada de NaCl

#### *Procedimiento:*

Día 1

1. Aislamiento de núcleos de los tubos de sangre (colectada en tubos con EDTA):

Se añadieron 9 volúmenes Buffer A, se mezcló bien y se pusieron en hielo por 2 minutos. Se centrifugó a 1500 rpm a 4°C por 15 minutos. Se resuspendieron los pellet de núcleos en 5 ml Buffer B y se transfirieron a un tubo para centrifugar de 15 ml de polipropileno.

2. Se añadieron 500 ul 10% SDS y 55 ul proteinasa K (10 mg/ml). Se incubó a 37°C durante la noche en un agitador orbital.

## Día 2

1. Se añadieron 1.4 ml de solución de NaCl saturada (aproximadamente 6M) a cada tubo. Se agitaron vigorosamente por 15 segundos. Se centrifugaron los tubos a 2500 rpm en la centrifuga de Beckman de baja velocidad por 15 minutos.
2. Se transfirió el supernadante a otro tubo de 15 ml de polipropileno dejando el pellet de proteína precipitada.
3. Se añadieron exactamente dos volúmenes de etanol al 100% a temperatura ambiente e invertir el tubo varias veces hasta que el precipitado de DNA se vuelva visible.
4. Remover las bandas de DNA con una espátula plástica o pipeta y transferir a un tubo eppendorf conteniendo 100 - 200 ul TE. Permitir que el DNA se disuelva al menos 2 horas a 37°C antes de la cuantificación.

## *Soluciones:*

- **Buffer A**

- 0.32 M sucrosa                      109.5 g sucrosa
- 10 mM Tris HCl pH 7.6              10 ml 1 M Tris-HCl pH 7.6
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>                          5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>
- 1 % Triton-X-100
  
- Alcanzar un volumen de 1 litro con agua deionizada.  
Esterilizar esta solución en autoclave, luego añadir 10 ml Triton-X-100.

- **Buffer B**

- 25 mM EDTA pH 8.0      50 ml EDTA pH 8.0
- 75 mM NaCl              40 ml 5 M NaCl
- Alcanzar un volumen de 1 litro con agua deionizada.  
Esterilizar esta solución en autoclave

- **Solución saturada de NaCl** ( aproximadamente 6M)

Disolver 35 gramos de NaCl en un volumen total de 100 ml (de agua deionizada). Si la solución no tiene precipitados, añadir 2 gramos de NaCl y mezclar. Repetir hasta que no más NaCl entre en solución. Esterilizar por filtración.

- **TE**

TRIS-HCL 10mM pH 8, EDTA 1 mM

#### Tipificación de los genes del sistema HLA.

Se realizó la tipificación del antígeno DR2, por medio de PCR en el Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán.

Una vez aislado el DNA, se procedió a la amplificación del exón 2 de la cadena  $\beta$  del HLA-DR utilizando iniciadores específicos de la región 5' y 3' mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

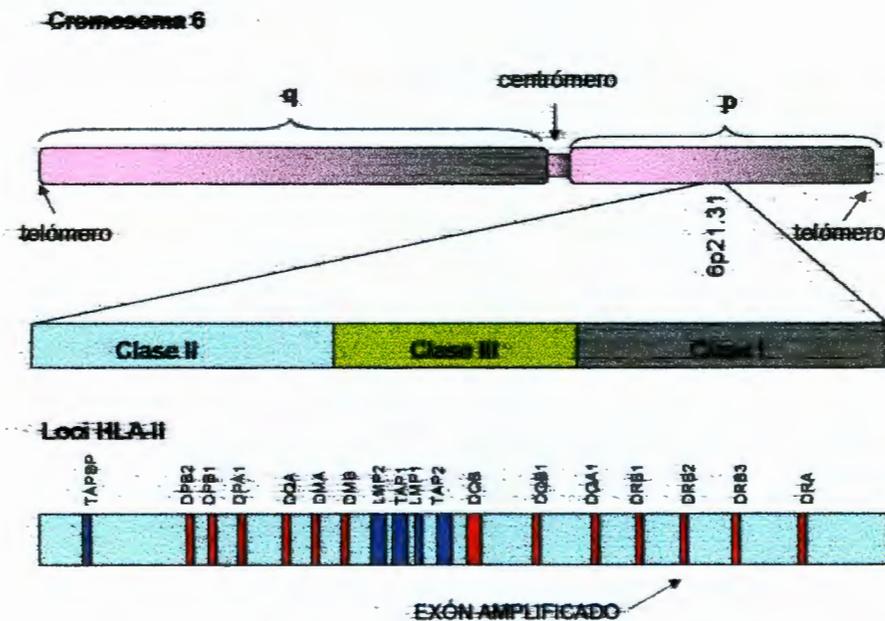


Figura 3.1. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6. El complejo está convencionalmente dividido en tres regiones: I, II y III. Cada región contiene numerosos loci (genes), sólo algunos de los cuales son mostrados. De la clase II se muestran los genes que se expresan. Los genes de la clase III no están relacionados con los genes de la clase uno estructural ni funcionalmente. Se muestra el exón amplificado en este estudio.

La amplificación de los genes que codifican para las moléculas del MHC que se amplificaron fueron HLA-DRB2 por PCR de secuenciación específica de oligotipos hibridación dot blot reversa (Amplicor, Hoffman La Roche, Basel, Switzerland). La alta resolución de la tipificación HLA fue realizada por hibridación dot blot de DNA amplificado con secuencias específicas de oligonucleótidos con bandas marcadas con digoxigenina di-deoxi-uridin-trifosfato (Dig-11-ddUTP). La información acerca de las secuencias DRB2, fue obtenida del 12th Internacional Histocompatibility Workshop.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los pacientes tuvieron diagnóstico de esclerosis múltiple, tanto clínico como por imagen de resonancia magnética, realizado por médicos neurólogos de hospitales de tercer nivel (IMSS siglo XXI).

Se estudiaron 6 mujeres y 2 hombres, todos pertenecientes al nivel socioeconómico medio. Ninguno tuvo antecedentes familiares de EM.

Cinco de los pacientes nacieron en México, DF, uno en Querétaro, otro en Guadalajara, Jal y el último en Chihuahua, Chih, pero todos tuvieron más de dos décadas de residir en Querétaro, con una media de 28.5 años (18-40 años).

Cuatro de los pacientes refieren tener ascendencia española, 1 de ellos refiere un abuelo austriaco y los otros tres ignoran si tuvieron o no ascendencia extranjera. Ninguno de ellos refiere haber realizado un viaje durante su infancia a países de alta prevalencia, o haber vivido en el extranjero.

La escolaridad de la mayoría es la educación media superior, y sólo un paciente tiene licenciatura.

En cuanto a las características generales de la enfermedad, cabe mencionar que la media de edad de inicio fue de 29.3 años (20-49), todos iniciaron con el patrón RR, es decir por la presentación de brotes cíclicos con remisiones. Cinco han evolucionado a la fase secundaria progresiva, han dejado de aparecer los brotes, pero están presentando un deterioro motor lento, pero progresivo

Ver cuadro 4.1.

**Cuadro 4.1. Características Descriptivas de los Pacientes de Estudio**

No.	Edad	Género	Nivel SE	Escolaridad	Nac	Viven Qro.	Antec EM
1	51	M	M	EMS	DF	30	No
2	42	F	MB	Secundaria	Qro.	42	No
3	60	M	M	Licenciatura	DF	35	No
4	40	F	MA	EMS	DF	20	No
5	46	F	M	Comercio	DF	23	No
6	37	F	MB	EMS	Jal	18	No
7	34	F	MB	EMS	Chih	20	No
8	60	F	MA	EMS	DF	40	No
Media	46					28.5	

M = masculino

F = femenino

SE = socioeconómico

Nac = lugar de nacimiento

Viven Qro = tiempo de residir en Querétaro, en años

Antec EM = antecedentes familiares de esclerosis múltiple

EMS = educación media superior

D.F. = Distrito Federal

Qro. = Querétaro

Jal = Jalisco

Chih = Chihuahua

En cuanto a la escala de discapacidad de Kurtzke (anexo 5), observamos a dos pacientes confinados a silla de ruedas, otro de ellos se encuentra esencialmente restringido a una silla de ruedas pero capaz de movilizarse por sí solo en ella y puede entrar y salir de la silla sin asistencia. Dos más requieren asistencia para caminar (uno de ellos bastón y el otro andadera), otros dos presentan moderada incapacidad, ya que son capaces de caminar sin ayuda y llevar a cabo sus actividades diarias, únicamente alguna monoparesia en un miembro superior, y por último una sola paciente tiene incapacidad mínima.

Los antígenos HLA clase I no se han relacionado con la susceptibilidad a la EM. Estos antígenos son marcadores de población, es por eso que observamos tanta heterogeneidad en los resultados obtenidos. Los antígenos HLA clase I A1, A2, A3, B7, B44, son los antígenos más frecuentemente observados en mestizos mexicanos sanos (Gorodezky, 1986). En estos casos, observamos alguno de estos antígenos en 7 de los 8 pacientes.

En lo concerniente a los antígenos de histocompatibilidad clase II, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 2, observándose que sólo dos de los ocho pacientes portan el antígeno DR15.

Los alelos más frecuentes en individuos mestizos mexicanos sanos son el DR9, DR7 y DR4 (Alvarado de la Barrera, 2000). Sin embargo, en nuestros casos número 2, 6 y 7 los presentan en homocigosis, lo cual no es normal.

De los ocho pacientes estudiados, se encontraron los haplotipos más característicos en la EM reportados por Alvarado de la Barrera, en dos el DR15 (pacientes 4 y 8) y en otros dos el DR3 (pacientes 1 y 5).

Ver cuadro 4.2.

**Cuadro 4.2. Resultados observados en los pacientes respecto a la enfermedad.**

No.	Edad inicio	Tiempo enfermo	Curso clínico	Fase de la enfermedad	SSDK	HLA-I*	HLA-II
1	43	8	RR	SP	3	A2, A29 B18, B35	DR3 DR6
2	21	21	RR	SP	7	A2, A32 B57, B40	DR8 DR8
3	30	30	RR	SP	8	A2, A29 B44, B50	DR7 DR3
4	21	19	RR	RR	6	A29, A31 B35, B8	DR1 <b>DR15</b>
5	30	16	RR	SP	3	A2, A11 B49,	DR13 DR3
6	21	16	RR	RR	2	A2, A3 B7, B53	DR8 DR8
7	20	14	RR	RR	6	A3, A32 B7, B60	DR7 DR7
8	49	11	RR	SP	8	A25, A1 B39, B60	DR8 <b>DR15</b>
Medias	29.3	16.8					

HLA = antígenos leucocitarios humanos

SSDK = Escala de Discapacidad de Kurtzke (anexo 5)

RR = remisión-exacerbación

SP = secundaria progresiva

\* Es importante señalar, que obtuvieron otros antígenos de histocompatibilidad de interés, con la finalidad de conocer los haplotipos de la población, ya que estos antígenos no se relacionan con la susceptibilidad a la EM.

## DISCUSIÓN

La causa de la EM no es bien comprendida. Sin embargo, muchas investigaciones apoyan la evidencia de la importancia que tienen los factores genéticos en la susceptibilidad a dicha enfermedad. Primero, las diferencias en la prevalencia de la EM, se observan entre los diferentes grupos étnicos que residen bajo el mismo ambiente. Segundo, el riesgo de que los familiares en primer grado desarrollen EM es de 3% a 5%, lo cual equivale a 30 a 50 veces el riesgo para la población general. Tercero, los estudios en gemelos en múltiples poblaciones indican un promedio de concordancia de 31% en gemelos monocigóticos y de 5% en gemelos dicigóticos.

Los individuos mestizos mexicanos, tienen una proporción del 56% de genes de Indios Nativos Americanos, 40% de genes blancos y 4% de genes afroamericanos. (Alvarado de la Barrera, 2000). La EM ha aumentado en la población mexicana, ya que de ser una enfermedad aparentemente rara en los 1970s pasó a una causa frecuente de admisión en el servicio de neurología en los 1990s (González, 1995). De ahí que los antígenos HLA clase II se estudiaran en estos pacientes con la finalidad de tratar de elucidar los factores genéticos detrás de esta enfermedad.

Los hallazgos clínicos característicos encontrados en estos pacientes, concuerdan con los reportados en los grupos caucásicos. El promedio de la edad de inicio de estos pacientes, es semejante a la reportada en la literatura internacional, siendo también más frecuente en mujeres, cuyas manifestaciones clínicas corresponden a las encontradas en países con alta prevalencia.

Otros autores han relacionado al medio ambiente urbano-industrializado con la EM, lo cual coincide en este estudio, ya que ninguno de estos pacientes tiene historia familiar de EM, por lo que creemos que el número de nuevos casos aumenta cada año.

Los haplotipos encontrados por Alvarado de la Barrera en pacientes mestizos mexicanos más característicos fueron el DR2 y el DR3, así los encontramos en 4 de los ocho pacientes, sin embargo, estos haplotipos se presentan en una proporción consistentemente baja en la población general mexicana, lo cual sugiere que los alelos antes mencionados, fueron adquiridos por la mezcla con poblaciones blancas. De hecho 5 de nuestros casos refieren abuelos blancos.

Además, en varias enfermedades autoinmunes en pacientes blancos y mexicanos, se ha encontrado una asociación con el antígeno HLA-DR3 (Granados, 1986), el cual encontramos en dos de nuestros casos.

Creemos que va a seguir aumentando la prevalencia de la enfermedad, principalmente en aquellas ciudades en donde la inmigración es grande y por tanto el riesgo de mezcla aumenta. Por ejemplo, Durango, es un estado que tiene muy poca afluencia de extranjeros por no ser una ciudad industrial importante, sin embargo, estados como Querétaro, en el cual hay un gran número de industrias extranjeras, provoca que lleguen extranjeros a trabajar en ellas, por tanto está en gran riesgo de aumentar su prevalencia de EM al producirse la mezcla con poblaciones blancas.

Otro hallazgo interesante, es el estudio publicado por Hegert y cols en 1996, sobre la susceptibilidad a la EM relacionada con los antígenos HLA-II en Islandia. Refieren el haplotipo DR13 en ausencia de DR2 como un factor protector de la EM, sin embargo, uno de los casos de este estudio presenta haplotipo DR13. En este mismo estudio encuentran al haplotipo DR7 como un factor protector, incluso más que el DR13, y en el presente estudio se observaron dos casos con haplotipo DR7 (uno en homocigosis). Si bien ambas poblaciones no son comparables, ya que las condiciones geográficas y étnicas son diferentes, el estudio de pacientes con EM en diferentes condiciones geográficas y étnicas puede ayudar a la identificación de factores pronósticos, que de otra manera no podrían ser reconocidos cuando se estudian los pacientes con EM como un todo.

Estoy consciente de que el pequeño grupo de pacientes no permite llegar a conclusiones definitivas. Únicamente el seguimiento de los pacientes estudiados, permitirá observar si el alelo DR15 define a un subgrupo con EM severa o si presentan un curso clínico peculiar, y de ahí que pueda tomarse como un factor pronóstico, al menos en México.

Debido a los numerosos genes candidatos de la susceptibilidad a la EM que aún no han sido examinados, el continuo estudio de ellos será una tarea monumental. La esperanza es que esos resultados puedan dirigir en el futuro nuevos genes candidatos de estudio. Esto mejorará al perfeccionar la metodología en el análisis de ligamiento y métodos de asociación para utilizarse en la persona afectada y sus familiares (desequilibrio de transmisión), lo cual conducirá a resultados definitivos en el futuro.

Espero que pronto se descubra un tratamiento, que logre impedir la incapacidad provocada por esta enfermedad y así mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

## LITERATURA CITADA

- Alvarado-de la Barrera C, Zúñiga-Ramos J, Ruiz-Morales JA, Estañol B, Granados J, Llorente L. 2000. HLA class II genotypes in Mexican Mestizos with familial and nonfamilial multiple sclerosis. *Neurology*. 55(12):1897-900
- Anderson DW, Ellenberg JH, and Leventhal CM. 1992. Revised estimate of the prevalence of multiple sclerosis in the United States. *Ann Neurol*. 31:333-6.
- Boiko A, Vorobeychik G, Paty D, Devonshire V, Sadovnick D. 2002. Early onset multiple sclerosis: a longitudinal study. *Neurology* 59(7):1006-10
- Buntinx M, Stinissen P, Steels P, Ameloot M, Raus J. 2002. Immune-mediated oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Crit Rev Immunol*. 22(5&6):391-424.
- Compston A. 1992. Reviewing multiple sclerosis. *Postgrad Med J*. 68:507-516.
- Compston A, Coles A. 2002. Multiple sclerosis. *Lancet*. 360(9333): 1221-31
- Confavreux C, Vukusic S. 2002. Natural history of multiple sclerosis: implications for counselling and therapy. *Curr Opin Neurol*. 15(3):257-266.
- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. 2000. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343(20):1430-38
- Dyment D, Ebers G, Dessa Sadovnick A. 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3(2):104
- French-Constant, C. 1994. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Lancet*. 343:271-76

- Frohman E, Goodin D, Calabresi P, Corboy J, Coyle P, Filippi M. 2003. The utility of MRI in suspected MS. *Neurology*. 61(5): 602-11
- Frohman E. 2003. Multiple sclerosis. *Med Clin of North America*. 87(4):867-97.
- González O, Sotelo J. 1995. Is the frequency of multiple sclerosis increasing in Mexico?. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59:528-30.
- Gorodezky C, Nájera R, Rangel B, Castro L, Flores J, Granados J, et al. 1986. Immunogenetic profile of multiple sclerosis in mexicans. *Hum Immunol* 16:364-74
- Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F, Melín-Aldana H, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. 1986. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. *Lupus Hum Immunol*. 5:184-189.
- Hafler A. 2004. Multiple sclerosis. *Clin Invest*. 113:788-794
- Halfpenny C, Benn T, Scolding N. 2002. Cell transplantation, myelin repair, and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 1(1):31-40
- Hawker K, Frohman E. 2004. Multiple sclerosis. *Prim Care*. 31(1):201-20
- Hemmer B, Archelos J, Hartung H. 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3(4): 291-301
- Hensiek A, Sawcer S, Feakes R, Deans J, Mander A, Akesson E, et al. 2002 HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis - *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72(2): 184-7

- Hernández M. 2000. Epidemiología de la Esclerosis Múltiple. Controversias y realidades. *Rev Neurol.* 30(10):959-64
- Hogancamp, W, Rodríguez M, Weinshenker B. 1997. Identification of Multiple Sclerosis-Associated Genes. *Mayo Clin Proc.* 72(10):965-76
- Kurtzke JF. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology (Cleveland).* 33: 1444-1452.
- Lublin F, Reingold, S. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology.* 46(4):907-11
- Lucchinetti C, Rodríguez M. 1997. The Controversy Surrounding the Pathogenesis of the Multiple Sclerosis Lesion [Symposium On Multiple Sclerosis-Part I]. *Mayo Clin Proc.* 72(7):665-78
- Martino G, Hartung HP. 1999. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr Opin Neurol* 12:309-21
- McDonald W, Compston A, Edan G, Hangtung H, Lublin F, McFarland H, Paty D, Polman C, Reingold S, Sandberg-Wolheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S. 2001. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: *Ann Neurol.* 50:121-7
- Noseworthy J, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 343:938-52.
- O'Connor P, 2002. Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. An overview. *Neurology.* 59(Suppl 6):S1-33

- Ohashi T, Yamamura T, Inobe J, Kondo J, Kunishita T, Tabira T. 1995. Analysis of proteolipids protein (PLP)-specific Tcells in multiple sclerosis: identification of PLP95-116 as an HLA-DR2-w15-associated determinant. *Int Immunol* 7 (11): 1771-8.
- Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R 1993. Assessment Of MRI Criteria For A Diagnosis Of MS. *Neurology*. 43:905-09
- Poser C, Paty D, Scheinberg L, McDonald W, Davis F, Ebers G, et al.1983. New Diagnostic Criteria For Multiple Sclerosis; Guidelines For Research Protocols. *Ann Neurol*. 13(3):227-31
- Prat E, Martin R. 2002. The immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Reh Res Dev*. 39(2):187-200
- Racke MK, Ratts R, Arredondo L, Perrin PJ, Lovett-Racke A. 2000. The role of costimulation in autoimmune demyelination. *J Neuroimmunol*. 107(2): 205-15
- Rolak LA. 2001. Multiple sclerosis treatment 2001. *Neurol Clin*. 19(1): 107-18.
- Shumacher G, Beebe G, Kibler R, Kurland L, Kurtzke J, McDowell F, Nagler B, Sibley W, Tourtellotte W, Willmon T .1965. Problems of experimental trials of therapy in MS: Report by the Panel on the evaluation of experimental trials of therapy in MS *Ann NY Acad Sci*. 122: 552-68.
- Slavin A, Soos J, Stuve O, Patarroyo J, Weiner H, Fontana A, Bikoff E, Zamvil S. 2001. Requirement for endocytic antigen processing and influence of invariant chain and H-2M deficiencies in CNS autoimmunity. *J Clin Inv* 108(8): 1133-1139.

Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Sastre-Garriga J, et al. 2003. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. *Neurology*. 60(1):27-30

Weinshenker BG, Bass B, and Rice GPA. 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. Predictive value of the early clinical course. *Brain*. 112:1419-28.

Wucherpfennig K. 2001. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents *J Clin Inv* 108(8):1097-1104

# APÉNDICE

## **Anexo 1.**

### **Criterios diagnósticos de la EM**

#### **Criterios de Shumacher (1965)**

##### **A. EM definida clínicamente**

1. Signos objetivos de disfunción del sistema nervioso central (SNC).
2. Los signos y síntomas neurológicos implican a la sustancia blanca del SNC.
3. Daño predominantemente en la sustancia blanca.
4. Diseminación en el tiempo, establecido por:
  - a. Dos o más episodios por al menos 24 horas de separación en el último mes.
  - b. Progresión en los últimos seis meses.
5. 5. Diseminación en espacio: Evidencia de daño en dos o más sitios del SNC.
6. Edad de inicio: entre los 10 y 50 años.
7. Diagnosticado por un neurólogo; los signos y síntomas no pueden ser explicados por otra enfermedad.

Fuente: Shumacher G, Beebe G, Kibler R, Kurland L, Kurtzke J, McDowell F, Nagler B, Sibley W, Tourtellotte W, Willmon T .1965. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* .122: 552

## **Anexo 2.**

### **Criterios de Poser (1983)**

#### **A. EM definida clínicamente**

- 1.- Dos brotes y evidencia clínica de dos lesiones separadas.
- 2.- Dos brotes y evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión separada.

#### **B. EM definida apoyada por laboratorio**

- 1.- Dos brotes, evidencia de una lesión clínica o paraclínica y LCR: BO/IgG
- 2.- Un brote, evidencia clínica de dos lesiones separadas y LCR: BO/IgG
- 3.- Un brote, evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión separada y LCR: BO/IgG

#### **C. Probable clínicamente**

- 1.- Dos brotes, evidencia clínica de una lesión
- 2.- Un brote y evidencia clínica de dos lesiones separadas.
- 3.- Un brote, evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión separada.

#### **D. Probable apoyada por laboratorio**

- 1.- Dos brotes y LCR: BO/IgG.

NOTA: paraclínica= potenciales evocados, TAC o MRI; al menos 2 bandas oligoclonales (BO), ninguna en suero.

Fuente: Poser C, Paty D, Scheinberg L, McDonald W, Davis F, Ebers G, et al.1983. "New Diagnostic Criteria For Multiple Sclerosis; Guidelines For Research Protocols" *Ann Neurol* 1983; 13(3):227-31

### **Anexo 3.**

#### **Criterios de Paty (RMN)**

1.- Fuertemente sugestiva

- A. Cuatro lesiones (mayor de 3mm) o
- B. Tres lesiones (una periventricular)

2.- Sugestiva

- A. Tres lesiones o
- B. Dos lesiones (una periventricular)

3.- Probablemente sugestiva

- A. Dos lesiones o
- B. Una periventricular

#### **Criterios de Fazekas (RMN)**

(Dos de los tres criterios)

1. Lesión mayor o igual de 6 mm
2. Lesión (s) periventricular (s)
3. Lesión (s) infratentorial (s)

Fuente: Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R et al. "Assessment Of MRI Criteria For A Diagnosis Of MS" Neurology 1993; 43:905-909)

## Anexo 4.

### Criterios de McDonald et al.

<b>Presentación clínica</b>	<b>Datos adicionales necesarios para el diagnóstico de EM</b>
2 o más ataques y evidencia objetiva clínica de 2 o más lesiones	Ninguna
2 o más ataques y evidencia objetiva clínica de 1 lesión	Diseminación en espacio basada en MRI; o 2 o más lesiones consistentes con EM y LCR positivo o Await clinical attack implicando un sitio diferente
1 ataque y evidencia clínica objetiva de 2 o más lesiones.	Diseminación en espacio sobre MRI o un segundo ataque clínico
1 ataque y evidencia clínica objetiva de 1 lesión.	1. Diseminación en espacio sobre MRI; o LCR positivo con 2 o más lesiones en MRI consistentes con EM y, 2. Diseminación en tiempo sobre MRI; o un segundo ataque clínico.
<p>Progresión neurológica insidiosa.</p> <p>Nota: LCR positivo = presencia de bandas oligoclonales de IgG bandas diferentes de cualquiera de las bandas séricas de anticuerpos o presencia de un índice elevado de IgG. VEP anormales pueden aportar información adicional a la obtenida por el examen clínico para aportar evidencia objetiva de una lesión secundaria (muestra la lesión expresada únicamente clínicamente que no afectó el campo visual). Otros tipos de VEP contribuyen muy poco al Dx de EM.</p>	<p>1. LCR positivo en progresión y</p> <p>2. Diseminación en espacio por MRI con 9 o más lesiones T2 lesiones o 2 o más lesiones en médula espinal o 4-8 lesiones cerebrales + 1 lesión en médula espinal, o VEP anormal con 4-8 lesiones cerebrales, o &lt;4 lesiones cerebrales + 1 lesión en medula espinal con VEP anormal y</p> <p>3. Diseminación en tiempo con MRI o progresión continua por 1 año.</p>

VEP = Potenciales evocados  
MRI = Resonancia magnética  
LCR = Líquido cefalorraquídeo

Fuente: McDonald W, Compston A, Edan G, Hangtung H, Lublin F, McFarland H, Paty D, Polman C, Reingold S, Sandberg-Wolheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S. 2001. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: *Ann Neurol.* 50:121-7

**Anexo 5.**

<b>Multiple Sclerosis Kurtzke disability status scale*</b>	
Nombre: _____	
Fecha: _____	
1	Sin incapacidad & signos neurológicos mínimos
2	Incapacidad mínima – ligera debilidad o entumecimiento, ligera alteración de la vejiga o ligera alteración visual.
3	Moderada incapacidad - monoparesis (parálisis parcial o incompleta, parálisis que afecta una o parte de una extremidad) ligera hemiparesis (pequeña parálisis que afecta a una parte del cuerpo), moderada ataxia, alteración de la sensibilidad sensorial, síntomas urinarios importantes o visuales o una disfunción combinada.
4	Relativamente discapacidad severa, pero deambula totalmente sin ayuda, autosuficiente y capaz de estar levantado por cerca de 12 horas, no impide la capacidad de trabajar o de llevar a cabo sus actividades diarias normales, excluyendo la disfunción sexual
5	La discapacidad es lo suficientemente severa para impedir trabajar, la función motora involucra caminar sin ayuda más de 500 metros
6	Necesita asistencia para caminar, por ejemplo, un bastón, muletas o andadera.
7	Esencialmente restringido a una silla de ruedas pero capaz de movilizarse por sí solo en ella y puede entrar y salir de la silla sin asistencia
8	Esencialmente restringido a una cama o silla, conserva muchas funciones de autocuidado y tiene uso efectivo de sus brazos.
9	Incapacitado y confinado a una cama. Puede comunicarse y comer
10	Muerte debido a EM – ocurre por parálisis respiratoria, coma de origen incierto o por crisis epilépticas repetidas o prolongadas.

- Utilizada en este estudio

## Anexo 6.

### Expanded Disability Status Scale (EDSS) de Kurtzke

---

Kurtzke JF. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* (Cleveland). 33: 1444-1452.

Escala EDSS de Kurtzke: criterios de puntuación

Escala Funcional (FS)

#### Piramidal

- 1. normal.
- 2. signos anormales sin incapacidad.
- 3. incapacidad mínima.
- 4. paraparesia o hemiparesia leve o moderada. Monoparesia grave.
- 5. paraparesia o hemiparesia grave. Monoplejía o cuadriparesia moderada.
- 6. paraplejía o hemiplejía. Cuadriparesia intensa.
- 7. cuadriplejía.

#### Cerebelo

- 1. Normal.
- 2. Signos anormales sin incapacidad.
- 3. Ligera ataxia.
- 4. Moderada ataxia de los miembros o del tronco.
- 5. Ataxia intensa de todas las extremidades.
- 6. Incapaz de realizar movimientos coordinados por ataxia.

+. añadir tras cada puntuación en caso de debilidad grado 3 que dificulte la prueba.

#### Tronco del encéfalo

- 1. Normal.
- 2. Sólomente signos.
- 3. Nistagmus moderado o cualquier otro tipo de incapacidad.
- 4. Nistagmus intenso, parálisis extraocular intensa o moderada incapacidad por otros pares.
- 5. Disartria intensa o cualquier otro tipo de incapacidad.
- 6. Incapacidad para tragar o hablar.

## Sensibilidad

- 1. Normal.
- 2. Alteración de la vibratoria o grafestesia en una o dos extremidades.
- 3. Disminución ligera de la sensibilidad táctil o dolorosa, o de la posicional y/o disminución ligera de la vibratoria en uno o dos miembros o vibratoria (o grafestesia) en 3 o 4 miembros.
- 4. Id. moderada, incluida alteración propioceptiva en 3 ó 4 miembros.
- 5. Id. intensa, o bien grave alteración propioceptiva en más de 2 miembros.
- 6. Pérdida de la sensibilidad en una o dos extremidades o bien disminución del tacto o dolor y/o pérdida del sentido posicional en más de dos miembros.
- 7. Pérdida de sensibilidad prácticamente total por debajo de la cabeza.

Vejiga e intestino (Redefinición de Goodkin et al. Neurology 1992; 42: 859-863).

Instrucciones: Añada un punto más en la puntuación de 1-4 vesical si se usa autocateterismo vesical. Puntúe la situación peor del modo siguiente:

- Vejiga
  - 1. función normal.
  - 2. ligero titubeo, urgencia o retención.
  - 3. moderado titubeo, urgencia o retención tanto del intestino como de la vejiga, o incontinencia urinaria poco frecuente.
  - 4. incontinencia > semanal.
  - 5. incontinencia < semanal.
  - 6. incontinencia diaria.
  - 7. catéter vesical.
- Intestino
  - 1. función normal.
  - 2. estreñimiento de < diario, sin incontinencia.
  - 3. estreñimiento de menos de a diario pero no incontinencia.
  - 4. incontinencia > semanal.
  - 5. incontinencia < semanal pero no a diario.
  - 6. ningún control intestinal.
  - 7. grado 5 intestinal más grado 5 de disfunción vesical.

## Visión

- 1. normal.
- 2. escotoma con agudeza visual (corregida) superior a 20/30.
- 3. el ojo que está peor con un escotoma tiene de agudeza entre 30/30 y 20/59.
- 4. El ojo peor (por escotoma o alteración de campo) con agudeza máxima entre 20/60 y 20/99.

- 5. id. entre 20/100 y 20/200; igual un grado 3 más máxima agudeza en el mejor ojo de 20/60 o inferior.
- 6. id. en el ojo peor con agudeza inferior a 20/200; o bien grado 4 más máxima agudeza en el ojo mejor de 20/60 o menos.
- 7. +. añadir tras la puntuación en los grados 0-5 si existe palidez temporal.

### Funciones mentales

- 1. normal.
- 2. alteración del estado de ánimo únicamente (no afecta a la puntuación EDSS).
- 3. ligera alteración cognitiva.
- 4. moderada alteración cognitiva.
- 5. marcada alteración cognitiva.
- 6. demencia o síndrome cerebral crónico.

### **Expanded Disability Status Scale (EDSS)**

<b>Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS)</b>	
<b>Puntuación</b>	<b>Status</b>
0	Examen neurológico normal (todos los ítems de FS son de cero).
1.0	Ninguna incapacidad pero signos mínimos solamente en un apartado de la FS.
1.5	Ninguna incapacidad pero signos mínimos en más de un apartado de la FS
2.0	Incapacidad mínima en un apartado de la FS (al menos uno con puntuación de 2).
2.5	Incapacidad mínima (dos apartados de la FS puntuando 2).
3.0	Incapacidad moderada en un FS (un FS puntúa 3 pero los otros entre 0 y 1). El paciente deambula sin dificultad
3.5	Deambula sin limitaciones pero tiene moderada incapacidad en una FS (una tiene un grado 3) o bien tiene una o dos FS que puntúan un grado 2 o bien dos FS puntúan un grado 3 o bien 5 FS tienen un grado 2 aunque el resto estén entre 0 y 1.
4.0	Deambula sin limitaciones, es autosuficiente, y se mueve de un lado para otro alrededor de 12 horas por día pese a una incapacidad relativamente importante de acuerdo con un grado 4 en una FS (las restantes entre 0 y 1). Capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.
4.5	Deambula plenamente sin ayuda, va de un lado para otro gran parte del día, capaz de trabajar un día completo, pero tiene ciertas limitaciones para una actividad plena, o bien requiere un mínimo de ayuda. El paciente tiene una incapacidad relativamente importante, por lo general con un apartado de FS de grado 4 (los restantes entre 0 y 1) o bien una combinación alta de los demás apartados. Es capaz de caminar sin ayuda ni descanso alrededor de 300 metros.

5.0	Camina sin ayuda o descanso en torno a unos 200 metros; su incapacidad es suficiente para afectarle en funciones de la vida diaria, v.g. trabajar todo el día sin medidas especiales. Los equivalentes FS habituales son uno de grado 5 solamente, los otros entre 0 y 1 o bien combinaciones de grados inferiores por lo general superiores a un grado 4.
5.5	camina sin ayuda o descanso por espacio de unos 100 metros; la incapacidad es lo suficientemente grave como para impedirle plenamente las actividades de la vida diaria. El equivalente FS habitual es de un solo grado 5, otros de 0 a 1, o bien una combinación de grados inferiores por encima del nivel 4.
6.0	Requiere ayuda constante, bien unilateral o de forma intermitente (bastón, muleta o abrazadera) para caminar en torno a 100 metros, sin o con descanso. Los equivalentes FS representan combinaciones con más de dos FS de grado 3.
6.5	Ayuda bilateral constante (bastones, muletas o abrazaderas) para caminar unos 20 metros sin descanso. El FS habitual equivale a combinaciones con más de dos FS de grado 3+.
7.0	Incapaz de caminar más de unos pasos, incluso con ayuda, básicamente confinado a silla de ruedas y posibilidad de trasladarse de ésta a otro lugar, o puede manejarse para ir al lavabo durante 12 horas al día. El equivalente FS habitual son combinaciones de dos o más de un FS de grado 4+. Muy raramente síndrome piramidal grado 5 solamente.
7.5	Incapaz de caminar más de unos pasos. Limitado a silla de ruedas. Puede necesitar ayuda para salir de ella. No puede impulsarse en una silla normal pudiendo requerir un vehículo motorizado. El equivalente FS habitual son combinaciones con más de un FS de grado 4+.
8.0	básicamente limitado a la cama o a una silla, aunque puede dar alguna vuelta en la silla de ruedas, puede mantenerse fuera de la cama gran parte del día y es capaz de realizar gran parte de las actividades de la vida diaria. Generalmente usa con eficacia los brazos. El equivalente FS habitual es una combinación de varios sistemas en grado 4.
8.5	Básicamente confinado en cama la mayor parte del día, tiene un cierto uso útil de uno o ambos brazos, capaz de realizar algunas actividades propias. El FS habitual equivale a combinaciones diversas generalmente de una grado 4+.
9.0	Paciente inválido en cama, puede comunicarse y comer. El equivalente FS habitual son combinaciones de un grado 4+ para la mayor parte de los apartados.
9.5	totalmente inválido en cama, incapaz de comunicarse o bien comer o tragar. El equivalente FS habitualmente son combinaciones de casi todas las funciones en grado 4+.
10.0	Muerte por esclerosis múltiple.

## **Anexo 7.**

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método rápido y simple para copiar y amplificar secuencias específicas de ADN de hasta 1 kilobase de longitud. Para utilizar este método es necesario conocer la secuencia de una porción corta de ADN en cada extremo de la secuencia grande que se quiere copiar. Estas secuencias cortas se utilizan para especificar sondas de oligonucleótidos. El método consiste en realizar ciclos repetidos de fundido de las cadenas de ADN, templado del ADN y síntesis del ADN. El ADN de doble cadena que contiene la secuencia que se va a copiar y amplificar se mezcla con un gran exceso molar de dos oligonucleótidos de ADN de cadena simple (los cebadores). El primer cebador es idéntico al extremo 5' de la cadena en sentido 5'-3' del ADN que se va a copiar, y el segundo cebador es idéntico al extremo 3' de la cadena de ADN en sentido 3'-5' (antisentido). (Como la doble cadena de ADN es antiparalela, el segundo cebador es también el complemento invertido de la cadena en sentido 5'-3').

La reacción de la polimerasa se inicia separando la doble cadena de ADN a la temperatura de 95°C y enfriando la mezcla para permitir la unión del ADN. Durante la separación, el primer cebador (presente en gran exceso molar) se hibridará con el extremo 3' de la cadena 5'-3'. La mezcla templada se incuba con la ADN polimerasa I y los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (A, T, G y C), permitiendo así la síntesis de un nuevo ADN. La ADN polimerasa I extenderá el extremo 3' de cada cebador unido, sintetizándose así una cadena complementaria a la cadena simple de ADN templado. Específicamente, la cadena original en sentido 5'-3' se utiliza para formar una nueva cadena en sentido contrario, y viceversa. Con esto termina el ciclo 1. El ciclo 2 se inicia cuando la mezcla se refunde y se permite que se una de nuevo con los cebadores. En el paso de síntesis de ADN en el segundo ciclo, cada cadena sintetizada en el primer ciclo sirve como una plantilla adicional, tras hibridarse con los cebadores adecuados. (De esto se deriva que el número de plantillas en la reacción se duplica en cada ciclo, de ahí el nombre de "reacción en cadena"). El segundo ciclo

se completa cuando la ADN polimerasa I extiende los cebadores para sintetizar el complemento de las plantillas. Las reacciones de PCR deben hacerse durante 20 o más ciclos doblando las secuencias flanqueadas por los cebadores en cada paso. Estas reacciones habitualmente se automatizan utilizando controladores cíclicos de temperatura para regular la separación, la unión y la síntesis de ADN, y empleando la enzima ADN polimerasa I aislada de bacterias termoestables que pueden soportar las temperaturas utilizadas para separar el ADN.

La PCR tiene muchas utilidades. En este caso, se eligieron los primers adecuados, se amplificó el exón 2 de un alelo HLA-DR $\beta$  desconocido (es decir, el exón que codifica el dominio  $\beta$ 1 polimórfico).