



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis doctoral

2016

Estudio del papel de los genes *perforin 1* (*PRF1*), *caspase 8* (*CASP8*) y *B-cell translocation gene 1* (*BTG1*) en esclerosis múltiple

Montserrat Camiña Tato

Servei de Neurologia-Neuroimmunologia. Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat). Institut de Recerca Vall d' Hebron (VHIR). Hospital Universitari Vall d' Hebron.

Programa Doctorat en Medicina. Departament de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

Estudio del papel de los genes *perforin 1* (PRF1), *caspase 8* (CASP8) y *B-cell translocation gene 1* (BTG1) en esclerosis múltiple.

Montserrat Camiña Tato

Directores:

Xavier Montalban Gairín

Manuel Comabella López

Tutor:

Miquel Vilardell i Tarrés



Tesis doctoral

Barcelona 2016

Los directores **Dr. Manuel Comabella López** y el **Dr. Xavier Montalban Gairín**
y el tutor **Miquel Vilardell i Tarrés**,

Cerfican:

Que el trabajo experimental y la redacción de la memoria de la Tesis Doctoral
“Estudio del papel de los genes perforin 1 (PRF1), caspase 8 (CASP8) y B-cell
translocation gene 1 (BTG1) en esclerosis múltiple” han sido realizados por
Montserrat Camiña Tato bajo su dirección y consideran que es apta para ser
presentada para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de
Barcelona

Barcelona, 5 de septiembre de 2016

Dr. Manuel Comabella López

Dr. Xavier Montalban Gairín

Dr. Miquel Vilardell i Tarrés

Dña. Montserrat Camiña Tato

“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican”.

Severo Ochoa

AGRADECIMIENTOS

Estos agradecimientos van dirigidos a todas aquellas personas que me han ayudado y han estado a mi lado durante la realización y la redacción de este trabajo. Gracias a todos ellos por hacer posible esta tesis.

En primer lugar, a Xavier Montalban y Manuel Comabella, mis directores, gracias por vuestra confianza en mi trabajo, vuestros consejos y ayuda. Gracias por permitirme obtener, no sólo una amplia visión del mundo de la investigación, sino también conocimiento sobre cómo realizar un buen trabajo en equipo.

Mis agradecimientos también a mis compañeros de laboratorio, en especial a Silvia, Eva y María José por hacer más fácil mi estancia en Barcelona, por los cafés, las comidas, las excursiones por Catalunya y, sobre todo, por vuestra amistad. También a Mireia, Hammad, Robert, Cristina, Carmen, Roland, Mireia Sospedra y Zoraida por vuestra ayuda y por todos los buenos momentos compartidos.

Mis agradecimientos al equipo de neurólogos de la unidad, entre ellos a Mar, Jordi, Carlos y Carmen, por compartir sus conocimientos conmigo y por ayudarme a seleccionar a los pacientes y controles más adecuados para esta tesis.

Gracias también al personal del hospital de día, sobre todo a Rosalía, María José y Mila, y al personal de gestión, Josep y Dunia, por su trabajo constante, a veces no tan visible, pero de elevada importancia.

Quiero mostrar también mi agradecimiento a mis actuales compañeros de trabajo en el Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento de la Universidade de Santiago de Compostela, José Luis, Alberto, José Manuel, Susana, Carou, Eva, Fernando, Iria, Lydia, Bea, Diego, Patricia, Loli, Ramón y Manel, por permitirme trabajar en el maravilloso mundo de la transferencia de resultados de la investigación a la sociedad, por sufrirme en esta última etapa de mi tesis y por los buenos momentos compartidos a diario.

Y también a Rosa y a Mónica de UNINOVA, por los cafés de media mañana acompañados de buenas conversaciones.

Gracias también a mis amigas Sonia, Ana, Verónica, Raquel, Montse y Libe-Ane por estar siempre cerca.

Gracias también a toda mi familia, en especial a mi hermano Carlos, por todo el apoyo y cariño que me habéis dado siempre.

Quiero agradecer enormemente a mis padres, Elsa y Baldomero, todo el amor, cariño, apoyo y ayuda que me han dado a lo largo de mi vida, así como todo el esfuerzo que han realizado para que pudiera estudiar y desarrollarme personal y profesionalmente. Muchísimas gracias a los dos por enseñarme a no rendirme nunca.

Por último, quisiera mostrar mis más cariñosos y afectuosos agradecimientos a las tres personas que comparten conmigo mi día a día. Gracias Jose por estar a mi lado, por tu ayuda y tu paciencia, por apoyarme siempre y por haberme dado la oportunidad de formar una familia a tu lado.

Gracias Claudia y Estela por sonreír y hacerme sonreír, sois el mejor regalo que me ha hecho la vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANZgene	<i>Australia and New Zealand MS Genetics Consortium</i>
ARNm	ARN mensajero
BOC	Bandas oligoclonales
BTG1	<i>B-cell translocation gene 1</i>
CASP	Caspasa
CIS	Síndrome clínicamente aislado
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DE	Desviación estándar
EAE	Encefalomiелitis alérgica experimental
EBV	Virus de Epstein Barr
EDSS	Escala de discapacidad ampliada de Kurtzke
EM	Esclerosis múltiple
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMRR	Esclerosis múltiple remitente-recurrente
EMRR/SP	Esclerosis múltiple con inicio en brote
EMSP	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAMES	<i>Genetic Analysis of Multiple Sclerosis in Europeans</i>
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
HLA	Complejo mayor de histocompatibilidad
IC 95%	Intervalo de confianza al 95%
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IMSGC	<i>International Multiple Sclerosis Genetics Consortium</i>

LT	Linfotoxina
MSSS	Escala de gravedad de la esclerosis múltiple
NK	<i>Natural Killer</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridinin clorofil proteína
PRF1	Perforina
PHA	Fitohemaglutinina
SNC	Sistema nervioso central
SNPs	Polimorfismos de nucleótido único
TNF	Factor de necrosis tumoral

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1. EM.....	5
1.2. Aspectos clínicos de la EM	6
1.3. Patología e inmunopatología de la EM.....	8
1.3.1. Papel de las células inmunológicas en la EM.....	10
1.3.2. Tipos de placas en la EM	13
1.4. Mecanismos de muerte celular	15
1.4.1. Muerte celular autofágica	15
1.4.2. Necrosis.....	17
1.4.3. Apoptosis.....	19
1.4.4. Apoptosis y EM.....	26
1.5. Factores genéticos en la EM.....	28
1.5.1. Estudios de ligamiento.....	29
1.5.2. GAMES.....	31
1.5.3. Estudios de asociación o estudios de genes candidatos.....	36
1.5.4. GWAS.....	38
1.6. Justificación del estudio	43
1.6.1. El gen PRF1	46
1.6.2. El gen de la CASP8.....	49
1.6.3. El gen BTG1	51
2. HIPÓTESIS	55
3. OBJETIVOS	59
4. MATERIAL Y MÉTODOS	63
4.1. Población del estudio	63
4.1.1. Características clínicas	63
4.2. Extracción de ADN genómico	65
4.3. Selección de SNPs.....	65

4.4.	Genotipado de los SNPs: ensayo de la 5' nucleasa	67
4.4.1.	Introducción a la técnica de discriminación alélica	67
4.5.	Replicación de los resultados obtenidos en poblaciones independientes.....	71
4.6.	Determinación de la expresión génica de BTG1 y CASP8.....	72
4.6.1.	Interpretación de los resultados obtenidos	74
4.7.	Determinación de la expresión génica de PRF1	78
4.8.	Determinación de la expresión de PRF1 en células T CD8 ⁺ y NK mediante citometría de flujo	79
4.9.	Ensayos funcionales de la PRF1	80
4.10.	Detección del genoma del EBV	80
4.11.	Expresión en PBMCs de PRF1 por sexos en condiciones basales e inducidas mediante hormonas sexuales	80
4.12.	Análisis estadístico	81
5.	RESULTADOS	85
5.1.	PRF1.....	85
5.1.1.	Equilibrio de Hardy Weinberg y desequilibrio de ligamiento	85
5.1.2.	Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la población estudiada para el gen de la PRF1	86
5.1.3.	Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas, según la forma clínica de la enfermedad, en la población estudiada para el gen de la PRF1	92
5.1.4.	Distribución de haplotipos en la población estudiada para el gen PRF1.....	102
5.1.5.	Replicación de los resultados obtenidos para el gen de la PRF1 en dos poblaciones independientes.....	110
5.1.6.	Gravedad de la enfermedad y polimorfismos en el estudio de la PRF1.....	113
5.1.7.	Estudio de la expresión génica de PRF1 mediante microarrays	113
5.1.8.	Expresión del gen y de la proteína PRF1 en PBMCs de pacientes de sexo masculino con formas de EMPP	117
5.1.9.	Estudio de la carga viral de EBV en pacientes con EMPP	119
5.1.10.	Estudio de la expresión basal de PRF1 e inducida por hormonas en hombres y mujeres controles	119
5.1.11.	Implicaciones funcionales de los haplotipos de riesgo para PRF1 en pacientes con EMPP.....	120
5.2.	CASP8	121
5.2.1.	Equilibrio de Hardy Weinberg y desequilibrio de ligamiento	121

5.2.2.	Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la población estudiada para el gen CASP8.	122
5.2.3.	Distribución de haplotipos en la población estudiada para el gen CASP8	123
5.2.4.	Gravedad de la enfermedad y polimorfismos de CASP8.....	130
5.2.5.	Estudio de la expresión génica de CASP8 asociada a los haplotipos de riesgo y protector	131
5.3.	BTG1.....	132
5.3.1.	Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	132
5.3.2.	Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la población estudiada para el gen BTG1.....	132
5.3.3.	Distribución de haplotipos en la población estudiada para el gen BTG1.....	136
5.3.4.	Replicación de los resultados obtenidos para el gen BTG1 en una población independiente	138
5.3.5.	Gravedad de la enfermedad y polimorfismos del BTG1	138
5.3.6.	Estudio de la expresión génica de BTG1 asociada a los genotipos del SNP rs731652.....	138
6.	DISCUSIÓN GENERAL	143
6.1.	PRF1 y susceptibilidad a la EM.....	143
6.2.	CASP8 y susceptibilidad a la EM	147
6.3.	BTG1 y susceptibilidad a la EM	149
7.	CONCLUSIONES.....	155
8.	COMENTARIO FINAL	159
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	163
10.	ANEXOS	205

RESUMEN

El estudio de las bases genéticas de las enfermedades es clave para un diagnóstico mejor y más rápido de las patologías así como, para su mejor tratamiento. En los últimos años se han descubierto un gran número de genes que pueden generar susceptibilidad a la EM, sin embargo, hay muchos que aún están pendientes de replicación en otras poblaciones.

El objetivo principal de esta tesis es la confirmación de la participación en la susceptibilidad a padecer EM de tres genes. En concreto se trata de los genes *PRF1*, *CASP8* y *BTG1*.

Tras realizar genotipado de SNPs por discriminación alélica y estudios de expresión mediante *microarrays*, entre otras técnicas, se han obtenido resultados que apuntan a que los tres genes podrían participar de forma moderada en la susceptibilidad a padecer EM.

En el caso del gen *PRF1* se observa una fuerte asociación entre éste y la susceptibilidad a padecer la enfermedad, sobre todo en hombres con formas de EMPP.

Los resultados para el gen *CASP8* muestran asociación entre este gen y la susceptibilidad a padecer la enfermedad en formas de EMPP. También se observa una asociación entre *CASP8* y la progresión del curso de la enfermedad.

Por último, los resultados para el gen *BTG1* muestran también asociación entre este gen y la susceptibilidad a padecer la enfermedad en formas de EMRR/SP.

ABSTRACT

The study of the genetic basis of the diseases is key not only for a better and fast diagnostic of the diseases, but also for a better treatment. In recent years, many genes that confer susceptibility to MS have been discovered; however, many remain yet to be replicated in other populations.

The main objective of this doctoral thesis is to confirm the involvement of the following genes in the susceptibility to MS: *PRF1*, *CASP8* and *BTG1*.

After performing SNP genotyping by allelic discrimination and expression studies by microarrays, among other studies, our results indicate that the three genes may contribute in a modest way to the susceptibility to MS.

In the case of the *PRF1* gene, we observed a strong association between this gene and the susceptibility to MS, mainly in males with PPMS forms.

The results with the *CASP8* gene suggest an association between this gene and the susceptibility to MS in patients with PPMS. In addition, we observed an association between the *CASP8* gene and the course of MS.

Finally, the results with the *BTG1* gene suggest an association between this gene and the susceptibility to suffer MS in forms with relapse-onset course.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

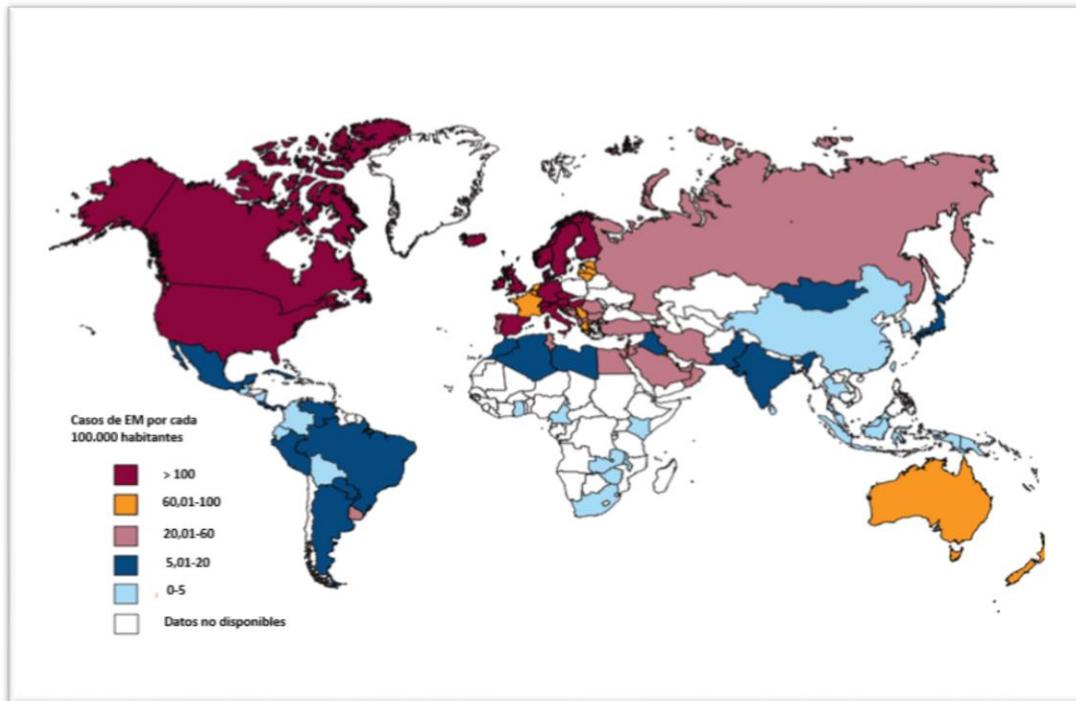
1.1. EM

La EM [MIM 126200], descrita en 1868 por primera vez como entidad clínica por Jean-Martin Charcot, es una enfermedad inflamatoria, crónica y neurodegenerativa, de probable etiología autoinmune, que afecta al SNC. Es la principal causa de discapacidad no traumática en adultos jóvenes. Se inicia a edades comprendidas entre los 20 y 40 años, con mayor frecuencia en mujeres que en hombres (razón 2:1), y provoca una disfunción neurológica considerable tras 15-20 años de su comienzo. Después de este periodo de tiempo, el 80% de los pacientes presentan limitaciones funcionales o cognitivas y entre el 50-60% necesitan ayuda para caminar (*Oksenberg y cols., 2008*).

Aunque su prevalencia varía según la zona estudiada (Figura 1), sabemos que alrededor de 2,3 millones de personas padecen EM en todo el mundo. En el caso de España, se estima que los valores probables en la población general se sitúan entre los 90 - 124 enfermos por cada 100.000 habitantes.

La etiología de la EM se desconoce, pero los datos que tenemos apuntan a que se trata de una enfermedad autoinmune del SNC condicionada, en la que factores genéticos y ambientales interactúan para dar lugar al fenotipo de la enfermedad.

Figura 1



Leyenda. Datos de prevalencia de la EM en el mundo. Modificado de Atlas of MS. Date 2013. MS International Federation. Disponible en <http://www.msif.org/about-us/advocacy/atlas/>.

1.2. Aspectos clínicos de la EM

La EM presenta manifestaciones clínicas poco específicas y muchos de los signos o síntomas como visión doble, pérdida de visión, espasmos musculares o alteración de la sensibilidad pueden aparecer en otras patologías. Sólo el síntoma de Lhermitte y el fenómeno de Uhthoff se consideran particularmente característicos de la enfermedad (*Compston y Coles, 2008*).

El primer signo clínico de la EM es habitualmente lo que se conoce como CIS. Se trata de un episodio de desmielinización aislada inflamatoria, que produce una disfunción neurológica afectando al tronco encefálico, al nervio óptico o a la médula espinal y que dura al menos 24 horas. El CIS no va acompañado de fiebre, infección o encefalopatía (*Miller y cols., 2008; Krupp y cols., 2007*) y aquellas personas que lo padecen tienen entre un 42-82% de posibilidades de desarrollar EM clínicamente definida (*Brownlee y Miller, 2014*).

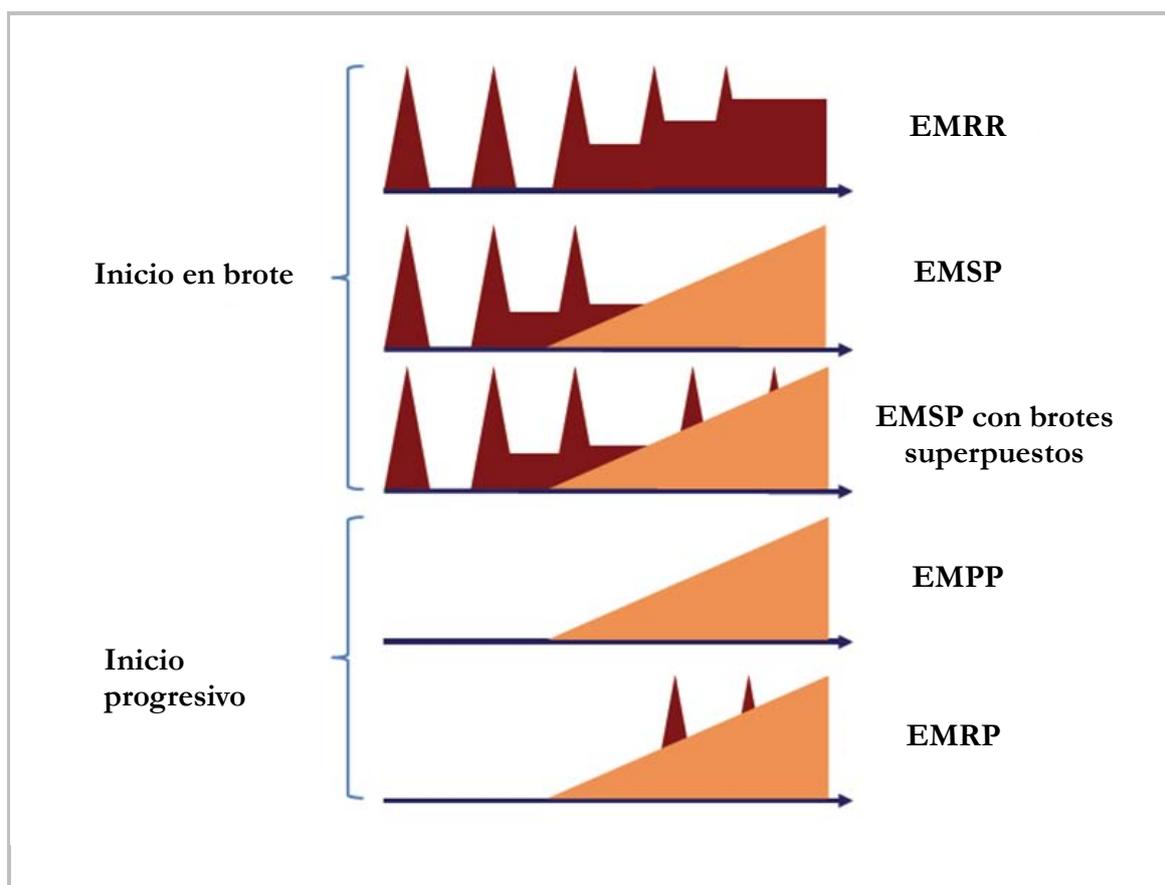
En cuanto al desarrollo de la enfermedad, en 1996 la *US National Multiple Sclerosis Society (NMSS) Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis* definió los distintos cursos clínicos de la EM. Los clasificó en cuatro formas: EMRR, EMSP, EMPP y, por último, EMRP (*Lublin y Reingold, 1996*). Después, en 2013, se revisó esta clasificación sugiriéndose que los CIS deberían ser incluidos en el grupo de fenotipos de la EM y que la forma EMRP debería desaparecer e incluirse a los pacientes así clasificados en la forma EMPP con actividad de la enfermedad (Figura 2) (*Lublin y cols., 2014*).

Entre los pacientes con EM, la forma clínica más frecuente es la EMRR que representa entre un 80-85% de los casos. Esta forma clínica se caracteriza por la existencia de brotes seguidos de remisiones, donde el enfermo vuelve al estado inicial o presenta discapacidad residual tras el brote, pero sin observarse progresión de la enfermedad. Un brote se define como una alteración en el SNC que dura al menos 24 horas en ausencia de fiebre o infección. El 75% de los pacientes que sufren esta forma clínica desarrollan posteriormente formas de EMSP en las que se produce una progresión irreversible de la discapacidad que puede ir o no acompañada de brotes superpuestos.

El resto de pacientes con EM, entre un 15-20%, desarrollan formas de EMPP con un avance de la enfermedad insidioso, sin episodios de recurrencia y remisión. (*Sospedra y Martin, 2005; Myrh, 2008*).

La enfermedad suele desarrollarse a lo largo de varias décadas, dando lugar al incremento del riesgo de muerte prematura de los pacientes con respecto a la población general (*Kaufman y cols., 2014; Lalmohamed y cols., 2012*). Se ha visto que la EM disminuye la expectativa de vida entre 7 y 14 años (*Scalfari y cols., 2013*) siendo el tiempo medio de muerte de los pacientes de 35 años tras el comienzo de la enfermedad (*Degenhardt y cols., 2009*).

Figura 2



Leyenda. Cursos clínicos de la EM. Multiple Sclerosis: Modificado de *Current Knowledge and Future Outlook*. Kamm y cols., 2014. *Eur Neurol* 2014; 72:132–141 DOI: 10.1159/000360528

Son varias las escalas que se han desarrollado para cuantificar el impacto de la enfermedad, documentar la evolución clínica y comparar la eficacia de tratamientos en los ensayos clínicos. Para la determinación del estado de afectación neurológica de un paciente que padece EM, la escala más utilizada es la denominada EDSS, que incluye un rango de cero a diez, siendo cero el valor dado a una exploración neurológica normal y diez el valor dado al fallecimiento del paciente (*Kurtzke, 1983*). Otra escala muy utilizada es la MSSS, que compara la discapacidad del individuo con la distribución de las puntuaciones en casos con una duración de la enfermedad equivalente.

1.3. Patología e inmunopatología de la EM

Aunque el SNC se consideró durante años un sistema inmunológicamente privilegiado debido, entre otras características, a la existencia de la barrera

hematoencefálica o la existencia de moléculas proapoptóticas en dicha barrera, en los últimos años este concepto ha cambiado, gracias a descubrimientos como el paso habitual de linfocitos T y B a través de la barrera hematoencefálica o la identificación del espacio cerebroespinal como compartimento inmunológico (*Bechmann, 2005*).

Se cree que la EM es una enfermedad mediada por el sistema inmune adaptativo, existiendo dos hipótesis sobre la forma de participación del mismo en la enfermedad. La primera hipótesis apunta a los linfocitos T como los que reconocen fragmentos de mielina produciendo daño en los tejidos y evolución en las lesiones provocadas (*Stuve y Zamvil, 1999*). La segunda hipótesis sugiere que la EM es una circunvolución inmunológica entre un desorden degenerativo primario y una respuesta inmune aberrante del individuo (*Stys y cols., 2012*). Sea como fuere, los investigadores coinciden en que el sistema inmune juega un importante papel en el desarrollo de las lesiones que caracterizan a la enfermedad especialmente, durante los brotes que se producen en las fases tempranas en formas recurrentes. Estas lesiones son provocadas por desmielinización del SNC acompañadas por disrupción de la barrera hematoencefálica, inflamación, daño axonal y gliosis. Se observan infiltrados inflamatorios que contienen células T CD8⁺ y CD4⁺, células T γ δ , monocitos, células B y células plásmáticas (*Babbe y cols., 2000; Wucherpfennig y cols., 1992; Booss y cols., 1983*). Además, en la aparición y avance de la enfermedad participarían también otras células inmunológicas como las células NK, la microglía, macrófagos o astrocitos.

Aunque hasta hace unos años la EM se consideraba una enfermedad que afectaba sobre todo a la sustancia blanca del SNC, estudios recientes apuntan a que las lesiones se encuentran también en la sustancia gris, sobre todo en aquellos pacientes con formas progresivas, aunque también pueden observarse en fases tempranas de la enfermedad (*Geurts y Barkhof, 2008; Pirko y cols., 2007*). Las lesiones, con características histológicas e inmunocitológicas dependientes de la actividad de la enfermedad, se encuentran diseminadas a lo largo del SNC con predilección por el nervio óptico, regiones subcorticales y periventriculares de la sustancia blanca, el

cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal (*Popescu y Lucchinetti, 2012; Lassmann y cols., 2007; Compston y Coles, 2008*).

1.3.1. Papel de las células inmunológicas en la EM

En cuanto al papel de cada uno de los tipos celulares inmunológicos que participan en el comienzo y avance de la enfermedad, se sabe que:

Las células T CD8⁺ tienen un importante papel patogénico y/o inmunoregulatorio participando en el daño axonal mediante apoptosis y en la neuroinflamación ya que, son las células más abundantes en los infiltrados inflamatorios (*Venters y cols., 2000; Mizuno y cols., 2008*).

Por su parte, las células T CD4⁺ juegan un importante papel en las formas EMRR, sobre todo las células T CD4⁺ efectoras tipo *helper*, Th1 y Th17. Las Th1 expresan el factor de transcripción Tbet y se activan en respuesta a la aparición de IL-12 producida por células dendríticas mieloides e IFNs producidos por células dendríticas plasmacitoides y células NK. La IL-12 da lugar a la activación de moléculas de señalización de tipo STAT4 mientras que los IFNs activan moléculas de señalización de tipo STAT1. Así, las señales enviadas por IL-12 e IFNs a través de las moléculas de señalización STAT4 y STAT1 incrementan la expresión de Tbet que, a su vez, produce la diferenciación de células T naive en células Th1. Una vez diferenciadas, las células Th1 producen citoquinas como IFN- γ , TNF β o LT e IL-2 (*Louten y cols., 2009; Vojdani y Lambert, 2011*). Por su parte, las células Th17, se diferencian ante la aparición del factor de crecimiento transformante β , IL-6 o IL-21 e IL-23 y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR γ t, dando lugar a la expresión de IL-17 e IL-23. Entre otras funciones se sabe que las células Th17 participan en la destrucción de tejidos durante los procesos inflamatorios por lo que tiene un papel importante en el desarrollo de enfermedades crónicas inflamatorias (*Louten y cols., 2009; Sie y cols., 2014; O' Garra y Murphy, 2009; Miossec y cols., 2009*). Ambos tipos celulares participan también en la activación de la microglía y de los macrófagos que, a su vez, también pueden ser activados por productos generados a partir de la degradación de la mielina. Si esta activación se produce en los estadios más

tempranos de la enfermedad da lugar a daño axonal y neuronal (*Singh y cols., 2013; Diestel y cols., 2003*).

Aunque tradicionalmente se creía que la EM era una enfermedad mediada por linfocitos T, desde hace unos años se ha visto que los linfocitos B también tendrían un papel fundamental dentro de la patogénesis de la enfermedad. Responsables de la inmunidad humoral, el número de linfocitos B se encuentra aumentado tanto en tejidos inflamados del SNC de pacientes como en líquido cefalorraquídeo (*Cepok y cols., 2001; Esiri, 1980*). Su función principal es la producción de anticuerpos, aunque también desempeñan otras funciones como la presentación de antígenos a los linfocitos T y la producción de citoquinas.

En cuanto a su capacidad de producir anticuerpos, la función de estos anticuerpos es neutralizar a los antígenos mediante mecanismos efectores que los destruyan. En las enfermedades autoinmunes existen respuestas autorreactivas en las que se generan anticuerpos frente a antígenos propios. Diversos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* muestran que el anticuerpo IgG presente en el SNC de pacientes con EM produce desmielinización y daño axonal (*Piddlesden y cols., 1993; Elliott y cols., 2012*) También se ha visto que existe producción intratecal de anticuerpos IgG y de IgG y complemento en pacientes con varios tipos de lesiones (*Lumsden, 1971; Lucchinetti y cols., 2000; Breij y cols., 2008*). Conviene destacar que la presencia anormal de anticuerpos IgG e IgM en el SNC es la prueba inmunodiagnóstica más consistente en EM, conocida como BOC. Existen BOC de dos tipos. Por un lado, están las de IgG que, aunque no son específicas de la enfermedad, están presentes en el 95% de los pacientes, por lo que se utilizan en el diagnóstico y dan información sobre las características inflamatorias de las lesiones (*Masjuan y cols., 2006; Tintoré y cols., 2008*). También se detectan BOC de tipo IgM que están presentes en un 40% de los casos y se asocian a un pronóstico desfavorable de la patología (*Perini y cols., 2006*).

Por otro lado, en cuanto a la capacidad de presentar antígenos, se sabe que las interacciones antígeno específicas entre linfocitos B y T necesitan que

los linfocitos B internalicen el antígeno a través de sus receptores, lo asocian a moléculas de histocompatibilidad de clase II y lo presentan a los linfocitos T CD4⁺. Esto es especialmente relevante en enfermedades autoinmunes donde los linfocitos B presentarían antígenos propios a los linfocitos T dando lugar a la activación y diferenciación de linfocitos T autorreactivos que, a su vez, dan lugar a procesos de inflamación como los descritos en la EM. La bibliografía describe un elevado número de antígenos propios característicos de la EM como son la proteína básica de la mielina, la glicoproteína oligodendrocítica de la mielina o la proteína de neurofilamentos, frente a los cuales actuaría el sistema inmune generando una respuesta autoinmune (*Berger y cols., 2003; Bartos y cols., 2007; Hedegaard y cols., 2009; Lalive y cols., 2006*).

Por último, estaría la función de producción de citoquinas a través de las cuales los linfocitos B influyen en la función de otras células. Los linfocitos B pueden ser clasificados en función de las citoquinas que expresen. Así, pueden producir citoquinas con función proinflamatoria como el TNF- α , la IL-6 o la LT- α , o antiinflamatorias como la IL-10 o la IL-35 (*Fillatreau y cols., 2002; Shen y cols., 2014; Bar-Or y cols., 2010; Carter y cols., 2012; Yoshizaki y cols., 2012; Meini y cols., 2006*). Publicaciones recientes atribuyen a un subgrupo de los linfocitos B, concretamente a las conocidas como células B reguladoras, un papel como modulador de la respuesta inmune en condiciones patogénicas (*Tedder, 2015*). Este subgrupo reduciría la respuesta inmune generada por linfocitos T CD4⁺ Th1/Th17 gracias a la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (*Correale y cols., 2008; Correale y Equiza, 2014*) promoviendo la producción de células T reguladoras. Los niveles bajos de células B reguladoras se han relacionado con enfermedades como la EM (*Knippenberg y cols., 2011; de Andrés y cols., 2014*). También existen estudios en los que los resultados son contradictorios mostrando que no existen diferencias entre pacientes y controles sanos en cuanto a la frecuencia y la función de las células B reguladoras (*Michel y cols., 2014*).

Por otro lado, se cree que los linfocitos B también serían importantes en la aparición de lesiones en la sustancia gris, gracias a la liberación de citoquinas

proinflamatorias como la LT- α y TNF- α , y a su capacidad de presentar antígenos que hace que se activen los linfocitos T.

El papel de las células NK en la EM aún no está claro. Se sabe que tienen un papel inmunomodulador y que participan en la respuesta a diferentes tratamientos (*Bielekova y cols., 2006; Saraste y cols., 2007; Perini y cols., 2007*). Además, se ha visto una actividad citolítica de estas células frente a oligodendrocitos, astrocitos y microglía que disminuye durante los brotes de la enfermedad (*Benczur y cols. 1980; Kastrukoff y cols. 1998; Kastrukoff y cols. 2003; Saikali y cols. 2007*). Sin embargo, son necesarios más estudios para conocer su papel en la EM.

Los astrocitos, por su parte, se activarían a través de citoquinas y productos de degradación de la mielina, lo que daría lugar a la producción de citoquinas y quimiocinas como el CCL-2 o el TNF- α que producen una respuesta inflamatoria en el SNC y la apoptosis neuronal (*Mayo y cols., 2014; Mascanfroni y cols., 2013; Brosnan y Raine, 2013*). Además, también se ha visto la producción de cantidades importantes de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, glutamato y ATP en las lesiones, que interfieren con la actividad mitocondrial de las neuronas, dando lugar a la pérdida de axones y neuronas. El ATP, por su parte, promueve respuestas proinflamatorias en tipos celulares como microglía y células dendríticas y efectos neurotóxicos (*Monif y cols., 2010; Basso y cols., 2008; Matute y cols., 2007*). Sumado a esto, la producción de gran cantidad de glutamato junto a la baja posibilidad de limitar los niveles extracelulares, darían lugar a muerte neuronal por excitotoxicidad.

Los oligodendrocitos, por su parte, controlarían la producción y mantenimiento de la mielina en el SNC.

1.3.2. Tipos de placas en la EM

En cuanto a los tipos de placa presentes como consecuencia de la desmielinización, sabemos que sus características histopatológicas dependen de la edad de la lesión, que viene determinada por el grado de inflamación y por la cicatriz glial. Las placas pueden clasificarse en tres tipos:

Placas activas agudas: típicas de los brotes y de las formas de EMRR. Se caracterizan por bordes difusos, con elevado número de macrófagos infiltrados uniformemente distribuidos a lo largo de la lesión formando lo que se conoce como “mar de macrófagos” que engullen los restos de mielina, y con numerosos linfocitos en el parénquima y perivascuales, la mayoría de ellos de tipo T CD8⁺ linfotóxicos y, en menor cantidad, T CD4⁺ *helper*, células plasmáticas y células B (*Lucchinetti y cols., 2000; Popescu y Lucchinetti, 2012b*).

Placas crónicas: características de las formas progresivas. Estas se pueden clasificar en lesiones activas, caracterizadas por ser lesiones desmielinizadas donde un elevado número de macrófagos cargados de mielina se sitúan en los bordes de la lesión disminuyendo su centro inactivo hipocelular y, lesiones inactivas, que están completamente desmielinizadas y sólo presentan pequeños signos de inflamación. Habitualmente, las lesiones inactivas rodean a lesiones caracterizadas por la pérdida sustancial de axones, oligodendrocitos, astrogliosis, microglía y linfocitos (*Popescu y Lucchinetti, 2012b; Sobel y Moore, 2008*).

Placas de remielinización: entre el 40-60% de las placas crónicas en pacientes que presentan un estado avanzado de la enfermedad muestran remielinización. La remielinización es característica de la EM y se produce en la sustancia gris y blanca. Suelen aparecer en la fase temprana de la EM y se caracterizan por la presencia de axones rodeados de una capa fina de mielina con cortas distancias internodales. Esta nueva capa de mielina, junto a la aparición de células precursoras de oligodendrocitos, nos pueden indicar una remielinización en fase temprana (*Popescu y cols., 2012b; Sobel y Moore, 2008*). La presencia y el alcance de la remielinización depende, en parte, de la disponibilidad de células precursoras de oligodendrocitos y del balance entre moléculas pro- y antiinflamatorias que varía entre los pacientes, posiblemente debido a la heterogeneidad patológica en el daño de los oligodendrocitos (*Lucchinetti y cols., 2000*). La realidad es que la mayoría de los pacientes muestran niveles bajos de remielinización, aunque es cierto que, en algunos de ellos puede ser de hasta un 90% de las lesiones localizadas en la sustancia

blanca. Se cree que la remielinización puede tener más un papel en la supervivencia del axón a largo plazo que en su rápida reparación (*Irvine y Blakemore, 2008*).

La pérdida axonal se considera el principal motivo de la discapacidad clínica permanente y puede producirse de forma aguda en las nuevas lesiones inflamatorias, pero también en las crónicas (*Kutzelnigg y cols., 2005*). La pérdida axonal puede darse por diversos motivos como células citotóxicas, autoanticuerpos frente a neurofascina, el déficit de energía debido a fallos en las funciones de las mitocondrias del axón, la pérdida del aporte trófico de la mielina, las deleciones en el ADN mitocontrial de neuronas corticales, la acumulación de hierro en los oligodendrocitos o la liberación de productos tóxicos por parte de los macrófagos (*Smith y Lassmann, 2002; Trapp y Stys, 2009; Lassmann y cols., 2012*).

1.4. Mecanismos de muerte celular

Existen tres tipos de muerte celular conocidos (*Galuzzi y cols., 2007*):

- La apoptosis o muerte celular tipo I.
- La muerte celular autofágica o muerte celular tipo II.
- La necrosis o muerte celular tipo III.

De la apoptosis hablaremos en último lugar por ser el mecanismo de muerte celular con el que se trabaja en esta tesis.

1.4.1. Muerte celular autofágica

La muerte celular autofágica es un proceso celular altamente conservado en eucariotas, que se caracteriza por la aparición de vesículas intracelulares y la puesta en marcha de la maquinaria celular autofágica. Existen tres tipos de autofagia: macrofagia, microfagia y autofagia mediada por chaperonas.

La macrofagia, que se describe a continuación denominándola autofagia, es principalmente un programa de supervivencia que se pone en marcha cuando la célula se encuentra en situaciones adversas como una crisis metabólica, la eliminación de agregados protéicos o la existencia de la

necesidad de eliminar orgánulos celulares dañados (*Levine y Kroemer, 2008; Kroemer y cols., 2010*). Si con el proceso de autofagia la célula no es capaz de combatir la situación adversa, el proceso continúa hasta la muerte celular. Por ello, la autofagia no es un proceso que promueva la muerte celular, sino que cuando está implicada en la muerte celular se debe a un fallo en el proceso de supervivencia (*Shen y cols., 2012*).

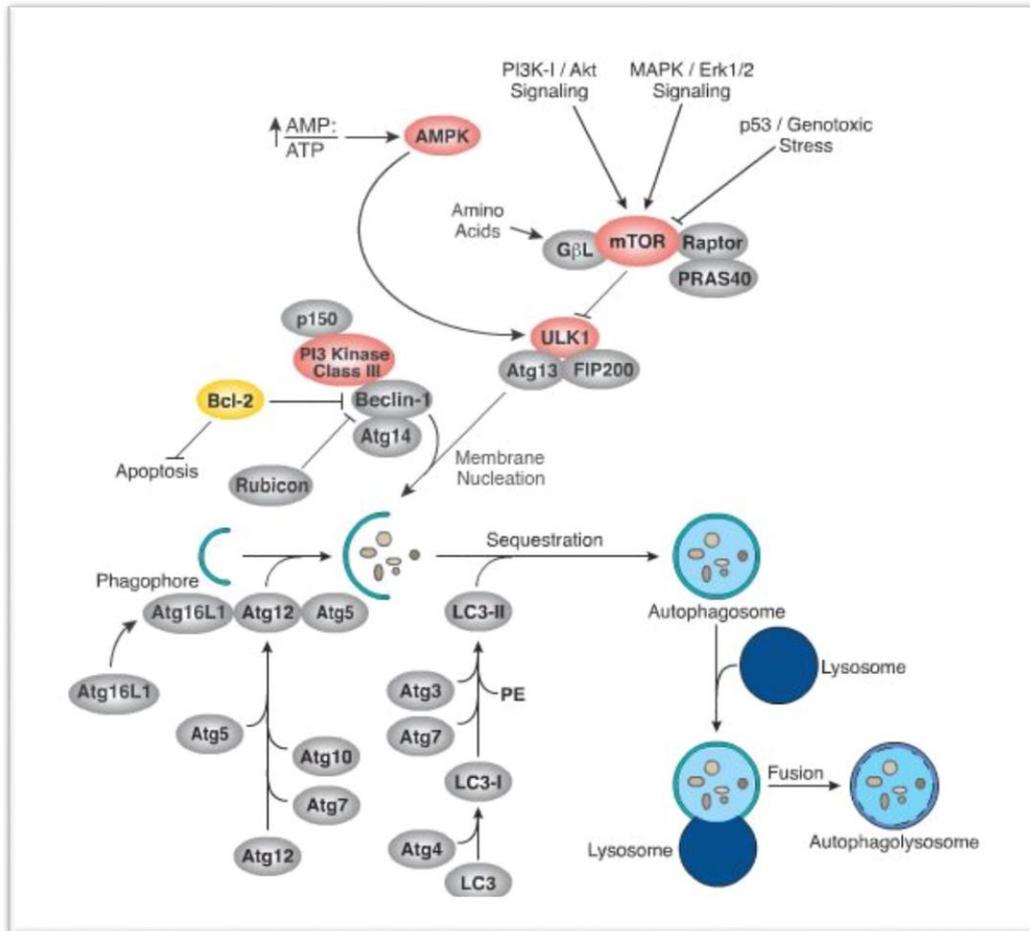
Este proceso (Figura 3) comienza con la activación de una quinasa, la AMPK, y/o la inhibición del complejo rapamicina 1, conocido como mTORC1, que da lugar a un complejo de preinicio formado por las quinasas ULK1, FIP200 y ATG13 (*Egan y cols., 2011; Kim y cols., 2011*). Este complejo activa otro complejo de iniciación formado por las proteínas beclin 1, VPS15 y VPS34 que genera fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P) que, a su vez, recluta la proteína ligasa ATG7 del fagóforo (*He y Levine, 2010*). Esta ligasa, pone en marcha la muerte celular autofágica por medio de dos vías:

- 1- En una de las vías, denominada vía ATG5-ATG12, el ATG12 es reemplazado por ATG10, ATG7 y ATG12. El complejo ATG5-12 recluta ATG16L y forma el complejo necesario para estabilizar el fagóforo (*Hanada y cols., 2007*).
- 2- En la segunda vía, denominada LC3-PE, el LC3 se rompe por ATG4 y es secuencialmente conjugado con ATG7 y ATG3. El complejo descrito anteriormente y formado por ATG5-ATG12-ATG16L realiza un paso final que consiste en la transferencia de LC3 a PE para formar el complejo LC3-PE también denominado LC3-II. El LC3-II se asocia a la membrana autofagosómica lo cual es necesario para que se lleve a cabo la identificación de los autofagosomas por parte de los lisosomas, y para la selección autofágica de orgánulos celulares y de agregados de proteínas (*Hanada y cols., 2007*).

El proceso de muerte celular autofágica finaliza con la formación de una estructura de doble membrana, denominada autofagosoma, que envuelve el material intracelular y se fusiona con lisosomas dando lugar a la degradación del material envuelto.

Se ha visto que los miembros de la familia del Bcl-2 pueden regular la formación de los complejos iniciales mediante sus miembros antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL.

Figura 3



Leyenda. Esquema de muerte celular autofágica.

Disponible en <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-autophagy&pathway=Autophagy%20Signaling>.

1.4.2. Necrosis

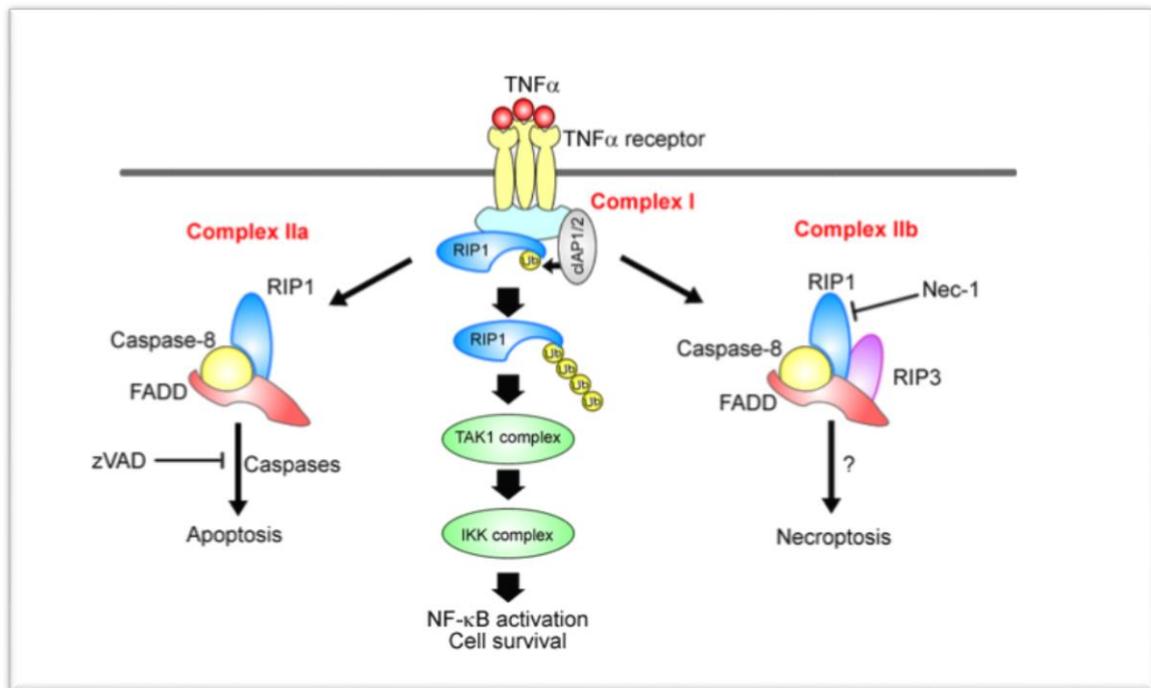
Por su parte, la necrosis engloba un amplio número de procesos de muerte celular que tienen en común la rotura de la membrana plásmatica con la consecuente fuga de los componentes citoplasmáticos (Yuan y Kroemer, 2010).

Los motivos que pueden dar lugar a la necrosis son varios, entre ellos las altas temperaturas o el estrés mecánico. Suele implicarse en el proceso al

calcio provocando un exceso del mismo en la mitocondria, la activación de proteasas y fosfolipasas y la aparición de especies reactivas de oxígeno. Todo esto da lugar a una disfunción mitocondrial, una desregulación del balance iónico y la pérdida de la integridad de la membrana con la correspondiente pérdida de la estructura por parte de los orgánulos celulares, sin condensación de la cromatina (*Vanlangenakker y cols., 2012; Golstein y Kroemer, 2007; Festjens y cols., 2006*).

Además, también se sabe que las células necróticas generan factores inmunomoduladores que causan la activación de la respuesta inmune (*Golstein y Kroemer, 2007; Festjens y cols., 2006*). La necrosis se puede activar por un daño celular, sin ser necesaria la activación de una vía de señalización, pero también puede activarse de forma programada dando lugar a lo que se denomina necroptosis. Ésta es una vía CASP independiente, siendo la vía de señalización más conocida la RIP-quinasa-dependiente (*Degterev y cols., 2005*). Esta forma de muerte celular puede ponerse en marcha por varios estímulos internos y externos como el TNF, FasL o la puesta en marcha de sensores de inmunidad innata, pero todas convergen en la activación del receptor interactuador proteína quinasa 3 (RIP3) (*Han y cols., 2011; Kono y Rock, 2008; He y cols., 2009; He y cols., 2011*). Actualmente la vía más estudiada es la que se pone en marcha mediante el estímulo del TNF que induce otras vías de señalización interrelacionadas a partir de tres complejos denominados complejo I, complejo II y complejo IIb (*Günther y cols., 2011; Vandenabeele y cols., 2010; Günther y cols., 2015*). Una vez unido el TNF a su receptor (TNFR1) forma un complejo unido a membrana que incluye proteínas con dominio de muerte (TRADD), factor 2 asociado al factor TNF (TRAF2) y RIP1. Tras esto se produce una deubiquitinización que desestabiliza el complejo I y da lugar a que RIP1 reclute la proteína asociada a Fas con dominio de muerte (FADD) y CASP8 formando el complejo II, lo que daría lugar a la puesta en marcha de la vía extrínseca de la apoptosis. Sin embargo, si aparece RIP3 dando el complejo IIb y se produce una inhibición de la CASP8 con un aumento del RIP3 se activa el complejo IIb dando lugar a la necroptosis (*Günther y cols., 2015; Micheau y Tschopp, 2003; Wang y cols., 2014; Newton y cols., 2014; Zhang y cols., 2009; Zhou y cols., 2012*) (Figura 4).

Figura 4



Leyenda. Esquema de necroptosis. Disponible en <https://yuan.med.harvard.edu/discoveries>

1.4.3. Apoptosis

Se sabe desde hace años que existe una relación entre la muerte celular programada o apoptosis y la inflamación, uno de los hallazgos a nivel patológico más destacados de la EM. La apoptosis, descrita por primera vez por Kerr y cols. en 1972, es uno de los procesos responsables de la regulación, entre otras, de las células autoinmunes en el organismo humano. Así, su desregulación puede dar lugar a diversas patologías incluyendo defectos en el desarrollo, enfermedades neurodegenerativas, cáncer o enfermedades autoinmunes.

1.4.3.1 Características de la apoptosis

Cuando una célula va a sufrir apoptosis se activa un conjunto de eventos moleculares que acaban dando lugar a la desintegración del material celular, generando restos envueltos en porciones de membrana. Se trata de un proceso ATP dependiente, que produce los siguientes cambios morfológicos en la célula: disminución de su volumen debido a una deshidratación de la misma, condensación de la cromatina que comienza en la periferia del núcleo,

aparición de protuberancias en la membrana, rotura de la envuelta nuclear que acaba por desintegrarse y formación de cuerpos apoptóticos en los que se incluyen fragmentos nucleares y orgánulos celulares rodeados por fragmentos de la membrana plasmática (*Blank y Shiloh, 2007*). Una vez formados, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos, células dendríticas inmaduras o células de la microglía (*Liu y cols., 2006; Roos y cols., 2004*). Además, durante este proceso, se suceden también un grupo de procesos moleculares y bioquímicos que hacen que la muerte celular sea muy controlada y claramente dirigida a células que ya han concluido su función o que están dañadas (*Kroemer y cols. 2009*). El proceso apoptótico permite, por tanto, eliminar células provocando el menor daño tisular e inflamación local (*Garg y cols., 2010*).

Otra característica de la apoptosis es la activación de endonucleasas que cortan el ADN de la célula en secciones internucleosomales (*Arends, 1990; Compton, 1992; Wyllie y cols., 1992*). Así, los segmentos en los que se degrada el ADN forman un patrón característico en escalera al correrlo en una electroforesis en gel de agarosa.

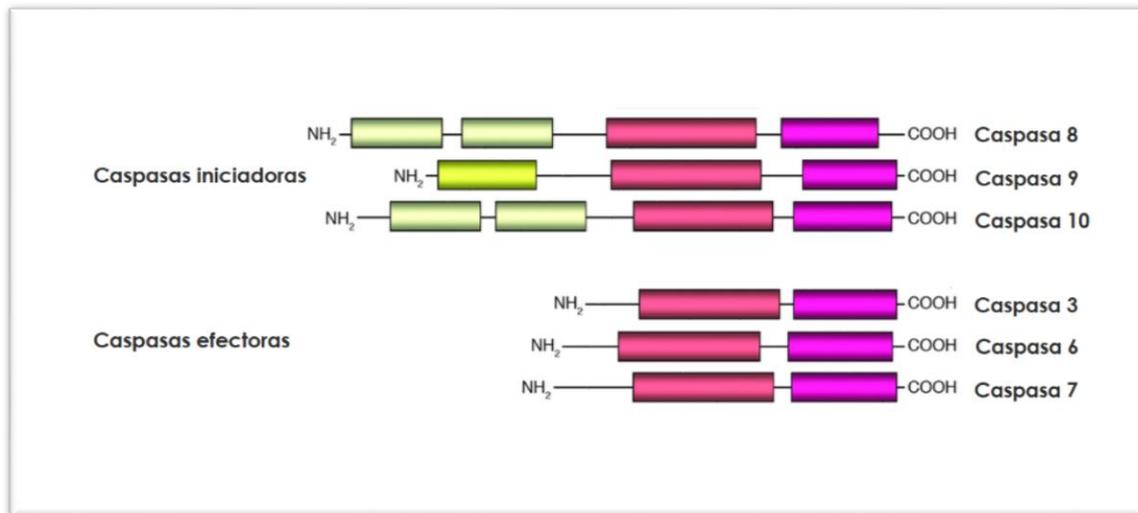
Por último, también sabemos que la apoptosis durante sus fases iniciales afecta a la integridad de la membrana celular y sus funciones. Sin embargo, en otros orgánulos como la mitocondria o los lisosomas, la integridad de la membrana se mantiene hasta las últimas etapas aunque, en el caso de la mitocondria el potencial transmembrana se altera casi al inicio (*Lizard, 1995; Castedo, 1996; Darzynkiewicz y Traganos, 1998*).

1.4.3.2 Papel de las CASPs en la apoptosis

Las CASPs son proteínas que contienen un residuo nucleofílico de cisteína en el centro activo que presenta especificidad por los residuos de aspartato incluidos en sus proteínas sustrato (*Thornberry y Lazebnik, 1998*). Las CASPs actúan sobre un amplio número de proteínas involucradas en procesos celulares como la fragmentación y reparación del ADN, la externalización de la fosfatidilserina de la membrana plasmática o las proteínas señalizadoras necesarias para la supervivencia celular (*Elkon, 1999*).

La familia de las CASPs está formada por 15 miembros de los cuales vamos a centrarnos en aquellos que participan en la apoptosis. Las CASPs que participan en este proceso de muerte celular se dividen en dos grupos. En primer lugar, tenemos las conocidas como iniciadoras que incluyen la CASP8, CASP9 y CASP10, y en segundo lugar las efectoras que comprenden las CASP3, CASP6 y CASP7 (Figura 5). Estas últimas necesitan para su activación de su rotura por parte de las CASPs iniciadoras (Nicholson y Thornberry, 1997; Green, 2000; Pop y Salvesen, 2009).

Figura 5



Leyenda. CASPs iniciadoras y efectoras que participan en la muerte celular programada o apoptosis. Modificado de Rupinder y cols., 2007

Las CASPs se expresan como zimógenos en su forma inactiva (procaspasas). En el caso de las procaspasas iniciadoras son capaces de autoactivarse gracias a su condición autocatalítica. Sin embargo, las procaspasas efectoras necesitan de la activación por parte de las CASPs iniciadoras (Siegel, 2006).

En cuanto a la estructura de las procaspasas, tanto las iniciadoras como las efectoras presentan un dominio proteasa de alta homología que puede ser dividido en dos subunidades, una subunidad mayor (20 kDa) y otra menor (10

kDa). Las procaspasas iniciadoras poseen también en su estructura una cola N-terminal en la que pueden estar incluidos distintos motivos reguladores como el dominio efector de muerte, conocido como DED por sus siglas en inglés, que aparece en las procaspasas 8 y 10, o el dominio de reclutamiento de CASPs, conocido como CARD por sus siglas en inglés, presente en la procaspasa 9. La función de estos dominios es mediar las interacciones homo- y heterofílicas entre las CASPs y con sus adaptadores (*Rupinder y cols., 2007*).

1.4.3.3 Proteínas anti y proapoptóticas

Para que la apoptosis tenga lugar es necesario disminuir el efecto inhibitorio de distintas proteínas. La familia de proteínas conocidas como IAP que comprende proteínas como XIAP, c-IAP1 y c-IAP2, presenta un potente efecto inhibitorio de las CASPs. Con el fin de que no ejerzan su función, se liberan otras proteínas mitocondriales intermembranales como SMAC/DIABLO y HtrA2 que inhiben la función antiapoptótica de las proteínas de la familia IAP y por tanto permiten la activación de las CASPs (*Chai y cols., 2000; Srinivasula y cols., 2003; Yang y cols., 2003*).

Además, existen otras dos familias de proteínas que también participan en la inhibición de la apoptosis a distintos niveles. Se trata en primer lugar de la proteína FLIP (FLICE-proteína inhibitoria) que impide el reclutamiento de CASP8 por parte de Fas, y en segundo lugar de la proteína Bcl-2 con Bcl-XL que inhibe la liberación del citocromo c por parte de la mitocondria (*Dianzani y cols., 2003*).

Es también conocido que la apoptosis puede ser regulada por las formas solubles de Fas y FasL (sFas y sFasL) que se forman a partir de un *splicing* alternativo o de una rotura proteolítica de los receptores unidos a membrana. Así, mientras el Fas y FasL unido a la membrana pueden poner en marcha la apoptosis, las formas solubles pueden inhibirla, posiblemente, por unión competitiva al receptor de membrana (*Guicciardi y Gores, 2009*).

Otras proteínas de elevada importancia en este proceso son las proteínas de la familia Bcl-2 que desarrollan un papel clave en la vía intrínseca de la apoptosis. En sus estructuras los miembros de esta familia contienen de uno a

cuatro dominios de homología con Bcl-2 (BH) denominados BH1, BH2, BH3 y BH4. Esta familia se divide a su vez, teniendo en cuenta su estructura y función, en dos grupos: proteínas antiapoptóticas y proteínas proapoptóticas (*Adams, 2003; Youle y Strasser 2008; Chipuk y cols. 2010*). Las proteínas antiapoptóticas son las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, Bcl-B y A1, y excepto Mcl-1 y A1, todas contienen los cuatro dominios BH. Suelen localizarse en la membrana mitocondrial externa, en el citosol o unidas a la membrana del retículo endoplasmático. Estas proteínas ejercen su función antiapoptótica por unión directa a las proteínas proapoptóticas (*Chipuk y cols. 2010*).

En cuanto a las proteínas proapoptóticas las podemos dividir en dos subtipos: las multidominios y las solo-BH3. Las proteínas multidominios, Bax y Bak, contienen dominios BH1, BH2, BH3 y BH4. La activación de estas proteínas multidominios produce la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, denominada MOMP por sus siglas en inglés, seguida de diferentes acontecimientos a nivel celular y mitocondrial. Por su parte, las proteínas solo-BH3 tienen, como su nombre indica, solo dominios BH3 formado por nueve aminoácidos. Esta estructura es suficiente para desencadenar la apoptosis (*Huang y Strasser, 2000; Willis y Adams, 2005; Shibue y Taniguchi, 2006*). Dentro del subtipo BH3 se incluyen las proteínas Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa, Bmf, Hrk y Bik entre otras. A su vez éstas podemos clasificarlas en función de su capacidad para interactuar con proteínas antiapoptóticas o proteínas multidominio.

1.4.3.4 Vías apoptóticas: Vía extrínseca y vía intrínseca

Existen dos vías apoptóticas denominadas extrínseca, la cual implica la participación de los receptores de muerte localizados en la superficie celular a los que se unen ligandos extracelulares, e intrínseca, que implica la participación de la mitocondria y donde las señales de apoptosis provienen del interior celular, generalmente generadas en respuesta a estrés celular, daño del ADN o infecciones virales entre otros. En ambas vías las CASPs proapoptóticas y las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel importante.

La vía extrínseca se pone en marcha tras señales de estrés celular detectadas y propagadas por receptores transmembrana específicos. A continuación, se produce la interacción entre un miembro de la familia del TNF o ligando de muerte (TNF α , TRAIL o FasL) y su correspondiente receptor de muerte (TNFR1, TRAILR1 o Fas) formando el complejo de muerte celular, conocido como DISC por sus siglas en inglés (*Blank y Shiloh, 2007; Kalman y cols., 2007*). Esta vía también se puede activar a través de receptores denominados receptores de dependencia que sólo ejercen su función letal cuando la concentración de su correspondiente ligando disminuye a niveles críticos (*Schutze y cols., 2008; Mehlen y Bredesen, 2011*). Una vez producida la interacción entre receptor y ligando, se estabiliza una conformación en forma de trímero, que induce cambios conformacionales, permitiendo el ensamblaje de un complejo multiprotéico en la parte citosólica de estos receptores, concretamente en un dominio de aproximadamente 80 aminoácidos llamado dominio de muerte, conocido como DD por sus siglas en inglés (*Boldin y cols., 1995*). El complejo supramolecular formado se conoce con el nombre de DISC, que constituye la plataforma que regula la activación de la CASP8 o 10 (*Kischkel y cols., 1995*). La unión de las CASPs iniciadoras a DISC da lugar a un cambio conformacional en éstas que las activa parcialmente y permite que interaccionen entre ellas dando lugar a una rotura autoproteolítica que las activa completamente. La activación de las CASPs iniciadoras da lugar a la activación por proteólisis de las CASPs efectoras 3 y 7 (*Lavrik y cols. 2005*).

Cabe destacar que existen células en las que se conectan las vías extrínseca e intrínseca para que los receptores de muerte puedan inducir eficientemente la apoptosis. En función de que esto ocurra o no, las células se clasifican en dos tipos. Por un lado, estarían las células tipo I, como los linfocitos, con elevado nivel de expresión del complejo DISC y alta actividad de las CASPs iniciadoras en las que la activación de estas CASPs es suficiente para que se activen las CASPs efectoras (*Scaffidi y cols., 1999; Ozoren y El-Deiry, 2002; Lavrik y cols., 2005*). Por otro lado, estarían las células de tipo II, como los hepatocitos y células β del páncreas, donde el bajo nivel de expresión de DISC y menor actividad de las CASPs iniciadoras hacen necesaria la participación de las mitocondrias para inducir la apoptosis. En este caso, las

CASPs iniciadoras activan una proteína de la familia Bcl-2, conocida como solo-BH3 Bid, mediante actividad proteolítica que da lugar a que la proteína truncada tBid active el complejo Bax/Bak en la célula e induzca MOMP con la posterior puesta en marcha de la vía intrínseca (*Luo y cols. 1998*). Así, tras la MOMP, se activa la liberación de citocromo c y factor inductor de la apoptosis (AIF) en el citoplasma. El citocromo c se une con otros factores apoptóticos formando el apoptosoma el cual pone en marcha la cascada de CASPs mientras AIF lidera por sí mismo la apoptosis (*Ventimiglia y cols., 2001; Kalman y cols., 2007; Circo y Aw, 2010*).

En el caso de la vía intrínseca, el mecanismo se pone en marcha tras señales de estrés citosólico como agentes quimioterapéuticos, radiaciones UV, estrés oxidativo, daños en el ADN o existencia de proteínas con plegamiento deficiente entre otras. En ella participan también proteínas de la familia del Bcl-2. Tras el estímulo las proteínas proapoptóticas Bak y Bax se activan y se forma el poro mitocondrial MOMP. En ese momento, el potencial de la membrana mitocondrial desaparece, se deja de producir ATP y se liberan proteínas apoptogénicas desde el espacio intermembranal al citoplasma. La más importante de estas proteínas es el citocromo c, el cual, una vez en el citoplasma y junto a otras moléculas como Apaf-1 y (d)ATP, da lugar a la formación del apoptosoma y la activación de la CASP9 que, a su vez, activa gracias a una cascada proteolítica la CASP3. El apoptosoma comprende siete moléculas de Apaf-1 con 7 dominios CARD a través de los cuales se une la procaspasa 9 al apoptosoma, gracias a las interacciones CARD-CARD. Esta unión da lugar a cambios conformacionales que derivan en la activación de la CASP9 sin necesidad de un procesamiento proteolítico y que tiene la capacidad de activar la CASP3. Otras formas de activación de la CASP9 serían una acción autocatalítica o bien el procesamiento de ésta por la CASP3 ya activada, lo que da lugar a un desplazamiento de la CASP9, por parte de moléculas procaspasa 9, del apoptosoma comenzando un nuevo ciclo de activación de la CASP9 (*Zou y cols., 1997; Green y Reed, 1998; Blank y Shiloh, 2007; Wurstle y cols., 2012*).

Finalmente, podemos decir que ambas vías confluyen en la activación de las CASPs efectoras que son a su vez las responsables de la puesta en marcha de la maquinaria apoptótica que conducirá a la destrucción de la célula y la formación de cuerpos apoptóticos que, como ya se ha dicho anteriormente, serán engullidos por fagocitos impidiendo la liberación del contenido celular y la posible respuesta inflamatoria (*Krysko y cols., 2006*).

1.4.4. Apoptosis y EM

Se ha visto que la apoptosis es un mecanismo relevante en un gran número de patologías, destacando su implicación en enfermedades como el cáncer, Alzheimer, Huntington o EM entre otras. Además, se ha visto también una importante asociación entre la apoptosis y el riesgo de padecer procesos autoinmunes (*Artemiadis y Anagnostouli, 2010*).

Estudios en pacientes con EM han mostrado que fallos en el proceso de apoptosis contribuyen a la etiopatogénesis de la enfermedad (*Zipp, 2000; Torado y cols., 2004*). La existencia de células inmunes periféricas con resistencia a la apoptosis, incrementada debido a la alteración de diversas moléculas con actividades pro- y antiapoptóticas (*Sharief, 2000; Comi y cols., 2000; Sharief y cols., 2001; Zipp y cols., 2000*) podría alterar la regulación e intensidad de la respuesta inmune. Ésto podría dar lugar a la aparición en el SNC de elevados números de células T reactivas frente a la mielina que aumentarían el proceso de inflamación (*Ohsako y Elkon, 1999*) y la muerte de células neuronales participando en la aparición y avance de la discapacidad (*Meyer y cols., 2001; Oren y cols., 2001; Pender, 2005; Zipp, 2000*). Además, recientemente se ha visto que la apoptosis ejerce dos efectos opuestos en la EM, por un lado da lugar a la muerte de oligodendrocitos y neuronas en el SNC y, por otro, inactiva la respuesta inmune y regula la homeostasis del sistema inmune mediante eliminación de células inmunes autorreactivas (*Reichardt y Luhder, 2012*).

También estudios realizados en el modelo animal de EM han mostrado que en la fase de recuperación existen elevados niveles elevados de apoptosis espontánea en células T de sangre periférica, o que el modelo animal Fas

deficiente padece un curso progresivo crónico de la enfermedad (*Schmied y cols., 1993; Malipiero y cols., 1997*).

Estos hallazgos apuntan a que es necesaria la realización de estudios de genes candidatos involucrados en el proceso de apoptosis para conocer mejor las bases genéticas que dan lugar al desarrollo de la EM.

Son muchos los estudios genéticos y de expresión realizados en EM que han incluido entre los genes estudiados uno o varios de los genes implicados en la apoptosis. Estos estudios se apoyan en hallazgos previos que muestran la posibilidad de que el proceso apoptótico esté relacionado con la etiopatogénesis de la enfermedad.

Entre los trabajos que se han realizado hasta este momento se encuentra el de *Gödde y cols.*, en 2005 que recoge el estudio de 202 microsatélites situados dentro o cerca de genes candidatos relacionados con la apoptosis y el sistema inmune. Tras el estudio no encontraron asociación de ninguno de los genes con la enfermedad.

Otros trabajos como el de *Moreno y cols.*, 2013, donde estudiaron diferentes formas solubles pertenecientes a la superfamilia del TNF como sFas, sFasL y sTRAIL llegaron a la conclusión de que TRAIL participa en la patogénesis de la EM. También se ha visto que alteraciones en el gen del receptor de TRAIL (TRAILR-1) influyen en la respuesta de los pacientes tratados con IFN- β recombinante, uno de los tratamientos más utilizados en pacientes con EM.

Se ha relacionado también con la enfermedad la prevalencia de miembros antiapoptóticos de la familia del Bcl-2 y proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) que se han encontrado en linfocitos T activados de pacientes con EM clínicamente activa (*Sharief y Semra, 2001; Semra y cols., 2002a, 2002b; Sharief y cols., 2002, 2003; Mandel y cols., 2012*), y el aumento de la expresión del gen de la proteína adaptadora proapoptótica (FADD) en pacientes con la forma de EMRR (*Reuss y cols., 2014*).

En la revisión desarrollada en 2007 por Comabella y Martin, donde se resumían los resultados obtenidos en estudios de expresión génica realizados previamente en distintos tipos de muestras biológicas de pacientes con EM y en EAE mediante *microarrays*, también se encontraron diferencias en la expresión de varios genes relacionados con la apoptosis tanto en estudios realizados en PBMCs como en tejido cerebral, en EAE o en estudios con pacientes tratados con IFN- β

1.5. Factores genéticos en la EM

Los primeros datos que apuntaron a la importancia de la genética en la susceptibilidad a la EM aparecieron a finales del siglo XIX, momento en el que se hablaba ya de la posibilidad de que existiera una herencia familiar en la enfermedad (*Eichorst, 1896*). Posteriormente, estudios epidemiológicos hallaron diferencias en género y/o etnia en cuanto al riesgo de padecer la enfermedad así como, en el riesgo de recurrencia de la EM en familias donde los hermanos de los enfermos tienen 20 veces más posibilidades de padecer la enfermedad que la población general (*Sadovnik y Baird, 1988*). Trabajos en gemelos mostraron que en monozigotos la posibilidad de concordancia es del 20-35% con respecto a población no emparentada, mientras que cuando los gemelos son dizigotos la posibilidad de que uno padezca la enfermedad si la padece el otro disminuye hasta el 2-5% (*Mumford y cols., 1994; Willer y cols., 2003*). Por último, el análisis en familiares de pacientes de 1º, 2º y 3º grado ha mostrado también un mayor riesgo de padecer EM en éstos frente al riesgo encontrado en la población general (*Sadovnick, 1994; Carton y cols., 1997; Compston y Coles, 2002*).

En los últimos 25 años se han realizado un importante número de estudios genéticos aunque, cuando más se está avanzando en el conocimiento de los genes que confieren susceptibilidad a la EM es en estos últimos años gracias, por un lado, a la aparición de tecnologías de genotipado masivo y ultrasecuenciación que permiten realizar GWAS en tiempos reducidos y, por otro, a la colaboración entre grupos de investigación que, aportando sus

muestras a los estudios, consiguen tamaños muestrales que permiten alcanzar un elevado poder estadístico.

1.5.1. Estudios de ligamiento

La primera región cromosómica asociada a la susceptibilidad a la EM fue la región del HLA situada en el brazo corto del cromosoma 6. Concretamente, en 1972 se asoció el HLA de clase I (*Bertrams y Kuwert, 1972; Naito y cols., 1972*) y, posteriormente, se vio una fuerte asociación del HLA de clase II (*Compston y cols., 1976*). El HLA fue durante muchos años la única región genética asociada de forma consistente con la enfermedad.

En la primera mitad de la década de los 90, el número de estudios de ligamiento realizados con el fin de analizar si la enfermedad y algún alelo mantenían una transmisión común en las familias, fue elevado. Para ello, se utilizaron distintos niveles de resolución y de cobertura del genoma, pero fue a mediados de esta década cuando se publicaron los primeros tres trabajos de ligamiento realizados en genoma completo. Estos trabajos incluyeron familias de Reino Unido, Estados Unidos y Canadá. En el caso de Reino Unido y Canadá se incluyeron sólo hermanos mientras que los estadounidenses incluyeron extensas genealogías. Las metodologías de los estudios fueron similares, incluyendo microsatélites a lo largo de todo el genoma con una separación de entre 10-15 cM tal y como se recomendaba. Estos trabajos consiguieron identificar un elevado número de regiones cromosómicas con potencial implicación en la susceptibilidad a padecer EM, entre ellas la región del HLA (*Ebers y cols., 1996; Sawcer y cols., 1996; Haines y cols., 1996*).

Posteriormente se realizaron estudios del mismo tipo en ocho poblaciones: Finlandia (*Kuokkanen y cols., 1997*), Cerdeña (*Coraddu y cols., 2001*), Italia (*Broadley y cols., 2001*), Australia (*Ban y cols., 2002*), Países Escandinavos (*Akesson y cols., 2002*), Turquía (*Eraksoy y cols., 2003*) y también en población británica (*Hensiek y cols., 2003*). En la población australiana, escandinava y turca sólo se incluyeron familiares afectados por la enfermedad, mientras que en los otros estudios participaron tanto miembros afectados como sanos. Los resultados fueron dispares, y aunque algunas de las regiones ligadas o

potencialmente ligadas a la enfermedad coincidían, la inmensa mayoría de ellas no se replicaron en estudios posteriores. Ni siquiera la asociación a la región del HLA fue confirmada en algunos de estos estudios, y mientras algunos replicaban este hallazgo de forma clara otros únicamente mostraban una baja o inexistente evidencia de ligamiento.

En 1999 y 2001, *Wise y cols.*, y el *Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative* respectivamente, realizaron un meta-análisis de estudios de ligamiento en genoma completo desarrollados previamente, consiguiendo valores estadísticamente significativos en varias regiones cromosómicas, entre ellas, la 6p donde se encuentra el HLA (*Wise y cols.*, 1999; *Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative*, 2001).

En 2003, este mismo grupo junto al GAMES hizo un nuevo meta-análisis, en este caso teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diez estudios de ligamiento realizados en genoma completo, descritos previamente, e incluyeron además 42 pares de hermanos afectos de Reino Unido, que no habían participado en estudios anteriores, en los que se genotiparon 398 marcadores. Únicamente la región del HLA alcanzó un valor estadísticamente significativo, mientras otras seis regiones presentaron valores que podrían sugerir que se trataba de zonas potencialmente ligadas a la susceptibilidad de la enfermedad (*GAMES y the Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative*, 2003).

En 2005, el IMSGC tras estudiar los meta-análisis realizados hasta la fecha, descubrió una serie de deficiencias en la calidad de los datos de los distintos estudios incluidos y decidió revisar las familias disponibles de cuatro de las poblaciones estudiadas (Australia, Países Escandinavos, Reino Unido y Estados Unidos) a las que se añadieron 216 familias no estudiadas previamente. De nuevo, sólo se encontró una asociación entre el *locus* HLA y la enfermedad (*IMSGC*, 2005).

En 2007 *Hermanowski y cols.*, realizaron un meta-análisis de estudios de ligamiento utilizando el *Genome Search Meta-Analysis Method* (GSMA) para el

análisis de los resultados. Una vez más, la región más fuertemente ligada a la enfermedad fue la 6p donde se encuentra el HLA.

Por tanto, tras la realización de todos estos trabajos la única región claramente asociada a la EM fue la del HLA. Esto sirvió para concluir, entre otras cosas, que los estudios de ligamiento no son la forma más adecuada para la búsqueda de genes ligados a la enfermedad cuando se trata de una patología genéticamente compleja. En estas patologías suelen estar implicados un elevado número de genes, cada uno de los cuales tiene un efecto moderado en la susceptibilidad a la enfermedad e interaccionan entre ellos y con el ambiente. Hay que tener en cuenta que la potencia de los estudios de ligamiento depende fuertemente de la frecuencia de los alelos de susceptibilidad en la población estudiada (*Risch y Merikangas, 1996*), contando con menos potencia estadística que los estudios de asociación que pueden detectar variantes genéticas comunes que confieren un riesgo moderado de susceptibilidad a la enfermedad. Muchos de los marcadores están en *loci* adyacentes del genoma que se encuentran en desequilibrio de ligamiento, permitiendo que los estudios de asociación generen información aun cuando los marcadores están a una distancia menor de 0,5 cM del *locus* que produce susceptibilidad a la enfermedad (*Compston, 2000*). Los estudios de asociación, por tanto, determinan si variantes genéticas específicas predisponen a una enfermedad en una población y tienen mayor potencia estadística que los de ligamiento en todos los casos, excepto en las enfermedades conocidas como mendelianas donde existe una elevada penetrancia de las variables de baja frecuencia (*Risch, 2000*).

1.5.2. GAMES

En 2003 se publicaron los resultados del estudio GAMES donde se genotiparon un elevado número de marcadores de forma sistemática. En este caso se genotiparon 6.000 microsatélites situados cada 500 kb con la finalidad de identificar nuevas regiones genómicas de interés que contuvieran *loci* implicados en la predisposición a la enfermedad (*Barcellos y cols., 1997*).

El proyecto GAMES partía de la idea de que al menos algunos de los marcadores estudiados tendrían alelos en desequilibrio de ligamiento con

variantes que influirían en la susceptibilidad a la enfermedad (Sawcer y Compston, 2003). Para esto, sería necesario que la mayoría de alelos de susceptibilidad pertenecieran a un *locus* ancestral común y que además su recombinación, mutación y conversión génica hubiera producido por azar la eliminación de una asociación aleatoria con alelos de marcadores flanqueantes.

En el proyecto GAMES participaron 15 países, 14 europeos y Australia (Figura 6), en los cuales se reclutaron 9.629 individuos (3.376 pacientes, 3.409 controles y 948 tríos familiares formados por un individuo enfermo y sus padres). Con el ADN de los individuos que participaron se construyeron *pools* siguiendo la metodología propuesta por Barcellos y cols., 1997. Los *pools* contenían ADN de 200 casos o 200 controles. En el caso del ADN que provenía de tríos los *pools* se realizaron de forma que el ADN del miembro enfermo del trío y el de sus padres fuera en *pools* diferentes.

El estudio de los 6.000 microsatélites se realizó mediante PCR generando patrones de imagen de alelos para cada *pool* de ADN.

Se obtuvieron 35 regiones asociadas a la enfermedad, para las distintas poblaciones estudiadas, analizando cada uno de los centros participantes sus datos de forma individual.

Figura 6



Leyenda. Mapa y grupos participantes en el proyecto GAMES. Fuente: Sawcer y Compston, 2003.

Más del 80% de los cribados realizados mostraron una asociación significativa con uno o más marcadores situados dentro del *locus* HLA. Esto confirmaba la implicación de los genes de esta región en la enfermedad. Otros *loci* con efectos mucho más débiles no pudieron ser identificados.

También se encontraron asociaciones para regiones que previamente habían sido asociadas a la enfermedad mediante estudios de ligamiento. Ejemplos de estos hallazgos son la región 19q13 la cual fue asociada previamente por varios grupos y a través de un meta-análisis, o las regiones 11q23 y 17q11 (*Barcellos y cols., 1997b; Haines y cols., 1996; Kuokkanen y cols., 1997; Pericak-Vance y cols., 2001; Sawcer y cols., 1996; Wise y cols., 1999*).

El análisis de los resultados incluidos en la bibliografía publicada a partir de este estudio nos muestra que un total de 26 marcadores se asociaron a la enfermedad en más de una población. El cromosoma en el que más microsatélites asociados a la enfermedad encontramos es el cromosoma 6 en

el que, como ya se ha apuntado anteriormente, se localiza el HLA, por lo que se confirmaría la importancia de esta región genética en la enfermedad. Además, existen microsatélites del cromosoma 6 asociados a la EM en todas las poblaciones estudiadas, excepto Turquía e Italia.

Un posterior meta-análisis de los resultados obtenidos en el GAMES identificó 12 marcadores situados fuera de la región del HLA. Estos 12 marcadores fueron de nuevo genotipados, confirmándose la asociación de tres de ellos. Posteriormente, fueron estudiados en 937 tríos familiares de Reino Unido y como resultado se vio una asociación poco robusta de los genes JAG1 y P0U2AF1 con la enfermedad (*The Games Collaborative Group y cols., 2006*).

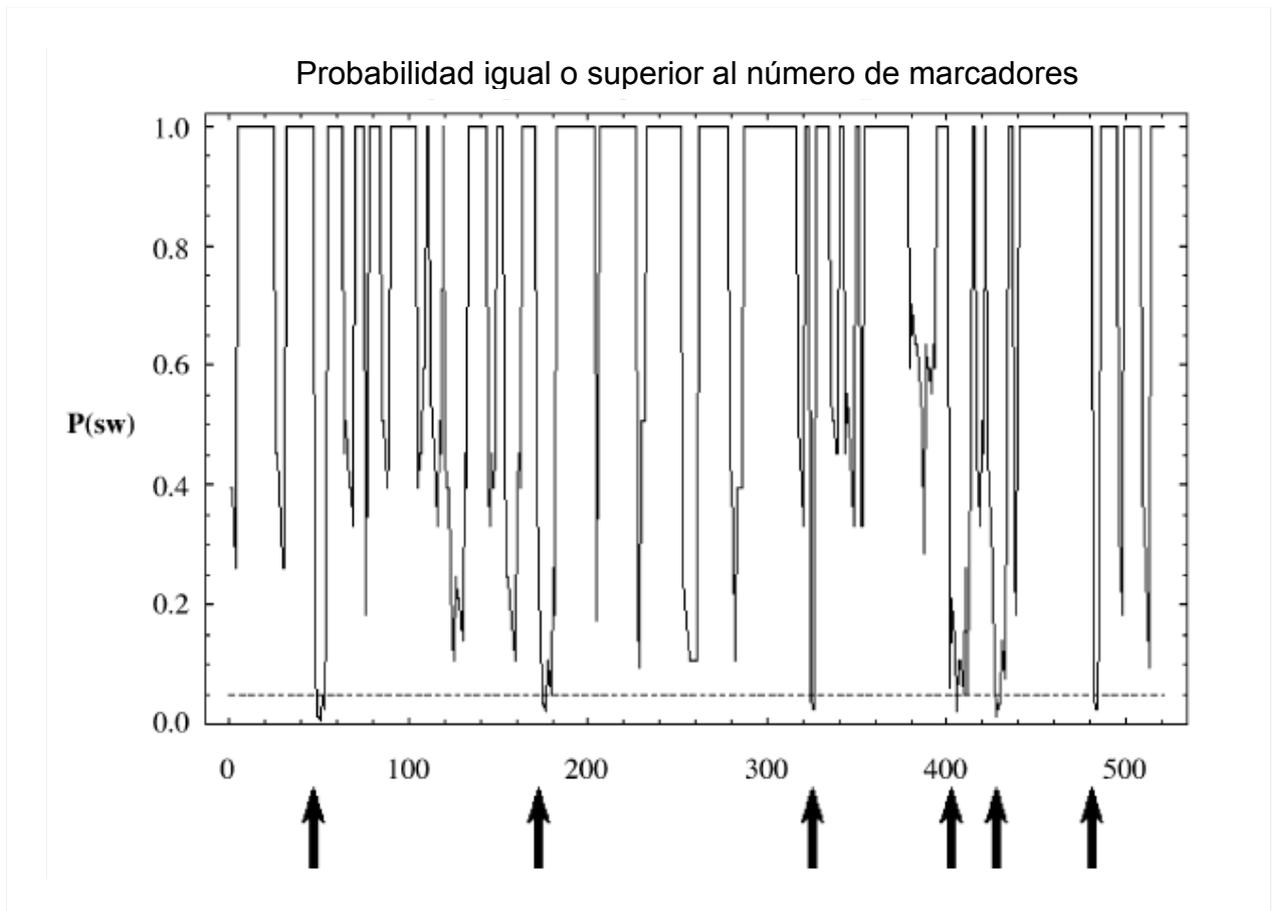
En el caso de España el análisis de los resultados se realizó utilizando el método de las ventanas deslizantes (*Marques-Bonet y cols., 2005*) que permitía detectar potenciales regiones candidatas mediante la explotación de la distribución de los marcadores asociados positivamente. Para ello se utilizó la herramienta informática denominada *Association Cluster Detector* (ADC), en la que se introdujo una serie de datos que incluían los nombres de los marcadores, su posición genómica y los valores p obtenidos de los estudios de asociación realizados. Estos valores p podían ser ajustados utilizando uno de los cuatro métodos habituales: corrección de Bonferroni, corrección de Sidak, Bonferroni secuencial o corrección basada en el FDR. Los valores p, ajustados o no, fueron introducidos en el ADC dando lugar a la identificación de regiones genómicas que albergaban grupos de marcadores asociados a la EM. De todos los marcadores incluidos en cada una de las ventanas, la herramienta proporcionaba datos de asociación que permitieron seleccionar aquellos marcadores que presentaban una mayor asociación con la enfermedad.

El método de ventanas deslizantes se realizó en todos los cromosomas. A partir de cada marcador se definió una ventana de 2 cM de acuerdo con las posiciones de los marcadores en el mapa SA6 incluido en *deCODE Genetic* (*Gabriel y cols., 2002; Reich y cols., 2001*) y se cuantificaron el número total de marcadores y el número total de marcadores que mostraron asociación. La proporción de marcadores con valores significativos en el cromosoma de

estudio se usó para predecir el número de marcadores significativos esperados en cada ventana bajo la hipótesis de una distribución independiente de los marcadores significativos. Se consideró que la ventana tenía un grupo de marcadores asociados (número de marcadores mayor o igual a dos) cuando la probabilidad de obtener un número de marcadores asociados de forma significativa era igual o superior que el número observado, es decir, menor que 0,05. (Figura 7).

En España, los individuos que participaron en el estudio fueron 200 pacientes con EM clínicamente definida y 200 controles sanos. En la fase inicial del estudio se obtuvieron datos para 5.131 de los 5.546 marcadores iniciales, con una media de un marcador por cada 0,58 cM. De esos 5.131 marcadores, 1.269 fueron considerados positivos tras el análisis estadístico. Se repitió el genotipado en los 1.269 marcadores manteniéndose los valores significativos en 645 marcadores. Tras la aplicación de la herramienta de patrones de imagen de alelos solo 191 de los marcadores mantuvieron un valor hipotético superior a 0,05. De ellos destaca que, 11 se situaban en la región HLA del cromosoma 6p21 (D6S459, D6S2444, D6S1955, D6S1662, D6S1034, D6S1017, D6S1014, TNFa, SA-99, HO16369, G511525) lo que nos confirmó que nuestro estudio tenía potencia para identificar *loci* en desequilibrio de ligamiento en los que se encontraban genes que influyen en la susceptibilidad de la enfermedad con un efecto moderado. Se confirmó la asociación entre la EM y 14 *loci* identificados en estudios previos de ligamiento: 3p14-13, 4q31-tel, 5p15, 5q14-11, 5q23-13, 6p21, 6q27-22, 10q11, 12p13, 12q23, 16p13, 17q21-24, 18p11, 19q13-12 (*Akesson y cols., 2002; Barcellos y cols., 1997b; Chataway y cols., 1998; Dai y cols., 2001; Ebers y cols., 1996; Haines y cols., 1996; Kuokkanen y cols., 1996; Larsen y cols., 2000; Sawcer y cols., 1996; Xu y cols., 1999*). También se identificaron nuevas regiones asociadas a la enfermedad, algunas de ellas situadas cerca de regiones previamente asociadas a la enfermedad.

Figura 7



Leyenda: Ejemplo de imagen del método de las ventanas deslizantes. En la figura se muestra los resultados del análisis del cromosoma 1 del estudio realizado en población española. De un total de 520 marcadores de este cromosoma, 50 mostraron una asociación significativa con EM. El método identificó seis ventanas, marcadas por las flechas en la figura, en las que existe una acumulación excesiva de marcadores asociados de forma significativa a la enfermedad. Modificado de Goertsches y cols., 2003.

1.5.3. Estudios de asociación o estudios de genes candidatos

Paralela y posteriormente a los estudios de ligamiento y al estudio GAMES realizados en EM, se desarrollaron un elevado número de estudios de asociación. Estos estudios basan su estrategia en la selección de genes con función conocida o que se habían asociado previamente a otras enfermedades autoinmunes o neurológicas. Como muestras se utiliza ADN de pacientes y controles no emparentados y del mismo grupo étnico para evitar la existencia de estratificación. Para el estudio de estos genes se emplean marcadores genéticos polimórficos, sobre todo SNPs. La fórmula habitual es la selección de

varios SNPs situados en la región del gen, en su región promotora o en los alrededores de su secuencia, permitiendo la formación de haplotipos. Con el fin de que los SNPs proporcionen la mayor información posible, se seleccionan aquellos que están situados en los exones del gen y, si es posible, que el cambio del nucleótido produzca un cambio en el aminoácido de la proteína, es decir, nucleótidos no sinónimos.

La realización de este tipo de trabajos, a través de la elección de genes candidatos, fue muy común en la primera década del siglo XXI. Algunos de los genes se eligieron por su relevancia biológica, como el *IFN- γ* y diversas *IL* (*IL-1*, *IL-10*), el *TNF- α* o el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (*CTLA-4*), y otros por encontrarse dentro de las regiones cromosómicas previamente asociadas a la EM o a otras enfermedades autoinmunes.

También se realizaron estudios a nivel del ADN mitocondrial, debido a que se había sugerido previamente la posible implicación de estos genes en la EM y a que, enfermedades como la neuropatía óptica hereditaria de Leber, causada por mutaciones en el ADN mitocondrial, tiene como síntoma una desmielinización inflamatoria similar a la que aparece en la EM.

De esta forma, son más de 100 los genes que se han asociado en algún momento a la enfermedad, sin embargo, los resultados de estos estudios no han sido tan concluyentes como podíamos pensar en un principio ya que, aunque el número de genes con resultados estadísticamente significativos para las distintas poblaciones ha sido alto, la replicación de estos hallazgos en otras poblaciones ha sido baja.

El único gen claramente asociado con la EM ha sido el *HLA-DR1*, en concreto el haplotipo *HLA-DR2* (*DRB1*15:01*, *DQA1*01:02*, *DQB1*06:02*) que se encuentra dentro del cromosoma 6p21 y que se ha visto fuertemente ligado a la enfermedad en caucásicos explicando entre el 25-35% del componente genético de la enfermedad (*Olerup y Hillert, 1991; Haines y cols., 1998; Dyment y cols., 2004; Sawcer, 2008*). Además, dentro de este haplotipo los trabajos indican que los alelos *DR* son los más relevantes en la asociación (*Martin y*

cols., 1992). Así, el alelo *HLA-DRB1*15:01*, el principal factor de riesgo, incrementa entre 3 y 7 veces el riesgo de padecer EM en función de si se trata de un homocigoto o un heterocigoto (*Barcellos y cols.*, 2006).

Se barajan varios motivos para explicar la no replicación de los resultados obtenidos para otros genes, quizás el más habitual sea el uso de tamaños muestrales reducidos que limitan el poder estadístico y no permiten confirmar o refutar la participación de los genes estudiados en la susceptibilidad a la enfermedad, sobre todo en aquellos genes con un efecto moderado en la enfermedad. El uso de tamaños muestrales reducidos da lugar a unos valores de OR muy bajos en aquellos genes asociados que ejercen un efecto moderado dentro de la enfermedad. De aquí, que sea necesario utilizar un número elevado de muestras tanto de pacientes como de controles para alcanzar el poder estadístico necesario. Tampoco debemos descartar el uso de diferentes protocolos o tecnologías a la hora de realizar el genotipado de las muestras o la dificultad para la selección de los genes más adecuados para su estudio entre otros.

Los resultados contradictorios de estos trabajos nos ayudaron a entender que este tipo de estudios debían desarrollarse como grandes colaboraciones para poder obtener datos fiables.

1.5.4. GWAS

La aparición de tecnologías de genotipado masivo permitió el desarrollo de GWAS. Estos trabajos tienen la ventaja de permitir el estudio de cientos o incluso miles de SNPs a la vez en cientos o miles de muestras, sin embargo, tienen como desventaja un precio elevado. Su estrategia se basa en la comparación de la frecuencia de los alelos de los SNPs situados en genes a lo largo de todo el genoma utilizando para ello pacientes y controles sanos no vinculados familiarmente. Sin duda, es una potente herramienta para el estudio de enfermedades poligénicas (*Cree, 2014*).

Un problema frecuente en ellos es el alto número de falsos positivos obtenidos en las asociaciones, por lo que hay que optar por la confirmación de los resultados obtenidos con nuevos estudios realizados en poblaciones independientes. El número de estudios realizados mediante *arrays* de SNPs en los últimos años es elevado.

Durante el año 2007 destacan cuatro GWAS realizados que llevaron a la confirmación de la participación en la susceptibilidad a la enfermedad de varios genes distintos al HLA. Dichos estudios fueron desarrollados por el IMSGC (*Hafler y cols., 2007*) y por el *Multiple Sclerosis Genetics Group* (*Gregory y cols., 2007*). En el primero participaron 931 tríos familiares, 609 tríos, 2.322 pacientes y 789 controles. Se realizó un proceso con dos pasos de genotipado, incluyéndose en el primero 334.923 SNPs de los cuales se seleccionaron 110 para un segundo genotipado de confirmación. De estos 110 SNPs, mostraron una fuerte asociación con la EM dos SNPs situados en el gen de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (*IL2R α*), un SNP situado en el gen de la cadena alfa del receptor de la IL-7 (*IL7R α*), y varios SNPs situados en el *locus HLA-DRA* fuertemente asociado a la EM. En el segundo estudio se incluyeron 760 familias estadounidenses y se identificó una asociación entre un SNP situado en el gen del *IL7R α* (*rs6897932*) y la EM. Posteriormente, estos resultados fueron confirmados en varios estudios realizados en población europea independiente. El valor p alcanzado tras el análisis de todos los datos obtenidos fue de $2,9 \times 10^{-7}$.

Posteriormente, en el mismo año, se realizó un tercer estudio (*Lundmark y cols., 2007*), en el que se incluyeron muestras de 1.820 pacientes y 2.634 controles sanos de países nórdicos (Dinamarca, Finlandia, Noruega y Suecia). En este estudio se genotiparon varios SNPs entre los que se encontraba el *rs6897932* confirmándose también la asociación del gen *IL7R α* , a través del SNP *rs6897932*, que fue el más fuertemente asociado con la EM.

Por tanto, de estos tres estudios cabe destacar la confirmación de la participación de genes del HLA así como de los genes *IL7R α* e *IL2R α* en la susceptibilidad a padecer EM.

El cuarto estudio fue el realizado por *Burton y cols.*, también en el 2007, en el que incluyeron 975 pacientes y 1.500 controles y estudiaron 14.500 SNPs no sinónimos, obteniendo como resultado asociaciones para 10 genes. Además de replicarse la asociación del HLA observada previamente, se asociaron también SNPs de genes como *SLC4A5*, *FJL10902*, *IL7R*, *INNPP5A*, *LRP5*, *GIPR*, *SAP102*, *ZNF45* y *FJL10204*.

Un año después, en 2008, *Comabella y cols.*, realizaron un GWAS en el que se incluyeron *pools* de ADN de 242 pacientes con EMRR/SP y el mismo número de controles. Para el genotipado utilizaron el *microarray* Affymetrix 500K EA con 428.867 SNPs. Tras el primer genotipado se seleccionaron 320 SNPs, los que mostraron un mayor grado de asociación. Con estos SNPs se realizó una segunda fase, incluyendo 100 pacientes y 100 controles sanos, en el que se buscaba la confirmación de las asociaciones obtenidas inicialmente. Como resultados se obtuvieron 8 SNPs que mostraron una asociación más fuerte alcanzando valores *p* por debajo de 0,01. La validación de este estudio viene dada por el hecho de que, como en anteriores estudios realizados, el SNP que mostró una mayor asociación fue el *rs3129934* situado cerca del *locus* HLA-DRB1 (valor *p*=1,4 x 10⁻⁵; OR=3). El resto de SNPs asociados se encontraban situados en los genes *E2F1*, *LOC121727* y uno de ellos, el de mayor valor *p* tras *rs3129934*, se situaba en una región no anotada previamente del cromosoma 13, concretamente en la región 13q31.3.

En 2009 fueron *Baranzini y cols.*, los que realizaron un GWAS en el que se incluyeron 978 pacientes y 883 controles sanos. Para ello se utilizó el *microarray* Sentrix HumanHap550 BeadChip con 551.642 SNPs. En este estudio se volvió a confirmar la participación del HLA en la enfermedad. Además 13 marcadores pertenecientes a 12 genes alcanzaron valores *p* estadísticamente significativos ≤ 0,05. Se trata de los genes *C20orf46*, *GPC5*, *PDZRN4*, *CSMD1*, *SLC25A36*, *SH3GL2*, *TBC1D2*, *EN1*, *MGC45800*, *ZIC1*, *DDEF2* y *TRIB2*. Por otro lado, se obtuvieron resultados positivos para genes que habían sido anteriormente asociados con la enfermedad en el estudio

realizado en el 2007 por el IMSGC. Estos fueron *PTPRU*, *PARK2*, *RDH10*, *JRK* y *RPS29*.

También en el 2009, *De Jager y cols.*, realizaron un meta-análisis de varios GWAS publicados y no publicados previamente. Se trabajó con datos de 2.560.000 SNPs genotipados en 2.624 pacientes y 7.220 controles sanos. Como resultado obtuvieron la replicación de asociación de varios genes implicados como el *HLA-DRB1*, *HLA-B*, *CD58*, *IL2RA*, *IL7R* y *CLEC16A*. Junto a éstos, obtuvieron resultados positivos para un grupo de tres genes que previamente no habían sido asociados: *TNFRSF1A*, *IRF8* y *CD6*. Por último, identificaron siete genes que, aunque no alcanzaron valores estadísticamente significativos, si mostraron una tendencia. Se trata de los genes *CXCR4*, *PTGER4*, *MPHOSPH9*, *ZMIZ1*, *IL12A*, *RGS1* y *OLIG3-TNFAIP3*.

En el mismo año, el ANZgene realizó también un GWAS con 1.618 pacientes y 3.413 controles sanos en los cuales se genotiparon 302.098 SNPs. Para 46.817 SNPs se obtuvo un valor p significativo ($< 1 \times 10^{-4}$). Con los 100 SNPs que presentaron un valor p más significativo, se llevó a cabo un estudio de confirmación en el que se incluyeron 2.256 pacientes y 2.310 controles. De estos 100 SNPs, 91 pasaron los filtros de control de calidad. Veintiuno de ellos alcanzaron un valor p $\leq 0,05$. De los 21 SNPs, seis de ellos pertenecían a *loci* no asociados previamente a la susceptibilidad a la EM (12q13-14 y 20q13), otros nueve pertenecían a *loci* que, aunque previamente no se habían asociado a EM, si se había visto una tendencia. Y otros seis pertenecían a *loci* previamente asociados a la susceptibilidad de padecer EM.

En 2010 *Sanna y cols.*, realizaron un nuevo GWAS en el que incluyeron 882 pacientes y 872 controles sanos. En cuanto al número de SNPs genotipados en estas muestras fueron 6.607.266 usando para ello el *microarray* de Affymetrix 6.0. Como en los casos anteriores, los SNPs que alcanzaron un valor significativo más elevado fueron aquellos situados dentro de la región del HLA. Posteriormente, se eligieron nueve SNPs para ser validados en una cohorte diferente compuesta por 1.264 pacientes y 1.305 controles. En los controles se incluyeron 403 pseudo-controles que provenían de tríos con un afectado. De los nueve SNPs solamente uno mostró un valor p significativo ($p \leq 0,05$) y fue nuevamente genotipado en una cohorte con 511 pacientes y 700 controles entre los que se incluían 128 pseudo-controles. En

concreto, el SNP que se genotipó fue el rs9657904 que se encuentra situado en el intrón 1 del gen *CBLB*. Otro GWAS realizado en 2010 fue el de *Nischwitz y cols.*, en este caso se incluyeron 590 pacientes y 825 controles sanos y se genotiparon con los *microarrays* Illumina HumanHap300 y Human CNV 370-2. El *microarray* Illumina HumanHap300 contiene aproximadamente 300.000 SNPs. Catorce de los SNPs que presentaron un valor estadísticamente significativo estaban situados en la región del HLA. Fuera de esta región, los SNPs que presentaron un valor p más significativo fueron tres: *rs3780792* que pertenece al gen *VAV2*, *rs3745672* que pertenece al gen *ZNF433*, y por último el SNP intergénico *rs2503875*.

En el 2011 fue el grupo de *Patsopoulos y cols.*, los que realizaron un meta-análisis de estudios realizados previamente, en concreto del GWAS realizado en 2007 por el IMSSGC, el meta-análisis realizado por *De Jager* en 2009 y el GWAS realizado por ANZgene en 2009. Se incluyeron datos de 5.545 pacientes y 12.153 controles sanos en los que se habían genotipado 2.529.394 SNPs. Como en los otros casos, la mayoría de los SNPs que alcanzaron valores p significativos estaban ubicados en la región del HLA. Tres de los SNPs no habían sido descritos previamente asociados a la EM ni a otras enfermedades inflamatorias. Se trata del SNP *rs170934* localizado en una zona intergénica del cromosoma 3 entre los genes *CMC1* de función desconocida y el gen *EOMES* que es parálogo de *TBX21/TBET*. El segundo SNP es el *rs2150702* que se encuentra situado en el segundo intrón del gen *MLANA* en el cromosoma 9 que es conocido como antígeno del melanoma. Y, por último, el tercer SNP es el *rs6718520* también situado en una región intergénica del cromosoma 2 cerca del gen *THADA*. También se obtuvieron datos para otros cuatro *loci* previamente asociados a la EM; se trata de SNPs situados en la región de los genes *IL2RA*, *CD58* y *STAT3*. Sin embargo, no se encontraron valores significativos para *loci* previamente asociados como *KIF1B*, *CBLB* y *cr5p15.32*. Tras este importante número de GWAS realizados entre el 2007 y el 2010 el número de genes asociados a la susceptibilidad de la EM que se habían confirmado ya superaba los 40.

Es importante mencionar que el GWAS realizado hasta el día de hoy con mayor tamaño muestral fue el desarrollado por parte del IMSSGC (*IMSSGC and WTCCC2, 2011*), que incluyó 9.772 pacientes y 17.376 controles sanos. En él

se genotiparon 441.547 SNPs y, tras la realización de las confirmaciones necesarias, este estudio obtuvo resultados que permitieron elevar a 52 el número de *loci* que conferían riesgo para la EM. En 2013 se recuperaron cinco loci de este estudio que habían quedado muy cerca de alcanzar el valor estadísticamente significativo necesario y se volvieron a estudiar con un resultado positivo que hizo aumentar el número de *loci* asociados hasta 57 (IMSGC, 2013a). En ese mismo año se publicaron los datos del InmunoChip, en el cual tras genotipar 38.589 SNPs se elevó el número de genes fuera de la región del HLA asociados de forma sólida con la EM hasta 110 (IMSGC, 2013b). En breve se publicarán por parte del IMSGC los resultados de un meta-análisis de todos los GWAS realizados hasta la fecha, y se estima que aumentará el número de genes asociados con la EM a más de 200.

Por tanto, los GWAS están generando una gran cantidad de información en cuanto a genes implicados en la enfermedad. Sin embargo, al realizar estudios de expresión nos encontramos con que los resultados no se reproducen ya que, tras varios estudios publicados solamente un 6% de los genes diferencialmente expresados se han identificado en al menos dos estudios (Kempainen y cols., 2011)

Por tanto, con los estudios realizados hasta este momento, podríamos decir que la EM es una enfermedad genéticamente compleja en la que intervendrían un indeterminado número de genes donde cada uno de ellos contribuiría con un riesgo pequeño o como mucho moderado en el desarrollo de la enfermedad. El número de genes implicados en la enfermedad, las interacciones que existen entre ellos así como, entre genes y ambiente son aún desconocidos.

1.6. Justificación del estudio

La genética ha experimentado avances muy importantes en el último siglo gracias, sobre todo, a los descubrimientos e invenciones que se produjeron en este campo. Entre ellos, los más destacados han sido el descubrimiento de la estructura de doble cadena del ADN, en 1953, por *J. Watson y F. Crick* (Watson y Crick, 1953), la invención de la técnica de PCR (Mullis y cols, 1986)

y el desarrollo del Proyecto Genoma Humano que, concluido en 2004, nos ha permitido conocer la secuencia completa de nuestro genoma (*International Human Genome Sequencing Consortium, 2004*). Estos tres progresos han permitido un importante desarrollo de la genética en general y de la genética humana molecular, la genómica, la farmacogenética, la farmacogenómica, la biotecnología y la biomedicina, en particular.

El estudio de las bases genéticas de las enfermedades es clave para un diagnóstico mejor y más rápido de las patologías así como para su mejor tratamiento. En los últimos años se han descubierto un gran número de genes que pueden generar susceptibilidad a la EM; sin embargo, hay muchos que aún están pendientes de replicación en otras poblaciones o que obtenidos a través de tecnologías de genotipado masivo o de secuenciación están pendientes de confirmación.

El presente estudio persigue la confirmación de la participación de tres genes en la susceptibilidad a la EM. En concreto, se trata del gen *PRF1*, el gen *CASP8* y el gen *BTG1*.

Las razones que nos llevaron a la selección de estos tres genes para su confirmación son varias.

En primer lugar, el hecho de que estos tres genes estén implicados en el mecanismo de muerte celular por apoptosis. Como ya se ha mencionado anteriormente, existen estudios que indican que la apoptosis podría jugar un papel importante en la EM (*Zipp, 2000; Torado y cols., 2004*) debido a la relación que se ha visto que existe entre la apoptosis y la inflamación, uno de los hallazgos más característicos de la EM.

Una segunda razón fueron los resultados obtenidos en el proyecto GAMES. Este proyecto consistió, como ya se describió anteriormente, en el genotipado de 6.000 microsatélites en muestras de pacientes y controles reunidas formando *pooles*. Una vez realizado el genotipado, los resultados de la población española fueron analizados mediante el método de las ventanas

deslizantes, lo que permitió obtener regiones del genoma asociadas a la susceptibilidad de padecer EM. Tras conocer dichas regiones, se hicieron búsquedas de los genes incluidos dentro de aquéllas que presentaban un valor *p* inferior a 0,05 y en sus alrededores, delimitando el estudio a las 5.000 pares de bases anteriores y posteriores a la región. Entre los genes incluidos en estas regiones o en sus alrededores, se encontraron diversos genes implicados en la apoptosis, entre los que estaban *PRF1* (situado en la región anterior a la zona D10S537-D10S1685), *CASP8* (situado en la región posterior a la zona D2S2392-D2S309), y *BTG1* (situado en la región anterior a la zona D12S2077-D12S301). Las regiones obtenidas a partir del proyecto GAMES que contienen dos o más marcadores se muestran a continuación (Tabla 1).

La tercera razón para nuestra selección sería el hecho de que existían estudios previos, realizados con *microarrays* de expresión, en los cuales también se vieron diferencias en la expresión de genes implicados en la apoptosis (*Comabella y Martin, 2007*).

Tabla 1

Cr.	Región	Cr	Región
1	D1S478-D1S2725	9	D9S144-D9S775
	ATA-D1S520	10	D10S1751-D10S1779
	D1S394-D1S398		D10S537-D10S1685
	D1S2794-D1S1660	11	D11S1366-D11S4120
	D1S2760-D1S1644	12	D12S391-D12S1581
2	D2S297-D2S1400	13	D13S1492-D13S146
	D2S428-D2S394	14	D14S585-D14S283
3	D3S611-D3S3693		D14S1280-D14S275
	D3S2425-D3S2427		D14S614-D14S267
4	D4S2460-D4S3245	15	D15S811-D15S999
5	D5S1953-D5S1486	16	D16S769-D16S3093
	D5S1463-D5S2499	17	D17S974-D17S1303
	D5S494-D5S657		D17S917-D17S808
6	TNFa-D6S2444	18	D18S865-D18S872
	D6S1275-D6S467	20	D20S603-D20S846
7	D7S677-D7S634	X	DXS1218-DXS8049
8	D8S543-D8S175		DXS339-DXS8052

Leyenda: Ventanas que incluyen grupos de marcadores asociados a EM en población española.

En este contexto, se observaron diferencias en cuanto a la expresión de la *PRF1* en el estudio realizado por *Baranzini y cols.*, 2005 en el modelo animal de EM.

En el caso de *BTG1* se vio una diferencia en su expresión en PBMCs tanto en el análisis realizado por *Bomprezzi y cols.*, 2003 como en el de *Mandel y cols.*, 2004. Además, también se observaron diferencias en la expresión de este gen en el estudio llevado a cabo en tejido cerebral por *Jelinski y cols.*, 2005 y en estudios realizados en modelo animal por *Spach y cols.*, 2004; *Baranzini y cols.*, 2005; *Paintlia y cols.*, 2004; *Ibrahim y cols.*, 2001; *Jelinski y cols.*, 2005 y *Carmody y cols.*, 2002.

En el caso del gen *CASP8* se observaron diferencias en cuanto a su expresión en los estudios realizados por *Mandel y cols.*, 2004; *Maas y cols.*, 2002; *Achiron y cols.*, 2004 en PBMCs y los realizados por *Baranzini y cols.*, 2005 y *Carmody y cols.*, 2002 en EAE.

Por tanto, el estudio de la implicación de genes relacionados con la apoptosis en la etiopatogénesis de la enfermedad es importante a la hora de identificar biomarcadores ya sea tanto para el pronóstico y/o diagnóstico de la enfermedad, como para predecir la respuesta a los distintos tratamientos. Este es el motivo que nos ha llevado a realizar esta tesis en la que se incluyen los resultados de los estudios realizados para la confirmación de la participación en la susceptibilidad de padecer EM de tres genes candidatos involucrados en la apoptosis. Los genes estudiados se describen a continuación.

1.6.1. El gen *PRF1*

Varios estudios han sugerido un importante papel de las células T CD8⁺ citotóxicas autoinmunes en la EM, ya que son el subgrupo de células T más frecuente en los infiltrados inflamatorios de las lesiones producidas en la enfermedad y se cree que contribuyen al daño neuronal (*Skulina y cols.*, 2004; *Friese y Fugger*, 2005; *Junker y cols.*, 2007; *Pittock y Lucchinetti*, 2007; *Lu y cols.*, 2009; *Friese y Fugger*, 2009). Una de las vías a través de las cuales estas células ejercen su citotoxicidad es la de la *PRF1*.

La PRF1 es una glicoproteína de 70 Kda y 534 aminoácidos que pertenece a la familia de proteínas denominado complejo de ataque de membrana/perforina, conocidas como MACPF por sus siglas en inglés, y cuya principal función es formar poros, compuestos de entre 12 y 18 monómeros, en la membrana de las células sobre las que actúa, para permitir la entrada de granzimas en el citoplasma de la célula diana dando lugar a un efecto citolítico y muerte por apoptosis con actividad de las CASPs (*Tschopp y cols., 1986; Lichtenheld y cols., 1988; Trapani y Smyth, 2002*). Se ha visto que la granzima B se presenta en niveles elevados en las lesiones activas de EM (*Haile y cols., 2011*). Dentro de las células que la contienen, además de las células citotóxicas T CD8⁺, están las células NK y las células T $\gamma\delta$ (*Chavez-Galan y cols., 2009; Tejera-Alhambra y cols., 2012*) donde se encuentra formando gránulos citoplasmáticos líticos que son liberados sobre sus células dianas para su eliminación, una vez que estas son reconocidas por la célula citotóxica. Recientemente, se ha visto la expresión de PRF1 en otros tipos celulares como neutrófilos (*Kish y cols., 2012*) y células B reguladoras donde se cree que podría mediar la función supresora de estas células sobre los linfocitos T CD4⁺ (*De Andrés y cols., 2014*).

Los mecanismos que ponen en marcha la liberación de la PRF1 no son del todo conocidos pero se sabe que están involucradas proteínas como la Munc 13-4, Munc 18-2 o la syntaxina 11 (*Lieberman, 2003*).

Además de su efecto citolítico, recientemente también se han visto efectos no citolíticos para la PRF1 como su participación en el control de la reactivación de la infección neuronal provocada por el virus HSV-1 o su contribución a la activación de células T CD8⁺ y presentación del antígeno a las células dendríticas durante la infección por arenavirus (*Knickelbein y cols., 2008; Lykens y cols., 2011; Terrell y Jordan, 2013*).

En cuanto a la genética no queda muy claro cómo las alteraciones en el gen *PRF1* influyen en la EM. Se sabe que mutaciones bialélicas del gen *PRF1* causan la enfermedad conocida como linfocitosis hemofagocítica familiar. Se trata de una enfermedad con similitudes al síndrome autoinmune

linfoproliferativo, que se caracteriza por una inflamación progresiva causada por una respuesta inmune ineficiente e incontrolada debido al fallo en las células CTL y NK.

Estudios *in silico* muestran que la aparición de mutaciones en la estructura de *PRF1*, generalmente, producen una desestabilización de la estructura de la proteína dando lugar a un plegado incorrecto de la molécula y, algunas de estas mutaciones, reducen su actividad generando susceptibilidad a enfermedades autoinmunes como la EM. Sin embargo, otros estudios apuntan a que la no expresión por delección genética de la *PRF1* protege a los axones desmielinizados (Howe y cols., 2007; Deb y cols., 2009; Deb y cols., 2010) o a que la rotura de la barrera hematoencefálica es dependiente de la expresión de *PRF1* (Suidan y cols., 2008).

Por último, trabajos previos de nuestro grupo han permitido identificar en población española regiones genómicas que están implicadas en la susceptibilidad a la EM, entre las que se encuentra la región 10q21 que alberga el gen *PRF1* (Goertsches y cols., 2003; Marquès-Bonet y cols., 2005). Otros dos genes incluidos en esta región genómica, *disintegrin and metalloproteinase metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 14 (ADAMTS14)* y *chromosome 10 open reading frame 27 (C10orf27)*, se han asociado con la susceptibilidad a padecer EM (Goertsches y cols., 2005; Goertsches y cols., 2008).

Otros estudios como el realizado por Cappellano y cols., 2008, donde se secuenció el gen *PRF1* en un grupo de casos y controles recogidos entre población italiana, muestran la existencia de un mayor número de variaciones en el gen *PRF1* en el caso de los pacientes con EM. Por ello, teniendo en cuenta las evidencias encontradas que apuntan a que la *PRF1* puede tener un papel en el riesgo genético de padecer EM, hemos decidido estudiar si polimorfismos incluidos en el gen *PRF1* estarían implicados en la susceptibilidad a la EM.

1.6.2. El gen de la CASP8

Las CASPs, como ya se dijo antes, son una familia de enzimas intracelulares que participan activamente en la apoptosis dando lugar a la muerte celular. Se ha visto que actúan sobre varios tipos celulares, entre los que se encuentran las neuronas en diversas enfermedades neurodegenerativas. En concreto, la CASP8, conocida previamente como FLICE, cuyo gen se localiza en el cromosoma 2, está incluida entre las CASPs denominadas iniciadoras del proceso apoptótico a través de la vía extrínseca (*Barnhart y cols., 2003*). Como sucede en otras CASPs, la CASP8 es sintetizada como un zimógeno monomérico formado por un prodominio, compuesto por dos dominios efectores de muerte (conocidos por sus siglas en inglés DED), unido a dos subunidades catalíticas conocidas como subunidad grande y subunidad pequeña. Para que la CASP8 se active es necesario la rotura enzimática del zimógeno a nivel de dos residuos de ácido aspártico situados en las posiciones 374 y 384 entre las subunidades grande y pequeña (*Zhao y cols., 2010*). Su inhibición vendría dada por dos isoformas parálogas no catalíticas de la CASP8 denominadas cFLIP_L y cFLIP_S, en función de que se trate de la forma larga o corta.

Además de su función dentro de la apoptosis, esta enzima presenta también funciones no apoptóticas importantes como participación en el desarrollo embrionario, activación y proliferación de las células T, proliferación de otras células como las B o las NK, migración celular o activación de la microglía (*Chun y cols., 2002; Salmena y cols., 2003; Burguillos y cols., 2011*). Estudios realizados en ratones indican que la disminución en la expresión de CASP8 en la etapa embrionaria lleva a la muerte del embrión debido a una necrosis incontrolada.

Esta enzima ha sido implicada en enfermedades como la EM, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer entre otras (*Das y cols., 2008; Tokuda y cols., 2007; Tatton y cols., 2003; Ho y cols., 2009; Taru y cols., 2004; Chung y cols., 2003; Burguillos y cols., 2011*).

En estudios previos se ha visto que la disminución en la expresión del gen *CASP8* está correlacionada con la rotura de la barrera hematoencefálica y con la inflamación cerebral. Estos hallazgos invitan a pensar que la baja expresión podría estar involucrada en un fallo de la regulación de las células de sangre periférica que pueden atravesar la barrera hematoencefálica (*Gomes y cols., 2003*).

En trabajos realizados por nuestro grupo se vio que el gen *CASP8* estaba situado próximo a una región cromosómica localizada en el cromosoma 2 (2q33-q34) que confiere susceptibilidad para la EM (*Goertsches y cols., 2003; Marques-Bonet y cols., 2005*). Por otro lado, la *CASP8* presenta diferentes perfiles de expresión en estudios realizados tanto en pacientes con EM como en el modelo animal de la enfermedad, la EAE (*Comabella y Martin, 2007*). Por último, diversos estudios en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la EM frente a controles sanos, han encontrado una sobreexpresión de esta enzima en PBMCs mientras otros han encontrado una disminución de su expresión (*Maas y cols., 2002; Mandel y cols., 2004*). Además, se observó una disminución de la expresión durante el brote comparado con la fase de remisión (*Achiron y cols., 2004*). Estudios en EAE han mostrado una sobreexpresión en el SNC durante la fase de brote frente a la fase de recuperación y frente a controles sanos (*Carmody y cols., 2002; Baranzini y cols., 2005*).

También se cree que la *CASP8* podría jugar un papel importante en el proceso de neuroinflamación, uno de los hallazgos más característicos de la EM, junto al inflammasoma NLRP3, el cual se ha visto que participa en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas y se cree que podría estar implicado en la EM de acuerdo con los resultados obtenidos en modelo animal, aunque por ahora aún no está del todo claro (*Inoue y Shinohara, 2013; Inoue y cols., 2012*).

Teniendo en cuenta todos estos hallazgos y la importancia de la apoptosis en la patogénesis de la enfermedad, decidimos estudiar el gen de la *CASP8*.

1.6.3. El gen *BTG1*

La familia BTG/Tob se compone por seis proteínas (BTG1, BTG2/PC3/Tis21, BTG3/ANA, BTG4/PC3B, TOB1/TOB, and TOB2) (Winkler, 2010). En mamíferos, estas seis proteínas han sido clasificadas en tres subfamilias basándose en la longitud de la secuencia de su extremo C-terminal. Las subfamilias estarían formadas en primer lugar por BTG1 y BTG2, la segunda subfamilia la formarían BTG3 y BTG4, y la tercera TOB1 y TOB2 (Matsuda y cols, 2001; Mauxion y cols, 2009; Winkler, 2010). La función de estas proteínas es inhibir la proliferación celular y la progresión del ciclo celular junto con inducir la diferenciación en varios tipos celulares. En el caso del gen *BTG1*, la proteína codificada corresponde a un cofactor transcripcional que regula la división y diferenciación de varios tipos celulares y que fue identificado a partir de un caso de leucemia linfoblástica de células B con translocación cromosomal (Rouault y cols, 1992). Su mayor expresión se produce cuando el ciclo celular se encuentra en la fase G₀/G₁ y su expresión disminuye cuando el ciclo celular se encuentra en la fase G₁. Además, la proteína BTG1 puede unirse al receptor TR α , al factor miogénico MyoD, a la proteína *arginine methyltransferase 1* y al *human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1* (Rouault y cols., 1992; Bogdan y cols., 1998; Kawamura-Tsuzuku y cols., 2004; Busson y cols., 2005; Hata y cols., 2007). Su estructura cuenta con una región conservada en el extremo N-terminal de entre 100-120 aminoácidos que contiene dos zonas bien conservadas conocidas como cajas A y B (Mauxion y cols, 2009; Winkler, 2010). La caja A tendría una función antiproliferación mientras que la B parece que actúa como lugar de unión a las moléculas diana (Yang y cols., 2008). Se ha detectado sobreexpresión de BTG1 en células apoptóticas y en relación con los efectos citotóxicos inducidos por el Bcl-2 antisentido (Corjay y cols., 1998; Nahta y cols., 2006), y se ha visto que su inhibición conlleva una desinhibición del ciclo celular acompañado de apoptosis.

El papel del gen *BTG1* ha sido muy estudiado en varios tipos de cáncer como por ejemplo el cáncer gástrico, cáncer de próstata, y la leucemia linfoblástica, pero no en otro tipo de patologías. Sin embargo, estudios previos realizados por nuestro grupo (Goertsches y cols., 2003; Marques-Bonet y cols., 2005) dieron lugar a la identificación de la región 12q 22, situada en el

cromosoma 12, como región que confiere susceptibilidad a la EM. En esta región se encuentra incluido el gen *BTG1*. Estos datos sumados a su participación en el proceso de apoptosis, proceso importante en el desarrollo de la EM (Zipp, 2000), nos ha llevado a estudiar el papel que este gen juega en la EM.

Para confirmar la participación de estos tres genes en la susceptibilidad a padecer EM se van a realizar los siguientes pasos:

- 1- Genotipado de SNPs localizados en los tres genes candidatos usando muestras de ADN de población española.
- 2- Confirmación de los resultados obtenidos mediante estudio de los SNPs asociados a la susceptibilidad a padecer EM en población española y en muestras de ADN de cohortes independientes de otras poblaciones.
- 3- Estudios de expresión en muestras de pacientes de población española portadoras de los haplotipos asociados a la susceptibilidad de la enfermedad.
- 4- Estudios mediante citometría de flujo y/o ensayos funcionales de los haplotipos asociados a la susceptibilidad de la enfermedad.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Las hipótesis conceptuales de este estudio son las siguientes:

- Los genes *BTG1*, *CASP8* y *PRF1* confieren susceptibilidad a la EM en población española.
- Los genes *BTG1*, *CASP8* y *PRF1* confieren susceptibilidad a la EM en otras poblaciones distintas a la española.
- Los niveles de expresión de los genes *BTG1*, *CASP8* y *PRF1* se encuentran diferencialmente expresados en PBMCs de pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad y respecto a controles sanos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo 1:

Confirmar la asociación de los genes *BTG1*, *CASP8* y *PRF1* con el riesgo de EM en población española.

Objetivo 2:

Confirmar la asociación de los genes *BTG1*, *CASP8* y *PRF1* con el riesgo de EM en otras poblaciones distinta a la española.

Objetivo 3:

Investigar si polimorfismos de los genes *BTG1*, *CASP8* y *PRF1* se asocian con diferencias en los niveles de expresión y alteraciones funcionales en PBMCs de pacientes con EM y controles sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Población del estudio

Para realizar estos estudios se recogieron muestras de sangre completa de pacientes, no emparentados, con distintas formas clínicas de EM, que seguían control periódico en la Unitat de Neuroimmunologia Clínica del Hospital Vall d'Hebron (Barcelona). Todos los casos incluidos eran de origen español y cumplieron los criterios de Poser de EM clínicamente definida (*Poser y cols., 1983*). La gravedad de la enfermedad se midió con la escala MSSS (*Roxburgh y cols., 2005*).

Como grupo control se utilizaron sujetos, no emparentados, cuya muestra de sangre se obtuvo a través del Banc de Sang i Teixits de Catalunya que tiene un centro territorial ubicado también en el Hospital Vall d'Hebron. Al igual que en el caso de los pacientes, los sujetos control fueron todos de origen español y ninguno de ellos presentaba EM en el momento de la donación ya que, en la legislación española se recoge la EM como motivo de exclusión definitiva para la donación de sangre (Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre)

De todos los pacientes y controles incluidos en el estudio se obtuvo consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica del Hospital Vall d'Hebron.

4.1.1. Características clínicas

Las características clínicas de los controles y pacientes incluidos en el estudio de cada gen se muestran a continuación (Tablas 2, 3 y 4):

Tabla 2

<i>Características</i>	<i>Controles sanos</i>	<i>Pacientes con EM</i>	<i>Pacientes con EMRR/SP</i>	<i>Pacientes con EMPP</i>
<i>n</i>	512	420	324	96
<i>Mujer/Hombre (% mujeres)</i>	280/232 (54,7)	260/160 (61,9)	209/115 (64,5)	51/45 (53,1)
<i>Edad (años)^a</i>	40,3 (11,4)	42,6 (11,9)	39,7 (10,7)	53,3 (9,6)
<i>Evolución de la enfermedad (años)^a</i>	--	12,4 (7,7)	12,1 (7,5)	13,4 (8,0)
<i>EDSS^b</i>	--	4,0 (2,0-6,0)	3,0 (2,0-6,0)	6,0 (4,5-7,0)

Leyenda: Características clínicas de pacientes y controles incluidos en el estudio del gen *PRF1*. ^aDatos expresados como media (DE). ^bDatos expresados como mediana (rango intercuartil).

Tabla 3

<i>Características</i>	<i>Controles sanos</i>	<i>Pacientes con EM</i>	<i>Pacientes con EMRR/SP</i>	<i>Pacientes con EMPP</i>
<i>n</i>	547	546	416	130
<i>Mujer/Hombre (% mujeres)</i>	300/247 (54,9)	346/200 (63,3)	277/139 (66,5)	68/62 (52,5)
<i>Edad (años)^a</i>	46,5 (12,7)	47,4 (12,4)	44,3 (10,7)	60,1 (10,0)
<i>Evolución de la enfermedad (años)^a</i>	--	12,5 (7,9)	12,3 (8,0)	13,5 (8,9)
<i>EDSS^b</i>	--	4,0 (2,0-6,0)	3,0 (2,0-6,0)	6,0 (5,0-7,0)

Leyenda: Características clínicas de pacientes y controles incluidos en el estudio del gen *CASP8*. ^aDatos expresados como media (DE). ^bDatos expresados como mediana (rango intercuartil)

Tabla 4

<i>Características</i>	<i>Controles sanos</i>	<i>Pacientes con EM</i>	<i>Pacientes con EMRR/SP</i>	<i>Pacientes con EMPP</i>
<i>n</i>	548	550	430	120
<i>Mujer/Hombre (% mujeres)</i>	300/248 (54,7)	351/199 (63,8)	286/144 (66,5)	65/55 (54,2)
<i>Edad (años)^a</i>	45,5 (12,8)	46,7 (12,3)	43,5 (10,7)	58,5 (10,3)
<i>Evolución de la enfermedad (años)^a</i>	--	17,5 (8,1)	17,2 (7,6)	18,7 (9,2)
<i>EDSS^b</i>	--	4,1 (2,0-6,0)	3,5 (1,8-6,0)	5,6 (5,0-6,0)

Leyenda: Características clínicas de pacientes y controles incluidos en el estudio del gen *BTG1*. ^aDatos expresados como media (DE). ^bDatos expresados como mediana (rango intercuartil)

4.2. Extracción de ADN genómico

A cada uno de los casos y controles incluidos en el estudio se le extrajo una muestra de sangre utilizando para ello 3 tubos con EDTA (Vacutainer) de 10 ml.

Para aislar el ADN genómico de las muestras se utilizó una versión modificada del protocolo descrito por *Miller y cols.*, (1988) basado en la deshidratación y precipitación de las proteínas celulares mediante el uso de una solución salina saturada. Posteriormente se determinó la concentración y la pureza del ADN (ver protocolos en Anexo 1, apartados 1 y 2)

4.3. Selección de SNPs

Como ya se ha comentado anteriormente, los genes elegidos para el estudio fueron tres: *PRF1*, *CASP8* y *BTG1*. La selección de los SNPs que se utilizaron para el genotipado, con el fin de verificar que se trata de genes candidatos a conferir susceptibilidad a la EM, se hizo teniendo en cuenta los siguientes criterios:

En primer lugar, se realizó una selección de aquellos SNPs conocidos como *tag* SNPs que se caracterizan por ser SNPs representativos de una región del genoma con un elevado desequilibrio de ligamiento y nos permiten detectar variación genética sin tener que genotipar todos los SNPs de la región. Para realizar esta selección se utilizó la información del proyecto HapMap y, de esta forma, se seleccionaron los siguientes *tag* SNPs: *rs12694* del gen *BTG1*, *rs2037815* del gen *CASP8*, *rs885822* y *rs3758562* del gen *PRF1*.

Tras esta selección, y para incrementar la información obtenida a través del genotipado, se incluyeron algunos SNPs más para cada gen estudiado. Para esta segunda selección se tuvo en cuenta que la frecuencia alélica menor en la población fuera superior a 0,10 y que, si era posible, estuviera en un bloque de desequilibrio de ligamiento distinto al del *tag* SNP elegido en caso de que existiera otro bloque dentro del mismo gen. Además, cuando era posible, se seleccionaron SNPs funcionales. La segunda selección se realizó con *Celera Discovery System™ SNP database*, disponible en la página web de Applied Biosystems y que se puede consultar a través del programa *SNPBrowser version 3.5*.

La selección final de SNPs estudiados para cada gen fue la que se recoge en la Tabla 5.

Tabla 5

<i>Gen</i>	<i>SNP</i>	<i>P. física^a</i>	<i>Posición</i>	<i>Variación</i>	<i>FAM^b</i>	<i>FAM^c</i>
<i>PRF1</i>	<i>rs885822</i>	72.028.583	Exón 3 (sinónimo)	A/G	0,38	0,39
	<i>rs10999426</i>	72.030.044	Intrón 2	A/G	0,29	0,33
	<i>rs3758562</i>	72.032.086	Intrón 1	A/G	0,29	0,33
<i>CASP8</i>	<i>rs2037815</i>	201.809.960	Intrón 2	A/G	0,48	0,46
	<i>rs12990906</i>	201.822.869	Intrón 2	C/T	0,45	0,44
	<i>rs1035140</i>	201.860.736	Exón 10 (3' UTR)	A/T	0,43	0,39
<i>BTG1</i>	<i>rs731652</i>	91.062.940	Intrón 1	C/T	0,26	0,19
	<i>rs12694</i>	91.063.721	Exón 1	A/G	0,42	0,42

Leyenda. Características de los SNPs seleccionados para el estudio. ^aPosición física basado en NCBI build 129 genome. ^bFAM: Frecuencia alélica menor para individuos de origen caucásico (Applied Biosystems). ^cFAM: Frecuencia alélica menor para la población española de este estudio.

4.4. Genotipado de los SNPs: ensayo de la 5' nucleasa

Para el genotipado de los SNPs seleccionados se utilizó la técnica basada en la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa junto a sondas fluorogénicas TaqMan para la discriminación entre los dos alelos de un SNP. Se trata de sondas comercializadas por la casa comercial Applied Biosystems.

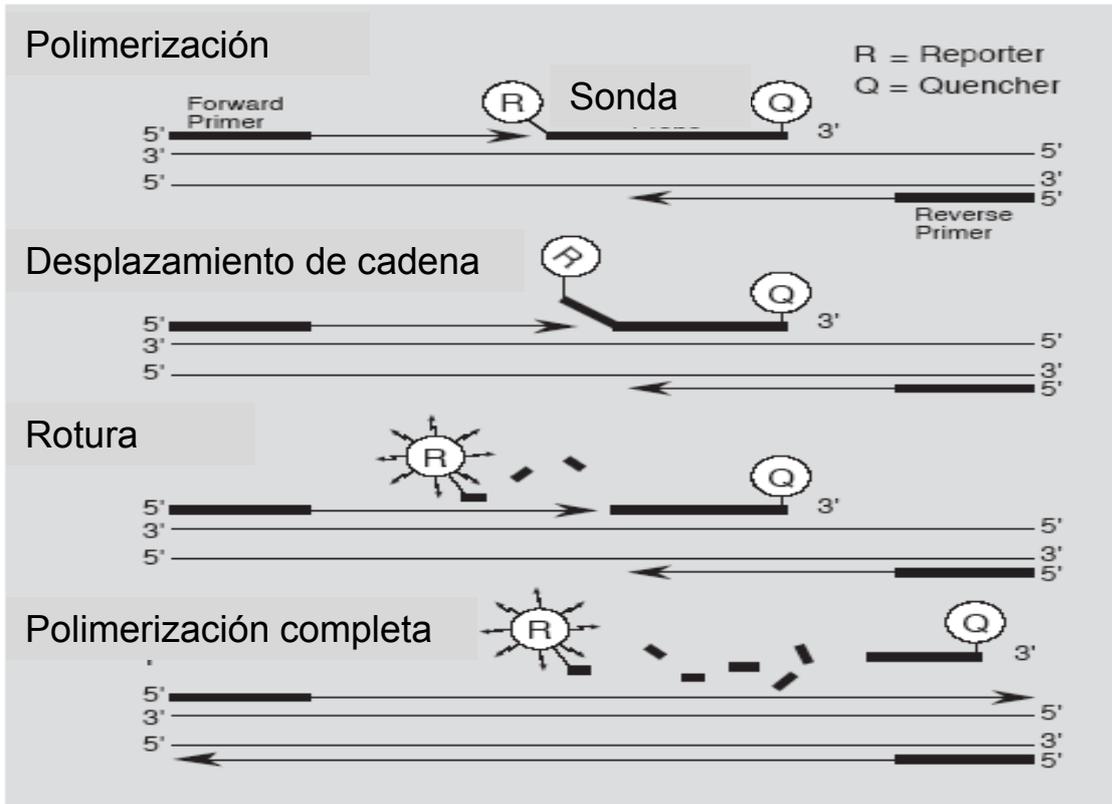
4.4.1. Introducción a la técnica de discriminación alélica

Para llevar a cabo un genotipado mediante discriminación alélica realizamos una PCR a la que se incorporaron, entre otros componentes, la enzima Taq Polimerasa con su actividad 5' nucleasa y dos sondas complementarias a cada uno de los alelos de un SNP. Las sondas presentan unidas dos moléculas, una de ellas en el extremo 3' que ejerce una función inhibidora de la fluorescencia (*reporter*) y otra fluorescente en el extremo 5' (*quencher*). Cuando la sonda está intacta, la proximidad entre la molécula inhibidora de la fluorescencia y la molécula fluorescente hace que la primera provoque transferencia de energía por resonancia Foster (FRET) inhibiendo así la fluorescencia de la molécula fluorescente. En el momento en el que esta sonda se une al lugar correspondiente y amplifica, la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa hace que la sonda se rompa liberándose la molécula inhibidora de la fluorescencia y dando lugar a un incremento en la intensidad de la misma.

En la Figura 8 se muestran los pasos realizados para el genotipado mediante discriminación alélica. Para el estudio de SNPs con dos alelos se incluyen en la PCR dos sondas, cada una de ellas específica para uno de los alelos estudiados y unidas a un marcador fluorescente distinto (marcadores FAM® o VIC®). Estas sondas se unen al alelo correspondiente y al amplificar la función 5' nucleasa de la Taq polimerasa rompe la sonda liberando la molécula inhibidora de fluorescencia. Cuando esto ocurre se produce un incremento de la fluorescencia o bien FAM o bien VIC, en el caso de que los individuos sean homocigotos para el alelo, o de ambas en el caso de que nos encontremos ante un heterocigoto (Figura 9). Este aumento de la fluorescencia es detectado por el sistema de detección y cuantificación ABI 7000 (Applied Biosystems) y mostrado en un gráfico de amplificación. De esta forma, podemos conocer qué

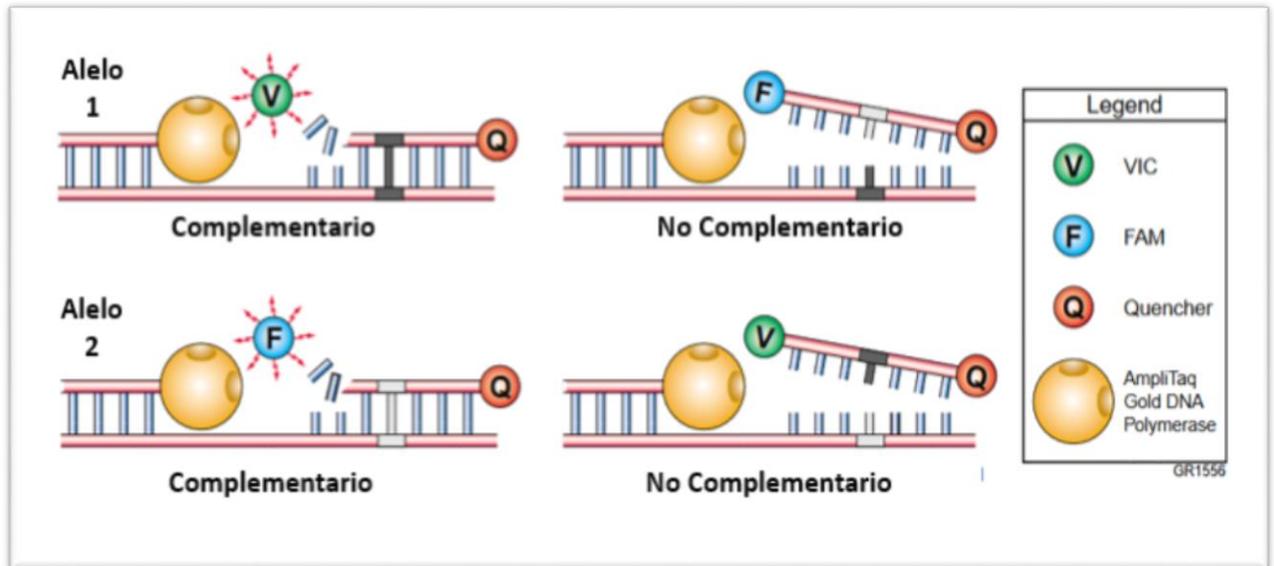
alelos expresa cada individuo para el SNP estudiado (ver protocolo de genotipado en Anexo 1, apartado 3).

Figura 8



Leyenda. Amplificación mediante PCR y detección de sondas fluorescentes utilizando la función 5' nucleasa de la ADN polimerasa. Modificado de *ABI PRISM 7000 User Guide*. Los puntos clave en esta reacción son la polimerización de la secuencia, el desplazamiento de la hebra y la rotura de la sonda. Dos marcadores, la molécula fluorescente (R - reporter) y la molécula inhibidora de la fluorescencia (Q - quencher) se encuentran unidos a la sonda fluorogénica. Mientras ambos permanecen unidos la emisión de R es inhibida por Q. Cuando la sonda participa en alguno de los ciclos de extensión activamente la función 5' nucleasa de la ADN polimerasa rompe la sonda dejando libre a R y permitiendo que éste emita fluorescencia que será recogida por la máquina.

Figura 9



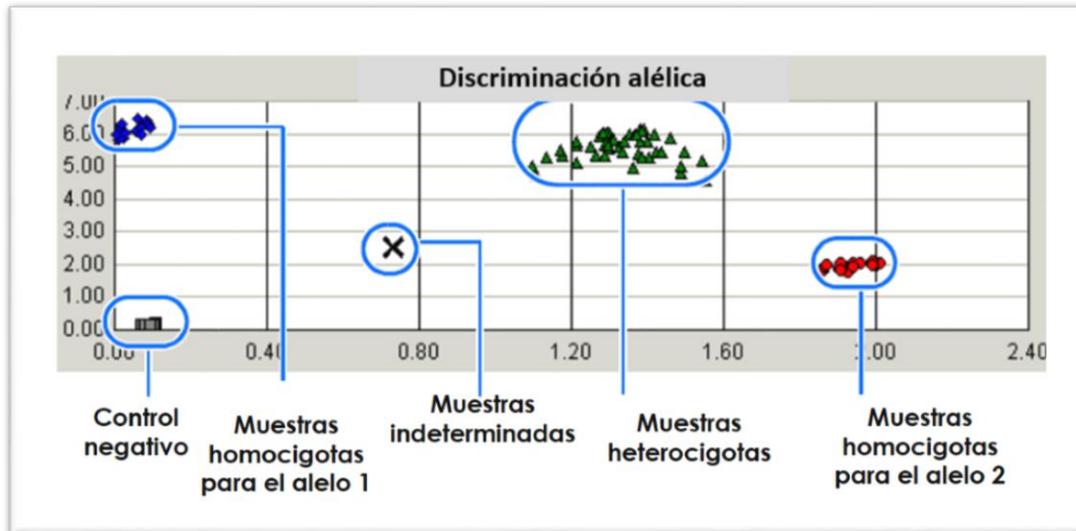
Leyenda. Estrategia de diseño de sondas fluorogénicas para ensayos de discriminación alélica con actividad 5' nucleasa. Modificado de *ABI PRISM 7000 User Guide*. La no complementariedad entre la sonda y la secuencia hace que la sonda no se una perfectamente y por tanto no existe rotura ni liberación de moléculas fluorescentes.

Una vez aquí realizamos el análisis de los resultados con ayuda del programa SDS 2.1. Este programa analiza los datos crudos obtenidos, que son datos de fluorescencia frente a longitud de onda, y los representa con aspas (X) localizadas sobre un diagrama de dispersión. Cada pocillo está representado por una X y según su localización podemos saber si se trata de una muestra homocigota para el alelo 1, homocigota para el alelo 2, o heterocigota. En el caso de que durante el proceso tanto de pipeteo como de amplificación se haya producido algún problema, el X que representa a la muestra aparecerá separado del resto de aspas.

Una vez aquí, debemos indicarle al programa, seleccionando cada grupo de aspas, si consideramos homocigotas o heterocigotas a las muestras que componen cada grupo, y en función de nuestra opción el programa asigna a cada aspa una forma geométrica (Figura 10) lo cual permite obtener un listado con el nombre de cada muestra y el genotipo de la muestra estudiada para ese polimorfismo (Figura 11). Tras la obtención de estos datos realizamos los

análisis estadísticos necesarios para conocer si el polimorfismo que habíamos estudiado confería o no susceptibilidad a la enfermedad.

Figura 10



Leyenda. Ejemplo de diagrama de dispersión, generado a partir de la lectura de las fluorescencias de las muestras, por el programa SDS 2.1. Modificado de ABI PRISM 7000 User Guide

Figura 11

Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality	Method
A1	NTC	App E	NTC	1214.669	2.095	2.546	NTC		
A2	Unknown	App E	Unknown	1711.700	2.015	2.570	Allele G		Manual C
A3	Unknown	App E	Unknown	2114.408	0.144	6.436	NTC		
A4	Unknown	App E	Unknown	2360.448	0.166	6.493	Allele A		Manual C
A5	Unknown	App E	Unknown	2349.744	0.252	0.730	Undetermined		Manual C
A6	Unknown	App E	Unknown	2350.868	0.223	0.755	Undetermined		Manual C
A7	Unknown	App E	Unknown	2504.501	1.547	5.712	Both		Manual C
A8	Unknown	App E	Unknown	2222.107	1.700	5.598	Both		Manual C
A9	Unknown	App E	Unknown	2516.080	1.795	5.335	Both		Manual C
A10	Unknown	App E	Unknown	1628.340	1.508	6.246	Both		Manual C
A11	Unknown	App E	Unknown	1644.862	1.467	6.378	Both		Manual C
A12	Unknown	App E	Unknown	1040.586	1.477	6.200	Both		Manual C
B1	NTC	App E	NTC	1232.171	2.163	2.754	NTC		
B2	Unknown	App E	Unknown	1874.757	2.068	2.670	Allele G		Manual C
B3	Unknown	App E	Unknown	2250.497	0.162	6.758	NTC		
B4	Unknown	App E	Unknown	2326.933	0.155	6.546	Allele A		Manual C
B5	Unknown	App E	Unknown	2398.477	0.235	0.814	Undetermined		Manual C
B6	Unknown	App E	Unknown	2555.882	0.233	0.800	Undetermined		Manual C
B7	Unknown	App E	Unknown	2579.415	1.592	6.094	Both		Manual C
B8	Unknown	App E	Unknown	2559.678	1.710	5.787	Both		Manual C
B9	Unknown	App E	Unknown	2226.186	1.762	5.988	Both		Manual C

Leyenda. Ejemplo de resultados de genotipados de un grupo de muestras. ABI PRISM 7000 User Guide.

4.5. Replicación de los resultados obtenidos en poblaciones independientes

Se intentó validar los resultados obtenidos para los genes *PRF1* y *BTG1* usando para ello poblaciones independientes.

En el caso del gen de la *PRF1*, en el que uno de los SNPs estudiados se encontró fuertemente asociado a la EM, se intentó validar este resultado en dos poblaciones independientes. La primera de ellas recogía muestras de controles y pacientes de etnia caucásica y procedencia estadounidense. La segunda población recogía también muestras de controles y pacientes de etnia caucásica pero esta vez su procedencia era de Islandia. Las características clínicas de ambas poblaciones se presentan en las Tablas 6 y 7.

En el caso del gen *BTG1* también se encontró un SNP asociado a la EM cuyos resultados se intentaron validar posteriormente en la población independiente estadounidense descrita en el párrafo anterior.

La técnica utilizada para el genotipado de las muestras de las nuevas poblaciones sometidas a estudio fue la misma que en el caso de la población española. Se siguió el mismo protocolo, utilizando el mismo equipo y los mismos reactivos.

Tabla 6

Características	Controles sanos	Pacientes EM	Pacientes EMRR/SP	Pacientes EMPP
<i>n</i>	300	292	273	19
<i>Mujer/Hombre (% mujeres)</i>	184/116 (61,3)	182/110 (62,3)	178/95 (65,2)	5/14 (26,3)
<i>Edad (años)^a</i>	42,0 (11,0)	49,6 (10,7)	49,2 (11,4)	58,9 (10,8)

Leyenda. Características clínicas de pacientes y controles de la población estadounidense. ^aDatos expresados como media (DE).

Tabla 7

<i>Características</i>	<i>Controles sanos</i>	<i>Pacientes con EM</i>	<i>Pacientes con EMRR/SP</i>	<i>Pacientes con EMPP</i>
<i>n</i>	424	340	324	16
<i>Mujer/Hombre (% mujeres)</i>	213/211 (50,2)	239/101 (70,3)		--
<i>Edad (años)^a</i>	55,7 (13,4)	54,9 (13,8)	--	--

Leyenda. Características clínicas de pacientes y controles de la población islandesa. ^aDatos expresados como media (DE).

4.6. Determinación de la expresión génica de *BTG1* y *CASP8*

Se realizaron experimentos de expresión génica con la finalidad de detectar si existían diferencias en la expresión de los distintos genes estudiados al comparar pacientes con distintos haplotipos o genotipos para el mismo gen.

Para ello se extrajo una muestra de sangre a pacientes que expresaban los genotipos o haplotipos que nos interesaba analizar y, a partir de esta muestra, se separaron PBMCs mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Isopaque. Posteriormente, las células fueron conservadas en las condiciones iniciales o activadas utilizando para ello PHA. Luego se extrajo el ARN total de estas células y, tras sintetizar ADN complementario a partir de ARNm, se realizaron las reacciones necesarias para determinar la expresión génica de los distintos genes estudiados.

En el caso de los genes *BTG1* y *CASP8* para la expresión génica se utilizó la tecnología *Taqman Gene Expression Assay* (Applied Biosystems) basada en la actividad 5'nucleasa de la polimerasa. Se trata de un conjunto formado por una sonda MGB Taqman junto a dos cebadores para PCR. La sonda MGB Taqman está marcada con un marcador fluorescente, por ejemplo FAM, en su extremo 3' y con MGB y un inhibidor de fluorescencia en el extremo 3'. El MGB incrementa la temperatura de fusión sin aumentar el tamaño de la sonda, lo que permite diseñar sondas no demasiado largas. El inhibidor de fluorescencia permite que la fluorescencia del marcador fluorescente no se detecte hasta que la sonda participa en alguno de los ciclos de extensión activamente, al igual que pasaba con las sondas utilizadas en el genotipado.

Además, para determinar la expresión génica, también se incluyó en cada experimento un control endógeno. Los *Taqman Endogenous Controls* (Applied Biosystems) son un conjunto de sondas prediseñadas junto a cebadores que sirven para normalizar los niveles de expresión de los genes diana, corrigiendo la diferencia en las cantidades de ADN complementario que se añaden a los pocillos de la placa en la que tiene lugar la reacción de PCR. Para elegir el control endógeno más adecuado, hay que tener en cuenta que se trate de un gen que se exprese consistentemente en la muestra que vamos a utilizar para nuestro estudio. Para nuestra determinación de la expresión génica seleccionamos el control endógeno ARN ribosómico 18S de eucariotas.

La técnica utilizada fue la PCR a tiempo real que permite la acumulación del producto amplificado que puede ser detectado y cuantificado a medida que la reacción progresa. Esta detección es posible gracias a las moléculas fluorescentes unidas a las sondas que, como ya se dijo anteriormente, emiten su fluorescencia sólo cuando participan en un ciclo de extensión. Así, el aumento de la fluorescencia es proporcional al aumento de la cantidad de ADN complementario. Los protocolos utilizados se presentan en el Anexo 1, apartados del 4 al 10.

Una vez extraído el ARN y transcrito a ADN complementario se realizó la determinación de expresión génica para los genes *BTG1* y *CASP8*. Las muestras que se procesaron en cada caso fueron las siguientes (Tabla 8 y 9):

Tabla 8

<i>Gen</i>	<i>N total</i>	<i>Células</i>	<i>Forma de EM</i>	<i>Genotipos</i>	<i>N por genotipo</i>
BTG1	18	Condiciones basales	EMRR/SP	<i>TT/CT</i>	11
		Condiciones basales	EMRR/SP	<i>CC</i>	7
	15	Estimuladas con PHA	EMRR/SP	<i>TT/CT</i>	9
		Estimuladas con PHA	EMRR/SP	<i>CC</i>	6

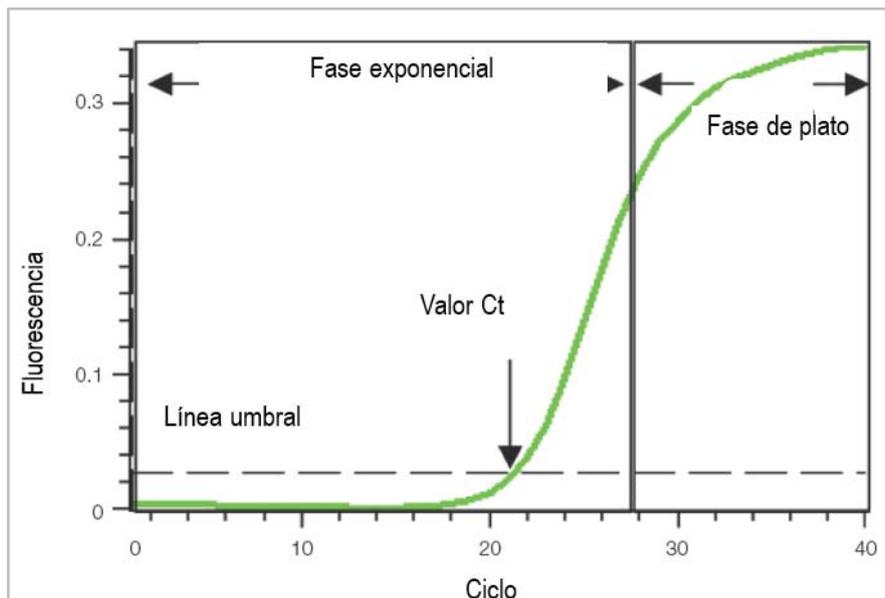
Tabla 9

<i>Gen</i>	<i>N total</i>	<i>Células</i>	<i>Forma de EM</i>	<i>Haplotipos</i>	<i>N por genotipo</i>
CASP8	11	Condiciones basales	EMRR/SP	GCA/GCA	2
		Condiciones basales	EMPP	GCA/GCA	2
		Condiciones basales	EMRR/SP	ACT/ACT	7
	11	Estimuladas con PHA	EMRR/SP	GCA/GCA	2
		Estimuladas con PHA	EMPP	GCA/GCA	2
		Estimuladas con PHA	EMRR/SP	ACT/ACT	7

4.6.1. Interpretación de los resultados obtenidos

Durante el proceso de PCR a tiempo real el programa SDS 2.1 nos proporcionó una gráfica en la que veíamos cómo el producto de cada uno de los pocillos iba creciendo en cantidad a medida que pasaban los ciclos (Figura 12).

Figura 12



Leyenda. Fases de la PCR a tiempo real. *ABI PRISM 7000 User Guide*

La línea verde que aparece en la gráfica de amplificación nos muestra el curso de amplificación de una muestra. El eje X muestra el número de ciclo y el eje Y muestra la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto en cada momento de la reacción.

La gráfica muestra tres fases: una primera fase en la que la fluorescencia presenta valores no detectables a pesar de que el producto se está acumulando exponencialmente (ciclos del 1 al 18); una segunda fase de tipo exponencial en la que la cantidad de producto que hay en un ciclo crece hasta casi el doble en el siguiente ciclo (ciclos del 18 al 28); y una última fase conocida como fase de meseta en la que los reactivos que participan en la reacción se han ido consumiendo y alguno de ellos se encuentra en cantidades limitantes dando lugar a un enlentecimiento de la reacción y a un aumento menor del producto en cada ciclo (ciclos del 28 al 40).

El ciclo en el que la fluorescencia comienza a ser detectable se conoce como ciclo umbral o ciclo C_T . El ciclo umbral de la reacción viene determinado por la cantidad de muestra inicial añadida al pocillo. Si la cantidad de muestra añadida es elevada se alcanzará antes el ciclo en el que la fluorescencia es detectable; en este caso el número de ciclos necesarios será bajo. Por el contrario, si la cantidad inicial de la muestra añadida al pocillo es baja, el número de ciclos necesarios para acumular una cantidad de producto suficiente para que la fluorescencia sea detectada será mayor, por lo que el ciclo umbral tardará más en alcanzarse. Por tanto, para conocer la cantidad de muestra de la que partimos es necesario conocer el valor C_T y, por este motivo, el cálculo del valor C_T debe hacerse de forma cuidadosa con el fin de no introducir ningún tipo de error que pudiera llevarnos a unos resultados finales erróneos.

Existen unas condiciones que la PCR en tiempo real debe de cumplir para ser óptima. En primer lugar, la curva estándar construida a partir de diferentes diluciones de la muestra que nos darán diferentes valores de C_T debe de tener un coeficiente de determinación (R^2) de 0,980. Además, se considerará que una reacción de PCR a tiempo real es óptima cuando la cantidad de producto de un ciclo de amplificación a otro casi se duplica, dando lugar a una eficiencia de amplificación de entre el 90-105%. Una eficiencia de alrededor de 100% nos indica que nuestro experimento es sólido y reproducible.

Una vez conocida esta información, para el análisis de los resultados obtenidos, debemos de tener en cuenta que nosotros realizaremos una cuantificación relativa normalizada, mediante un gen de referencia que se basa en el cociente resultante de la cantidad relativa del ácido nucleico diana para cantidades equivalentes de muestras y controles estudiados. Para ello, incluimos en la reacción un control endógeno que nos permite asegurarnos de que los resultados obtenidos para el gen diana son comparables ya que, las cantidades de muestra de las que hemos partido son equivalentes y con ello se evita la necesidad de una cuidada cuantificación y carga de la muestra inicial.

Para hacer este tipo de análisis hay que elegir una de las muestras como muestra calibradora. Generalmente la muestra calibradora es aquella que se cree que no ha sufrido alteración en la expresión del gen por la circunstancia estudiada, por ejemplo por una enfermedad. La muestra calibradora es tomada como referencia para calcular si el resto de muestras han aumentado o disminuido su expresión del gen.

Una vez se han tenido en cuenta estas condiciones se toman los valores de C_T de la gráfica de cada muestra y de su control endógeno. Para el análisis de los resultados se pueden utilizar 3 métodos:

1. Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak)

Este método asume que tanto el gen diana como el gen endógeno se han amplificado con una eficiencia del 100% y con una diferencia entre ellos de menos del 5%, aunque estos datos hay que confirmarlos mediante los métodos adecuados. Tras este paso, debemos de normalizar el valor C_T de las muestras y del gen endógeno para las muestras y para la muestra calibradora de la siguiente forma:

$$\begin{aligned}\Delta C_T(\text{muestra}) &= C_T(\text{gen estudiado}) - C_T(\text{gen endógeno}) \\ \Delta C_T(\text{calibrador}) &= C_T(\text{gen calibrador}) - C_T(\text{endógeno calibrador})\end{aligned}$$

Como segundo paso se normaliza el ΔC_T de la muestra estudiada frente al ΔC_T de la muestra calibradora:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{muestra}) - \Delta C_T (\text{calibrador})$$

Y finalmente se calcula la ratio de expresión:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{ratio de expresión normalizada}$$

El resultado obtenido son las veces que se aumenta o disminuye la expresión del gen estudiado en la muestra estudiada con respecto a la muestra calibradora que está normalizada, gracias al uso del gen endógeno que permite eliminar cualquier diferencia generada por distinta cantidad de muestra.

2. Método ΔC_T usando un gen de referencia

Corresponde a una variación del método *Livak*, que utiliza las diferencias existentes entre los valores de C_T del gen endógeno y el gen de referencia para cada muestra. Aquí el valor de expresión de la muestra calibradora no es uno, sino que los valores de expresión obtenidos en este método para las muestras son divididos por los valores de expresión elegidos para la muestra calibradora, obteniéndose como resultado de este cálculo exactamente lo mismo que se obtenía del método $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

$$\text{Ratio (reference/target)} = 2^{C_T(\text{reference}) - C_T(\text{target})}$$

3. Método de Pfaffl

El método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ es sólo válido cuando la eficiencia de amplificación para el gen estudiado y el gen endógeno es similar. En otros casos la fórmula que debe de utilizarse para el cálculo de la diferencia de expresión es:

$$\text{Expresión} = \frac{(\text{Expresión del gen estudiado})^{\Delta C_T, \text{ gen estudiado (calibrador - gen estudiado)}}}{(\text{Expresión del gen endógeno})^{\Delta C_T, \text{ gen endógeno (calibrador - gen estudiado)}}$$

En esta ecuación la expresión del gen estudiado y del gen endógeno se refiere a la eficiencia de amplificación de ambos genes. $\Delta C_T, \text{ gen estudiado}$

(*calibrador – gen estudiado*) se refiere al valor obtenido para C_T en el gen estudiado para la muestra calibradora menos el valor obtenido para C_T en el gen estudiado para la muestra que estamos analizando. ΔCT , *gen endógeno (calibrador – gen estudiado)* se refiere al valor obtenido para C_T en el gen endógeno para la muestra calibradora menos al valor obtenido para C_T en el gen estudiado para la muestra que estamos analizando. La ecuación asume que cada gen tiene la misma eficiencia de amplificación en las muestras de estudio y en calibradora, no teniendo que ser necesario que esto se cumpla cuando hablamos del gen de estudio y el de referencia.

Finalmente indicar que el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y el método de Pfaffl están muy relacionados ya que el primero no es más que un caso especial del método de Pfaffl.

4.7. Determinación de la expresión génica de PRF1

En el caso de la determinación de la expresión génica de *PRF1* (ver material y protocolos en Anexo 1, apartado 11) la técnica que utilizamos fue el *microarray* de oligonucleótidos. Utilizamos un *microarray* de la casa Affymetrix, en concreto el GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array, que analiza la expresión génica de aproximadamente 38.500 genes a lo largo de todo el genoma humano en una muestra. Así, además de la expresión génica de *PRF1*, estudiamos también la expresión génica de otros genes en los individuos analizados.

Los pacientes seleccionados para el estudio de la expresión génica fueron 10 pacientes con forma EMPP sin ningún tratamiento, con una media de edad de 54,1 años. Cuatro de los pacientes eran homocigotos para el haplotipo protector (*AGA*) y 6 heterocigotos u homocigotos para el haplotipo de riesgo (*AGG* o *GAA*). Además, también se incluyeron en el estudio 6 controles con una media de edad de 55,2 años. Todos los individuos (pacientes y controles) incluidos en el estudio de expresión génica fueron del sexo masculino.

4.8. Determinación de la expresión de PRF1 en células T CD8⁺ y células NK mediante citometría de flujo

Para la determinación de PRF1 se obtuvieron muestras de sangre completa de 10 pacientes con formas de EMPP, sin ningún tratamiento, con una media de edad de 54,1 años. Cuatro de los pacientes eran homocigotos para el haplotipo protector (AGA) y 6 heterocigotos u homocigotos para el haplotipo de riesgo (AGG o GAA). Además, también se incluyeron en el estudio 6 controles con una media de edad de 55,2 años. Las muestras se obtuvieron de los mismos individuos, todos del sexo masculino, que se utilizaron para realizar la determinación de la expresión de *PRF1* mediante *microarrays* (ver apartado 4.7).

Los tipos celulares estudiados fueron dos de los que la bibliografía incluye como células que expresan PRF1, concretamente linfocitos T CD8⁺ y células NK. Para el estudio de estos tipos celulares utilizamos la citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica basada en el análisis individualizado de células en suspensión frente a una fuente de luz, recogiendo la dispersión de la luz generada por las células y los compuestos fluorescentes unidos a ellas, gracias a un sistema de lentes y filtros que conducen la luz hacia diferentes detectores. La dispersión de la luz por parte de las células nos proporciona información sobre sus características físicas. Por su parte, los compuestos fluorescentes también producen una dispersión de la luz ya que absorben luz a partir de una determinada longitud de onda y emite fotones a una mayor longitud de onda. De esta forma, utilizando un láser de 488 nm se pueden excitar varios fluorocromos a la vez que emitirán luz a distintas longitudes de onda diferenciándolos posteriormente gracias a un sistema de filtros ópticos que reparten la señal entre los distintos sensores. Así, el uso de anticuerpos unidos con distintos fluorocromos nos permite identificar simultáneamente diferentes proteínas celulares extra- o intracelulares. Toda esta información es recogida por un ordenador donde posteriormente podemos analizarla (ver material y protocolos en Anexo 1, apartados 12 y 13).

4.9. Ensayos funcionales de la PRF1

Se obtuvieron células T CD8⁺ de cinco pacientes con formas de EMPP portadores de los haplotipos de riesgo (*GAA/AGA*; n=2) o protectores (*AGA/AGA*; n=3) para *PRF1*. Para su obtención se utilizaron dos protocolos diferentes (ver material y protocolos en Anexo 1, apartado 14).

4.10. Detección del genoma del EBV

Para la detección del genoma del EBV utilizamos un kit basado en la técnica de PCR a tiempo real. En este caso, se realizó una PCR con el fin de amplificar regiones específicas del genoma del patógeno. Ésta amplificación se detectó gracias a los marcadores fluorescentes que portan las sondas oligonucleotídicas incluidas en el experimento y que se unen específicamente al producto cuando éste es amplificado. Como en el caso de la expresión génica, al monitorizarse la intensidad de la fluorescencia durante el transcurso de la PCR, se pudo detectar y cuantificar el producto acumulado a lo largo del proceso (ver material y protocolos en el Anexo 1, apartado 15).

4.11. Expresión en PBMCs de PRF1 por sexos en condiciones basales e inducidas mediante hormonas sexuales

Se determinó la expresión basal de PRF1 en células T CD8⁺ y células NK utilizando para ello 5 controles del sexo masculino con media (DE) de edad de 33,4 años (5,6) y 5 controles del sexo femenino con media de edad de 30 años (3,5). En cuatro de los controles (2 hombres y 2 mujeres) se determinó la expresión de PRF1 en PBMCs (5×10^6 células) crecidas en medio RPMI libre de fenol rojo y enriquecido con 10% de FBS charcoal-stripped en presencia de dihidrotestosterona (10^{-7} M), estradiol (10^{-10} M), progesterona (10^{-7} M), o diluyente (0,3% etanol) frente al grupo control durante 3, 6, y 24 horas (ver material y protocolo en Anexo 1, apartado 16).

4.12. Análisis estadístico

Programas estadísticos	
SNPator	Nodo de Bioinformática del CeGen, Universidad Pompeu Fabra, Barcelona
PHASE 2.1	Dept. Statistics, Univ. of Washington, Seattle, WA, USA
Haploview 4.0	Whitehead Inst. for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA

Se elaboró una base de datos con los resultados del genotipado de las muestras e información sociodemográfica de controles y casos. Esta base de datos se utilizó para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos utilizando para ello programas estadísticos de código abierto.

Para los estudios de asociación se utilizó el programa SNPator (*Morcillo-Suárez y cols., 2008*). Se analizaron las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas, y para todas ellas se hicieron las siguientes comparaciones: todos los casos frente a todos los controles, forma clínica EMRR/SP frente a controles, forma clínica EMPP frente a controles, forma clínica EMRR/SP frente a forma clínica EMPP, y también se realizaron todas estas comparaciones tras estratificar por sexo. En el análisis de asociación de genotipos, cada genotipo fue analizado frente a los otros dos posibles genotipos.

Para el análisis de asociación de haplotipos se utilizó el programa PHASE 2.1 con las configuraciones predeterminadas; cada haplotipo fue analizado frente al grupo formado por el resto de haplotipos posibles. Al cálculo de las OR y del IC 95% se le aplicó la corrección de Haldane cuando fue necesario. Las estimaciones de desequilibrio de ligamiento se obtuvieron utilizando el programa SNPator con los datos obtenidos del programa PHASE en el caso de los tres genes estudiados. También se analizó el desequilibrio de ligamiento entre el gen de la *PRF1* y otros dos genes que estaban próximos a él en el cromosoma 10 (*ADAMTS14* y *C10orf27*) empleando en este caso se utilizó el programa Haploview 4.0. Para la corrección de las comparaciones múltiples realizadas se utilizó la corrección de *Benjamini y Hochberg* (False Discovery Rate - FDR; *Benjamini y Hochberg, 1995*). Se asumió un 5% de nivel de significancia.

Para las comparaciones entre la media de la escala MSSS y los genotipos se utilizó el test no paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. PRF1

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el gen *PRF1*.

5.1.1. Equilibrio de Hardy Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Cuando se realizan estudios de asociación en los que se incluyen casos y controles, los controles deben de representar a la población general y deben de encontrarse en equilibrio de Hardy Weinberg ya que, esto indica que la población elegida como control no presenta sesgo alguno. Por este motivo, realizamos los cálculos necesarios para asegurarnos de que nuestra población de controles cumplía esta condición esencial.

Tras los cálculos vimos que los SNPs *rs885822*, *rs10999426* y *rs3758562* pertenecientes al gen *PRF1* se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg en controles con valores p de 0,258, 0,851 y 0,530 respectivamente.

Otro parámetro que analizamos en nuestro estudio fue la existencia o no de desequilibrio de ligamiento entre los SNPs estudiados para el gen *PRF1*. El desequilibrio de ligamiento nos informa de si los SNPs estudiados se transmiten de forma independiente o por el contrario van ligados. Al hacer el estudio vimos que los 3 SNPs analizados presentan un fuerte desequilibrio de ligamiento con valores $p < 10^{-90}$ (Tabla 10).

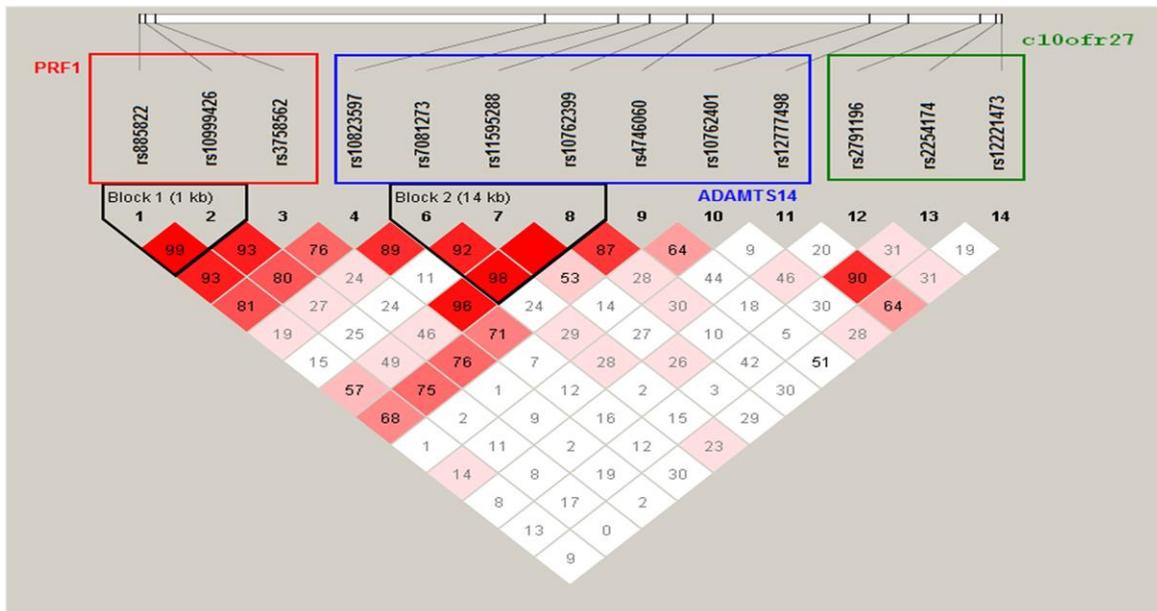
Tabla 10

SNPs	D'	r ²
<i>rs885822 vs. rs10999426</i>	D'=0,995	r ² =0,731
<i>rs885822 vs. rs3758562</i>	D'=0,936	r ² =0,647
<i>rs10999426 vs. rs3758562</i>	D'=0,935	r ² =0,874

Además de estudiar el desequilibrio de ligamiento entre los SNPs seleccionados, quisimos conocer también los posibles efectos causados por la

proximidad de otros genes al gen estudiado. Para ello se calculó el desequilibrio de ligamiento entre el gen *PRF1* y los genes *ADAMST14* y *C10orf27*, situados también en la región 10q21, utilizando datos de estudios previos realizados por nuestro grupo en los que se concluía que estos genes participaban en la susceptibilidad a la enfermedad (Goertsches y cols., 2005; Goertsches y cols., 2008). Como se puede observar en la Figura 13, existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los SNPs estudiados para el gen *PRF1*, pero no entre los SNPs de este gen con respecto a los estudiados para el *ADAMTS14* y el *C10orf27*. Estos hallazgos sugieren un papel independiente del gen *PRF1* en esta región.

Figura 13



Leyenda. Representación del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs estudiados para los genes *PRF1*, *ADAMTS14* y *C10orf27* utilizando el programa Haploview 4.0. Los números de las figuras se corresponden con los valores D'.

5.1.2. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la población estudiada para el gen de la *PRF1*

El siguiente análisis que realizamos fue el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas para los SNPs en la población de estudio. La frecuencia alélica se calcula teniendo en cuenta la proporción en la que se presenta cada alelo en cada uno de los SNPs estudiados en la población de estudio. La suma

de la frecuencia alélica de cada uno de los alelos que pueden estar presentes en el SNP estudiado suma 1 (100%).

Si un SNP tiene 2 alelos por ejemplo, alelo E y alelo e , la frecuencia con la que el alelo E aparece en el SNP será (p) y la frecuencia en la que el alelo e aparece en el SNP será (q). Por tanto:

$$p + q = 1$$

Como cada SNP tiene 2 alelos, el cálculo de las frecuencias alélicas en una población de 100 individuos con los alelos repartidos de la siguiente forma:

- Individuos EE : 60
- Individuos Ee : 30
- Individuos ee : 10

Será como se muestra a continuación:

$$60 \times 2 \text{ alelos } E = 120 \text{ alelos } E$$

$$30 \times 1 \text{ alelos } E = 30 \text{ alelos } E$$

Así que el número de alelos E que habría en esta población sería de 150 que si lo dividimos por los 200 alelos (100 individuos \times 2 alelos cada uno) de la población para el SNP estudiado tenemos una frecuencia de:

$$150 / 200 = 0,75$$

De forma que la frecuencia del alelo e es de $1 - 0,75 = 0,25$

La frecuencia genotípica es aquella que nos indica la proporción de individuos de una población que presenta un determinado genotipo. Si, como hemos explicado anteriormente, p es la frecuencia del alelo E y q es la frecuencia del alelo e , y los alelos se combinan al azar en la población para formar genotipos, entonces la probabilidad de que un individuo presente el genotipo EE será p^2 , la probabilidad de que su genotipo sea ee será q^2 y, por

último, la probabilidad de que presente el genotipo *Ee* será $2pq$. Y todo esto, como postula la ley de Hardy-Weinberg, viene dado por la fórmula binomial:

$$(p + q)^2 = p^2 + q^2 + 2pq$$

En la población en la que hemos realizado este estudio de asociación, como se puede ver en la Tabla 11, las frecuencias alélicas nos indican la asociación del alelo *A* del SNP *rs10999426* y del alelo *G* del SNP *rs3758562* con la enfermedad (con una OR=1,4 y un valor *p* corregido=0,020 para el SNP *rs10999426* y una OR=1,4 y un valor *p* corregido=0,025 para el SNP *rs3758562*). Cuando analizamos las frecuencias genotípicas vemos que los genotipos *GG* para el SNP *rs10999426* (con una OR=0,7 y un valor *p* corregido=0,025) y *AA* para el SNP *rs3758562* (con una OR=0,7 y un valor *p* corregido=0,028) se asocian de forma negativa, indicando que desempeñan un efecto protector frente a la enfermedad. En el caso del tercer SNP estudiado en la población para el gen *PRF1*, SNP *rs885822*, al analizar los resultados no se encontró ningún tipo de asociación ni a nivel de alelos ni de genotipos.

Tabla 11

<i>Datos totales</i>						
<i>SNP</i>		<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
	<i>Análisis</i>	<i>EM</i>	<i>Controles</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	480 (57,1)	643 (62,8)	1,3 (1,1-1,5)	0,013	0,079
	G	360 (42,9)	381 (37,2)			
	Genotipo					
	AA	143 (34,1)	204 (39,6)	0,8 (0,6-1,02)	0,766	0,227
	AG	194 (46,2)	235 (45,9)	1,0 (0,8-1,3)	0,947	1,000
	GG	83 (19,7)	73 (14,3)	1,5 (1,1-2,1)	0,028	0,121
	<i>rs10999426</i>	Alelo				
A		308 (36,7)	304 (29,7)	1,4 (1,1-1,7)	0,002	0,020
G		532 (63,3)	720 (70,3)			
Genotipo						
AA		55 (13,1)	47 (9,2)	1,5 (1,0-2,3)	0,059	0,199
AG		198 (47,1)	210 (41,0)	1,3 (1,0-1,7)	0,063	0,211
GG		167 (39,8)	255 (49,8)	0,7 (0,5-0,9)	0,002	0,025
<i>rs3758562</i>		Alelo				
	A	533 (63,5)	719 (70,2)	1,4 (1,1-1,7)	0,002	0,025
	G	307 (36,5)	305 (29,8)			
	Genotipo					
	AA	169 (40,2)	256 (50,0)	0,7 (0,5-0,9)	0,003	0,028
	AG	195 (46,6)	207 (40,4)	1,3 (1,0-1,7)	0,727	0,226
	GG	56 (13,3)	49 (9,6)	1,5 (1,0-2,2)	0,077	0,226

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en los grupos de pacientes y controles. Los valores p en negrita indican asociaciones estadísticamente significativas. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*.

Cuando el estudio de las frecuencias alélicas se realizó estratificando por sexo observamos una asociación del alelo A del SNP *rs10999426* y del alelo G para el SNP *rs3758562* en hombres (OR=1,9, valor p corregido=0,003; OR=1,7, valor p corregido=0,007 respectivamente). Sin embargo esta asociación no se vió en mujeres (OR=1,1, valor p corregido=0,821 para el SNP *rs10999426*; OR=1,1, valor p corregido=0,681 para el SNP *rs3758562*).

De la misma forma, al estudiar las frecuencias genotípicas estratificando por sexo vimos que tanto el genotipo GG para el SNP *rs10999426* como el AA para el SNP *rs3758562* ejercían un efecto protector frente a la enfermedad en hombres (OR=0,5, valor p corregido=0,003 y OR=0,5, valor p corregido=0,020 respectivamente) pero no en mujeres (OR=0,9, valor p corregido=0,832 y OR=0,9, valor p corregido=0,697 respectivamente) (Tablas 12 y 13).

Tabla 12

<i>Datos en mujeres</i>						
SNP		N(%)	N(%)	OR (95% IC)	Valor P	Valor P^a
	<i>Análisis</i>	EM	Controles			
rs885822	Alelo					
	A	299 (57,5)	333 (60,3)	1,1 (0,9-1,4)	0,352	0,667
	G	221 (42,5)	219 (39,7)			
	Genotipo					
	AA	91 (35,0)	99 (35,9)	0,9 (0,7-1,4)	0,857	0,999
	AG	117 (45,0)	135 (48,9)	0,9 (0,6-1,2)	0,387	0,695
	GG	52 (20,0)	42 (15,2)	1,4 (0,9-2,2)	0,173	0,406
	rs10999426	Alelo				
A		183 (35,2)	184 (33,3)	1,1 (0,8-1,4)	0,562	0,821
G		337 (64,8)	368 (66,7)			
Genotipo						
AA		30 (11,5)	28 (10,1)	1,2 (0,7-1,2)	0,677	0,880
AG		123 (47,3)	128 (46,4)	1,0 (0,7-1,5)	0,863	0,998
GG		107 (41,2)	120 (43,5)	0,9 (0,7-1,3)	0,601	0,832
rs3758562		Alelo				
	A	334 (64,2)	369 (66,8)	1,1 (0,9-1,4)	0,369	0,681
	G	186 (35,8)	183 (33,2)			
	Genotipo					
	AA	105 (40,4)	122 (44,2)	0,9 (0,6-1,2)	0,383	0,697
	AG	124 (47,7)	125 (45,3)	1,1 (0,8-1,6)	0,604	0,832
	GG	31 (11,9)	29 (10,5)	1,2 (0,7-2,0)	0,681	0,882

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en los grupos de pacientes y controles estratificado por sexo, en este caso, mujeres. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*.

Tabla 13

<i>Datos en hombres</i>							
SNP		N(%)	N(%)	OR(95% IC)	Valor P	Valor P^a	
	<i>Análisis</i>	EM	Controles				
rs885822	Alelo						
	A	181 (56,6)	310 (65,7)	1,5 (1,1-2,0)	0,011	0,071	
	G	139 (43,4)	162 (34,3)				
	Genotipo						
	AA	52 (32,5)	105 (44,5)	0,6 (0,4-0,9)	0,021	0,107	
	AG	77 (48,1)	100 (42,4)	1,3 (0,8-1,9)	0,303	0,613	
	GG	31 (19,4)	31 (13,1)	1,6 (0,9-2,7)	0,121	0,317	
	rs10999426	Alelo					
		A	125 (39,1)	120 (25,4)	1,9 (1,4-2,6)	0,0001	0,003
G		195 (60,9)	352 (74,6)				
Genotipo							
AA		25 (15,6)	19 (8,1)	2,1 (1,1-4,0)	0,022	0,107	
AG		75 (46,9)	82 (34,7)	1,7 (1,1-2,5)	0,016	0,091	
GG		60 (37,5)	135 (57,2)	0,5 (0,3-0,7)	0,0001	0,003	
rs3758562		Alelo					
		A	199 (62,2)	350 (74,2)	1,7 (1,3-2,4)	0,0004	0,007
	G	121 (37,8)	122 (25,8)				
	Genotipo						
	AA	64 (40,0)	134 (56,7)	0,5 (0,3-0,8)	0,002	0,020	
	AG	71 (44,4)	82 (34,8)	1,5 (1,0-2,3)	0,059	0,198	
	GG	25 (15,6)	20 (8,5)	2,0 (1,1-3,7)	0,035	0,138	

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en los grupos de pacientes y controles estratificado por sexo, en este caso, hombres. Los valores p en negrita indican asociaciones estadísticamente significativas. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*.

5.1.3. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas, según la forma clínica de la enfermedad, en la población estudiada para el gen de la PRF1

Posteriormente, realizamos el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas teniendo en cuenta las formas clínicas de la enfermedad. Como se

muestra en la Tabla 14, las comparaciones que realizamos fueron controles frente a pacientes con formas EMRR/SP, controles frente a pacientes con formas EMPP, y pacientes con formas EMRR/SP frente a pacientes con formas EMPP.

Tras estas comparaciones obtuvimos solo resultados significativos para las frecuencias alélicas y genotípicas al comparar el grupo de pacientes con formas de EMRR/SP y los controles sanos. Cuando el análisis, teniendo en cuenta las formas clínicas, se realizó tras estratificar por sexo (Tabla 14), los resultados fueron para el alelo A del SNP *rs10999426* (OR=1,4, valor p corregido=0,036 al estudiar el total de los pacientes; OR=1,9, valor p corregido=0,005 al estudiar sólo hombres; OR=1,1, valor p corregido=0,878 en el caso de las mujeres), y para el alelo G del SNP *rs3758562* (OR=1,4, valor p corregido=0,036 al estudiar el total de los pacientes; OR=1,8, valor p corregido=0,01 en hombres; OR=1,1, valor p corregido =0,794 para mujeres), indicando que la asociación se mantenía en hombres pero no en mujeres. De la misma forma, cuando analizamos las frecuencias genotípicas para GG en el SNP *rs10999426* obtuvimos una OR=0,7 con valor p corregido=0,041 al analizar todos los pacientes, y al estratificar por sexo los resultados obtenidos fueron una OR=0,5 con valor p corregido=0,01 en hombres, y una OR=1,1 con valor p corregido de 0,857 en mujeres. En el caso del genotipo AA para el SNP *rs3758562* los resultados fueron una OR=0,7 con valor p corregido=0,031 al analizar todos los pacientes, y al estratificar por sexo una OR=0,5 con valor p corregido=0,025 en hombres y una OR=0,8 con valor p corregido=0,666 en mujeres. Por tanto la asociación encontrada en pacientes con formas EMRR/SP fue negativa ejerciendo por tanto un papel protector frente a la enfermedad.

Tabla 14

<i>Datos totales</i>						
<i>SNP</i>		<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
	<i>Análisis</i>	<i>EMRR/SP</i>	<i>Controles</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	370 (57,1)	643 (62,8)	1,3 (1,0-1,6)	0,021	0,108
	G	278 (42,9)	381 (37,2)			
	Genotipo					
	AA	108 (33,3)	204 (39,8)	0,8 (0,6-1,0)	0,070	0,216
	AG	154 (47,5)	235 (45,9)	1,1 (0,8-1,4)	0,670	0,875
	GG	62 (19,1)	73 (14,3)	1,4 (1,0-2,1)	0,067	0,216
<i>rs10999426</i>	Alelo					
	A	236 (36,4)	304 (29,7)	1,4 (1,1-1,7)	0,004	0,036
	G	412 (63,6)	720 (70,3)			
	Genotipo					
	AA	41 (12,7)	47 (9,2)	1,4 (0,9-2,2)	0,132	0,341
	AG	154 (47,5)	210 (41,0)	1,3 (1,0-1,7)	0,073	0,225
	GG	129 (39,8)	255 (49,8)	0,7 (0,5-0,9)	0,005	0,041
<i>rs3758562</i>	Alelo					
	A	411 (63,4)	719 (70,2)	1,4 (1,1-1,7)	0,005	0,036
	G	237 (36,6)	305 (29,8)			
	Genotipo					
	AA	128 (39,5)	256 (0,5)	0,7 (0,5-0,9)	0,004	0,031
	AG	155 (47,8)	207 (40,4)	1,4 (1,0-1,8)	0,038	0,146
	GG	41 (12,7)	49 (9,6)	1,4 (0,9-2,1)	0,170	0,408

Tabla 14 continuación

<i>Datos en mujeres</i>						
<i>SNP</i>		<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
	<i>Análisis</i>	<i>EMRR/SP</i>	<i>Controles</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	243 (58,1)	333 (60,3)	1,1 (0,9-1,4)	0,510	0,786
	G	175 (41,9)	219 (39,7)			
	Genotipo					
	AA	71 (34,0)	99 (35,9)	0,9 (0,6-1,3)	0,701	0,890
	AG	101 (48,3)	135 (48,9)	1,0 (0,7-1,4)	0,927	1,000
	GG	37 (17,7)	42 (15,2)	1,2 (0,7-1,9)	0,535	0,802
<i>rs10999426</i>	Alelo					
	A	145 (34,7)	184 (33,3)	1,1 (0,8-1,4)	0,678	0,878
	G	273 (65,3)	368 (66,7)			
	Genotipo					
	AA	22 (10,5)	28 (10,1)	1,0 (0,6-1,9)	0,882	0,995
	AG	101 (48,3)	128 (46,4)	1,1 (0,8-1,6)	0,714	0,902
	GG	86 (41,1)	120 (43,5)	1,1 (0,8-1,6)	0,643	0,857
<i>rs3758562</i>	Alelo					
	A	270 (64,6)	369 (66,8)	1,1(0,9-1,4)	0,491	0,794
	G	148 (35,4)	183 (33,2)			
	Genotipo					
	AA	83 (39,7)	122 (44,2)	0,8 (0,6-1,2)	0,354	0,666
	AG	104 (49,8)	125 (45,3)	1,2 (0,8-1,7)	0,359	0,666
	GG	22 (10,5)	29 (10,5)	1,0 (0,6-1,8)	1,000	1,000

Tabla 14 continuación

<i>Datos en hombres</i>						
<i>SNP</i>	<i>Análisis</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR (95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
		<i>EMRR/SP</i>	<i>Controles</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	127 (55,2)	310 (65,7)	1,6 (1,1-2,1)	0,008	0,055
	G	103 (44,8)	162 (34,3)			
	Genotipo					
	AA	37 (32,2)	105 (44,5)	0,6 (0,4-0,9)	0,028	0,123
	AG	53 (46,1)	100 (42,4)	1,2 (0,7-1,8)	0,567	0,823
	GG	25 (21,7)	31 (13,1)	1,8 (1,0-3,3)	0,044	0,158
	<i>rs10999426</i>	Alelo				
A		91 (39,6)	120 (25,4)	1,9 (1,4-2,7)	0,0002	0,005
G		139 (60,4)	352 (74,6)			
Genotipo						
AA		19 (16,5)	19 (8,1)	2,3 (1,2-4,5)	0,027	0,120
AG		53 (37,4)	82 (34,7)	1,6 (1,0-2,5)	0,047	0,167
GG		43 (37,4)	135 (57,2)	0,5 (0,3-0,7)	0,0006	0,010
<i>rs3758562</i>		Alelo				
	A	141 (61,3)	350 (74,2)	1,8 (1,3-2,5)	0,0006	0,010
	G	89 (38,7)	122 (25,8)			
	Genotipo					
	AA	45 (39,1)	134 (56,8)	0,5 (0,3-0,8)	0,002	0,025
	AG	51 (44,3)	82 (34,7)	1,5 (1,0-2,4)	0,101	0,277
	GG	19 (16,5)	20 (8,5)	2,1 (1,1-4,2)	0,030	0,128

Tabla 14 continuación

<i>Datos totales</i>						
<i>SNP</i>		<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
	<i>Análisis</i>	<i>EMPP</i>	<i>Controles</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	110 (57,3)	643 (62,8)	1,3 (0,9-1,7)	0,169	0,407
	G	82 (42,7)	381 (37,2)			
	Genotipo					
	AA	35 (36,5)	204 (39,8)	0,9 (0,6-1,4)	0,570	0,824
	AG	40 (41,7)	235 (45,9)	0,8 (0,5-1,3)	0,503	0,789
	GG	21 (21,9)	73 (14,3)	1,7 (1,0-2,9)	0,065	0,215
	<i>rs10999426</i>	Alelo				
A		72 (37,5)	304 (29,7)	1,4 (1,0-2,0)	0,034	0,139
G		120 (62,5)	720 (70,3)			
Genotipo						
AA		14 (14,6)	47 (9,2)	1,7 (0,9-3,2)	0,136	0,347
AG		44 (45,8)	210 (41,0)	1,2 (0,8-1,9)	0,430	0,739
GG		38 (39,6)	255 (49,8)	0,7 (0,4-1,0)	0,075	0,225
<i>rs3758562</i>		Alelo				
	A	122 (63,5)	719 (70,2)	1,4 (1,0-1,9)	0,074	0,224
	G	70 (36,5)	305 (29,8)			
	Genotipo					
	AA	41 (42,7)	256 (0,5)	0,8 (0,5-1,2)	0,221	0,495
	AG	40 (41,7)	207 (40,4)	1,1 (0,7-1,6)	0,822	0,963
	GG	15 (15,6)	49 (9,6)	1,8 (0,9-3,3)	0,101	0,280

Tabla 14 continuación

<i>Datos en mujeres</i>						
<i>SNP</i>		<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
	<i>Análisis</i>	<i>EMPP</i>	<i>Controles</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	56 (54,9)	333 (60,3)	1,3 (0,8-1,9)	0,324	0,646
	G	46 (45,1)	219 (39,7)			
	Genotipo					
	AA	20 (39,2)	99 (35,9)	1,2 (0,7-1,9)	0,639	0,859
	AG	16 (31,4)	135 (48,9)	1,5 (0,3-0,9)	0,022	0,109
	GG	15 (29,4)	42 (15,2)	2,4 (1,2-4,6)	0,025	0,116
<i>rs10999426</i>	Alelo					
	A	38 (35,3)	184 (33,3)	1,2 (0,8-1,8)	0,495	0,785
	G	64 (62,7)	368 (66,7)			
	Genotipo					
	AA	8 (15,7)	28 (10,1)	1,6 (0,7-3,9)	0,232	0,511
	AG	22 (43,1)	128 (46,4)	0,9 (0,5-1,6)	0,760	0,931
	GG	21 (41,2)	120 (43,5)	1,0 (0,5-1,7)	0,878	0,999
<i>rs3758562</i>	Alelo					
	A	64 (62,7)	369 (66,8)	1,2 (0,8-1,9)	0,427	0,738
	G	38 (37,3)	183 (33,2)			
	Genotipo					
	AA	22 (43,1)	122 (44,2)	1,0 (0,6-1,8)	1,000	1,000
	AG	20 (39,2)	125 (45,3)	0,8 (0,5-1,4)	0,447	0,749
	GG	9 (17,6)	29 (10,5)	1,8 (0,8-4,1)	0,155	0,392

Tabla 14 continuación

<i>Datos en hombres</i>						
<i>SNP</i>		<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
	<i>Análisis</i>	<i>EMPP</i>	<i>Controles</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	54 (60,0)	310 (65,7)	1,3 (0,8-2,0)	0,336	0,650
	G	36 (40,0)	162 (34,3)			
	Genotipo					
	AA	15 (33,3)	105 (44,5)	0,6 (0,3-1,2)	0,190	0,436
	AG	24 (53,3)	100 (42,4)	1,6 (0,8-3,0)	0,192	0,438
	GG	6 (13,3)	31 (13,1)	1,0 (0,4-2,6)	1,000	1,000
<i>rs10999426</i>	Alelo					
	A	34 (37,8)	120 (25,4)	1,8 (1,1-2,9)	0,020	0,106
	G	56 (62,2)	352 (74,6)			
	Genotipo					
	AA	6 (13,3)	19 (8,1)	1,8 (0,7-4,7)	0,257	0,547
	AG	22 (48,9)	82 (34,7)	1,8 (0,9-3,4)	0,092	0,258
	GG	17 (37,8)	135 (57,2)	0,5 (0,2-0,9)	0,022	0,108
<i>rs3758562</i>	Alelo					
	A	58 (64,4)	350 (74,2)	1,6 (1,0-2,6)	0,071	0,224
	G	32 (35,6)	122 (25,8)			
	Genotipo					
	AA	19 (42,2)	134 (56,8)	0,6 (0,3-1,1)	0,102	0,278
	AG	20 (44,4)	82 (34,7)	1,5 (0,8-2,9)	0,238	0,520
	GG	6 (13,3)	20 (8,5)	1,7 (0,6-4,4)	0,275	0,573

Tabla 14 continuación

<i>Datos totales</i>						
<i>SNP</i>		<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
	<i>Análisis</i>	<i>EMPP</i>	<i>EMRR/SP</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	110 (57,3)	370 (57,1)	1,0 (0,7-1,4)	1,000	1,000
	G	82 (42,7)	278 (42,9)			
	Genotipo					
	AA	35 (36,5)	108 (33,3)	1,2 (0,7-1,9)	0,624	0,848
	AG	40 (41,7)	154 (47,5)	0,8 (0,5-1,3)	0,352	0,671
	GG	21 (21,9)	62 (19,1)	1,2 (0,7-2,1)	0,561	0,828
<i>rs10999426</i>	Alelo					
	A	72 (37,5)	236 (36,4)	1,1 (0,8-1,5)	0,799	0,965
	G	120 (62,5)	412 (63,6)			
	Genotipo					
	AA	14 (14,6)	41 (12,7)	1,2 (0,6-2,3)	0,608	0,835
	AG	44 (45,8)	154 (47,5)	0,9 (0,6-1,5)	0,816	0,961
	GG	38 (39,6)	129 (39,8)	1,0 (0,6-1,6)	1,000	1,000
<i>rs3758562</i>	Alelo					
	A	122 (63,5)	411 (63,4)	1,0 (0,7-1,4)	1,000	1,000
	G	70 (36,5)	237 (36,6)			
	Genotipo					
	AA	41 (42,7)	128 (39,5)	1,1 (0,7-1,8)	0,636	0,859
	AG	40 (41,7)	155 (47,8)	0,8 (0,5-1,2)	0,297	0,605
	GG	15 (15,6)	41 (12,7)	1,3 (0,7-2,4)	0,494	0,794

Tabla 14 continuación

<i>Datos en mujeres</i>						
<i>SNP</i>		<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
	<i>Análisis</i>	<i>EMPP</i>	<i>EMRR/SP</i>			
<i>rs885822</i>	Alelo					
	A	56 (54,9)	243 (58,1)	1,1 (0,7-1,8)	0,578	0,829
	G	46 (45,1)	175 (41,9)			
	Genotipo					
	AA	20 (39,2)	71 (34,0)	1,3 (0,7-2,4)	0,514	0,789
	AG	16 (31,4)	101 (48,3)	0,5 (0,3-0,9)	0,041	0,152
	GG	15 (29,4)	37 (17,7)	1,9 (1,0-3,9)	0,078	0,226
	<i>rs10999426</i>	Alelo				
A		38 (35,3)	145 (34,7)	1,1 (0,7-1,8)	0,645	0,854
G		64 (62,7)	273 (65,3)			
Genotipo						
AA		8 (15,7)	22 (10,5)	1,6 (0,7-3,8)	0,329	0,646
AG		22 (43,1)	101 (48,3)	0,8 (0,4-1,5)	0,535	0,807
GG		21 (41,2)	86 (41,1)	1,0 (0,5-1,9)	1,000	1,000
<i>rs3758562</i>		Alelo				
	A	64 (62,7)	270 (64,6)	1,1 (0,7-1,7)	0,731	0,911
	G	38 (37,3)	148 (35,4)			
	Genotipo					
	AA	22 (43,1)	83 (39,7)	1,2 (0,6-2,1)	0,751	0,923
	AG	20 (39,2)	104 (49,8)	0,6 (0,4-1,2)	0,212	0,477
	GG	9 (17,6)	22 (10,5)	1,8 (0,8-4,3)	0,225	0,500

Tabla 14 continuación

<i>Datos en hombres</i>						
SNP		N(%)	N(%)	OR(95% IC)	Valor P	Valor P^a
	<i>Análisis</i>	EMPP	EMRR/SP			
rs885822	Alelo					
	A	54 (60,0)	127 (55,2)	1,2 (0,7-2,0)	0,455	0,757
	G	36 (40,0)	103 (44,8)			
	Genotipo					
	AA	15 (33,3)	37 (32,2)	1,1 (0,5-2,2)	1,000	1,000
	AG	24 (53,3)	53 (46,1)	1,3 (0,7-2,7)	0,483	0,789
	GG	6 (13,3)	25 (21,7)	0,6 (0,2-1,5)	0,271	0,570
rs10999426	Alelo					
	A	34 (37,8)	91 (39,6)	1,1 (0,7-1,8)	0,800	0,962
	G	56 (62,2)	139 (60,4)			
	Genotipo					
	AA	6 (13,3)	19 (16,5)	0,8 (0,3-2,1)	0,809	0,956
	AG	22 (48,9)	53 (37,4)	1,1 (0,6-2,2)	0,860	1,000
	GG	17 (37,8)	43 (37,4)	1,0 (0,5-2,1)	1,000	1,000
rs3758562	Alelo					
	A	58 (64,4)	141 (61,3)	1,1 (0,7-1,9)	0,701	0,894
	G	32 (35,6)	89 (38,7)			
	Genotipo					
	AA	19 (42,2)	45 (39,1)	1,1 (0,6-2,3)	0,724	0,910
	AG	20 (44,4)	51 (44,3)	1,0 (0,5-2,0)	1,000	1,000
	GG	6 (13,3)	19 (16,5)	0,8 (0,3-2,1)	0,809	0,956

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas, en las diferentes formas clínicas de la EM frente a controles, estratificadas por sexo. Los valores p en negrita indican asociaciones estadísticamente significativas. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*. EMRR/SP son pacientes con comienzo en brote.

5.1.4. Distribución de haplotipos en la población estudiada para el gen PRF1

Una vez obtenidos estos resultados, también analizamos las frecuencias haplotípicas en pacientes con EM y controles sanos. Las frecuencias

haplotípicas se pueden inferir estadísticamente, una vez que conocemos las frecuencias genotípicas de la población de estudio, con métodos de combinatoria o funciones de máxima verosimilitud combinadas con algoritmos. Estos métodos nos dan información sobre cómo se combinan los alelos de los distintos SNPs al pasar de una generación a otra en nuestra población.

Gracias al programa informático PHASE reconstruimos 8 haplotipos en casos y controles (Tabla 15). Al realizar las distintas combinaciones posibles vimos que al comparar controles frente a pacientes existen dos haplotipos altamente significativos, uno con una función protectora (*AGA*) y otro que aumenta el riesgo de padecer la enfermedad (*GAG*), y otros dos que se asociaron en hombres pero no en mujeres, con un grado de significación menor, pero que también aumentan el riesgo de padecer la enfermedad (*AGG* y *GAA*). Al realizar las comparaciones teniendo en cuenta los cursos clínicos de la enfermedad vimos que la asociación de los haplotipos más significativos se mantenía sólo al comparar pacientes con formas EMRR/SP frente al grupo control en hombres, tal y como nos muestran los siguientes datos. En hombres para el haplotipo *AGA* la OR=0,6 con un valor p corregido=0,024 y en mujeres una OR=0,9 con un valor p corregido=0,774; para el haplotipo *GAG* una OR=1,8 con un valor p corregido=0,019 en hombres y una OR=1,1 con un valor p corregido=0,914 en mujeres.

Por otro lado, destaca que los dos haplotipos de menor riesgo, *AGG* y *GAA* se asociaron fuertemente con pacientes de sexo masculino que presentaban una forma clínica de EMPP al compararlos con controles, como puede observarse en la Tabla 15. Para el haplotipo *AGG* en hombres se obtuvo una OR=97,4 con un valor p corregido de 5×10^{-5} , y en mujeres una OR=1,8 con un valor p corregido de 1. Para el otro haplotipo *GAA* los resultados fueron de una OR=123,3 con un valor p corregido de 2×10^{-6} en hombres y una OR=1,1 con un valor p corregido de 0,914 en mujeres. Al analizarlo en pacientes con formas EMRR/SP, los resultados para el haplotipo *AGG* fueron de OR=22,3 con un valor p corregido de 0,005 en hombres; OR=0,4 con un valor p corregido de 0,828 en mujeres; y para el haplotipo *GAA* una OR=14,3 con un valor p corregido de 0,003 en hombres y en mujeres una OR=1,0 con un valor p corregido de 1 (Tabla 15).

Tabla 15

<i>Datos totales</i>					
<i>H</i>	<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
123	EM	Controles			
AAA	5 (0,6)	5 (0,5)	1,2 (0,4-4,2)	0,761	0,928
AAG	0 (0,0)	3 (0,3)	0,2 (0,01-3,4)	0,257	0,543
AGA	461 (54,9)	634 (61,9)	0,7 (0,6-0,9)	0,003	0,025
AGG	14 (1,7)	1 (0,1)	17,3 (2,3-132,1)	0,0001	0,003
GAA	17 (2,0)	0 (0,0)	43,5 (2,6-725,2)	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10⁻⁴
GAG	286 (34,1)	296 (28,9)	1,3 (1,0-1,6)	0,018	0,099
GGA	50 (6,0)	80 (7,8)	0,7 (0,5-1,1)	0,121	0,315
GGG	7 (0,8)	5 (0,5)	1,7 (0,5-5,4)	0,394	0,703
	EMRR/SP	Controles			
AAA	5 (0,8)	5 (0,5)	1,6 (0,5-5,5)	0,523	0,798
AAG	0 (0,0)	3 (0,3)	0,2 (0,01-4,4)	0,288	0,590
AGA	359 (55,4)	634 (61,9)	0,8 (0,6-0,9)	0,009	0,060
AGG	6 (0,9)	1 (0,1)	9,6 (1,2-79,6)	0,016	0,089
GAA	6 (0,9)	0 (0,0)	20,7 (1,2-368,6)	0,003	0,030
GAG	225 (34,7)	296 (28,9)	1,3 (1,1-1,6)	0,013	0,077
GGA	41 (6,3)	80 (7,8)	0,8 (0,5-1,2)	0,287	0,593
GGG	6 (0,9)	5 (0,5)	1,9 (0,6-6,3)	0,355	0,663

Tabla 15 continuación

<i>Datos totales</i>					
<i>H</i>	<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
123	EMPP	Controles			
AAA	0 (0,0)	5 (0,5)	0,5 (0,03-8,7)	1,000	1,000
AAG	0 (0,0)	3 (0,3)	0,8 (0,04-14,7)	1,000	1,000
AGA	102 (53,1)	634 (61,9)	0,7 (0,5-1,0)	0,024	0,114
AGG	8 (4,2)	1 (0,1)	44,5 (5,5-357,7)	3 x 10 ⁻⁶	2 x 10⁻⁴
GAA	11 (31,8)	0 (0,0)	129,8 (7,6-2213)	1 x 10 ⁻⁹	3 x 10⁻⁷
GAG	61 (31,8)	296 (28,9)	1,1 (0,8-1,6)	0,438	0,747
GGA	9 (4,7)	80 (7,8)	0,6 (0,3-1,2)	0,172	0,409
GGG	1 (0,5)	5 (0,5)	1,1 (0,1-9,2)	1,000	1,000
	EMPP	EMRR/SP			
AAA	0 (0,0)	5 (0,8)	0,3 (0,02-5,5)	0,594	0,828
AAG	0 (0,0)	0 (0,0)	0,0 (0,0-0,0)	--	--
AGA	102 (53,1)	359 (55,4)	0,9 (0,7-1,3)	0,621	0,847
AGG	8 (4,2)	6 (0,9)	4,7 (1,6-13,6)	0,005	0,041
GAA	11 (31,8)	6 (0,9)	6,5 (2,4-17,8)	2 x 10 ⁻⁴	0,005
GAG	61 (31,8)	225 (34,7)	0,9 (0,6-1,2)	0,488	0,793
GGA	9 (4,7)	41 (6,3)	0,7 (0,4-1,5)	0,489	0,789
GGG	1 (0,5)	6 (0,9)	0,6 (0,1-4,7)	1,000	1,000

Tabla 15 continuación

<i>Datos en mujeres</i>					
H	N(%)	N(%)	OR(95% IC)	Valor P	Valor P^a
123	EM	Controles			
AAA	1 (0,2)	4 (0,7)	0,3 (0,03-2,4)	0,375	0,687
AAG	0 (0,0)	2 (0,4)	0,2 (0,01-4,4)	0,500	0,789
AGA	293 (56,4)	326 (59,1)	0,9 (0,7-1,1)	0,387	0,700
AGG	5 (1,0)	1 (0,2)	5,3 (0,6-45,9)	0,114	0,302
GAA	5 (1,0)	0 (0,0)	11,8 (0,7-13,8)	0,027	0,121
GAG	177 (34,0)	178 (32,3)	1,08 (0,8-1,4)	0,559	0,830
GGA	35 (6,7)	39 (7,1)	0,9 (0,6-1,5)	0,904	1,000
GGG	4 (0,8)	2 (0,4)	2,1 (0,4-11,7)	0,439	0,744
	EMRR/SP	Controles			
AAA	1 (0,2)	4 (0,7)	0,3 (0,04-3,0)	0,397	0,705
AAG	0 (0,0)	2 (0,4)	0,3 (0,01-5,5)	0,509	0,790
AGA	237 (56,7)	326 (59,1)	0,9 (0,7-1,2)	0,470	0,774
AGG	5 (1,2)	1 (0,2)	6,7 (0,8-57,3)	0,090	0,256
GAA	4 (1,0)	0 (0,0)	11,9 (0,6-223)	0,034	0,137
GAG	140(33,5)	178 (32,3)	1,1 (0,8-1,4)	0,730	0,914
GGA	28 (6,7)	39 (7,1)	0,9 (0,6-1,6)	0,900	1,000
GGG	3 (0,7)	2 (0,4)	2,0 (0,3-12,0)	0,657	0,862

Tabla 15 continuación

<i>Datos en mujeres</i>					
<i>H</i>	<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
123	EMPP	Controles			
AAA	0 (0,0)	4 (0,7)	0,6(0,03-11,1)	1,000	1,000
AAG	0 (0,0)	2 (0,4)	1,1(0,05-22,5)	1,000	1,000
AGA	56 (54,9)	326(59,1)	0,8(0,6-1,3)	0,446	0,751
AGG	0 (0,0)	1 (0,2)	1,8 (0,1-44,3)	1,000	1,000
GAA	1 (1,0)	0(0,0)	16,3(0,7-403,7)	0,156	0,387
GAG	37 (36,3)	178(32,3)	1,2(0,8-1,9)	0,424	0,738
GGA	7 (6,9)	39(7,1)	1,0(0,4-2,2)	1,000	1,000
GGG	1 (1,0)	2(0,4)	2,7(0,2-30,3)	0,399	0,703
123	EMPP	EMRR/SP			
AAA	0 (0,0)	1 (0,2)	1,4 (0,1-33,6)	1,000	1,000
AAG	0 (0,0)	0 (0,0)	--	--	--
AGA	56 (54,9)	237 (56,7)	0,9 (0,6-1,4)	0,740	0,918
AGG	0 (0,0)	5 (1,2)	0,4 (0,02-6,7)	0,589	0,828
GAA	1 (1,0)	4 (1,0)	1,0 (0,1-9,3)	1,000	1,000
GAG	37 (36,3)	140(33,5)	1,1 (0,7-1,8)	0,641	0,858
GGA	7 (6,9)	28 (6,7)	1,0 (0,4-2,4)	1,000	1,000
GGG	1 (1,0)	3 (0,7)	1,4 (0,1-13,3)	0,584	0,830

Tabla 15 continuación

<i>Datos en hombres</i>					
<i>H</i>	<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
123	<i>EM</i>	<i>Controles</i>			
AAA	4 (1,3)	1 (0,2)	6,0 (0,7-53,6)	0,164	0,403
AAG	0 (0,0)	1 (0,2)	0,5 (0,02-12,1)	1,000	1,000
AGA	168 (52,5)	308 (65,3)	0,6 (0,4-0,8)	4 x 10 ⁻⁴	0,007
AGG	9 (2,8)	0 (0,0)	28,8 (1,7-497,0)	3 x 10 ⁻⁴	0,006
GAA	12 (3,8)	0 (0,0)	38,3 (2,3-649,1)	2 x 10 ⁻⁵	9 x 10⁻⁴
GAG	109 (34,1)	118 (25,0)	1,5 (1,1-2,1)	0,007	0,047
GGA	15 (4,7)	41 (8,7)	0,5 (0,3-1,0)	0,034	0,139
GGG	3 (0,94)	3 (0,64)	1,5 (0,3-7,4)	0,690	0,885
	<i>EMRR/SP</i>	<i>Controles</i>			
AAA	4 (1,7)	1 (0,2)	8,3 (0,9-75,0)	0,042	0,155
AAG	0 (0,0)	1 (0,2)	0,7 (0,03)	1,000	1,000
AGA	122 (53,0)	308 (65,3)	0,6 (0,4-0,8)	0,002	0,024
AGG	1 (0,4)	0 (0,0)	6,2 (0,3-152,2)	0,328	0,648
GAA	2 (0,9)	0 (0,0)	10,3 (0,5-216,3)	0,127	0,286
GAG	85 (37,0)	118 (25,0)	1,8 (1,3-2,5)	0,001	0,019
GGA	13 (5,7)	41 (8,7)	0,6 (0,3-1,2)	0,176	0,411
GGG	3 (1,3)	3 (0,64)	2,1 (0,4-10,3)	0,400	0,699

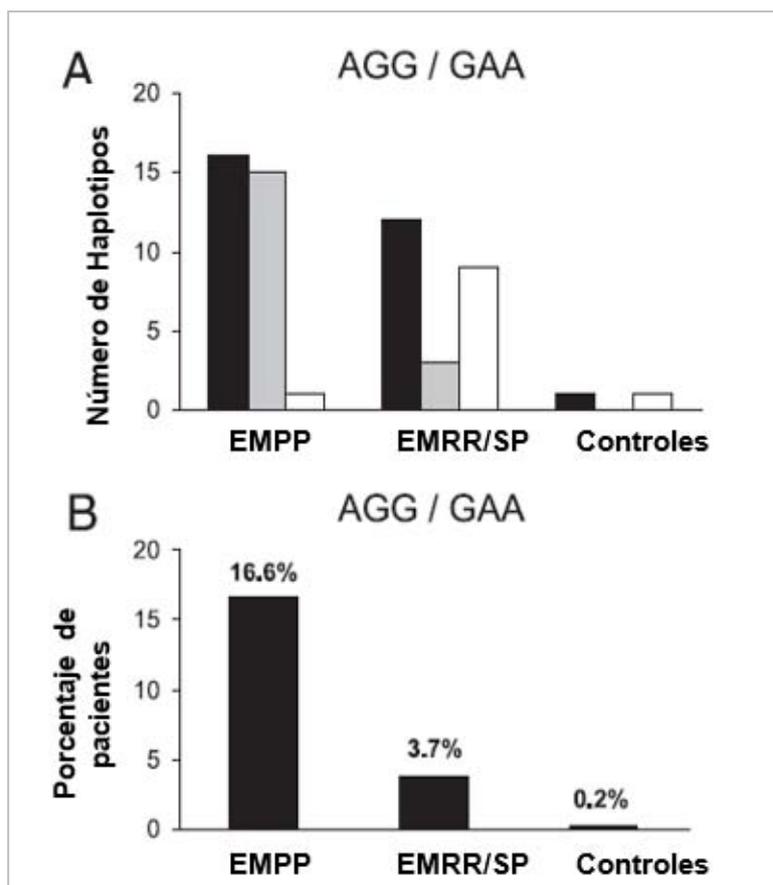
Tabla 15 continuación

<i>Datos en hombres</i>					
<i>H</i>	<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
123	EMPP	Controles			
AAA	0 (0,0)	1 (0,2)	1,7 (0,1-43,0)	1,000	1,000
AAG	0 (0,0)	1 (0,2)	1,7 (0,1-43,0)	1,000	1,000
AGA	46 (51,1)	308 (65,3)	0,6 (0,4-0,9)	0,012	0,077
AGG	8 (8,9)	0 (0,0)	97,4 (5,6-1703,2)	3 x 10 ⁻⁷	5 x 10⁻⁵
GAA	10 (11,1)	0 (0,0)	123,3 (7,2-2124,3)	7 x 10 ⁻⁹	2 x 10⁻⁶
GAG	24 (26,7)	118 (25,0)	1,1 (0,7-1,8)	0,791	0,960
GGA	2 (2,2)	41 (8,7)	0,2 (0,1-1,0)	0,031	0,129
GGG	0 (0,0)	3 (0,64)	0,7 (0,04-14,5)	1,000	1,000
	EMPP	EMRR/SP			
AAA	0 (0,0)	4 (1,7)	0,3 (0,01-5,2)	0,580	0,829
AAG	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,0
AGA	46 (51,1)	122 (53,0)	0,9 (0,6-1,5)	0,804	0,962
AGG	8 (8,9)	1 (0,4)	22,3 (2,8-181,4)	2 x 10 ⁻⁴	0,005
GAA	10 (11,1)	2 (0,9)	14,3 (3,1-66,4)	1 x 10 ⁻⁴	0,003
GAG	24 (26,7)	85 (37,0)	0,6 (0,4-1,1)	0,089	0,256
GGA	2 (2,2)	13 (5,7)	0,4 (0,1-1,7)	0,249	0,535
GGG	0 (0,0)	3 (1,3)	0,4 (0,02-7,0)	0,562	0,825

Leyenda. Frecuencias haplotípicas en pacientes totales, pacientes con distintas formas clínicas y controles estratificados por sexo. Los valores p en negrita indican asociaciones estadísticamente significativas. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*. EMRR/SP son pacientes con comienzo en brote.

Como se puede observar en la Figura 14, los haplotipos de riesgo AGG y GAA fueron más frecuentes en formas de EMPP, sobretodo en hombres. Al representar en un gráfico el porcentaje de pacientes de las distintas formas clínicas portadores de uno de estos haplotipos de riesgo, vimos que un 17% de los pacientes con EMPP eran homocigotos o heterocigotos para los haplotipos GAA o AGG, mientras que sólo un 3,7% de los pacientes con formas de EMRR/SP o un 0,2% de los controles presentaban esta condición.

Figura 14



Leyenda. Distribución de los haplotipos de riesgo AGG y GAA en pacientes con EM y controles. A: Número de haplotipos de riesgo. La barra negra muestra el número total de haplotipos; la barra gris muestra el número de haplotipos en hombres; la barra blanca muestra el número de haplotipos en mujeres. B: Porcentaje de pacientes portadores de haplotipos de riesgo. EMRR/SP: pacientes con formas de inicio en brotes.

5.1.5. Replicación de los resultados obtenidos para el gen de la PRF1 en dos poblaciones independientes

Tras la obtención de estos resultados significativos, decidimos estudiar el SNP que presentaba un mayor grado de asociación, *rs10999426*, en dos poblaciones independientes de casos y controles con el fin de intentar replicar los resultados obtenidos.

La replicación realizada en población estadounidense mostró resultados similares a los encontrados en la población española (Tabla 16). El alelo A se asoció de forma significativa con la enfermedad (OR=1,4; valor $p=0,002$) y al estratificar por sexos la asociación se mantuvo únicamente para hombres (OR=1,8; valor $p=0,003$). En el caso de la población islandesa la distribución de

los alelos fue similar a la de las otras dos poblaciones (Tabla 16), aunque no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos.

Para finalizar, se realizó un análisis combinando las tres poblaciones estudiadas y observamos una asociación estadísticamente significativa del SNP *rs10999426* con la enfermedad únicamente en hombres (OR=1,5, valor $p=2,4 \times 10^{-5}$ en hombres; OR=1,2, valor $p=0,06$ en mujeres) (Figura 15).

Tabla 16

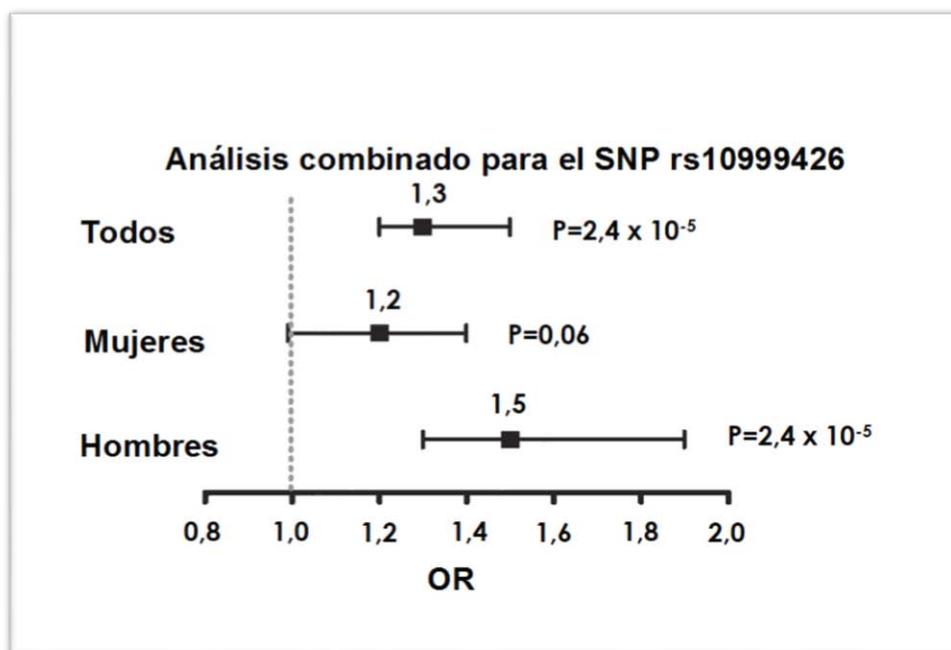
<i>Datos totales - Población de Estados Unidos</i>					
SNP	Análisis	N(%)	N(%)	OR(95% IC)	Valor P
		EM	Controles		
<i>rs10999426</i>	Alelo				
	A	279 (47,1)	230 (38,3)	1,4 (1,1-1,8)	0,002
	G	313 (52,9)	370 (61,7)		
<i>Datos en mujeres – Población de Estados Unidos</i>					
<i>rs10999426</i>	Alelo				
	A	180 (46,2)	157 (42,7)	1,3 (0,9-1,7)	0,080
	G	186 (50,8)	211 (57,3)		
<i>Datos en hombres – Población de Estados Unidos</i>					
<i>rs10999426</i>	Alelo				
	A	98 (45,0)	73 (31,5)	1,8 (1,2-2,6)	0,003
	G	120 (55,0)	159 (68,5)		

Tabla 16 continuación

<i>Datos totales - Población de Islandia</i>					
SNP	Análisis	N(%)	N(%)	OR(95% IC)	Valor P
		EM	Controles		
rs10999426	Alelo				
	A	232 (34,1)	267 (31,5)	1,1 (0,9-1,4)	0,276
	G	448 (65,9)	581 (68,5)		
<i>Datos en mujeres - Población de Islandia</i>					
rs10999426	Alelo				
	A	169 (35,4)	138 (32,4)	1,1 (0,9-1,5)	0,348
	G	309 (64,6)	288 (67,6)		
<i>Datos en hombres - Población de Islandia</i>					
rs10999426	Alelo				
	A	63 (31,2)	129 (30,6)	1,0 (0,7-1,5)	0,875
	G	139 (68,8)	293 (69,4)		

Leyenda. Validación de la asociación de *PRF1* mediante replicación en cohortes independientes. La tabla 16 muestra las frecuencias alélicas en casos y controles, estratificadas por sexo, para el SNP *rs10999426* en las cohortes de Estados Unidos e Islandia. Los valores p en negrita muestran valores estadísticamente significativos.

Figura 15



Leyenda. Gráfica que representa las OR y 95% IC del análisis combinado para el SNP *rs10999426*, incluyendo la cohorte española, estadounidense e islandesa.

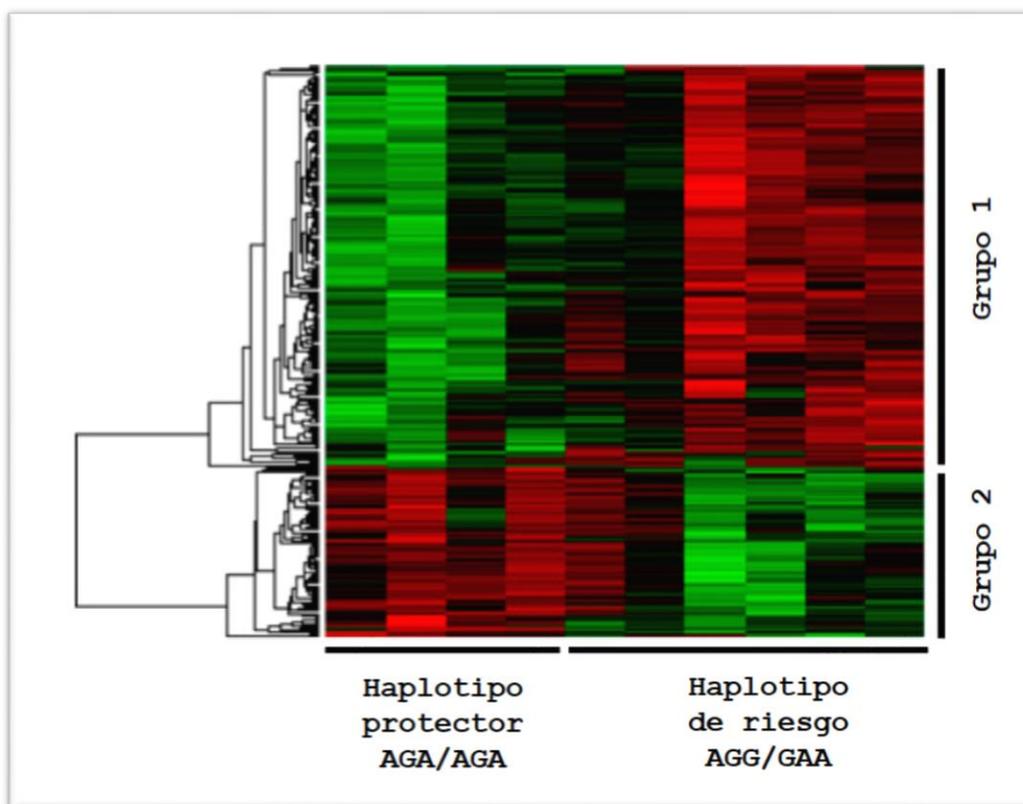
5.1.6. Gravedad de la enfermedad y polimorfismos en el estudio de la PRF1

La gravedad de la enfermedad se midió utilizando la escala del MSSS y se analizó teniendo en cuenta los genotipos obtenidos para cada SNP. Al concluir el análisis vimos que los valores medios de gravedad de la enfermedad fueron similares para los distintos genotipos de los SNPs estudiados y para las distintas formas clínicas. Al estratificar por sexo tampoco obtuvimos diferencias significativas.

5.1.7. Estudio de la expresión génica de PRF1 mediante microarrays

La alta asociación encontrada entre los haplotipos de riesgo y los pacientes de sexo masculino que presentaban una forma de EMPP nos llevó a realizar estudios adicionales en el subgrupo de pacientes portadores de los haplotipos de interés. Para ello, mediante *microarrays*, intentamos conocer los patrones de expresión de los pacientes que expresaban estos haplotipos comparando la expresión génica entre 6 pacientes de sexo masculino que expresan los haplotipos AGG y GAA y 4 pacientes con el haplotipo protector AGA. Como se puede ver en el *heatmap* de la Figura 16, los genes se distribuyen en dos grandes grupos. La Tabla Suplementaria II incluida en el Anexo 2 (en el artículo *Gender-Associated Differences of Perforin Polymorphisms in the Susceptibility to Multiple Sclerosis*) recoge una lista de los genes que presentaron una expresión diferencial entre ambos grupos.

Figura 16



Leyenda. Grupos de genes que se expresan de forma distinta en pacientes con haplotipo protector frente a aquellos con haplotipo de riesgo.

El estudio de las vías celulares representadas entre los genes con expresión diferencial incluidos en los dos grupos revela que, los genes con menor expresión en los pacientes con el haplotipo de bajo riesgo se encuentran incluidos en la categoría de “*killing cells*” (Tabla 17). Como ejemplo de genes incluidos en esta categoría están: *LYST* (regulador del tráfico de lisosomas), *P2RX7* (receptor de purinas P2X, canal iónico ligando dependiente, 7), y *SLAMF7* (gen de la familia SLAM miembro 7). La expresión de estos tres genes fue menor en hombres con formas de EMPP homo- y heterocigotos para el haplotipo de riesgo *AGG* y *GAA* al compararlos con hombres con la misma forma clínica pero homocigotos para el haplotipo protector *AGA* ($p=0,002$ para el gen *LYST*; $p=0,0008$ para el gen *P2RX7*; $p=0,0001$ para el gen *SLAMF7*).

Tabla 17

Categorías	GO ID	Genes	Valor p
<i>Procesos biológicos sobrerrepresentados en genes con menor expresión</i>			
Muerte celular	GO:0001906	<i>LYST, P2RX7, SLAMF7</i>	0,00082
Regulación positiva de procesos celulares	GO:0048522	<i>LYST, S1PR3, NRG1, IFI16, ILF3, P2RX7, MED1, TLR4, NCOA3, BCLAF1, THRAP3, SLAMF7, NLRC4, ZBTB38</i>	0,0012
Respuesta a estímulos externos	GO:0009605	<i>LYST, CCR2, S1PR3, F5, FPR2, TLR4, ABHD2, NLRC4, P2RY12</i>	0,0021
Regulación positiva de procesos biológicos	GO:0048518	<i>LYST, S1PR3, NRG1, IFI16, ILF3, P2RX7, MED1, TLR4, NCOA3, BCLAF1, THRAP3, SLAMF7, NLRC4, ZBTB38,</i>	0,0023
Detección de estímulos externos	GO:0009581	<i>TLR4, NLRC4</i>	0,0026
Vía de señalización del receptor andrógeno	GO:0030521	<i>MED1, NCOA3, THRAP3</i>	0,0026
Regulación positiva del proceso de desarrollo	GO:0051094	<i>LYST, NRG1, IFI16, P2RX7, BCLAF1, SLAMF7, NLRC4</i>	0,0035
Detección de estímulos bióticos	GO:0009595	<i>TLR4, NLRC4</i>	0,0051
Activación de macrófagos	GO:0042116	<i>TLR4, CD93</i>	0,0051
Secreción de IL-1	GO:0050701	<i>P2RX7, NLRC4</i>	0,0051
Secreción de IL-1b	GO:0050702	<i>P2RX7, NLRC4</i>	0,0051
Respuesta al estrés	GO:0006950	<i>LYST, CCR2, S1PR3, F5, FPR2, HSPA4, IFI16, TLR4, ABHD2, CLEC5A, RIF1, SLAMF7, NLRC4, P2RY12</i>	0,0060
Respuesta a daño	GO:0009611	<i>CCR2, S1PR3, F5, FPR2, TLR4, ABHD2, P2RY12</i>	0,0065
Vía de señalización del receptor de la hormona esteroide	GO:0030518	<i>MED1, NCOA3, THRAP3</i>	0,0074

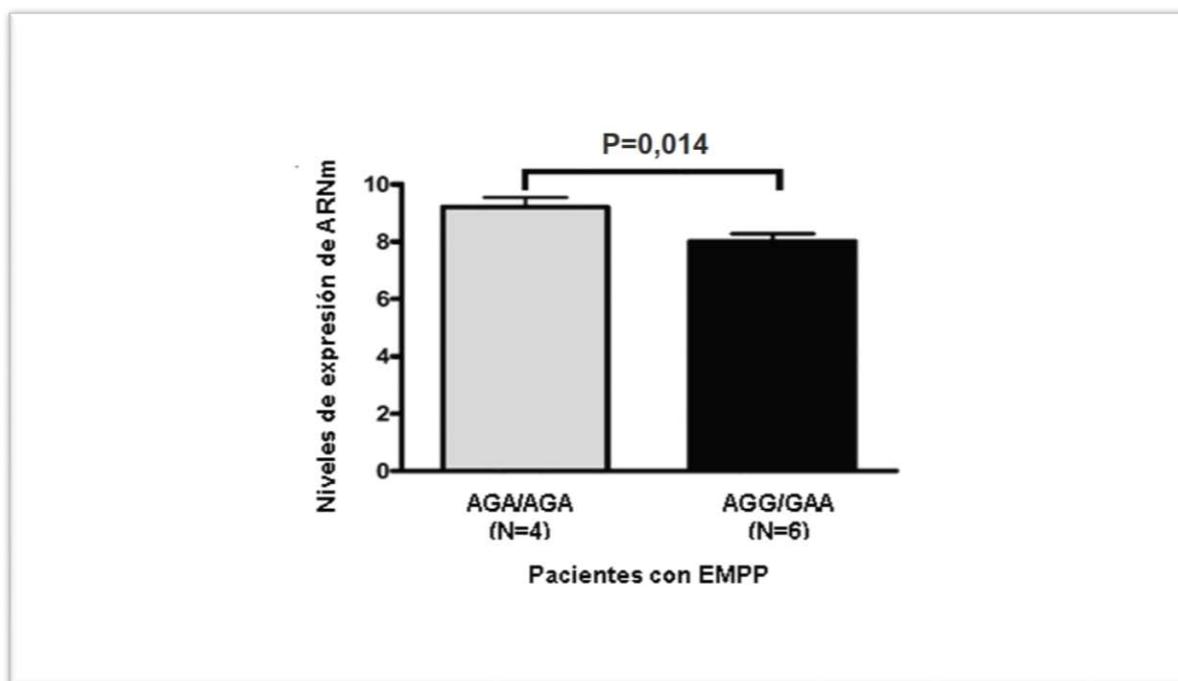
Categorías	GO ID	Genes	Valor p
Vía de señalización mediada por receptores intracelulares	GO:0030522	<i>MED1, NCOA3, THRAP3</i>	0,0074
Inmunidad mediada por células NK	GO:0002228	<i>LYST, SLAMF7</i>	0,0083
Citotoxicidad mediada por células NK	GO:0042267	<i>LYST, SLAMF7</i>	0,0083
<i>Procesos biológicos sobrerrepresentados en genes con mayor expresión</i>			
Comportamiento visual	GO:0007632	<i>KRAS, ATXN1</i>	0,0007
Aprendizaje visual	GO:0008542	<i>KRAS, ATXN1</i>	0,0007
Aprendizaje y/o memoria	GO:0007611	<i>EGR1, KRAS, ATXN1</i>	0,0013
Regulación negativa de la transcripción	GO:0016481	<i>EGR1, SMAD4, ATXN1, ZEB1, TLE1, BCOR</i>	0,0034
Regulación negativa de la expresión génica	GO:0010629	<i>EGR1, SMAD4, ATXN1, ZEB1, TLE1, BCOR</i>	0,0037
Regulación negativa del proceso de biosíntesis de macromoléculas	GO:0010558	<i>EGR1, SMAD4, ATXN1, ZEB1, TLE1, BCOR</i>	0,0040
Regulación negativa de procesos biosintéticos	GO:0009890	<i>EGR1, SMAD4, ATXN1, ZEB1, TLE1, BCOR</i>	0,0044
Regulación negativa de procesos metabólicos de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	GO:0045934	<i>EGR1, SMAD4, ATXN1, ZEB1, TLE1, BCOR</i>	0,0048
Sistema de desarrollo	GO:0048731	<i>BTG1, EGR1, FLT1, KRAS, SMAD4, NR4A2, TCF12, TLE1, PHLDA2, RNF103, BCL11A</i>	0,0049
Desarrollo muscular	GO:0007517	<i>BTG1, KRAS, TCF12</i>	0,0053
Desarrollo de órganos	GO:0048513	<i>BTG1, EGR1, FLT1, KRAS, SMAD4, TCF12, TLE1, PHLDA2, BCL11A</i>	0,0071
Regulación negativa del proceso metabólico de macromoléculas	GO:0010605	<i>EGR1, SMAD4, ATXN1, ZEB1, TLE1, BCOR</i>	0,0094

Categorías	GO ID	Genes	Valor p
Morfogénesis de estructuras ramificadas	GO:0001763	<i>FLT1, SMAD4</i>	0,0098
Diferenciación de células musculares	GO:0042692	<i>BTG1, KRAS</i>	0,0098
Morfogénesis ramificadas tubulares	GO:0048754	<i>FLT1, SMAD4</i>	0,0098

5.1.8. Expresión del gen y de la proteína PRF1 en PBMCs de pacientes de sexo masculino con formas de EMPP

El gen *PRF1* se encuentra entre los genes que mostraron un grado de expresión diferencial significativo entre pacientes de sexo masculino con formas de EMPP y haplotipos de riesgo y pacientes con formas de EMPP y haplotipos protectores. Como se muestra en la Figura 17, los niveles de expresión del ARNm de *PRF1* fueron significativamente inferiores en pacientes con EMPP homo- o heterocigotos para los haplotipos de riesgo *AGG* y *GAA* al compararlos con los pacientes con EMPP que expresan el haplotipo protector *AGA* ($p=0,014$). Con el fin de conocer si la diferencia en los niveles de expresión del gen *PRF1* influía en los niveles de expresión proteica de la PRF1, realizamos la determinación de la expresión de PRF1 mediante citometría de flujo en las dos principales poblaciones celulares sanguíneas que expresan PRF1, las células NK y los linfocitos T CD8⁺. Tanto los estudios de expresión génica como los de expresión proteica se realizaron en el mismo grupo de pacientes de sexo masculino con formas de EMPP (Figura 17).

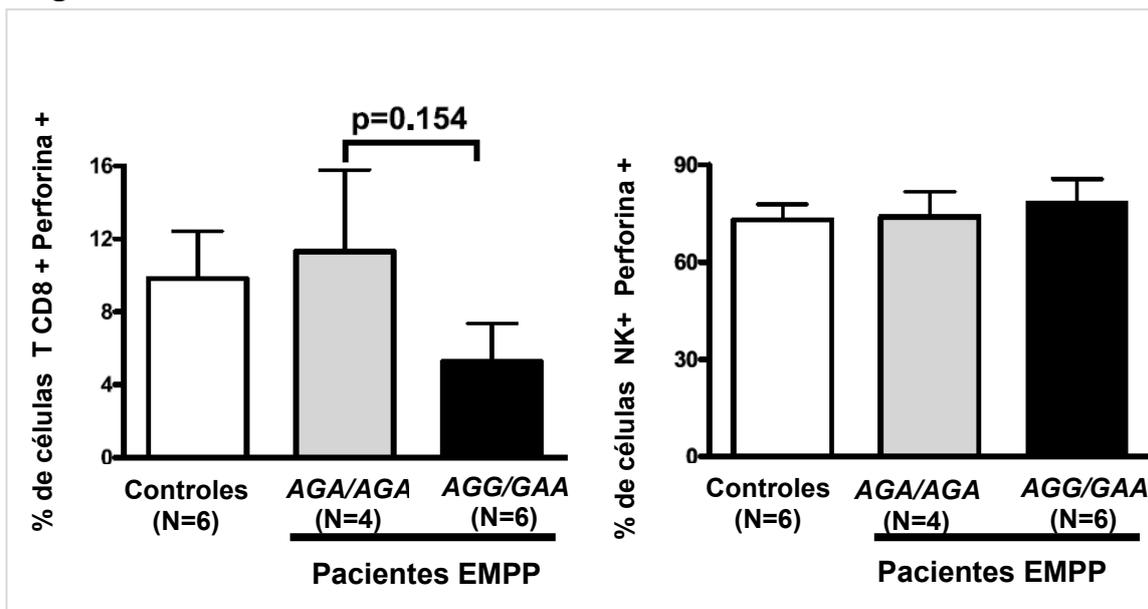
Figura 17



Leyenda. Niveles de expresión de ARNm de *PRF1* en función de que se exprese el haplotipo de riesgo o protector.

Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,154$; Figura 18) sí se observó una menor expresión de proteína PRF1 en células T CD8⁺ de pacientes con los haplotipos de riesgo AGG y GAA al compararlos con aquellos que expresaban el haplotipo protector AGA. Es importante mencionar que se observó una tendencia hacia una correlación significativa entre la expresión del gen de la *PRF1* en PBMCs y la expresión de la proteína PRF1 en células T CD8⁺ [coeficiente de correlación por rangos de Spearman (r)=0,61; valor $p=0,060$]. Por el contrario, la expresión de PRF1 en células NK fue similar en pacientes que expresaban el haplotipo de riesgo, aquellos con el haplotipo protector y los controles sanos estudiados. El resultado de la correlación entre la expresión del gen *PRF1* en PBMCs y la expresión de la proteína por células NK no alcanzó significación estadística ($r=0,28$; valor $p=0,425$).

Figura 18



Leyenda: Expresión de la proteína PRF1 en células CD8⁺ y NK de pacientes con haplotipo protector o de riesgo.

5.1.9. Estudio de la carga viral de EBV en pacientes con EMPP

Una de las principales funciones de las células NK y de los linfocitos T CD8⁺ es eliminar células infectadas por virus. Por este motivo, evaluamos si la disminución en la expresión de PRF1, expresada por linfocitos T CD8⁺ y por células NK, en pacientes con haplotipos de riesgo se asociaba a una reactivación de la infección viral por EBV. Para ello, realizamos una determinación de la carga de ADN del virus EBV, en los mismos pacientes en los que se estudió la expresión del gen y de la proteína PRF1 (n=10), mediante PCR cuantitativa. Como resultado vimos que no se detectó ADN viral de EBV en las PBMCs de los diez pacientes estudiados.

5.1.10. Estudio de la expresión de PRF1 basal e inducida por hormonas en hombres y mujeres controles

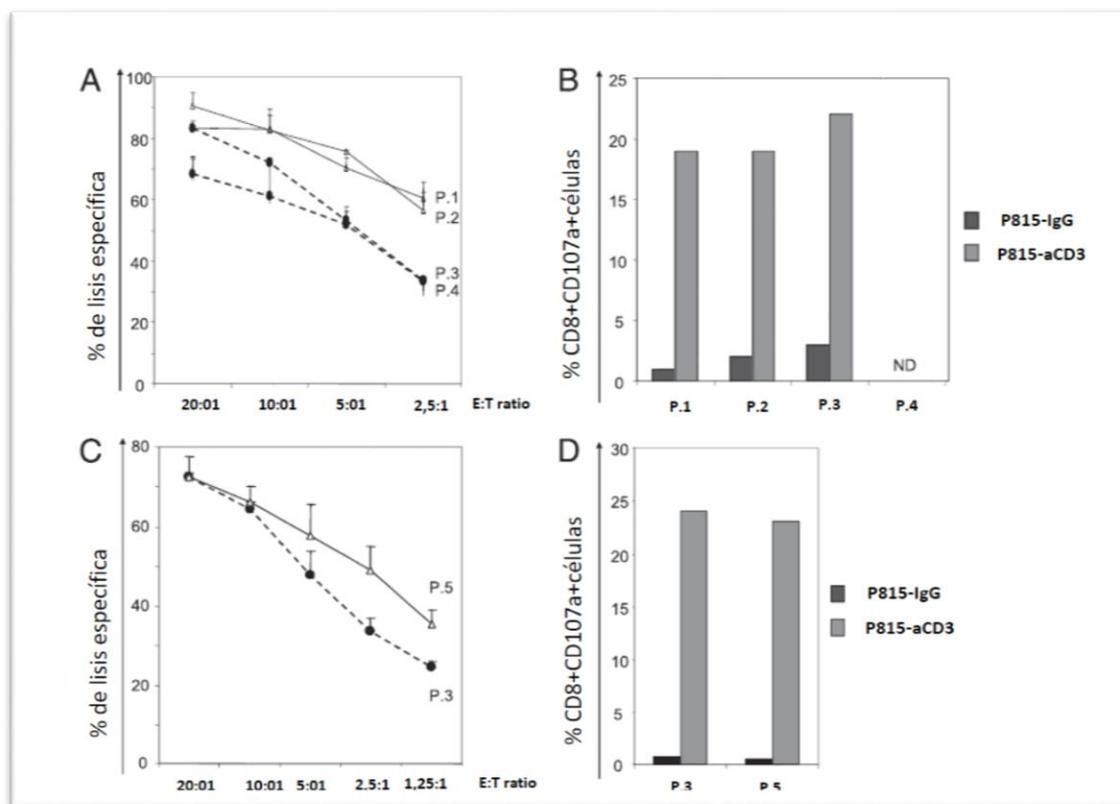
Debido a las diferencias entre sexos observadas tras el estudio de asociación de polimorfismos de *PRF1* y EM, decidimos analizar la expresión de PRF1 en PMBCs de controles sanos estratificados por sexo. El análisis de la expresión mostró una expresión basal de PRF1 similar entre hombres y mujeres sanos.

Por otro lado, cuando las células NK y los linfocitos T CD8⁺ se incubaron en presencia de hormonas sexuales como la dihidrotestosterona, el estradiol o la progesterona durante 3, 6 y 24 horas, se observaron pequeñas fluctuaciones en la expresión de PRF1 que no llegaron a ser estadísticamente significativas.

5.1.11. Implicaciones funcionales de los haplotipos de riesgo para PRF1 en pacientes con EMPP

Para evaluar el impacto funcional de los haplotipos observados en el gen *PRF1*, se purificaron y estimularon con IL-2 linfocitos T CD8⁺ que provenían de pacientes de sexo masculino con formas de EMPP y portadores de haplotipos de riesgo o protectores para *PRF1*. Estas células se utilizaron como células efectoras (E) en ensayos funcionales de citotoxicidad y degranulación. Se observó que los linfocitos T CD8⁺ que provenían de pacientes con haplotipos de riesgo (*GAA/AGA*) presentaron una actividad citotóxica más baja frente a células P815 (diana – T) marcadas con Cr⁵¹ en presencia de anticuerpo antiCD3 que aquellas que provenían de pacientes con el haplotipo protector (*AGA/AGA*). Los dos protocolos de activación celular utilizados dieron lugar a resultados similares. Por el contrario, los porcentajes de respuesta de los linfocitos T CD8⁺ a las células P815 evaluados mediante un ensayo de degranulación de CD107a fueron comparables en todos los pacientes (Figura 19).

Figura 19



Legenda: Disminución de la citotoxicidad en células T CD8⁺ purificadas de pacientes con EM portadores de los haplotipos de riesgo (*GAA/GAA*) para *PRF1*. Las figuras A y C muestran la actividad citotóxica de las células T CD8⁺ de hombres con formas de EMPP que portan los haplotipos de riesgo (líneas discontinuas) y los protectores (líneas continuas) para *PRF1*, que fue testada mediante ensayos de lisis redirigida en células P815 para evaluar la liberación de Cr⁵¹ indicada por la ratio E: T (ratio efector: diana). Las figuras B y D miden la proporción de células T CD8⁺ que responden a células P815 (E/T 5:1) mediante un ensayo de degranulación de CD107 por citometría de flujo. Las células CD8⁺ de A y B purificadas a partir de PMBCs se incubaron con IL-2 (1000 U/ml) durante 48 h y fueron usadas como efectoras. El porcentaje de lisis específica de células P815 marcadas con anticuerpo control (P815-IgG) y correspondiente a la ratio mayor (20:1) fue menor del 10% en todos los pacientes. En las figuras C y D las PBMCs fueron estimuladas con PHA + IL-2 durante 7 días y se utilizaron células T CD8⁺ como efectoras. El porcentaje de lisis específica de células P815 marcadas con el anticuerpo control y correspondiente a la ratio mayor (20:1) fue menor de un 4% en ambos pacientes. ND: no se determinó. P: paciente.

5.2. CASP8

5.2.1. Equilibrio de Hardy Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Los tres polimorfismos estudiados en este trabajo para el gen *CASP8* (*rs2037815*, *rs12990906* y *rs13113*) se encuentran en equilibrio de Hardy-

Weinberg con valores p de 0,387, 0,812 y 0,109 respectivamente. Además, los tres polimorfismos están en desequilibrio de ligamiento con un valor p $<10^{-20}$ (Tabla 18).

Tabla 18

SNPs	D'	r ²
<i>rs2037815 vs. rs12990906</i>	D'= 0,618	r ² =0,336
<i>rs2037815 vs. rs13113</i>	D'= 0,255	r ² =0,037
<i>rs12990906 vs. rs13113</i>	D'=0,751	r ² =0,281

5.2.2. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la población estudiada para el gen CASP8

Cuando calculamos las frecuencias alélicas y genotípicas comparando controles frente a pacientes con EM, observamos que las frecuencias para los distintos alelos y genotipos fueron similares entre ambos grupos (Tabla 19). Cuando este mismo análisis se realizó estratificando a los pacientes según el curso clínico de la enfermedad, vimos que existía una asociación significativa entre el alelo G del polimorfismo *rs2037815* y las formas de EMPP al compararlas con las formas de EMRR/SP (OR=1,6; valor p corregido=0,017) y con los controles sanos (OR=1,7; valor p corregido=0,002). Cuando analizamos los genotipos, la presencia del genotipo GG para el SNP *rs2037815* se asoció a las formas de EMPP al compararlas con las formas de EMRR/SP (OR=2,0; valor p corregido=0,019) y con los controles sanos (OR=2,1; valor p corregido=0,016). Para el polimorfismo *rs12990906* el genotipo CT se asoció con las formas de EMPP al compararlas con los controles sanos (OR=1,9; valor p corregido=0,030). Para el SNP *rs13113* no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa en el análisis realizado (Tabla 20).

Cuando este mismo análisis se realizó estratificando a los pacientes según el curso clínico de la enfermedad, vimos que existía una asociación significativa entre el alelo G del polimorfismo *rs2037815* y las formas de EMPP al compararlas con las formas EMRR/SP (OR=1,6; valor p corregido=0,017) y con los controles sanos (OR=1,7; valor p corregido=0,002). Cuando analizamos los

genotipos, la presencia del genotipo *GG* para el SNP *rs2037815* se asoció a las formas de EMPP al compararlas con las formas de EMRR/SP (OR=2,0; valor p corregido=0,019) y con los controles sanos (OR=2,1; valor p corregido=0,016). Para el polimorfismo *rs12990906* el genotipo *CT* se asoció con las formas de EMPP al compararlas con los controles sanos (OR=1,9; valor p corregido=0,030). Para el SNP *rs13113* no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa en el análisis realizado (Tabla 20).

5.2.3. Distribución de haplotipos en la población estudiada para el gen *CASP8*

Las frecuencias haplotípicas fueron similares al comparar casos y controles. Sin embargo, cuando los casos fueron estratificados por curso clínico de la enfermedad, se vio que el haplotipo de riesgo *GCA* se asociaba con las formas de EMPP al compararlas con los controles sanos (OR=2,0; valor p corregido=0,017). Además, se encontró un haplotipo con efecto protector, *ACT*, al comparar las formas de EMPP con las formas EMRR/SP y controles (OR=0,4, valor p corregido=0,002; OR=0,4, valor corregido p=0,001 respectivamente)(Tabla 21).

Tabla 19

Datos totales						
SNP		N(%)	N(%)	OR(95% IC)	Valor P	Valor P^a
	Análisis	EM	Controles			
rs2037815	Alelo					
	A	555 (50,82)	608 (55,58)	1,2 (1,0-1,4)	0,028	0,144
	G*	537 (49,18)	486 (44,42)			
	Genotipo					
	GG	135 (24,73)	113 (20,66)	1,3 (1,0-1,7)	0,112	0,391
	AG	267 (48,9)	260 (47,53)	1,1 (0,8-1,3)	0,671	0,867
	AA	144 (26,37)	174 (31,81)	0,8 (0,6-1,0)	0,053	0,224
rs12990906	Alelo					
	C	597 (56,0)	623 (59,9)	1,0 (0,9-1,2)	0,664	0,871
	T*	469 (44,0)	471 (43,1)			
	Genotipo					
	TT	97 (17,1)	100 (18,3)	0,9 (0,7-1,3)	0,632	0,843
	CT	287 (53,8)	271 (49,5)	1,2 (0,9-1,5)	0,161	0,479
	CC	155 (29,1)	176 (32,2)	0,9 (0,7-1,1)	0,291	0,596
rs13113	Alelo					
	A*	444 (40,7)	414 (37,8)	1,1 (1,0-1,3)	0,188	0,503
	T	648 (59,3)	680 (62,2)			
	Genotipo					
	TT	178 (32,6)	202 (36,9)	0,8 (0,6-1,1)	0,144	0,461
	AT	292 (53,5)	276 (50,5)	1,1 (0,9-1,4)	0,332	0,619
	AA	76 (13,9)	69 (12,6)	1,1 (0,8-1,6)	0,533	0,762

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en casos de EM y controles. OR: Odds ratio. 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. *Alelos que denotan riesgo. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de Benjamini-Hochberg.

La Figura 20 representa la distribución de los haplotipos protectores y de riesgo, teniendo en cuenta si son homocigotos o heterocigotos para estos haplotipos, para los controles y las diferentes formas clínicas de la EM. Se puede ver que el porcentaje de homocigotos y heterocigotos para el haplotipo de riesgo GCA es significativamente mayor en pacientes con formas de EMPP

al compararlos con los pacientes con formas EMRR/SP (OR=1,8; valor p=0,015) y con los controles sanos (OR=2,1; valor p=0,001) (Figura 20a). Por el contrario, el porcentaje de homo- y heterocigotos para el haplotipo protector ACT fue significativamente menor en pacientes con formas de EMPP al compararlos con pacientes con formas EMRR/SP (OR=0,4; valor p=0,0001) y controles (OR=0,4; valor p=0,0002) (Figura 20b). Destacar que ninguno de los pacientes con EMPP estudiados fue homocigoto para el haplotipo ACT.

Tabla 20

<i>Datos estratificados por forma clínica</i>						
<i>SNP</i>	<i>Análisis</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>ValorP^a</i>
<i>rs2037815</i>	Alelo	EMRR/SP	Controles			
	A	446 (53,6%)	608 (55,6)	1,1 (0,9-1,3)	0,405	0,649
	G*	386 (46,4)	486 (44,4)			
	Genotipo					
	GG	89 (21,4)	113 (20,7)	1,0 (0,8-1,4)	0,810	0,888
	AG	208 (50,0)	260 (47,5)	1,1 (0,9-1,4)	0,474	0,729
	AA	119 (28,6)	174 (31,8)	0,9 (0,6-1,1)	0,289	0,610
<i>rs12990906</i>	Alelo					
	C*	475 (57,1)	623 (57,0)	1,0 (0,8-1,2)	0,963	0,987
	T	357 (42,9)	471 (43,1)			
	Genotipo					
	TT	73 (17,6)	100 (18,3)	1,0 (0,7-1,3)	0,799	0,901
	CT	211 (50,7)	271 (49,5)	1,0 (0,8-1,4)	0,745	0,863
	CC	132 (31,7)	176 (32,2)	1,0 (0,7-1,3)	0,889	0,923
<i>rs13113</i>	Alelo					
	A*	326 (39,2)	414 (37,8)	1,1 (0,9-1,3)	0,570	0,786
	T	506 (60,8)	680 (62,2)			
	Genotipo					
	TT	145 (34,9)	202 (36,9)	0,9 (0,7-1,2)	0,542	0,760
	AT	216 (51,9)	276 (50,5)	1,1 (0,8-1,4)	0,696	0,844
	AA	55 (13,2)	69 (12,6)	1,1 (0,7-1,5)	0,846	0,902

Tabla 20 continuación

<i>Datos estratificados por forma clínica</i>						
<i>SNP</i>	<i>Análisis</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
<i>rs2037815</i>	Alelo	EMPP	Controles			
	A	109 (41,9)	608 (55,6)	1,7 (1,3-2,3)	0,0001	0,002
	G*	151 (58,1)	486 (44,4)			
	Genotipo					
	GG	46 (35,4)	113 (20,7)	2,1 (1,4-3,2)	0,0008	0,016
	AG	59 (45,4)	260 (47,5)	0,9 (0,6-1,4)	0,696	0,844
	AA	25 (19,2)	174 (31,8)	0,5 (0,3-0,8)	0,005	0,046
<i>rs12990906</i>	Alelo					
	C	122 (52,1)	623 (57,0)	1,2 (0,9-1,6)		0,494
	T*	112 (47,9)	471 (43,1)			
	Genotipo					
	TT	18 (15,4)	100 (18,3)	0,8 (0,5-1,4)		0,737
	CT	76 (65,0)	271 (49,5)	1,9 (1,3-2,9)		0,030
	CC	23 (19,7)	176 (32,2)	0,5 (0,3-0,8)		0,054
<i>rs13113</i>	Alelo					
	A*	118 (45,4)	414 (37,8)	1,4 (1,0-1,8)		0,152
	T	142 (54,6)	680 (62,2)			
	Genotipo					
	TT	33 (25,4)	202 (36,9)	0,6 (0,4-0,9)		0,084
	AT	76 (58,5)	276 (50,5)	1,4 (0,9-2,0)		0,393
	AA	21 (16,2)	69 (12,6)	1,3 (0,8-2,3)		0,612

Tabla 20 continuación

<i>Datos estratificados por forma clínica</i>						
<i>SNP</i>	<i>Análisis</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
<i>rs2037815</i>	Alelo	EMPP	EMRR/SP			
	A	109 (41,9)	446(53,6)	1,6 (1,2-2,1)	0,001	0,017
	G*	151(58,1)	386 (46,4)			
	Genotipo					
	GG	46 (35,4)	89 (21,4)	2,0 (1,3-3,1)	0,001	0,019
	AG	59 (45,4)	208 (50,0)	0,8 (0,6-1,2)	0,367	0,639
	AA	25 (19,2)	119 (28,6)	0,6 (0,4-1,0)	0,039	0,176
	<i>rs12990906</i>	Alelo				
C		122 (52,1)	475 (57,1)	1,2 (0,9-1,6)	0,180	0,498
T*		112 (47,9)	357 (42,9)			
Genotipo						
TT		18 (15,4)	73 (17,6)	0,9 (0,5-1,5)	0,677	0,846
CT		76 (65,0)	211 (50,7)	1,8 (1,2-2,8)	0,006	0,052
CC		23 (19,7)	132 (31,7)	0,5 (0,3-0,9)	0,011	0,074
<i>rs13113</i>		Alelo				
	A*	118 (45,4)	326 (39,2)	1,3 (1,0-1,7)	0,082	0,314
	T	142 (54,6)	506 (60,8)			
	Genotipo					
	TT	33 (25,4)	145 (34,9)	0,6 (0,4-1,0)	0,053	0,224
	AT	76 (58,5)	216 (51,9)	1,3 (0,9-1,9)	0,226	0,549
	AA	21 (16,2)	55 (13,2)	1,3 (0,7-2,2)	0,387	0,659

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en formas clínicas de EM y controles. OR: Odds ratio. 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. *Denotan alelos riesgo. En negrita se indican los valores p estadísticamente significativos. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de Benjamini-Hochberg.

Tabla 21

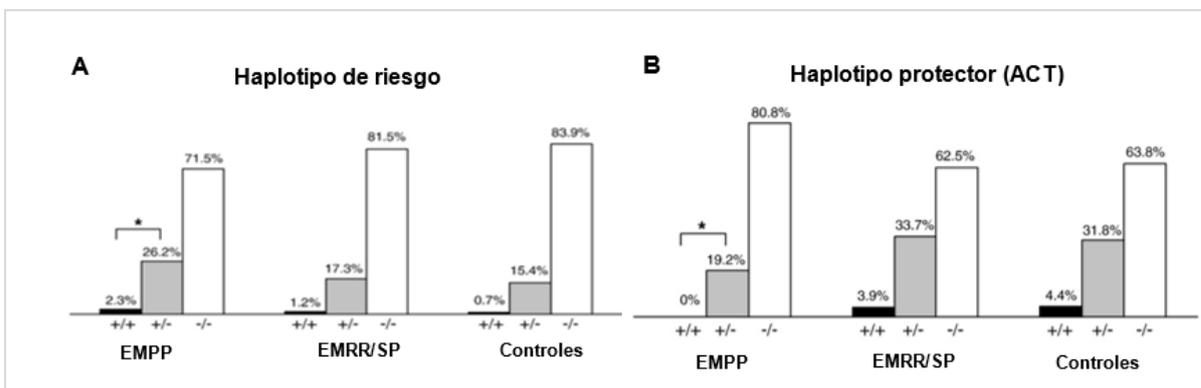
<i>Datos totales y estratificados por formas clínicas</i>					
<i>H</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
123	EM	Controles			
GCA	122 (11,2)	92 (8,4)	1,4 (1,0-1,8)	0,030	0,145
GTT	346 (31,7)	328 (29,9)	1,1 (0,9-1,3)	0,404	0,660
GTA	47 (4,3)	38 (3,5)	1,2 (0,8-1,9)	0,321	0,613
ACA	270 (24,7)	281 (25,7)	1,0 (0,8-1,2)	0,622	0,843
ACT	197 (18,0)	222 (20,3)	0,9 (0,7-1,1)	0,192	0,480
GCT	22 (2,0)	28 (2,6)	0,8 (0,4-1,4)	0,474	0,716
ATT	83 (7,6)	102 (9,3)	0,8 (0,6-1,1)	0,166	0,475
ATA	5 (0,5)	3 (0,3)	1,7 (0,4-7,0)	0,506	0,750
	EMRR/SP	Controles			
GCA	82 (9,9)	92 (8,4)	1,2 (0,9-1,6)	0,297	0,594
GTT	254 (30,5)	328 (29,9)	1,0 (0,8-1,3)	0,802	0,891
GTA	35 (4,2)	38 (3,5)	1,2 (0,8-2,0)	0,402	0,670
ACA	206 (24,8)	281 (25,7)	1,0 (0,8-1,2)	0,672	0,853
ACT	172 (20,7)	222 (20,3)	1,0 (0,8-1,3)	0,864	0,909
GCT	15 (1,8)	28 (2,6)	0,7 (0,4-1,3)	0,280	0,606
ATT	65 (7,8)	102 (9,3)	0,8 (0,6-1,1)	0,253	0,579
ATA	3 (0,4)	3 (0,3)	1,3 (0,3-6,5)	1,000	1,000
	EMPP	Controles			
GCA	40 (15,4)	92 (8,4)	2,0 (1,3-3,0)	0,001	0,017
GTT	92 (35,4)	328 (29,9)	1,3 (1,0-1,7)	0,100	0,366
GTA	12 (4,6)	38 (3,5)	1,3 (0,7-2,6)	0,363	0,646
ACA	64 (24,6)	281 (25,7)	0,9 (0,7-1,3)	0,752	0,859
ACT	25 (9,6)	222 (20,3)	0,4 (0,3-0,7)	3,5 x 10 ⁻⁵	0,001
GCT	7 (2,7)	28 (2,6)	1,1 (0,5-2,4)	0,830	0,897
ATT	18 (6,9)	102 (9,3)	0,7 (0,4-1,2)	0,274	0,608
ATA	2 (0,8)	3 (0,3)	2,8 (0,5-17,0)	0,246	0,579

Tabla 21 continuación

<i>Datos totales y estratificados por formas clínicas</i>					
H	N (%)	N (%)	OR(95% IC)	Valor P	Valor P^a
123	EMPP	EMRR/SP			
GCA	122 (11,2)	82 (9,9)	1,7 (1,1-2,5)	0,017	0,100
GTT	346 (31,7)	254 (30,5)	1,2 (0,9-1,7)	0,147	0,453
GTA	47 (4,3)	35 (4,2)	1,1 (0,6-2,2)	0,729	0,858
ACA	270 (24,7)	206 (24,8)	1,0 (0,7-1,4)	1,000	1,000
ACT	197 (18,0)	172 (20,7)	0,4 (0,3-0,6)	2,8 X 10 ⁻⁵	0,002
GCT	22 (2,0)	15 (1,8)	1,5 (0,6-3,7)	0,446	0,700
ATT	83 (7,6)	65 (7,8)	0,9 (0,5-1,5)	0,689	0,848
ATA	5 (0,5)	3 (0,4)	2,1 (0,4-12,9)	0,342	0,621

Leyenda. Análisis de las frecuencias de haplotipos en total y según las formas clínicas de la EM. H: haplotipos. OR: Odds ratio. 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. En negrita se indican los valores p estadísticamente significativos. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*.

Figura 20

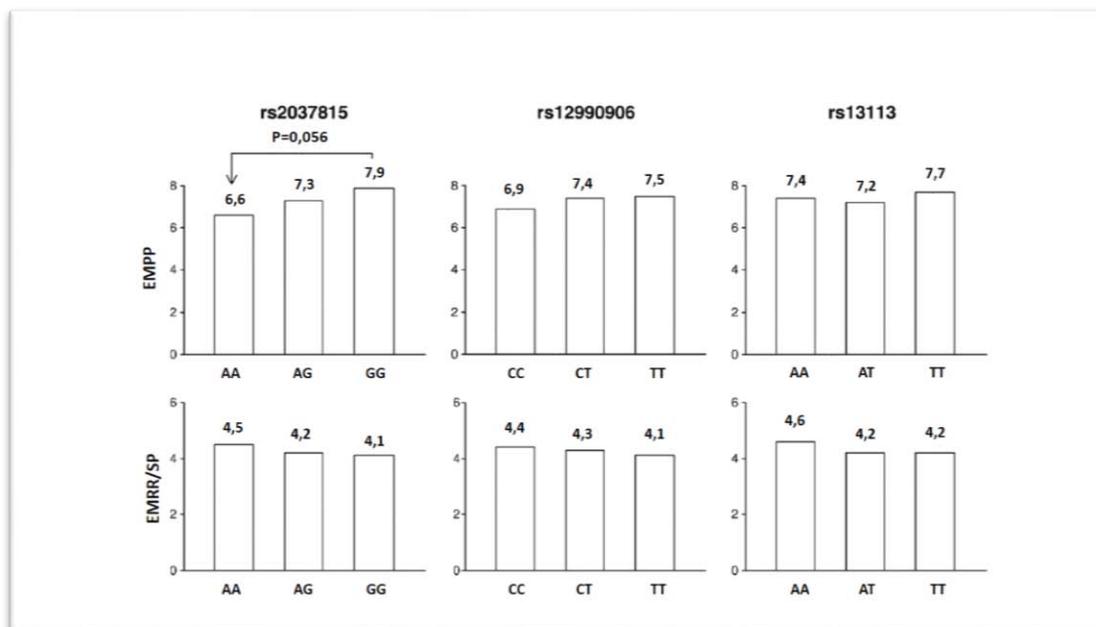


Leyenda. Frecuencia de los haplotipos de riesgo y protector en las formas clínicas de EM y controles. Los haplotipos fueron reconstruidos computacionalmente y enfrentados por parejas. (A) El porcentaje del haplotipo de riesgo *GCA* se encuentra incrementado en pacientes con formas de EMPP. +/+ : *GCA/GCA*; +/- : *GCA*/otro haplotipo; -/- : otro haplotipo/otro haplotipo. *Para formas EMRR/SP [OR (intervalo de confianza 95%); valor p: 1,8 (1,1–2,8); p=0,015]. Para controles: 2,1 (1,3–3,2); p=0,001. (B) El porcentaje de haplotipos protectores (*ACT*) está disminuido en pacientes con formas de EMPP. +/+ : *ACT/ACT*; +/- : *ACT*/otro haplotipo; -/- : otro haplotipo/otro haplotipo. *Para formas EMRR/SP: 0,4 (0,2–0,6); p=0,0001. Para controles: 0,4 (0,3–0,7); p=0,0002.

5.2.4. Gravedad de la enfermedad y polimorfismos de *CASP8*

Con el fin de conocer el papel de *CASP8* como gen modificador de la gravedad de la enfermedad, se comparó la gravedad de la enfermedad, medida con la escala MSSS, entre los distintos genotipos de los polimorfismos. En la Figura 21 se puede ver la media de los valores obtenidos en la escala del MSSS asociados con los distintos genotipos posibles para los SNPs *rs2037815*, *rs12990906*, y *rs13113* en pacientes con EMRR/SP y con EMPP. Se observa que los pacientes con formas de EMPP que presentan el alelo G para el polimorfismo *rs2037815* padecen un curso más agresivo de la enfermedad, y si el paciente es homocigoto GG para este SNP se observa una tendencia a que la enfermedad progrese más rápidamente al compararlo con los pacientes homocigotos AA para el SNP (puntuación media: 7,9 frente a 6,6 respectivamente; p=0,056). Para el resto de comparaciones, la media de las puntuaciones obtenidas con la escala del MSSS fue similar entre los diferentes genotipos del SNP *rs2037815* en pacientes con EMRR/SP, y para los SNPs *rs12990906* y *rs13113* tanto en pacientes con formas EMRR/SP como para los que presentan formas de EMPP.

Figura 21



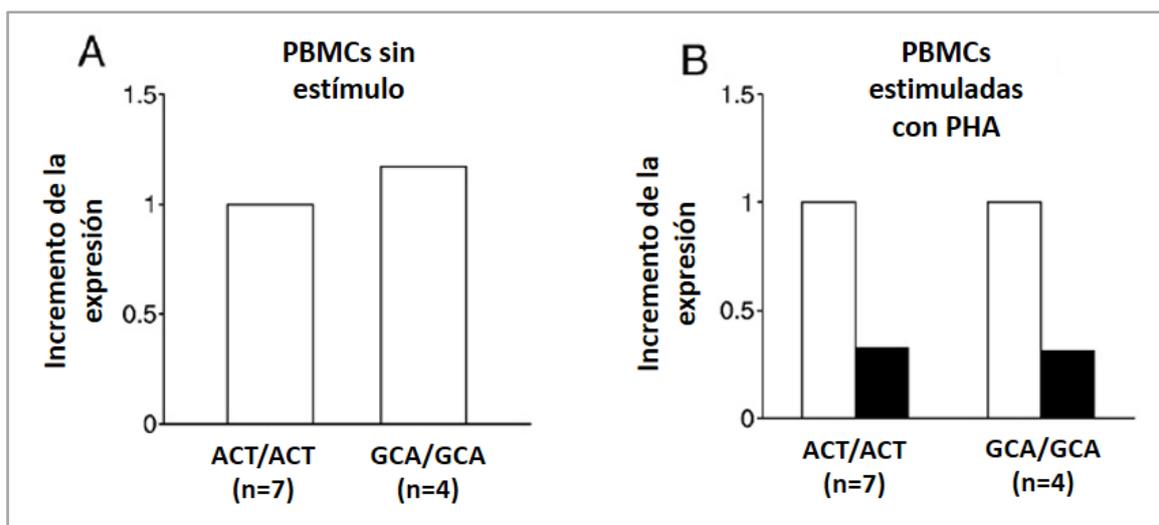
Leyenda. Puntuaciones en la escala del MSSS asociadas a los diferentes genotipos para la CASP8 que presentan los pacientes con formas de EMRR/SP y EMPP. Las barras de los gráficos representan la media de las puntuaciones obtenidas con la escala para los diferentes genotipos y SNPs estudiados.

5.2.5. Estudio de la expresión génica de CASP8 asociada a los haplotipos de riesgo y protector

Se compararon los niveles de expresión de *CASP8* entre pacientes con EM homocigotos para el haplotipo protector (*ACT/ACT*) y pacientes homocigotos para el haplotipo de riesgo (*GCA/GCA*) usando para ello un cultivo celular sometido a distintas condiciones.

Se incubaron PBMCs sin ningún tipo de estímulo y células del mismo tipo pero activadas con PHA durante 24 horas. Se extrajo ARN de las células sin y con PHA. Los niveles de expresión génica en las células sin activar fueron similares al comparar pacientes con el haplotipo protector y el de riesgo (incremento: 1,2; $p=0,235$ – test t de Student). Sin embargo, se observó una disminución en la expresión de *CASP8* tras la activación celular con PHA en ambos grupos siendo esta disminución similar en pacientes con haplotipos de riesgo y protector (disminución: 0,3; $p<0,01$ para ambos grupos – test t-pareado) (Figura 22).

Figura 22



Leyenda. Niveles de expresión génica de *CASP8* asociados al haplotipo de riesgo y al protector. (A) Células en condiciones basales. (B) Células tratadas 24 horas con PHA. Las células pertenecían a 11 pacientes; 7 con el haplotipo protector (*ACT/ACT*) y 4 con el haplotipo de riesgo (*GCA/GCA*). (A) Resultados expresados en incremento en veces de la expresión del gen en homocigotos *GCA/GCA* frente a homocigotos *ACT/ACT*, y (B) en PBMCs activadas frente a PBMCs sin estímulo. En (B) las barras blancas representan células sin activar y las barras negras células activadas.

5.3. *BTG1*

5.3.1. *Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento*

Los SNPs *rs731652* y *rs12694* del gen *BTG1* se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,914$ y $p=0,602$ respectivamente) y están en desequilibrio de ligamiento ($D'=0,85$; $R^2=0,23$).

5.3.2. *Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la población estudiada para el gen BTG1.*

En primer lugar, se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas teniendo en cuenta todos los casos y todos los controles. Como resultado obtuvimos que el cálculo de las frecuencias alélicas para el SNP *rs731652* mostraba una tendencia a una asociación significativa del alelo *T* con la enfermedad ($OR=1,3$; valor p corregido= $0,067$). Tras el estudio de las

frecuencias genotípicas vimos una asociación negativa del genotipo homocigoto *CC* para el SNP *rs731652* (OR=0,7; valor p corregido=0,019) con la enfermedad, y una asociación positiva entre el genotipo heterocigoto *CT* y la EM (OR=1,6; valor p corregido=0,008) (Tabla 22).

No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas a nivel alélico y genotípico para el polimorfismo *rs12694* al comparar controles y pacientes.

En segundo lugar, realizamos el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas teniendo en cuenta las diferentes formas clínicas de la enfermedad. Al comparar las formas de EMRR/SP con los controles observamos una asociación del alelo *T* con la enfermedad (OR=1,4; valor p corregido=0,021). Cuando estudiamos las frecuencias genotípicas comparando los mismos grupos vimos que el genotipo *CC* homocigoto para el polimorfismo *rs731652* se asociaba de forma negativa a la enfermedad (OR=0,6; valor p corregido=0,005), y el genotipo *CT* se asociaba de forma positiva (OR=1,7; valor p corregido=0,005) (Tabla 23).

El resto de comparaciones realizadas entre controles y formas de EMPP y entre formas de EMPP y formas de EMRR/SP no mostraron resultados significativos (Tabla 23).

Tabla 22

<i>Datos totales</i>						
<i>SNP</i>	<i>Análisis</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
rs731652	Alelo	EM	Controles			
	C	868 (79,2)	904 (83,4)	1,3 (1,1-1,6)	0,012	0,067
	T*	228 (20,8)	180 (16,6)			
	Genotipo					
	CC	338 (61,7)	383 (70,6)	0,7 (0,5-0,7)	0,002	0,019
	CT	192 (35,0)	138 (25,5)	1,6 (1,2-2,1)	6 x 10 ⁻⁴	0,008
	TT	18 (3,3)	21 (3,9)	0,8 (0,4-1,6)	0,628	1,000
rs12694	Alelo					
	A	639 (58,1)	638 (58,5)	1,0 (0,9-1,2)	0,834	1,000
	G*	461 (41,9)	452 (41,5)			
	Genotipo					
	AA	185 (33,6)	183 (33,6)	1,0 (0,8-1,3)	0,984	1,000
	AG	269 (48,9)	272 (49,9)	1,0 (0,8-1,2)	0,741	1,000
	GG	96 (17,5)	90 (16,5)	1,1 (0,8-1,5)	0,678	1,000

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en casos y controles. OR: Odds ratio. 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. *Denotan alelos de riesgo. En negrita se indican los valores estadísticamente significativos. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*.

Tabla 23

<i>Datos estratificados por forma clínica</i>						
<i>SNP</i>	<i>Análisis</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
<i>rs731652</i>	Alelo	EMRR/SP	Controles			
	C	667 (77,9)	904 (83,4)	1,4 (1,1-1,8)	0,002	0,021
	T*	189 (22,1)	180 (16,6)			
	Genotipo					
	CC	254 (59,3)	383 (70,7)	0,6 (0,5-0,8)	2 x 10 ⁻⁴	0,005
	CT	159 (37,1)	138 (25,5)	1,7 (1,3-2,3)	1 x 10 ⁻⁴	0,005
	TT	15 (3,6)	21 (3,8)	0,9 (0,5-1,6)	0,865	1,000
	<i>rs12694</i>	Alelo				
A		499 (58,0)	638 (58,5)	1,0 (0,9-1,2)	0,821	1,000
G*		361 (42,0)	452 (41,5)			
Genotipo						
AA		144 (33,5)	183 (33,6)	1,0 (0,8-1,3)	0,977	1,000
AG		211 (49,1)	272 (49,9)	1,0 (0,8-1,3)	0,795	1,000
GG		75 (17,4)	90 (16,5)	1,1 (0,8-1,5)	0,701	1,000
<i>rs731652</i>		Alelo	PPMS	Controles		
	C*	201 (83,8)	904 (83,4)	1,0 (0,7-1,5)	0,754	1,000
	T	39 (16,2)	180 (16,6)			
	Genotipo					
	CC	84 (70,0)	383 (70,7)	1,0 (0,6-1,4)	0,885	1,000
	CT	33 (27,5)	138 (25,5)	1,1 (0,7-1,7)	0,644	1,000
	TT	3 (2,5)	21 (3,8)	0,6 (0,2-2,2)	0,466	1,000
	<i>rs12694</i>	Alelo				
A		140 (58,3)	638 (58,5)	1,0 (0,8-1,3)	0,954	1,000
G*		100 (41,7)	452 (41,5)			
Genotipo						
AA		41 (34,2)	183 (33,6)	1,0 (0,7-1,6)	0,912	1,000
AG		58 (48,3)	272 (49,9)	0,9 (0,6-1,4)	0,741	1,000
GG		21 (17,5)	90 (16,5)	1,1 (0,6-1,8)	0,799	1,000

Tabla 23 continuación

<i>Datos estratificados por forma clínica</i>						
<i>SNP</i>	<i>Análisis</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor P^a</i>
rs731652	Alelo	EMPP	EMRR/SP			
	C*	201 (83,8)	667 (77,9)	1,5 (1,0-2,1)	0,049	0,212
	T	39 (16,2)	189 (22,1)			
	Genotipo					
	CC	84 (70,0)	254 (59,3)	1,6 (1,0-2,5)	0,033	0,172
	CT	33 (27,5)	159 (37,1)	0,7 (0,4-1,1)	0,056	0,201
	TT	3 (2,5)	15 (3,6)	0,7 (0,2-2,5)	0,585	1,000
	rs12694	Alelo				
A*		140 (58,3)	499 (58,0)	1,0 (0,8-1,4)	0,931	1,000
G		100 (41,7)	361 (42,0)			
Genotipo						
AA		41 (34,2)	144 (33,5)	1,0 (0,7-1,6)	0,889	1,000
AG		58 (48,3)	211 (49,1)	1,0 (0,7-1,4)	0,886	1,000
GG		21 (17,5)	75 (17,4)	1,0 (0,6-1,7)	0,988	1,000

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en casos según forma clínica y controles. OR: Odds ratio. 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. *Denotan alelos de riesgo. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*.

5.3.3. Distribución de haplotipos en la población estudiada para el gen BTG1

Como se puede ver en la Tabla 24, se reconstruyeron mediante un programa informático cuatro haplotipos. Al comparar controles y pacientes se observó una asociación del haplotipo *TA* con la EM (OR=2,8; valor p corregido=0,041). Cuando se analizaron las frecuencias haplotípicas estratificando por forma clínica se vio que esta asociación se mantenía sólo en pacientes con formas EMRR/SP al compararlos con controles (OR=2,9; valor p corregido=0,038).

Tabla 24

<i>Datos totales y estratificados por formas clínicas</i>					
H	N (%)	N (%)	OR(95% IC)	Valor P	Valor P^a
12	EM	Controles			
CA	613 (55,9)	624 (57,8)	1,0 (0,9-1,2)	1,000	1,000
CG	255 (23,3)	277 (25,6)	0,9 (0,8-1,2)	0,531	1,000
TA	25 (2,3)	9 (0,8)	2,8 (1,3-6,1)	0,005	0,041
TG	203 (18,5)	170 (15,7)	1,2 (0,9-1,5)	0,099	0,347
	EMRR/SP	Controles			
CA	478 (55,8)	624 (57,8)	1,0 (0,8-1,2)	1,000	1,000
CG	189 (22,1)	277 (25,6)	0,9 (0,7-1,1)	0,302	0,846
TA	20 (2,3)	9 (0,8)	2,9 (1,3-6,4)	0,006	0,038
TG	169 (19,7)	170 (15,7)	1,3 (1,0-1,7)	0,036	0,168
	EMPP	Controles			
CA	135 (56,3)	624 (57,8)	1,0 (0,8-1,3)	1,000	1,000
CG	66 (27,5)	277 (25,6)	1,1 (0,8-1,5)	0,562	1,000
TA	5 (2,1)	9 (0,8)	2,6 (0,9-7,8)	0,084	0,315
TG	34 (14,2)	170 (15,7)	0,9 (0,6-1,4)	0,708	1,000
	EMPP	EMRR/SP			
CA	135 (56,3)	478 (55,8)	1,0 (0,7-1,3)	1,000	1,000
CG	66 (27,5)	189 (22,1)	1,2 (0,8-1,7)	0,219	0,646
TA	5 (2,1)	20 (2,3)	0,9 (0,3-2,4)	0,810	1,000
TG	34 (14,2)	169 (19,7)	0,7 (0,5-1,1)	0,108	0,336

Leyenda. Análisis de las frecuencias de haplotipos en total y según las formas clínicas de EM. H: haplotipos. OR: Odds ratio. 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. 1 y 2 representan los SNPs rs731652 y rs12694. ^aValores p obtenidos tras la aplicación del test de corrección de *Benjamini-Hochberg*.

5.3.4. Replicación de los resultados obtenidos para el gen *BTG1* en una población independiente

El SNP *rs731652* se genotipó en una población caucásica independiente de origen estadounidense. Tras el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas se observó una distribución similar de ambas frecuencias en casos y controles (Tabla 25).

Tabla 25

<i>Datos totales</i>					
<i>SNP</i>	<i>Análisis</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>OR(95% IC)</i>	<i>Valor P</i>
<i>rs731652</i>	Alelo	EM	Controles		
	C*	492 (82,0)	477 (81,7)	1,0 (0,8-1,4)	0,886
	T	108 (18,0)	107 (18,3)		
	Genotipo				
	CC	194 (66,4)	200 (66,7)	0,9 (0,7-1,4)	0,953
	CT	89 (30,5)	92 (30,7)	0,9 (0,7-1,4)	0,961
	TT	9 (3,1)	8 (2,7)	1,2 (0,4-3,1)	0,762

Leyenda. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en EM y controles en la cohorte de pacientes estadounidenses. OR: Odds ratio. 95% IC: Intervalo de confianza del 95%. *Alelo de riesgo.

5.3.5. Gravedad de la enfermedad y polimorfismos del gen *BTG1*

Con el fin de conocer si la presencia de alelos o genotipos concretos para el gen *BTG1* alteraban el curso de la enfermedad, se compararon las medias de gravedad de la enfermedad obtenidas con la escala del MSSS con los distintos genotipos posibles para cada polimorfismo. Tras el análisis no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para ninguno de los genotipos de los dos SNPs estudiados.

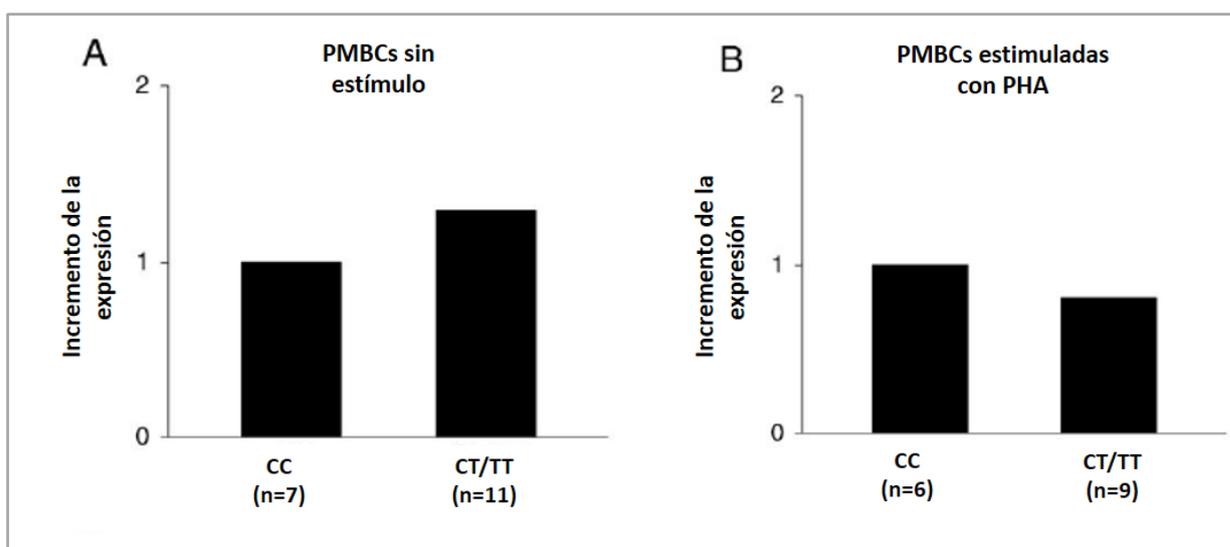
5.3.6. Estudio de la expresión génica de *BTG1* asociada a los genotipos del SNP *rs731652*

Para el estudio de expresión, debido a que la asociación del SNP *rs731652* con la enfermedad venía sobretodo determinada por el alelo *T*, y debido a la baja presencia de homocigotos *TT* (3,3%), los genotipos *TT* y *CT* se agruparon

a la hora de realizar el análisis. Así, los niveles de expresión del gen *BTG1* se compararon entre los grupos formados por individuos con genotipos *TT/CT* y aquellos que presentaban el genotipo *CC*. Para la determinación de la expresión de *BTG1*, las PBMCs se incubaron en condiciones basales y tras estimulación con PHA durante 4 horas.

Como se puede ver en la Figura 23, los niveles de expresión del gen fueron similares al comparar pacientes con formas de EMRR/SP y genotipos *CT/TT* y aquellos con genotipos *CC* tanto en condiciones basales (incremento: 1,3; $p=0,211$; test de Mann-Whitney) como tras activación con PHA (incremento: 0,8; $p=0,328$) (Figuras 23A y 23B).

Figura 23



Leyenda. Niveles de expresión del gen *BTG1* asociados con los distintos genotipos del SNP rs731652. El ARN total fue extraído de PBMCs en condiciones basales (A) y tras la incubación con PHA durante 4 horas (B) tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. Resultados expresados en incremento en veces de la expresión del gen en *CT* heterocigotos + *TT* homocigotos frente a *CC* homocigotos (calibradores).

DISCUSIÓN GENERAL

6. DISCUSIÓN GENERAL

Como queda recogido en apartados anteriores, este trabajo se basa en el estudio de tres genes (*PRF1*, *CASP8* y *BTG1*) con el fin de conocer su implicación en la susceptibilidad a padecer EM en diferentes poblaciones.

La selección de estos genes se realizó en base a:

- a) La implicación de los tres genes estudiados en el mecanismo de muerte celular por apoptosis, el cual juega un papel importante en la patogenia de la EM.
- b) Los resultados obtenidos a partir del proyecto GAMES para población española que, una vez analizados mediante el método de las ventanas deslizantes, dieron lugar a la delimitación de regiones genómicas asociadas a la susceptibilidad de padecer EM. Los genes estudiados se encuentran dentro o cerca de estas regiones.
- c) Los resultados de estudios de expresión previos realizados en muestras biológicas humanas o en el modelo animal, la EAE, en los que se observó, entre otros resultados, diferencias en la expresión de los genes aquí estudiados.

6.1. *PRF1* y susceptibilidad a la EM

Como ya se ha comentado, los estudios realizados previamente nos indicaban una elevada probabilidad de que el gen *PRF1* participara en la susceptibilidad a padecer EM, incluso mostraban que ciertas mutaciones en el gen *PRF1*, como la A91V, podrían estar implicadas en el desarrollo de la enfermedad (*Cappellano y cols., 2008*).

Uno de nuestros resultados más sorprendentes, tras la estratificación por sexos, fue la clara asociación del gen en población española con la susceptibilidad de padecer EM en pacientes de sexo masculino. Estos resultados se observaron a nivel de alelo, genotipo y haplotipo. Además, tras elegir el SNP que mostraba una mayor asociación a EM (*rs10999426*) y

genotiparlo en dos poblaciones independientes, islandesa y estadounidense, los resultados se replicaron para la población estadounidense.

Sumado a esto, los análisis combinados de los resultados para las tres cohortes estudiadas mostraron una fuerte asociación entre el gen y la susceptibilidad a la enfermedad en pacientes de sexo masculino.

Otro importante hallazgo de este estudio fue la asociación en hombres de los haplotipos de riesgo minoritarios *AGG* y *GAA*, en homo- y heterocigosis, con la forma de EMPP. A pesar de la baja frecuencia de estos haplotipos en general, más del 16% de los pacientes con EMPP mostraron estos haplotipos, de los cuales la gran mayoría eran pacientes del sexo masculino. El porcentaje de enfermos con formas de EMRR o de controles sanos que mostraban estos haplotipos fue mucho menor que en las formas de EMPP.

Tras obtener estos resultados, se compararon pacientes de sexo masculino con formas de EMPP que portaban los dos haplotipos de riesgo minoritarios, *AGG* y *GAA*, en homo- y heterocigosis, con pacientes con formas de EMPP que portaban el haplotipo protector *AGA* en homocigosis. Este estudio se realizó mediante *microarrays* de expresión. Los resultados obtenidos mostraron que aquellos pacientes con los haplotipos de riesgo presentaron una expresión disminuida de genes como *LYST*, *SLAMF7* y *P2RX7*, todos ellos relacionados con la principal función de la perforina. Aunque la expresión del gen de *PRF1* también fue menor, no se incluyó dentro de este grupo ya que el valor *p* no alcanzó el valor necesario para ser incluido en la categoría de muerte celular.

La relación entre el gen de *PRF1* y el gen *LYST* es muy interesante. Las mutaciones en el gen de *PRF1* aparecen en un 15-50% de los casos de linfocitosis hemofagocítica familiar (FHLH) (Online Mendelian Inheritance in Man #267700, #603553) (Katano y Cohen, 2005), una enfermedad multisistémica rara. Esto da lugar a una activación y proliferación de linfocitos T CD8⁺ incontrolada que produce una activación excesiva de macrófagos y altos niveles de citoquinas proinflamatorias provocando lo que se conoce como síndrome hemofagocítico. Este síndrome es también característico de deficiencias inmunológicas como el síndrome de Chédiak-Higashi (Online

Mendelian Inheritance in Man #214500), provocado por mutaciones en el gen *LYST*, que codifica una proteína intracelular que regula el tráfico de proteínas que entran y salen del lisosoma (*Janka, 2007; Filipovich, 2006; Ward y cols., 2002; Nagle y cols., 1996*).

En el caso del gen *P2RX7*, éste codifica un receptor que funciona como canal iónico dependiente de ligando y es responsable de la lisis ATP dependiente de macrófagos a través de la formación de poros en la membrana que la hacen permeable a moléculas largas (*North y Surprenant, 2000*).

El gen *SLAMF7* es un miembro de la familia de receptores relacionados con SLAM, la cual regula la función celular de las células NK (*Bouchon y cols., 2001; Claus y cols., 2008*).

Estos resultados podrían indicar un defecto generalizado en la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la muerte celular en pacientes de sexo masculino con formas de EMPP que portan los haplotipos de riesgo minoritarios *AGG* y *GAA*.

Otros genes que también mostraron una disminución en su expresión fueron los que participan en las vías de señalización de los receptores de andrógenos. Uno de éstos fue el gen *MED1* que tiene un papel importante en la producción de andrógenos adrenales (*Nakamura y cols., 2009*). Otro gen con expresión disminuida fue *NCOA3*, que es un coactivador transcripcional que interactúa con el receptor de andrógenos para mejorar su función de activación transcripcional (*Tien y cols., 2009*). Y, por último, el gen *THRAP3* que podría jugar un papel co-regulatorio en la expresión de genes mediada por el receptor de andrógenos (*Wang y cols., 2002*).

Aunque estos resultados son muy interesantes, se desconoce si la vía de señalización del receptor de andrógenos está relacionada con las diferencias en EM asociadas al sexo encontradas en este estudio. El transcriptoma de hormonas sexuales androgénicas programadas ha sido definido en leucocitos humanos con raíces en embriogénesis temprana, dependencia de exposición fetal a andrógenos, y no modificación de la exposición postnatal a esteroides (*Holterhus y cols., 2009*).

Son necesarios más estudios para conocer la regulación de la expresión de estos genes a través de otro u otros genes.

La disminución en la expresión de ARNm de *PRF1* observado en pacientes de sexo masculino con formas de EMPP que portan los haplotipos de riesgo *AGG* y *GAA*, nos llevó al estudio de la expresión de la proteína PRF1 en linfocitos T CD8⁺ y células NK pertenecientes a estos pacientes. Como resultado obtuvimos una disminución de la expresión de la proteína PRF1 por parte de los linfocitos T CD8⁺, paralelamente a la disminución observada en la expresión de ARNm en PBMCs; sin embargo, no conseguimos un valor estadísticamente significativo probablemente debido al pequeño tamaño de la muestra.

Estudios funcionales sugieren que los linfocitos T CD8⁺ que provienen de pacientes del sexo masculino con formas de EMPP que portan los haplotipos de riesgo de *PRF1* muestran una actividad citotóxica reducida comparada con las células de pacientes que portan los haplotipos protectores, a pesar de su similar capacidad de responder a la activación de receptores de las células T. Esta disminución de la citotoxicidad no parece ser secundaria a una exocitosis deficiente de los gránulos que contienen PRF1. El uso de dos protocolos de activación diferentes para linfocitos T CD8⁺ dio como resultado diferencias similares entre grupos con datos de actividad citotóxica reducida asociada con los haplotipos de riesgo para *PRF1*; sin embargo, se necesitan estudios en cohortes más numerosas de pacientes para confirmar estos hallazgos.

Otro parámetro que también evaluamos, mediante PCR cuantitativa, fue si la baja expresión de *PRF1* en pacientes con haplotipos de riesgo estaba asociada con la reactivación de una infección viral por EBV. Sin embargo, no detectamos genoma viral en PBMCs de pacientes con haplotipos de riesgo o protectores.

Por tanto, mediante el estudio de la relación entre el gen *PRF1* y la susceptibilidad a la EM:

- 1- Hemos confirmado los resultados anteriores, no sólo en población española sino también en estadounidense, obteniendo resultados que además indican una asociación con formas de EMRR/SP y EMPP.
- 2- Además, hemos identificado un subgrupo de pacientes con formas de EMPP, principalmente del sexo masculino, que portan haplotipos de riesgo que además de producir una baja expresión de PRF1 por parte de PBMCs tienen una expresión deficiente de otros genes que codifican para proteínas involucradas en la muerte celular por linfocitos T CD8⁺ y células NK, usando mecanismos efectores similares al de la PRF1. Estos resultados podrían apuntar a fallos en la delección apoptótica de células patogénicas entre pacientes con formas EMRR/SP o pacientes con formas esencialmente progresivas.
- 3- Finalmente, relacionado con el punto anterior, también proponemos una correlación funcional entre los hallazgos genéticos para *PRF1* y la actividad citotóxica reducida en linfocitos T CD8⁺ de pacientes con formas de EMPP.

6.2. CASP8 y susceptibilidad a la EM

Otro de los genes que tenía una elevada probabilidad de participar en la susceptibilidad a la EM, según estudios previos, es el gen *CASP8*. Este gen, situado en la región cromosómica 2q33-34, codifica para una proteasa de la familia de las CASPs que tiene un importante papel en la muerte celular por apoptosis (*Barnhart y cols., 2003; Lee y cols., 2006*). Como ya se ha descrito anteriormente, la apoptosis juega un papel muy importante en otros procesos como la homeostasis que según estudios previos podría estar involucrada en la prevención de enfermedades inmunes como la EM (*Chervonsky, 1999*).

En nuestro estudio, las asociaciones genéticas se observaron para el grupo de pacientes con formas de EMPP al compararlos con los pacientes con formas de EMRR/SP y con los controles sanos. En concreto, se asoció a aquellos pacientes que mostraron el genotipo homocigoto GG en el SNP *rs2037815* y el genotipo heterocigoto CT para el SNP *rs12990906* con una OR entre 1,9 y 2,1.

Tras los estudios de inferencia de haplotipos, en línea con los hallazgos en los genotipos, se identificó un haplotipo de riesgo *GCA* y un haplotipo protector *ACT* asociados a las formas de EMPP. Cabe destacar que la reconstrucción de los pares de haplotipos reveló una baja representación de heterocigotos para el haplotipo protector y una ausencia de pacientes con haplotipo en estado homocigótico en pacientes con formas de EMPP.

La media de la puntuación para la escala del MSSS fue mayor en pacientes con formas de EMPP que portaban el alelo *G* para el SNP *rs2037815*. Además, se vio que la enfermedad progresó más rápido en los pacientes homocigotos *GG* que en los pacientes homocigotos *AA*. Estos hallazgos muestran que los polimorfismos en el gen *CASP8* no sólo aumentan la susceptibilidad a padecer EM sino que también podrían influir en la progresión de la enfermedad de esta forma clínica.

No se pudieron realizar estudios de comparaciones de puntuación en el MSSS entre pacientes con formas clínicas de EMPP que portaban haplotipos de riesgo y protectores, debido al bajo número de pacientes contenidos en la muestra con el haplotipo homocigoto protector.

Con el fin de conocer mejor los mecanismos por los cuales los polimorfismos en el gen *CASP8* se asociaban con el incremento del riesgo para padecer EM y con la más rápida progresión de la enfermedad, se realizó un estudio de expresión del gen *CASP8* incluyendo un número pequeño de pacientes que portaban el haplotipo de riesgo o el protector. Como la apoptosis es inducida en la célula tras una activación celular, estos experimentos se realizaron en PBMCs con y sin estimulación. La estimulación de las células se llevó a cabo utilizando PHA. Así, mientras la activación celular se asoció con una disminución significativa de la expresión de *CASP8*, los niveles de expresión del gen antes y después de la estimulación fueron similares en pacientes que portaban el haplotipo de riesgo y el protector. Aunque los resultados están basados en un número pequeño de pacientes, éstos no confirman una alteración funcional de la *CASP8* asociada con los haplotipos de riesgo y protectores, al menos a nivel del ARNm. Sin embargo, no pueden descartarse un efecto específico a nivel celular debido a los haplotipos de

riesgo o protector, o diferencias a nivel de proteína debido a modificaciones tras la transcripción.

Por tanto, nuestros hallazgos sugieren un defecto en la delección apoptótica de linfocitos autorreactivos en pacientes con formas de EMPP. Apoyando esta hipótesis, el grupo de *Comi y cols.* (2000), publicó un estudio donde se incluyó un importante número de líneas celulares de linfocitos T de pacientes con formas progresivas estimuladas con PHA, que fueron resistentes a la apoptosis mediada por Fas comparado con células de pacientes con formas de EMRR y con células de controles sanos.

En un estudio más reciente, un polimorfismo localizado en el complejo B7/CD28 perteneciente a la superfamilia de moléculas coestimuladoras con funciones inhibitorias de linfocitos T, en concreto el gen PD1 (programmed death 1), se encontró asociado a pacientes con formas de EMPP. Sin embargo, estos resultados hay que interpretarlos con precaución (*Kroner y cols.*, 2005).

Tras el análisis de los resultados obtenidos, creemos que sería necesario realizar más estudios en cohortes independientes de pacientes con EM que permitan confirmar la participación del gen *CASP8* como modificador genético del riesgo y progresión de la enfermedad.

6.3. *BTG1* y susceptibilidad a la EM

Combinando datos genéticos y genómicos previamente publicados por nuestro grupo y por otros grupos, identificamos una región cromosómica de interés que incluía el gen *BTG1*. Estudios de expresión con *microarrays* muestran diferencias en la expresión de *BTG1* en pacientes con EM y en el modelo animal de la enfermedad. De esta forma, en los estudios de *Bomprezzi y cols.* y *Mandel y cols.*, (2003 y 2004, respectivamente), se vio una disminución en la expresión de este gen en PBMCs de pacientes con EM al compararlos con controles sanos. Por otro lado, estudios de expresión realizados en EAE mostraron un aumento de la expresión del gen en tejido procedente de SNC durante la enfermedad (*Ibrahim y cols.*, 2001; *Carmody y cols.*, 2002; *Paintlia y cols.*, 2004; *Spach y cols.*, 2004; *Baranzini y cols.*, 2005; *Jelinsky y cols.*, 2005).

En nuestro estudio el SNP *rs731652*, situado en el intrón 1 del gen, se asoció a EM tanto a nivel alélico como genotípico. Sin embargo, el SNP *rs12694*, que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con *rs731652* no mostró asociación. En el caso del SNP *rs731652* el alelo que confiere riesgo a la enfermedad, según nuestros resultados, sería el alelo *T* y el genotipo *CT*. Además, el estudio de inferencia de haplotipos revela una asociación del haplotipo *TA* con la EM. Aunque la asociación genética se observó al realizar comparaciones entre pacientes y controles sanos, está sólo se confirmó en pacientes con formas de EMRR/SP y no en pacientes con formas de EMPP.

La expresión de *BTG1* es dependiente del ciclo celular y sus máximos niveles se producen en la fase G0/G1 del mismo y disminuyen cuando las células progresan en la fase G1 (*Rouault y cols., 1992*). *BTG1* es regulado de forma negativa por Bcl-2 y se ha visto que es capaz de inducir apoptosis *in vitro* (*Corjay y cols., 1998; Nahta y cols., 2006*). Además, existen evidencias de que *BTG1* participaría en la muerte celular inducida por activación de la microglía (*Lee y cols., 2003*). Estímulos inflamatorios como lipopolisacáridos o IFN γ podrían disminuir el umbral para la apoptosis de la microglía con la expresión de mediadores inducibles como el *BTG1*, incrementando así la sensibilidad de las células de la microglía a la apoptosis inducida por ácido nítrico y controlando la activación de la microglía.

Estos datos podrían sugerir un papel importante de *BTG1* en la EM ya que, como se mencionó anteriormente, la apoptosis representa un mecanismo clave en la patogenia de la enfermedad para eliminar células autorreactivas y en el que la microglía activada contribuye al daño neuronal (*Nelson y cols., 2002*). Sin embargo, se desconoce si *BTG1* podría jugar un papel de riesgo o protector en la enfermedad.

Con el fin de intentar correlacionar los resultados genéticos con la expresión del gen, en un subgrupo de pacientes con formas de EMRR/SP se determinaron los niveles de expresión de *BTG1* asociados a los diferentes genotipos para el SNP *rs731652*. Debido a que la expresión del gen *BTG1* es

dependiente de las fases del ciclo celular, los niveles de expresión se determinaron en PBMCs en condiciones basales y tras estimulación con PHA. Como resultado, obtuvimos una expresión de *BTG1* similar, tanto en pacientes con genotipo CC como en pacientes con genotipos CT/TT en ambas condiciones. Aunque estos resultados no avalan una alteración funcional de *BTG1* asociada con los genotipos de riesgo, al menos a nivel del ARNm, no se puede descartar un efecto específico a nivel celular del SNP *rs731652*, o diferencias a nivel de proteína debido a modificaciones post-transcripcionales.

Con el fin de confirmar nuestros resultados, se realizó un estudio de replicación en una cohorte independiente de población caucásica estadounidense en la cual se genotipó el SNP *rs731652*. Como resultado obtuvimos frecuencias alélicas y genotípicas similares entre pacientes y controles sanos. Sin embargo, debido a que hay diferencias en la prevalencia de EM en las distintas poblaciones genotipadas y que los alelos que confieren susceptibilidad para la EM en población española pueden no tener la misma prevalencia en la población estadounidense caucásica, la no asociación de este SNP en la cohorte de replicación no puede utilizarse para la confirmación de la asociación negativa del gen con la enfermedad. Así, el SNP *rs731652* podría representar una región potencial de susceptibilidad para la EM en población española. Habría que realizar más estudios de replicación para confirmarlo.

Como conclusión podemos decir que, los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que polimorfismos del gen *BTG1* podrían influir en la susceptibilidad genética en pacientes con formas de EMRR/SP. Sin embargo, son necesarios más estudios en cohortes independientes de pacientes para implicar el gen *BTG1* en la susceptibilidad a padecer la enfermedad así como, para definir mejor el papel protector o de riesgo del gen en la patogénesis de la enfermedad.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan de estos tres estudios son las siguientes:

En cuanto al gen *PRF1*:

1. Se confirma la asociación del gen *PRF1* con la susceptibilidad a padecer EM en poblaciones independientes de pacientes.
2. Existe una asociación entre el gen *PRF1* y la susceptibilidad a padecer EM en pacientes del sexo masculino que presentan formas de EMRR/SP o formas de EMPP.
3. Los pacientes con formas de EMPP portadores de haplotipos de riesgo *AGG* y *GAA* presentan una expresión baja de la proteína *PRF1* junto a una expresión deficiente de otros genes que codifican proteínas implicadas en la muerte celular mediada por linfocitos T $CD8^+$ y células NK.
4. Existe una correlación funcional entre los resultados de los haplotipos del gen *PRF1* y la reducción en la actividad citotóxica de linfocitos T $CD8^+$ en pacientes con formas de EMPP.

En cuanto al gen *CASP8*:

5. Se confirma la asociación del gen *CASP8* con la susceptibilidad a padecer EM.
6. Existe una asociación entre el gen *CASP8*, la susceptibilidad a padecer EM y la progresión de la enfermedad en pacientes con formas de EMPP.

En cuanto al gen *BTG1*:

7. Se confirma la asociación del gen *BTG1* con la susceptibilidad a padecer EM.

8. Existe una asociación entre el gen *BTG1* y la susceptibilidad a padecer EM en pacientes con formas de EMRR/SP.

En general:

9. La EM es una enfermedad poligénica en la que los genes *PRF1*, *CASP8* y *BTG1* podrían participar de forma moderada en su susceptibilidad.

COMENTARIO FINAL

8. COMENTARIO FINAL

Los resultados de estos estudios permitieron la redacción de tres artículos científicos, listados a continuación y adjuntados al final de la tesis, que fueron aceptados en revistas internacionales con sistema de revisión por expertos (*peer-reviewed journals*). El desarrollo de estos tres artículos constituye el núcleo principal de la presente tesis doctoral.

Publicaciones:

Camiña-Tato M, Morcillo-Suárez C, Bustamante MF, Ortega I, Navarro A, Muntasell A, López-Botet M, Sánchez A, Carmona P, Julià E, Tortola MT, Audí L, Oksenberg JR, Martin R, Montalban X, Comabella M. Gender-associated differences of perforin polymorphisms in the susceptibility to multiple sclerosis. *J Immunol.* 2010;185(9):5392-404.

Camiña-Tato M, Fernández M, Morcillo-Suárez C, Navarro A, Julià E, Edo MC, Montalban X, Comabella M. Genetic association of CASP8 polymorphisms with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010;222(1-2):70-5.

Camiña-Tato M, Morcillo-Suárez C, Navarro A, Fernández M, Horga A, Montalban X, Comabella M. Genetic association between polymorphisms in the BTG1 gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009 Aug 18;213(1-2):142-7.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M, . Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann. Neurol.* 2004; 55:410–417

Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003;17(20):2481-95. Atlas of MS 2013. Multiple Sclerosis International Federation (MSIF). Disponible en: <http://www.msif.org/about-us/advocacy/atlas/>.

Akesson E, Oturai A, Berg J, Fredrikson S, Andersen O, Harbo HF, Laaksonen M, Myhr KM, Nyland HI, Ryder LP, Sandberg-Wollheim M, Sorensen PS, Spurkland A, Svejgaard A, Holmans P, Compston A, Hillert J, Sawcer S. A genome-wide screen for linkage in Nordic sib-pairs with multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2002;3(5):279-85.

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol.* 1990;136(3):593-608.

Artemiadis AK, Anagnostouli MC. Apoptosis of oligodendrocytes and post-translational modifications of myelin basic protein in multiple sclerosis: possible role for the early stages of multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 2010; 63(2):65-72. doi: 10.1159/000272940.

Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene). Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet.* 2009;41(7):824-8.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions

as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 2000;192(3):393-404.

Ban M, Stewart GJ, Bennetts BH, Heard R, Simmons R, Maranian M, Compston A, Sawcer SJ. A genome screen for linkage in Australian sibling-pairs with multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2002;3(8):464-9.

Baranzini SE, Bernard CC, Oksenberg JR. Modular transcriptional activity characterizes the initiation and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2005;174(11): 7412-22.

Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, Radue EW, Lindberg RL, Uitdehaag BM, Johnson MR, Angelakopoulou A, Hall L, Richardson JC, Prinjha RK, Gass A, Geurts JJ, Kragt J, Sombekke M, Vrenken H, Qualley P, Lincoln RR, Gomez R, Caillier SJ, George MF, Mousavi H, Guerrero R, Okuda DT, Cree BA, Green AJ, Waubant E, Goodin DS, Pelletier D, Matthews PM, Hauser SL, Kappos L, Polman CH, Oksenberg JR. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2009;18(4):767-78.

Barcellos LF, Klitz W, Field LL, Tobias R, Bowcock AM, Wilson R, Nelson MP, Nagatomi J, Thomson G. Association mapping of disease loci, by use of a pooled DNA genomic screen. *Am J Hum Genet.* 1997;61(3):734-47.

Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, Goodin DS, Pelletier D, Lincoln RR, Bucher P, Swerdlin A, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL; Multiple Sclerosis Genetics Group. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet.* 2003;72(3):710-6.

Barcellos LF, Thomson G, Carrington M, Schafer J, Begovich AB, Lin P, Xu XH, Min BQ, Marti D, Klitz W. Chromosome 19 single-locus and multilocus haplotype associations with multiple sclerosis. Evidence of a new susceptibility locus in Caucasian and Chinese patients. *JAMA.* 1997b;278(15):1256-61.

Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, Peter ME. The death effector domain protein family. *Oncogene.* 2003;22(53):8634-44.

Bartos A, Fialová L, Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Pit'ha J. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2007;254(1):20-5.

Basso AS, Frenkel D, Quintana FJ, Costa-Pinto FA, Petrovic-Stojkovic S, Puckett L, Monsonigo A, Bar-Shir A, Engel Y, Gozin M, Weiner HL. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1532-43.

Bechmann I. Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? *Neuromolecular Med.* 2005;7(3):217-28.

Benczur M, Petrányi GG, Pálffy G, Varga M, Tálas M, Kotsy B, Földes I, Hollán SR. Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: A possible pathogenetic factor. *Clin Exp Immunol.* 1980;39(3):657-62.

Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F, Reindl M. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med.* 2003;349(2):139-45.

Bertrams J, Kuwert E, Liedtke U. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 1972;2 (5):405-8.

Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, McFarland H, Henkart PA, Martin R. Regulatory CD56 (bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(15):5941-6.

Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle.* 2007;6(6):686-95

Bogdan JA, Adams-Burton C, Pedicord DL, Sukovich DA, Benfield PA, Corjay MH, Stoltenberg JK, Dicker IB. Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its

interaction with the B-cell translocation protein BTG1. *Biochem J.* 1998;336 (Pt 2):471-81.

Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem.* 1995;270(1):387-91.

Bomprezzi R, Ringnér M, Kim S, Bittner ML, Khan J, Chen Y, Elkahloun A, Yu A, Bielekova B, Meltzer PS, Martin R, McFarland HF, Trent JM. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(17):2191-9.

Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1983;62(1-3):219-32.

Bouchon A, Cella M, Grierson HL, Cohen JI, Colonna M. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol.* 2001;167(10):5517-21.

Boulanger JJ, Messier C. From precursors to myelinating oligodendrocytes: contribution of intrinsic and extrinsic factors to white matter plasticity in the adult brain. *Neuroscience.* 2014;269:343-66.

Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, Dijkstra CD, van der Valk P, Bö L. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2008;63(1):16-25.

Broadley S, Sawcer S, D'Alfonso S, Hensiek A, Coraddu F, Gray J, Roxburgh R, Clayton D, Buttinelli C, Quattrone A, Trojano M, Massacesi L, Compston A. A genome screen for multiple sclerosis in Italian families. *Genes Immun.* 2001;2(4):205-10.

Brønnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Stenager E. Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain.* 2004;127(Pt 4):844-50.

Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*. 2013;61(4):453-65.

Brownlee WJ, Miller DH. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2014;21(12):2065-71.

Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, Lassmann H. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 1995;38(5):788-96.

Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*. 2011; 472(7343):319-24. doi: 10.1038/nature09788.

Busson M, Carazo A, Seyer P, Grandemange S, Casas F, Pessemesse L, Rouault JP, Wrutniak-Cabello C, Cabello G. Coactivation of nuclear receptors and myogenic factors induces the major BTG1 influence on muscle differentiation. *Oncogene*. 2005;24(10):1698-710.

Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiochetti A, Bocca S, Boggio E, Bernardone IS, Cometa A, Clementi R, Barizzone N, D'Alfonso S, Corrado L, Galimberti D, Scarpini E, Guerini FR, Caputo D, Paolicelli D, Trojano M, Figà-Talamanca L, Salvetti M, Perla F, Leone M, Monaco F, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun*. 2008;9(5):438-44. doi: 10.1038/gene.2008.35.

Carmody RJ, Hilliard B, Maguschak K, Chodosh LA, Chen YH. Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J Neuroimmunol*. 2002;133(1-2):95-107.

Carton H, Vlietinck R, Debruyne J, De Keyser J, D'Hooghe MB, Loos R, Medaer R, Truyen L, Yee IM, Sadovnick AD. Risks of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997;62(4):329-33.

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol.* 1996;157(2):512-21.

Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Bøddeker I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain.* 2001;124(Pt 11):2169-76.

Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;406(6798):855-62.

Chataway J, Feakes R, Corradu F, Gray J, Deans J, Fraser M, Robertson N, Broadley S, Jones H, Clayton D, Goodfellow P, Sawcer S, Compston A. The genetics of multiple sclerosis: principles, background and updated results of the United Kingdom systematic genome screen. *Brain.* 1998;121 (Pt 10):1869-87.

Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol.* 2009;6(1):15-25. doi: 10.1038/cmi.2009.3.

Chen JW, Breckwoldt MO, Aikawa E, Chiang G, Weissleder R. Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 2008;131(Pt 4):1123-33.

Chervonsky AV. Apoptotic and effector pathways in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(6):684-8.

Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* 2010;37(3):299-310.

Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature.* 2002;419(6905):395-9.

Chung CW, Hong YM, Song S, Woo HN, Choi YH, Rohn T, Jung YK. Atypical role of proximal caspase-8 in truncated Tau-induced neurite regression and neuronal cell death. *Neurobiol Dis.* 2003;14(3):557-66.

Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010 Mar;48(6):749-62.

Claus M, Meinke S, Bhat R, Watzl C. Regulation of NK cell activity by 2B4, NTB-A and CRACC. *Front Biosci.* 2008;13:956-65.

Comabella M, Craig DW, Camiña-Tato M, Morcillo C, Lopez C, Navarro A, Rio J; BiomarkerMS Study Group, Montalban X, Martin R. Identification of a novel risk locus for multiple sclerosis at 13q31.3 by a pooled genome-wide scan of 500,000 single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2008;3(10): e3490.

Comabella M, Martin R. Genomics in multiple sclerosis-current state and future directions. *J Neuroimmunol.* 2007;187(1-2):1-8.

Comi C, Leone M, Bonisconi S, DeFranco S, Bottarel F, Mezzatesta C, Chiochetti A, Perla F, Monaco F, Dianzani U. Defective T cell fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2000;55(7):921-7.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2002; 359(9313):1221-31.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008; 372(9648):1502-17.

Compston A. The genetics of multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 2000;6 Suppl 2:S5-9.

Compston DA, Batchelor JR, McDonald WI. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *Lancet.* 1976;2(7998):1261-5.

Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11(2):105-19.

Coraddu F, Sawcer S, D'Alfonso S, Lai M, Hensiek A, Solla E, Broadley S, Mancosu C, Pugliatti M, Marrosu MG, Compston A. A genome screen for

multiple sclerosis in Sardinian multiplex families. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(8):621-6.

Corjay MH, Kearney MA, Munzer DA, Diamond SM, Stoltenberg JK. Antiproliferative gene BTG1 is highly expressed in apoptotic cells in macrophage-rich areas of advanced lesions in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit and human. *Lab Invest.* 1998 ;78(7):847-58.

Correale J, Equiza TR. Regulatory B cells, helminths, and multiple sclerosis. *Methods Mol Biol.* 2014;1190:257-69.

Correale J, Farez M, Gilmore W. Vaccines for multiple sclerosis: progress to date. *CNS Drugs.* 2008;22(3):175-98.

Cree BA. Multiple sclerosis genetics. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:193-209.

Dai Y, Xu C, Holmberg M, Oturai A, Fredrikson S, Sandberg-Wollheim M, Laaksonen M, Spurkland A, Myhr KM, Ryder LP, Sorensen PS, Svejgaard A, Hillert J. Linkage analysis suggests a region of importance for multiple sclerosis in 3p14-13. *Genes Immun.* 2001;2(8):451-4.

Darzynkiewicz Z, Traganos F. Measurement of apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 1998;62:33-73.

Das A, Guyton MK, Butler JT, Ray SK, Banik NL. Activation of calpain and caspase pathways in demyelination and neurodegeneration in animal model of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008;7(3):313-20.

De Andrés C, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Valor L, Teijeiro R, Ramos-Medina R, Mateos D, Faure F, Sánchez-Ramón S. New regulatory CD19(+)CD25(+) B-cell subset in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids. *J Neuroimmunol.* 2014;270(1-2):37-44.

De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, Piccio L, Raychaudhuri S, Tran D, Aubin C, Briskin R, Romano S; International MS Genetics Consortium, Baranzini SE, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL, Gibson RA, Naeglin Y, Uitdehaag B, Matthews PM, Kappos L, Polman C,

McArdle WL, Strachan DP, Evans D, Cross AH, Daly MJ, Compston A, Sawcer SJ, Weiner HL, Hauser SL, Hafler DA, Oksenberg JR. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009;41(7):776-82.

Deb C, Lafrance-Corey RG, Schmalstieg WF, Sauer BM, Wang H, German CL, Windebank AJ, Rodriguez M, Howe CL CD8+ T cells cause disability and axon loss in a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One.* 2010;5(8):e12478.

Deb C, Lafrance-Corey RG, Zoecklein L, Papke L, Rodriguez M, Howe CL. Demyelinated axons and motor function are protected by genetic deletion of perforin in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68(9):1037-48.

Degenhardt A, Ramagopalan SV, Scalfari A, Ebers GC. Clinical prognostic factors in multiple sclerosis: a natural history review. *Nat Rev Neurol.* 2009;5(12):672-82.

Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112-9.

Dianzani U, Chiocchetti A, Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sci.* 2003; 72(25):2803-24.

Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ullrich O. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med.* 2003;198(11):1729-40.

Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2004; 3(2):104-10.

Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, Armstrong H, Cousin K, Bell RB, Hader W, Paty DW, Hashimoto S, Oger J, Duquette P, Warren S, Gray T, O'Connor P, Nath A, Auty A, Metz L, Francis G,

Paulseth JE, Murray TJ, Pryse-Phillips W, Nelson R, Freedman M, Brunet D, Bouchard JP, Hinds D, Risch N. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet.* 1996;13(4):472-6.

Elkon KB. Apoptosis and autoimmunity. *J Rheumatol Suppl.* 1997;50:6-7.

Elliott C, Lindner M, Arthur A, Brennan K, Jarius S, Hussey J, Chan A, Stroet A, Olsson T, Willison H, Barnett SC, Meinl E, Linington C. Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. *Brain.* 2012;135(Pt 6):1819-33.

Eraksoy M, Kurtuncu M, Akman-Demir G, Kilinc M, Gedizlioglu M, Mirza M, Anlar O, Kutlu C, Demirkiran M, Idrisoglu HA, Compston A, Sawcer S; Turkish Multiple Sclerosis Genetics Study Group. A whole genome screen for linkage in Turkish multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003;143(1-2):17-24.

Esiri MM. Multiple sclerosis: a quantitative and qualitative study of immunoglobulin-containing cells in the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1980;6(1):9-21.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(9-10):1371-87.

Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and related disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006;6(6):410-5.

Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3(10):944-50

Forghani R, Wojtkiewicz GR, Zhang Y, Seeburg D, Bautz BR, Pulli B, Milewski AR, Atkinson WL, Iwamoto Y, Zhang ER, Etzrodt M, Rodriguez E, Robbins CS, Swirski FK, Weissleder R, Chen JW. Demyelinating diseases: myeloperoxidase as an imaging biomarker and therapeutic target. *Radiology.* 2012;263(2):451-60. doi: 10.1148/radiol.12111593.

Franzén B, Duvefelt K, Jonsson C, Engelhardt B, Ottervald J, Wickman M, Yang Y, Schuppe-Koistinen I. Gene and protein expression profiling of human cerebral endothelial cells activated with tumor necrosis factor-alpha. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;115(2):130-46.

Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain*. 2005;128(Pt 8):1747-63.

Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2009 ;66(2):132-41.

Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1175-89..

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296(5576):2225-9.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*. 2007 ;14(7):1237-43.

Games Collaborative Group, Ban M, Booth D, Heard R, Stewart G, Goris A, Vandebroek K, Dubois B, Laaksonen M, Ilonen J, Alizadeh M, Edan G, Babron MC, Brassat D, Clanet M, Cournu-Rebeix I, Fontaine B, Semana G, Goedde R, Epplen J, Weber A, Infante-Duarte C, Zipp F, Rajda C, Bencsik K, Vécsei L, Heggarty S, Graham C, Hawkins S, Liguori M, Momigliano-Richiardi P, Caputo D, Grimaldi LM, Leone M, Massacesi L, Milanese C, Salvetti M, Savettieri G, Trojano M, Bielecki B, Mycko MP, Selmaj K, Santos M, Maciel P, Pereira C, Silva A, Silva BM, Coraddu F, Marrosu MG, Akesson E, Hillert J, Datta P, Oturai A, Harbo HF, Spurkland A, Goertsches R, Villoslada P, Eraksoy M, Hensiek A, Compston A, Setakis E, Gray J, Yeo TW, Sawcer S. Linkage

disequilibrium screening for multiple sclerosis implicates JAG1 and POU2AF1 as susceptibility genes in Europeans. *J Neuroimmunol.* 2006;179(1-2):108-16.

GAMES; Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative. A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003;143(1-2):39-46.

Garg P, Duncan RS, Kaja S, Koulen P. Intracellular mechanisms of N-acylethanolamine-mediated neuroprotection in a rat model of stroke. *Neuroscience.* 2010;166(1):252-62.

Geurts J, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 841–51

Gödde R, Brune S, Jagiello P, Sindern E, Haupts M, Schimrigk S, Müller N, Epplen JT. An extended association screen in multiple sclerosis using 202 microsatellite markers targeting apoptosis-related genes does not reveal new predisposing factors. *J Negat Results Biomed.* 2005;4:7.

Goertsches R, Baranzini SE, Morcillo C, Nos C, Camiña M, Oksenberg JR, Montalban X, Comabella M. Evidence for association of chromosome 10 open reading frame (C10orf27) gene polymorphisms and multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008;14(3):412-4.

Goertsches R, Comabella M, Navarro A, Perkal H, Montalban X. Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005;164(1-2):140-7.

Goertsches R, Villoslada P, Comabella M, Montalban X, Navarro A, de la Concha EG, Arroyo R, Lopez de Munain A, Otaegui D, Palacios R, Perez-Tur J, Jonasdottir A, Benediktsson K, Fossdal R, Sawcer S, Setakis E, Compston A; Spanish MS Genetics Group. A genomic screen of Spanish multiple sclerosis patients reveals multiple loci associated with the disease. *J Neuroimmunol.* 2003;143(1-2):124-8.

Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(1):37-43.

Gomes AC, Morris M, Stawiarz L, Jönsson G, Putheti P, Bronge L, Link H, Hillert J. Decreased levels of CD95 and caspase-8 mRNA in multiple sclerosis patients with gadolinium-enhancing lesions on MRI. *Neurosci Lett.* 2003;352(2):101-4.

Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S. Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2008;444(2):195-8.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-12.

Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell.* 2000;102(1):1-4.

Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, McCauley JL, Sawcer SJ, Compston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Pericak-Vance MA, Haines JL; Multiple Sclerosis Genetics Group. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2007;39(9):1083-91.

Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009;23(6):1625-37.

Gumá M, Busch LK, Salazar-Fontana LI, Bellosillo B, Morte C, García P, López-Botet M. The CD94/NKG2C killer lectin-like receptor constitutes an alternative activation pathway for a subset of CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2005;35(7):2071-80.

Günther C, Buchen B, He GW, Hornef M, Torow N, Neumann H, Wittkopf N, Martini E, Basic M, Bleich A, Watson AJ, Neurath MF, Becker C. Caspase-8 controls the gut response to microbial challenges by Tnf- α -dependent and independent pathways. *Gut.* 2015;64(4):601-10.

Günther C, Martini E, Wittkopf N, Amann K, Weigmann B, Neumann H, Waldner MJ, Hedrick SM, Tenzer S, Neurath MF, Becker C. Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*. 2011;477(7364):335-9

Haile Y, Simmen KC, Pasichnyk D, Touret N, Simmen T, Lu JQ, Bleackley RC, Giuliani F. Granule-derived granzyme B mediates the vulnerability of human neurons to T cell-induced neurotoxicity. *J Immunol*. 2011;187(9):4861-72.

Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, Gusella JF, Kim DJ, Terwedow H, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Haynes CS, Roses AD, Lee A, Shaner B, Menold M, Seboun E, Fitoussi RP, Gartioux C, Reyes C, Ribierre F, Gyapay G, Weissenbach J, Hauser SL, Goodkin DE, Lincoln R, Usuku K, Oksenberg JR, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet*. 1996;13(4):469-71.

Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Oksenberg JR, Lincoln R, Zhang DY, Banatao DR, Gatto N, Goodkin DE, Hauser SL. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet*. 1998;7(8):1229-34.

Han J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol*. 2011;12(12):1143-9.

Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*. 2007;282(52):37298-302.

Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002;40(2):140-55.

Hata K, Nishijima K, Mizuguchi J. Role for Btg1 and Btg2 in growth arrest of WEHI-231 cells through arginine methylation following membrane immunoglobulin engagement. *Exp Cell Res*. 2007;313(11):2356-66.

He S, Liang Y, Shao F, Wang X Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(50):20054-9

He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*. 2009;137(6):1100-11

Hedegaard CJ, Chen N, Sellebjerg F, Sørensen PS, Leslie RG, Bendtzen K, Nielsen CH. Autoantibodies to myelin basic protein (MBP) in healthy individuals and in patients with multiple sclerosis: a role in regulating cytokine responses to MBP. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl): e451-61.

Hensiek AE, Roxburgh R, Smilie B, Coraddu F, Akesson E, Holmans P, Sawcer SJ, Compston DA. Updated results of the United Kingdom linkage-based genome screen in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003 ;143(1-2):25-30.

Hermanowski J, Bouzigon E, Forabosco P, Ng MY, Fisher SA, Lewis CM. Meta-analysis of genome-wide linkage studies for multiple sclerosis, using an extended GSMA method. *Eur J Hum Genet*. 2007;15(6):703-10.

Ho CC, Rideout HJ, Ribe E, Troy CM, Dauer WT. The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J Neurosci*. 2009;29(4):1011-6.

Holterhus PM, Bebermeier JH, Werner R, Demeter J, Richter-Unruh A, Cario G, Appari M. Disorders of sex development expose transcriptional autonomy of genetic sex and androgen-programmed hormonal sex in human blood leukocytes. *BMC Genomics*. 2009;10:292

Howe CL, Adelson JD, Rodriguez M. Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol Dis*. 2007;25(2):354-9.

Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 2000 ; 103(6):839-42.

Ibrahim SM, Mix E, Böttcher T, Koczan D, Gold R, Rolfs A, Thiesen HJ. Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. 2001;124(Pt 10):1927-38.

Inoue M, Shinohara ML. The role of interferon- β in the treatment of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis in the perspective of inflammasomes. *Immunology*. 2013;139(1):11-8.

Inoue M, Williams KL, Gunn MD, Shinohara ML. NLRP3 inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):10480-5.

International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, Lin W, Liu S, Pan H, Tang X, Wang J, Wang W, Yu J, Zhang B, Zhang Q, Zhao H, Zhao H, Zhou J, Gabriel SB, Barry R, Blumenstiel B, Camargo A, Defelice M, Faggart M, Goyette M, Gupta S, Moore J, Nguyen H, Onofrio RC, Parkin M, Roy J, Stahl E, Winchester E, Ziaugra L, Altshuler D, Shen Y, Yao Z, Huang W, Chu X, He Y, Jin L, Liu Y, Shen Y, Sun W, Wang H, Wang Y, Wang Y, Xiong X, Xu L, Wayne MM, Tsui SK, Xue H, Wong JT, Galver LM, Fan JB, Gunderson K, Murray SS, Oliphant AR, Chee MS, Montpetit A, Chagnon F, Ferretti V, Leboeuf M, Olivier JF, Phillips MS, Roumy S, Sallée C, Verner A, Hudson TJ, Kwok PY, Cai D, Koboldt DC, Miller RD, Pawlikowska L, Taillon-Miller P, Xiao M, Tsui LC, Mak W, Song YQ, Tam PK, Nakamura Y, Kawaguchi T, Kitamoto T, Morizono T, Nagashima A, Ohnishi Y, Sekine A, Tanaka T, Tsunoda T, Deloukas P, Bird CP, Delgado M, Dermitzakis ET, Gwilliam R, Hunt S, Morrison J, Powell D, Stranger BE, Whittaker P, Bentley DR, Daly MJ, de Bakker PI, Barrett J, Chretien YR, Maller J, McCarroll S, Patterson N, Pe'er I, Price A, Purcell S, Richter DJ, Sabeti P, Saxena R, Schaffner SF, Sham PC, Varilly P, Altshuler D, Stein LD, Krishnan L, Smith AV, Tello-Ruiz MK, Thorisson GA, Chakravarti A, Chen PE, Cutler DJ, Kashuk CS, Lin S, Abecasis GR, Guan W, Li Y, Munro HM, Qin ZS, Thomas DJ, McVean G, Auton A, Bottolo L, Cardin N, Eyheramendy S, Freeman C, Marchini J, Myers S, Spencer C, Stephens M, Donnelly P, Cardon LR, Clarke G, Evans DM, Morris AP, Weir BS, Tsunoda T,

Mullikin JC, Sherry ST, Feolo M, Skol A, Zhang H, Zeng C, Zhao H, Matsuda I, Fukushima Y, Macer DR, Suda E, Rotimi CN, Adebamowo CA, Ajayi I, Aniagwu T, Marshall PA, Nkwodimmah C, Royal CD, Leppert MF, Dixon M, Peiffer A, Qiu R, Kent A, Kato K, Niikawa N, Adewole IF, Knoppers BM, Foster MW, Clayton EW, Watkin J, Gibbs RA, Belmont JW, Muzny D, Nazareth L, Sodergren E, Weinstock GM, Wheeler DA, Yakub I, Gabriel SB, Onofrio RC, Richter DJ, Ziaugra L, Birren BW, Daly MJ, Altshuler D, Wilson RK, Fulton LL, Rogers J, Burton J, Carter NP, Clee CM, Griffiths M, Jones MC, McLay K, Plumb RW, Ross MT, Sims SK, Willey DL, Chen Z, Han H, Kang L, Godbout M, Wallenburg JC, L'Archevêque P, Bellemare G, Saeki K, Wang H, An D, Fu H, Li Q, Wang Z, Wang R, Holden AL, Brooks LD, McEwen JE, Guyer MS, Wang VO, Peterson JL, Shi M, Spiegel J, Sung LM, Zacharia LF, Collins FS, Kennedy K, Jamieson R, Stewart J. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851-61.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 431 (7011): 931-945.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, Oturai A, Saarela J, Fontaine B, Hemmer B, Martin C, Zipp F, D'Alfonso S, Martinelli-Boneschi F, Taylor B, Harbo HF, Kockum I, Hillert J, Olsson T, Ban M, Oksenberg JR, Hintzen R, Barcellos LF; Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2); International IBD Genetics Consortium (IBDGC), Agliardi C, Alfredsson L, Alizadeh M, Anderson C, Andrews R, Søndergaard HB, Baker A, Band G, Baranzini SE, Barizzone N, Barrett J, Bellenguez C, Bergamaschi L, Bernardinelli L, Berthele A, Biberacher V, Binder TM, Blackburn H, Bomfim IL, Brambilla P, Broadley S, Brochet B, Brundin L, Buck D, Butzkueven H, Caillier SJ, Camu W, Carpentier W, Cavalla P, Celius EG, Coman I, Comi G, Corrado L, Cosemans L, Cournu-Rebeix I, Cree BA, Cusi D, Damotte V, Defer G, Delgado SR, Deloukas P, di Sapio A, Dilthey AT, Donnelly P, Dubois B, Duddy M, Ekins S, Elovaara I, Esposito F, Evangelou N, Fiddes B, Field J, Franke A, Freeman C, Frohlich IY, Galimberti D, Gieger C, Gourraud PA, Graetz C, Graham A, Grummel V, Guaschino C, Hadjixenofontos A, Hakonarson H, Halfpenny C, Hall G, Hall P, Hamsten A,

Harley J, Harrower T, Hawkins C, Hellenthal G, Hillier C, Hobart J, Hoshi M, Hunt SE, Jagodic M, Jelčić I, Jochim A, Kendall B, Kermode A, Kilpatrick T, Koivisto K, Konidari I, Korn T, Kronsbein H, Langford C, Larsson M, Lathrop M, Lebrun-Frenay C, Lechner-Scott J, Lee MH, Leone MA, Leppä V, Liberatore G, Lie BA, Lill CM, Lindén M, Link J, Luessi F, Lycke J, Macchiardi F, Männistö S, Manrique CP, Martin R, Martinelli V, Mason D, Mazibrada G, McCabe C, Mero IL, Mescheriakova J, Moutsianas L, Myhr KM, Nagels G, Nicholas R, Nilsson P, Piehl F, Pirinen M, Price SE, Quach H, Reunananen M, Robberecht W, Robertson NP, Rodegher M, Rog D, Salvetti M, Schnetz-Boutaud NC, Sellebjerg F, Selter RC, Schaefer C, Shaunak S, Shen L, Shields S, Siffrin V, Slee M, Sorensen PS, Sorosina M, Sospedra M, Spurkland A, Strange A, Sundqvist E, Thijs V, Thorpe J, Ticca A, Tienari P, van Duijn C, Visser EM, Vucic S, Westerlind H, Wiley JS, Wilkins A, Wilson JF, Winkelmann J, Zajicek J, Zindler E, Haines JL, Pericak-Vance MA, Ivinson AJ, Stewart G, Hafler D, Hauser SL, Compston A, McVean G, De Jager P, Sawcer SJ, McCauley JL. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013a;45(11):1353-60.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007;357(9):851-62.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Lill CM, Schjeide BM, Graetz C, Ban M, Alcina A, Ortiz MA, Pérez J, Damotte V, Booth D, Lopez de Lapuente A, Broer L, Schilling M, Akkad DA, Aktas O, Alloza I, Antigüedad A, Arroyo R, Blaschke P, Buttman M, Chan A, Compston A, Cournu-Rebeix I, Dörner T, Epplen JT, Fernández Ó, Gerdes LA, Guillot-Noël L, Hartung HP, Hoffjan S, Izquierdo G, Kempainen A, Kroner A, Kubisch C, Kämpfel T, Li SC, Lindenberger U, Lohse P, Lubetzki C, Luessi F, Malhotra S, Mescheriakova J, Montalban X, Papeix C, Paredes LF, Rieckmann P, Steinhagen-Thiessen E, Winkelmann A, Zettl UK, Hintzen R, Vandenbroeck K, Stewart G, Fontaine B, Comabella M, Urcelay E, Matesanz F, Sawcer S, Bertram L, Zipp F. MANBA,

CXCR5, SOX8, RPS6KB1 and ZBTB46 are genetic risk loci for multiple sclerosis. *Brain*. 2013b;136(Pt 6):1778-82.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, D'Alfonso S, Blackburn H, Martinelli Boneschi F, Liddle J, Harbo HF, Perez ML, Spurkland A, Waller MJ, Mycko MP, Ricketts M, Comabella M, Hammond N, Kockum I, McCann OT, Ban M, Whittaker P, Kempainen A, Weston P, Hawkins C, Widaa S, Zajicek J, Dronov S, Robertson N, Bumpstead SJ, Barcellos LF, Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BA, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, de Bakker PI, Debouverie M, D'hooghe MB, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SF, Guerini FR, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung HP, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermode AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone MA, Leppä V, Liljedahl U, Bomfim IL, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen AR, Lupoli S, Macciardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero IL, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr KM, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L, Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL, Ramsay PP, Reunanen M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Rückert IM, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PM, Smestad C, Sørensen PS, Søndergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen AM,

Sundqvist E, Syvänen AC, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CN, Wichmann HE, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivinson AJ, De Jager PL, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P, Compston A. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.

Irvine KA, Blakemore WF. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain*. 2008;131(Pt 6):1464-77.

Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Pediatr*. 2007;166(2):95-109.

Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, Meinl E, Hohlfeld R, Dornmair K. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain*. 2007;130(Pt 11):2789-99.

Kalman B, Laitinen K, Komoly S. The involvement of mitochondria in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007;188(1-2):1-12. Review.

Kastrukoff LF, Lau A, Wee R, Zecchini D, White R, Paty DW. Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys innatural killer cell functional activity. *J Neuroimmunol*. 2003;145(1-2):103-14.

Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, White R, Petkau AJ, Satoh J, Paty DW. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1998;86(2):123-33.

Katano H, Cohen JL. Perforin and lymphohistiocytic proliferative disorders. *Br J Haematol*. 2005;128(6):739-50.

Kaufman DW, Reshef S, Golub HL, Peucker M, Corwin MJ, Goodin DS, Knappertz V, Pleimes D, Cutter G. Survival in commercially insured multiple sclerosis patients and comparator subjects in the U.S. *Mult Scler Relat Disord*. 2014;3(3):364-71.

Kawamura-Tsuzuku J, Suzuki T, Yoshida Y, Yamamoto T. Nuclear localization of Tob is important for regulation of its antiproliferative activity. *Oncogene*. 2004;23(39):6630-8.

Kemppinen AK, Kaprio J, Palotie A, Saarela J. Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis. *BMJ Open*. 2011;1(1):e000053.

Kish DD, Gorbachev AV, Parameswaran N, Gupta N, Fairchild RL. Neutrophil expression of Fas ligand and perforin directs effector CD8 T cell infiltration into antigen-challenged skin. *J Immunol*. 2012;189(5):2191-202.

Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science*. 2008;322(5899):268-71.

Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol*. 2011;239(1-2):80-6.

Koike F, Satoh J, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies interferon beta-regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;139(1-2):109-18.

Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):279-89.

Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008;255 Suppl 6:2-6.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.

Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010;40(2):280-93.

Krupp LB, Banwell B, Tenenbaum S; International Pediatric MS Study Group. Consensus definitions proposed for pediatric multiple sclerosis and related disorders. *Neurology.* 2007;68(16 Suppl 2):S7-12. Review.

Krysko DV, Denecker G, Festjens N, Gabriels S, Parthoens E, D'Herde K, Vandenabeele P. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.* 2006;13(12):2011-22.

Kuokkanen S, Gschwend M, Rioux JD, Daly MJ, Terwilliger JD, Tienari PJ, Wikström J, Palo J, Stein LD, Hudson TJ, Lander ES, Peltonen L. Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families. *Am J Hum Genet.* 1997;61(6):1379-87.

Kurtzke, J.F., Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 1983; 33(11):1444-52.

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain.* 2005; 128(Pt 11):2705-12.

Lalonde PH, Menge T, Delarasse C, Della Gaspera B, Pham-Dinh D, Villoslada P, von Büdingen HC, Genain CP. Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2280-5

Lalmohamed A, Bazelier MT, Van Staa TP, Uitdehaag BM, Leufkens HG, De Boer A, De Vries F. Causes of death in patients with multiple sclerosis and

matched referent subjects: a population-based cohort study. *Eur J Neurol.* 2012;19(7):1007-14.

Larsen F, Oturai A, Ryder LP, Madsen HO, Hillert J, Fredrikson S, Sandberg-Wollheim M, Laaksonen M, Harbo HF, Sawcer S, Fugger L, Sorensen PS, Svejgaard A. Linkage analysis of a candidate region in Scandinavian sib pairs with multiple sclerosis reveals linkage to chromosome 17q. *Genes Immun.* 2000;1(7):456-9.

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007;17(2):210-8.

Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(11):647-56.

Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 2):265-7.

Lee H, Cha S, Lee MS, Cho GJ, Choi WS, Suk K. Role of antiproliferative B cell translocation gene-1 as an apoptotic sensitizer in activation-induced cell death of brain microglia. *J Immunol.* 2003;171(11):5802-11.

Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, Peter ME, Chan AC. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* 2006;25(5):1009-23.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.

Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H, Podack ER. Structure and function of human perforin. *Nature.* 1988;335(6189):448-51.

Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):361-70.

Liu G, Wu C, Wu Y, Zhao Y. Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation *Scand J Immunol.* 2006; 64(1):1-9.

Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry*. 1995;21(3):275-83.

Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002;8(5):500-8.

Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(5):1004-11

Lu G, Xie ZD, Shen KL, Ye LJ, Wu RH, Liu CY, Jin YK, Yang S. Mutations in the perforin gene in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(23):2851-5.

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907-11.

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;47(6):707-17.

Lumsden CE. The immunogenesis of the multiple sclerosis plaque. *Brain Res*. 1971;28(3):365-90.

Lundmark F, Duvefelt K, Hillert J. Genetic association analysis of the interleukin 7 gene (IL7) in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007;192(1-2):171-3.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94(4):481-90.

Maas C, de Vries E, Tait SW, Borst J. Bid can mediate a pro-apoptotic response to etoposide and ionizing radiation without cleavage in its unstructured loop and in the absence of p53. *Oncogene.* 2011;30(33):3636-47.

Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, Aune TM. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol.* 2002;169(1):5-9.

Malipiero U, Frei K, Spanaus KS, Agresti C, Lassmann H, Hahne M, Tschopp J, Eugster HP, Fontana A. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas ligand-deficient *lpr* and *gld* mice. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3151-60.

Mandel I, Paperna T, Miller A. Aberrant expression of the apoptosis-related proteins BAK and MCL1 in T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012;244(1-2):51-6.

Mandel M, Gurevich M, Pauzner R, Kaminski N, Achiron A. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2004;138(1):164-70.

Marquès-Bonet T, Lao O, Goertsches R, Comabella M, Montalban X, Navarro A. Association Cluster Detector: a tool for heuristic detection of significance clusters in whole-genome scans. *Bioinformatics.* 2005;21 Suppl 2:ii180-1.

Martin R and Sospedra M. Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683-747.

Martin R, Utz U, Coligan JE, Richert JR, Flerlage M, Robinson E, Stone R, Biddison WE, McFarlin DE, McFarland HF. Diversity in fine specificity and T cell receptor usage of the human CD4+ cytotoxic T cell response specific for the immunodominant myelin basic protein peptide 87-106. *J Immunol.* 1992;148(5):1359-66.

Mascanfroni ID, Yeste A, Vieira SM, Burns EJ, Patel B, Sloma I, Wu Y, Mayo L, Ben-Hamo R, Efroni S, Kuchroo VK, Robson SC, Quintana FJ. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1054-63.

Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Martínez San Millán J, Villar LM. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology.* 2006;66(4):576-8.

Matejuk A, Dwyer J, Zamora A, Vandenberg AA, Offner H. Evaluation of the effects of 17beta-estradiol (17beta-e2) on gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis using DNA microarray. *Endocrinology.* 2002;143(1):313-9.

Matsuda S, Rouault J, Magaud J, Berthet C. In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family. *FEBS Lett.* 2001;497(2-3):67-72.

Matute C, Torre I, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodríguez-Antigüedad A, Sánchez-Gómez M, Domercq M. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci.* 2007;27(35):9525-33

Mauxion F, Chen CY, Séraphin B, Shyu AB. BTG/TOB factors impact deadenylases. *Trends Biochem Sci.* 2009;34(12):640-7.

Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev.* 2012;248(1):170-87.

Mayo L, Trauger SA, Blain M, Nadeau M, Patel B, Alvarez JI, Mascanfroni ID, Yeste A, Kivisäkk P, Kallas K, Ellezam B, Bakshi R, Prat A, Antel JP, Weiner HL, Quintana FJ. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med.* 2014;20(10):1147-56.

Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol.* 2006;59(6):880-92.

Meyer R, Weissert R, Diem R, Storch MK, de Graaf KL, Kramer B, Bahr M. Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2001;21(16):6214-20.

Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003 ;114(2):181-90.

Michel L, Chesneau M, Manceau P, Genty A, Garcia A, Salou M, Elong Ngonu A, Pallier A, Jacq-Foucher M, Lefrère F, Wiertlewski S, Soullillou JP, Degauque N, Laplaud DA, Brouard S. Unaltered regulatory B-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2014;155(2):198-208.

Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, Galetta SL, Hutchinson M, Johnson RT, Kappos L, Kira J, Lublin FD, McFarland HF, Montalban X, Panitch H, Richert JR, Reingold SC, Polman CH. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler.* 2008;14(9):1157-74.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med.* 2009;361(9):888-98.

Mizuno T, Zhang G, Takeuchi H, Kawanokuchi J, Wang J, Sonobe Y, Jin S, Takada N, Komatsu Y, Suzumura A. Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Exp Neurol.* 2014;262 Pt A:18-27.

Monif M, Burnstock G, Williams DA. Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(11):1753-6.

Morcillo-Suarez C, Alegre J, Sangros R, Gazave E, de Cid R, Milne R, Amigo J, Ferrer-Admetlla A, Moreno-Estrada A, Gardner M, Casals F, Pérez-Lezaun A, Comas D, Bosch E, Calafell F, Bertranpetit J, Navarro A. SNP analysis to results (SNPator): a web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data. *Bioinformatics.* 2008;24(14):1643-4.

Moreno M, Sáenz-Cuesta M, Castilló J, Cantó E, Negrotto L, Vidal-Jordana A, Montalban X, Comabella M. Circulating levels of soluble apoptosis-related molecules in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013;263(1-2):152-4.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology.* 1992;24:17-27.

Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology.* 1994;44(1):11-5.

Muñoz-Culla M, Irizar H, Otaegui D. The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates. *Appl Clin Genet.* 2013;6:63-73.

Muntasell, A, Magri G, Pende D, Angulo A, López-Botet M. Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. *Blood.* 2010; 115 (25):5170-9.

Myhr KM. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2008;188:12-21.

Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, Holmgren L, Bork P, Misumi DJ, McGrail SH, Dussault BJ Jr, Perou CM, Boissy RE, Duyk GM, Spritz RA, Moore KJ. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat Genet.* 1996;14(3):307-11.

Nahta R, Yuan LX, Fiterman DJ, Zhang L, Symmans WF, Ueno NT, Esteva FJ. B cell translocation gene 1 contributes to antisense Bcl-2-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(6):1593-601.

Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens.* 1972; 2(1):1-4.

Nakamura Y, Xing Y, Sasano H, Rainey WE. The mediator complex subunit 1 enhances transcription of genes needed for adrenal androgen production. *Endocrinology.* 2009;150(9):4145-53.

Nelson PS, Clegg N, Arnold H, Ferguson C, Bonham M, White J, Hood L, Lin B. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(18):11890-5.

Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, Vucic D, Komuves L, Ferrando RE, French DM, Webster J, Roose-Girma M, Warming S, Dixit VM. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science.* 2014;343(6177):1357-60.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997 ;22(8):299-306.

Nischwitz S, Cepok S, Kroner A, Wolf C, Knop M, Müller-Sarnowski F, Pfister H, Roeske D, Rieckmann P, Hemmer B, Ising M, Uhr M, Bettecken T, Holsboer F, Müller-Myhsok B, Weber F. Evidence for VAV2 and ZNF433 as susceptibility genes for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010;227(1-2):162-6.

No authors listed. A meta-analysis of genomic screens in multiple sclerosis. The Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative. *Mult Scler.* 2001;7(1):3-11.

North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:563-80.

O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nat Immunol.* 2009;10(9):929-32.

Ohsako S, Elkon KB. Apoptosis in the effector phase of autoimmune diabetes, multiple sclerosis and thyroiditis. *Cell Death Differ.* 1999; 6(1):13-21.

Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(7):516-26.

Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens.* 1991;38(1):1-15.

Øren A, White LR, Aasly J. Apoptosis in neurones exposed to cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis or acute polyradiculoneuropathy. *J Neurol Sci.* 2001;186(1-2):31-6.

Ozören N, El-Deiry WS. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia.* 2002;4(6):551-7.

Paintlia AS, Paintlia MK, Singh AK, Stanislaus R, Gilg AG, Barbosa E, Singh I. Regulation of gene expression associated with acute experimental autoimmune encephalomyelitis by Lovastatin. *J Neurosci Res.* 2004 ;77(1):63-81.

Patsopoulos NA; Bayer Pharma MS Genetics Working Group; Steering Committees of Studies Evaluating IFN β -1b and a CCR1-Antagonist; ANZgene Consortium; GeneMSA; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Esposito F, Reischl J, Lehr S, Bauer D, Heubach J, Sandbrink R, Pohl C, Edan G, Kappos L, Miller D, Montalbán J, Polman CH, Freedman MS, Hartung HP, Arnason BG, Comi G, Cook S, Filippi M, Goodin DS, Jeffery D, O'Connor P, Ebers GC, Langdon D, Reder AT, Traboulsee A, Zipp F, Schimrigk S, Hillert J, Bahlo M, Booth DR, Broadley S, Brown MA, Browning BL, Browning SR, Butzkueven H, Carroll WM, Chapman C, Foote SJ, Griffiths L, Kermode AG, Kilpatrick TJ, Lechner-Scott J, Marriott M, Mason D, Moscato P, Heard RN, Pender MP, Perreau VM, Perera D, Rubio JP, Scott RJ, Slee M, Stankovich J, Stewart GJ, Taylor BV, Tubridy N, Willoughby E, Wiley J, Matthews P, Boneschi FM, Compston A, Haines J, Hauser SL, McCauley J, Ivinson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance M, Sawcer SJ, De Jager PL, Hafler DA, de Bakker PI. Genome-

wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol*. 2011;70(6):897-912.

Pender MP. Oligodendrocyte apoptosis before immune attack in multiple sclerosis? *Ann Neurol*. 2005; 57(1):158

Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Haines JL, Garcia ME, Oksenberg JR, Barcellos LF, Lincoln R, Goodkin DE, Hauser SL. Linkage and association analysis of chromosome 19q13 in multiple sclerosis. *Neurogenetics*. 2001;3(4):195-201.

Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, Gallo P. The safety profile of cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy. *Expert Opin Drug Saf*. 2007;6(2):183-90.

Perini P, Ranzato F, Calabrese M, Battistin L, Gallo P. Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(8):953-5.

Perry VH, O'Connor V. The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN Neuro*. 2010;2(5):e00047.

Piddlesden SJ, Lassmann H, Zimprich F, Morgan BP, Linington C. The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol*. 1993;143(2):555-64.

Pirko I, Lucchinetti CF, Sriram S, Bakshi R. Gray matter involvement in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007;68(9):634-42.

Pittock SJ, Lucchinetti CF. The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *Neurologist*. 2007;13(2):45-56.

Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*. 2009;284(33):21777-81.

Popescu BF, Lucchinetti CF. Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2012;12:11. Review.

Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol.* 2012b;7:185-217.

Poser CM, Brinar VV. Diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2001;103(1):1-11.

Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Nguyen LT, Badgett D, Miller C, Patrick K, Brownschidle C, Jacobs L. In vivo gene expression revealed by cDNA arrays: the pattern in relapsing-remitting multiple sclerosis patients compared with normal subjects. *J Neuroimmunol.* 2001;116(2):213-9.

Real Decreto 1088/2005 por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión [en línea]. BOE del 20 de septiembre de 2005 Disponible en web: <http://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2005-15514>.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R, Lander ES. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature.* 2001 ;411(6834):199-204.

Reichardt HM, Lühder F. The ambivalent role of apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Curr Pharm Des.* 2012;18(29):4453-64.

Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 1996;273(5281):1516-7.

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 2000;405(6788):847-56.

Roos A, Xu W, Castellano G, Nauta AJ, Garred P, Daha MR, van Kooten C. Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol.* 2004; 34(4):921-9.

Rouault JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, Ffrench M, Duret L, Garoccio M, Germain D, Samarut J, Magaud JP. BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J.* 1992; 11(4):1663-70.

Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, Achiti I, Confavreux C, Coustans M, le Page E, Edan G, McDonnell GV, Hawkins S, Trojano M, Liguori M, Cocco E, Marrosu MG, Tesser F, Leone MA, Weber A, Zipp F, Mitterski B, Epplen JT, Oturai A, Sørensen PS, Celius EG, Lara NT, Montalban X, Villoslada P, Silva AM, Marta M, Leite I, Dubois B, Rubio J, Butzkueven H, Kilpatrick T, Mycko MP, Selmaj KW, Rio ME, Sá M, Salemi G, Savettieri G, Hillert J, Compston DA. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005;64(7):1144-51.

Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol*. 2007;46(6):383-93.

Sadovnick AD, Baird PA. The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology*. 1988;38(6):990-1.

Sadovnick AD. Genetic epidemiology of multiple sclerosis: a survey. *Ann Neurol*. 1994 ;36 Suppl 2:S194-203.

Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, Cayrol R, Prat A, Hall JA, Arbour N. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci*. 2007;27(5):1220-8.

Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PY, Berry DM, Tamblyn L, Shehabeldin A, Migon E, Wakeham A, Bouchard D, Yeh WC, McGlade JC, Ohashi PS, Hakem R. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev*. 2003;17(7):883-95.

Sanna S, Pitzalis M, Zoledziowska M, Zara I, Sidore C, Murru R, Whalen MB, Busonero F, Maschio A, Costa G, Melis MC, Deidda F, Poddie F, Morelli L, Farina G, Li Y, Dei M, Lai S, Mulas A, Cuccuru G, Porcu E, Liang L, Zavattari P, Moi L, Deriu E, Urru MF, Bajorek M, Satta MA, Cocco E, Ferrigno P, Sotgiu S, Pugliatti M, Traccis S, Angius A, Melis M, Rosati G, Abecasis GR, Uda M, Marrosu MG, Schlessinger D, Cucca F. Variants within the immunoregulatory

CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2010 ;42(6):495-7.

Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci.* 2007 ;28(3):121-6.

Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A, Daly MJ, De Jager PL, Walsh E, Lander ES, Rioux JD, Hafler DA, Ivinson A, Rimmler J, Gregory SG, Schmidt S, Pericak-Vance MA, Akesson E, Hillert J, Datta P, Oturai A, Ryder LP, Harbo HF, Spurkland A, Myhr KM, Laaksonen M, Booth D, Heard R, Stewart G, Lincoln R, Barcellos LF, Hauser SL, Oksenberg JR, Kenealy SJ, Haines JL; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet.* 2005;77(3):454-67.

Sawcer S, Compston A. The genetic analysis of multiple sclerosis in Europeans: concepts and design. *J Neuroimmunol.* 2003; 143(1-2):13-6.

Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, Robertson N, Clayton D, Goodfellow PN, Compston A. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet.* 1996; 13(4):464-8.

Sawcer S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain.* 2008; 131(Pt 12):3118-31.

Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22532-8.

Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2013;81(2):184-92.

Schmied R, Huang CC, Zhang XP, Ambron DA, Ambron RT. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for

programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol.* 1993;143(2):446-52.

Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Disease activity in multiple sclerosis correlates with T lymphocyte expression of the inhibitor of apoptosis proteins. *J Neuroimmunol.* 2002a;122(1-2):159-66.

Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol.* 2002b;122(1-2):132-9.

Sharief MK, Douglas M, Noori M, Semra YK. The expression of pro- and anti-apoptosis Bcl-2 family proteins in lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002;125(1-2):155-62.

Sharief MK, Matthews H, Noori MA. Expression ratios of the Bcl-2 family proteins and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003;134(1-2):158-65.

Sharief MK. Impaired Fas-independent apoptosis of T lymphocytes in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000;109(2):236-43.

Sharief MK. Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2001;119(2):350-7.

Shen S, Kepp O, Kroemer G. The end of autophagic cell death? *Autophagy.* 2012;8(1):1-3.

Shibue T, Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer.* 2006;119(9):2036-43.

Sie C, Korn T, Mitsdoerffer M. Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Exp Neurol.* 2014;262 Pt A:18-27.

Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(4):308-17.

Singh S, Metz I, Amor S, van der Valk P, Stadelmann C, Brück W. Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol.* 2013;125(4):595-608.

Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R, Goebels N. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(8): 2428-33.

Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002; 1(4):232-41.

Sobel, RA, and Moore GRW. 2008. Demyelinating Diseases. In Greenfield's neuropathology. J.G. Greenfield, S. Love, D.N. Louis, and D. Ellison, editors. Hodder Arnold, London. 1513-1608.

Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, Kayo T, Yandell BS, Prolla TA, Hayes CE. Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genomics.* 2004;18(2):141-51.

Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, Zhang Z, Hegde R, Cheong N, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem.* 2003;278(34):31469-72.

Suidan GL, Mcdole JR, Chen Y, Pirko I, Johnson AJ. Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells. *PLoS One.* 2008;3(8):e3037.

Taru H, Yoshikawa K, Suzuki T. Suppression of the caspase cleavage of beta-amyloid precursor protein by its cytoplasmic phosphorylation. *FEBS Lett.* 2004;567(2-3):248-52.

Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S61-70; discussion S70-2.

Tedder TF. B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. *J Immunol.* 2015;194(4):1395-401.

Tejera-Alhambra M, Alonso B, Teijeiro R, Ramos-Medina R, Aristimuño C, Valor L, de Andrés C, Sánchez-Ramón S. Perforin expression by CD4+ regulatory T cells increases at multiple sclerosis relapse: sex differences. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):6698-710.

Thornberry NA1, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281(5381):1312-6.

Tien JC, Zhou S, Xu J The role of SRC-1 in murine prostate carcinogenesis is nonessential due to a possible compensation of SRC-3/AIB1 overexpression. *Int J Biol Sci.* 2009;5(3):256-64.

Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, Téllez N, Perkal H, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis?. *Neurology.* 2008 ;70(13 Pt 2):1079-83

Tokuda E, Ono S, Ishige K, Watanabe S, Okawa E, Ito Y, Suzuki T. Dysequilibrium between caspases and their inhibitors in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 2007;1148:234-42.

Torado M, Zeuner Ann, Stassi G. Role of apoptosis in autoimmunity. *Journal of Clinical Immunology* 2004; 24 (1): 1-11.

Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):735-47.

Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2009;8(3):280-91.

Tschopp J, Masson D, Schäfer S. Inhibition of the lytic activity of perforin by lipoproteins. *J Immunol.* 1986;137(6):1950-3.

Van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(11):2899-937.

Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal*. 2010;3(115):re4.

Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):75-86.

Venters HD, Dantzer R, Kelley KW. A new concept in neurodegeneration: TNFalpha is a silencer of survival signals. *Trends Neurosci*. 2000;23(4):175-80.

Ventimiglia R, Lau LF, Kinloch RA, Hopkins A, Karran EH, Petalidis LP, Ward RW. Role of caspases in neuronal apoptosis. *Drug Development Research*. 2001; 52:515-533.

Vojdani A, Lambert J. The Role of Th17 in Neuroimmune Disorders: Target for CAM Therapy. Part I. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:927294

Wang Q, Sharma D, Ren Y, Fondell JD. A coregulatory role for the TRAP-mediator complex in androgen receptor-mediated gene expression. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42852-8.

Wang X, Wang Y, Ding ZJ, Yue B, Zhang PZ, Chen XD, Chen X, Chen J, Chen FQ, Chen Y, Wang RF, Mi WJ, Lin Y, Wang J, Qiu JH. The role of RIP3 mediated necroptosis in ouabain-induced spiral ganglion neurons injuries. *Neurosci Lett*. 2014;578:111-6.

Ward DM, Shiflett SL, Kaplan J. Chediak-Higashi syndrome: a clinical and molecular view of a rare lysosomal storage disorder. *Curr Mol Med*. 2002;2(5):469-77.

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953 ;171(4356):737-8.

Wellcome Trust Case Control Consortium; Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, Kwiatkowski DP, McCarthy MI, Ouwehand WH, Samani NJ, Todd JA, Donnelly P, Barrett JC, Davison D, Easton D, Evans DM, Leung HT, Marchini JL, Morris AP, Spencer CC, Tobin MD, Attwood AP, Boorman JP, Cant B, Everson U, Hussey JM, Jolley JD, Knight AS, Koch K, Meech E, Nutland S, Prowse CV, Stevens HE, Taylor NC, Walters GR, Walker NM, Watkins NA, Winzer T, Jones RW, McArdle WL, Ring SM, Strachan DP, Pembrey M, Breen G, St Clair D, Caesar S, Gordon-Smith K, Jones L, Fraser C, Green EK, Grozeva D, Hamshere ML, Holmans PA, Jones IR, Kirov G, Moskvina V, Nikolov I, O'Donovan MC, Owen MJ, Collier DA, Elkin A, Farmer A, Williamson R, McGuffin P, Young AH, Ferrier IN, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett JH, Bishop TD, Iles MM, Maqbool A, Yuldasheva N, Hall AS, Braund PS, Dixon RJ, Mangino M, Stevens S, Thompson JR, Bredin F, Tremelling M, Parkes M, Drummond H, Lees CW, Nimmo ER, Satsangi J, Fisher SA, Forbes A, Lewis CM, Onnie CM, Prescott NJ, Sanderson J, Matthew CG, Barbour J, Mohiuddin MK, Todhunter CE, Mansfield JC, Ahmad T, Cummings FR, Jewell DP, Webster J, Brown MJ, Lathrop MG, Connell J, Dominiczak A, Marcano CA, Burke B, Dobson R, Gungadoo J, Lee KL, Munroe PB, Newhouse SJ, Onipinla A, Wallace C, Xue M, Caulfield M, Farrall M, Barton A; Biologics in RA Genetics and Genomics Study Syndicate (BRAGGS) Steering Committee, Bruce IN, Donovan H, Eyre S, Gilbert PD, Hilder SL, Hinks AM, John SL, Potter C, Silman AJ, Symmons DP, Thomson W, Worthington J, Dunger DB, Widmer B, Frayling TM, Freathy RM, Lango H, Perry JR, Shields BM, Weedon MN, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Elliott KS, Groves CJ, Lindgren CM, Rayner NW, Timpson NJ, Zeggini E, Newport M, Sirugo G, Lyons E, Vannberg F, Hill AV, Bradbury LA, Farrar C, Pointon JJ, Wordsworth P, Brown MA, Franklyn JA, Heward JM, Simmonds MJ, Gough SC, Seal S; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Stratton MR, Rahman N, Ban M, Goris A, Sawcer SJ, Compston A, Conway D, Jallow M, Newport M, Sirugo G, Rockett KA, Bumpstead SJ, Chaney A, Downes K, Ghori MJ, Gwilliam R, Hunt SE, Inouye M, Keniry A, King E, McGinnis R, Potter S, Ravindrarajah R, Whittaker P, Widdon C, Withers D, Cardin NJ, Davison D, Ferreira T, Pereira-Gale J, Hallgrimsdottir IB, Howie BN, Su Z, Teo YY, Vukcevic D, Bentley D, Brown MA,

Compston A, Farrall M, Hall AS, Hattersley AT, Hill AV, Parkes M, Pembrey M, Stratton MR, Mitchell SL, Newby PR, Brand OJ, Carr-Smith J, Pearce SH, McGinnis R, Keniry A, Deloukas P, Reveille JD, Zhou X, Sims AM, Dowling A, Taylor J, Doan T, Davis JC, Savage L, Ward MM, Learch TL, Weisman MH, Brown M. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet.* 2007; 39(11):1329-37.

Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol.* 2001;50(2):169-80.

Westfall S, Young P. Resampling-Based Multiple Testing: Examples and Methods for p-Value Adjustment. Book. February 1993. ISBN: 978-0-471-55761-6.

Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE. Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J Neuroimmunol.* 2001;121(1-2):40-8.

Willer CJ, Dymont DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12877-82.

Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(6):617-25.

Winkler GS. The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family. *J Cell Physiol.* 2010;222(1):66-72.

Wise LH, Lanchbury JS, Lewis CM. Meta-analysis of genome searches. *Ann Hum Genet.* 1999;63(Pt 3):263-72.

Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA. Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4588-92.

Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res*. 2012;318(11):1213-20.

Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol*. 1992;4(6):389-97.

Xu C, Dai Y, Fredrikson S, Hillert J. Association and linkage analysis of candidate chromosomal regions in multiple sclerosis: indication of disease genes in 12q23 and 7p15. *Eur J Hum Genet*. 1999;7(2):110-6.

Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev*. 2003;17(12):1487-96

Yang X, Morita M, Wang H, Suzuki T, Yang W, Luo Y, Zhao C, Yu Y, Bartlam M, Yamamoto T, Rao Z. Crystal structures of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(21):6872-81.

Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):47-59.

Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev*. 2010;24(23):2592-602.

Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 2009 ;325(5938):332-6.

Zhao Y, Sui X, Ren H. From procaspase-8 to caspase-8: revisiting structural functions of caspase-8. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):316-20.

Zhou Z, Han V, Han J. New components of the necroptotic pathway. *Protein Cell*. 2012;3(11):811-7.

Zipp F. Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):163-71.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90(3):405-13.

10. ANEXOS

ANEXO 1

APARTADO 1-EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Reactivos, material y equipamiento

<i>Reactivos</i>			
<i>Tampón para la lisis de hematíes</i>			
144 mM	NH ₄ Cl		Merck
1mM	NaHCO ₃		Merck
2 mM	Na ₂ EDTA	(pH 8,2)	Sigma-Aldrich
<i>Tampón Nuclei Lysis</i>			
400 mM	NaCl		Fluka
10 mM	Tris-HCl	(pH=8,2)	Merck
2 mM	Na ₂ EDTA	(pH=8,2)	Sigma-Aldrich
0.2 %	SDS		Sigma-Aldrich
1 mg/ml	Proteinasa K		Sigma-Aldrich
<i>Tampón Tris-EDTA (TE)</i>			
			Sigma-Aldrich
<p>Ambas soluciones fueron filtradas, autoclavadas y guardadas a temperatura ambiente. Proteinasa K (10 mg /ml) se almacenó a -20°C y se preparó en el momento de usarse añadiendo 1 ml de proteinasa K a 9 ml de Tampón Nuclei Lysis.</p>			
<i>Material</i>			
Tubos BD Vacutainer SST			BD Diagnostics
Tubos BD Falcon 50 ml			BD Diagnostics
Pipetas Pasteur de polietileno 3,5 ml			Labclinics
Filtro (0,22 mm)			Millipore S.A.
Pipetas serológicas (5, 10, 25 ml)			Corning
Pipetas Pasteur de vidrio			Labclinics

<i>Equipamiento</i>	
Autoclave	JP Selecta
Centrifuga RT 6000 D	Sorvall
Agitador Basculante "Movil Tube"	JP Selecta
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Baño para agua	JP Selecta
Pipeteador de mano	Integra-Bioscience

Protocolo

A continuación, se describe el protocolo utilizado para la extracción del ADN genómico. Se entenderá que los pasos de este proceso se realizaron a temperatura ambiente en caso de que no se especifique otra cosa.

Se extrae la muestra de sangre del paciente y se somete a una centrifugación de 10 minutos a 700 g. Después, con ayuda de una pipeta Pasteur, descartamos el plasma y recogemos la interfase, aproximadamente 1,5 - 2,0 ml, en la que se concentran las células blancas ("*buffy coat*") y que se transfiere a un tubo BD Falcon de 50 ml. Añadimos al tubo que contiene la interfase tampón para la lisis de hematíes hasta alcanzar un volumen de 50 ml con el fin de eliminar la posible contaminación de la muestra recogida con hematíes. Posteriormente, agitamos lentamente el contenido del tubo durante 20 minutos usando para ello un agitador basculante y, después, centrifugamos a 1.700 g durante 20 minutos. Se descarta el sobrenadante, dejando un volumen residual en el que se resuspende el precipitado. Añadimos, de nuevo, al tubo tampón para la lisis de hematíes hasta alcanzar un volumen de 50 ml y agitamos lentamente el contenido del tubo durante 5 minutos y, después, centrifugamos a 1.700 g durante 10 minutos. Descartamos el sobrenadante, dejando el precipitado que contiene las células blancas y durante 20 segundos lo sometemos a una fuerte agitación con el fin de resuspender este precipitado. Añadimos 10 ml de tampón Nuclei Lysis, que entre sus componentes contiene proteinasa K, con el fin de romper las células y las membranas nucleares.

Agitamos y después incubamos la muestra en un baño durante 3 horas a 50°C moviéndola manualmente cada 30 minutos. Finalizada la incubación, para una óptima precipitación de las proteínas, la muestra se guarda en una nevera a 4°C durante 10 minutos. Después se le añaden 3,5 ml de acetato de amonio 7,5 M, se mezcla bien el contenido del tubo y se vuelve a guardar a 4°C en este caso durante 15 minutos. Centrifugamos a 2.700 g durante 10 minutos y recogemos el sobrenadante, que contiene el ADN, incorporándolo a un tubo BD Falcon de 50 ml con 25 ml de etanol 95% y descartamos el precipitado. Invertimos el tubo lentamente varias veces para ver cómo el ADN va precipitando. Centrifugamos a 1.700 g durante 10 minutos, descartamos el sobrenadante y añadimos 10 ml de etanol 95% dejando el tubo en el agitador basculante para que la muestra de ADN se lave. Centrifugamos durante 10 minutos a 1.700 g, extraemos el sobrenadante e invertimos el tubo sobre papel de filtro para permitir la completa evaporación de los restos de etanol que pudieran quedar. Tras este paso, resuspendemos el ADN en 4 ml de tampón Tris-EDTA (TE) y dejamos la muestra en el baño a 50°C durante toda la noche. Tras la incubación medimos la concentración y pureza de la muestra.

APARTADO 2- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y LA PUREZA DEL ADN GENÓMICO

Reactivos y equipamiento

<i>Reactivos</i>	
NaOH 1 M	Merck
HCl 1M	Merck
Tampón Tris-EDTA (TE)	Sigma-Aldrich
<i>Equipamiento</i>	
Espectrofotómetro GENEQUANT	Amersham Pharm
Cubeta de cuarzo (10 mm de grosor)	Amersham Pharm
Microcentrífuga para tubos de 1,5 ml	Eppendorf Iberica

Protocolo

Para medir la concentración y la pureza de las muestras de ADN obtenidas, se utilizó una cubeta de cuarzo que, antes de ser usada fue tratada con una solución de NaOH a una concentración de 1M y, posteriormente, se limpió con agua MilliQ. Para ajustar el espectrofotómetro a cero se utilizó agua MiliQ y para calibrarlo se utilizaron 10 μ l de tampón TE diluidos en 190 μ l de agua MilliQ. La longitud de onda a la que se midió la densidad óptica fue de 260 nm. Se realizaron tres mediciones de cada muestra de ADN para, posteriormente, obtener la concentración de la muestra con la media de estas tres medidas. Para conocer la pureza de la muestra se calculó el cociente entre la medida de densidad óptica obtenida a una longitud de onda de 260 nm y la obtenida a 280 nm. Fueron excluidas o reprecipitadas aquellas muestras con valores de pureza por debajo de 1,5 o por encima de 1,9. Para la reprecipitación se utilizó acetato de amonio al 7,5M y lavados con etanol al 95% hasta conseguir la pureza necesaria. Una vez extraídas y medidas las muestras, una parte de la muestra, 1,5 ml, fue almacenada a -80°C en un tubo de 1,5 ml con la concentración original y con el resto de la muestra se hicieron alícuotas de trabajo a una concentración de 20ng/ μ l que se almacenaron a -20°C .

APARTADO 3-GENOTIPADO DE SNPs

Reactivos, material y equipamiento

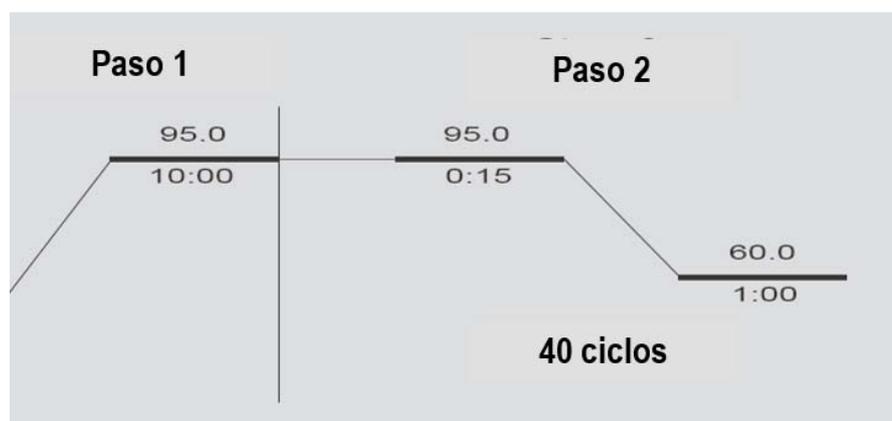
<i>Reactivos y Material</i>	
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 2000 reacc	Applied Biosystems
Assay-on-demand, SNP products/probes	Applied Biosystems
MicroAmp Optical 96-well reaction plate with Barcode (Code 128)	Applied Biosystems
Optical Adhesive Cover Started kit	Applied Biosystems
Agua para biología molecular	Sigma
Tubos 1.5 ml	Eppendorf
<i>Equipamiento</i>	
Centrífuga RT 6000 D	Sorvall
ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Centrífuga 5417 R (con refrigeración)	Applied Biosystems
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Pipetas Research (volumen variable)	Eppendorf
Puntas con Filtro ART (varios volúmenes)	VWR International
Software SDS 2.1	Applied Biosystems

Protocolo

El genotipado se realizó mediante la técnica de discriminación alélica. Para ello las muestras del estudio de los SNPs en cada uno de los genes, se distribuyeron en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se pipetearon manualmente la muestra y los reactivos necesarios para la reacción. Las cantidades utilizadas en cada caso fueron de 6,25 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix no AmpErase UNG, 0,625 µl de la sonda TaqMan específica, 20 ng de ADN genómico y 4,625 µl de agua MilliQ. El volumen final de la reacción fue de 12,5 µl en cada pocillo. En todas las placas se incluyó un control negativo que consistió en pipetear los mismos reactivos que en el resto de pocillos, pero sustituyendo la muestra de ADN por agua. Una vez preparada

la placa se sellaron los pocillos utilizando *Optical Adhesive Cover Started*, se centrifugó a 500 g durante 1 minuto para concentrar el volumen de reacción en el fondo del pocillo y tras este paso la placa se introdujo en un sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7000. Después, seleccionamos en el programa los marcadores fluorescentes unidos a las sondas que íbamos a utilizar y le indicamos a qué alelo correspondía cada marcador. Antes del comienzo de la PCR, se realizó una lectura de la fluorescencia inicial que presentaba cada muestra, generada por la sonda añadida a cada uno de los pocillos. Esta lectura se realizó a 60°C durante 2 minutos (etapa *pre-read*), y tras la misma se llevó a cabo una PCR de amplificación bajo las siguientes condiciones específicas: Como paso inicial la muestra fue sometida a 95 °C durante 10 min; tras este primer paso se realizaron 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C (Figura A). Una vez finalizada la PCR se sometió de nuevo la placa a una lectura final de la fluorescencia en cada pocillo (etapa *post-read*) a 60°C durante 2 minutos. En esta última lectura se recoge la fluorescencia que emite cada pocillo una vez acabada la PCR de amplificación y a este dato se le resta la fluorescencia emitida por cada pocillo antes de realizar la PCR, de esta forma obtenemos sólo la fluorescencia producida durante la amplificación.

Figura A



Leyenda. Condiciones de la PCR de amplificación. Modificado de *ABI PRISM 7000 User Guide*.

**APARTADO 4-PROTOCOLO DE SEPARACIÓN DE PBMCs
MEDIANTE GRADIENTE DE DENSIDAD CON FICOLL-ISOPAQUE**

Reactivos, Material y Equipamiento

<i>Reactivos y Material</i>	
Tubos BD Vacutainer SST	BD Diagnostics
Tubos 1,5 ml	Eppendorf
Tubos Falcon de 50 ml	BD Diagnostics
Suero Fisiológico	Braun
Ficoll-Hypaque 500 ml	Pharmacia Biotech
Medio de cultivo RPMI 1640	Gibco
Solución Azul Tripano	Sigma
Pipetas Pasteur	Deltalab
Pipetas serológicas graduadas estériles	Deltalab
Pipetas Pasteur de vidrio	Deltalab
<i>Equipamiento</i>	
Centrífuga RT 6000 D	Sorvall
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Regulador de vacío Lagoon600 vasi	Air Liquide
Microscopio invertido	Leica
Software SDS 2.1	Applied Biosystems
Pipeteador	Integra Biosciences

Protocolo

Las PBMCs pueden ser separadas del resto de las células de la sangre utilizando para ello un gradiente de densidad de Ficoll. El Ficoll es una sustancia líquida que tiene una densidad mayor que la de las PBMCs pero menor que el resto de células que conforman la sangre completa. Al añadir

sangre completa a un tubo con Ficoll y centrifugar conseguimos una interfase en la que se concentran las PBMCs por debajo de la interfase tendríamos el resto de componentes celulares y el Ficoll, y por encima estaría el plasma de la sangre.

La técnica de separación de PBMCs se describe a continuación:

Partiendo de 40 ml de sangre completa recogida en cuatro tubos con anticoagulante EDTA-K₃, se diluyó toda la sangre en suero fisiológico enriquecido hasta alcanzar un volumen final de 60 ml. Después, separamos las PBMCs mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Isopaque, utilizando para ello tres tubos Falcon de 50 ml a los que previamente se les había añadido 10 ml de Ficoll-Isopaque (el Ficoll-Isopaque debe de estar a una temperatura de 19°C en el momento de realizar el gradiente). Sobre él se incorporarán lentamente 20 ml de sangre diluida para alcanzar un volumen final en cada tubo de 30 ml. Posteriormente, se centrifugaron los tubos durante 25 minutos a 700 g a 19°C, se recogió con una pipeta Pasteur estéril la banda de PMBCs de cada uno de los 3 tubos y estas células fueron traspasadas a un tubo Falcon de 50 ml nuevo. Se centrifugó el contenido del tubo a 600 g durante 10 minutos a 19°C y se eliminó el sobrenadante con ayuda de una pipeta de vidrio estéril conectada a un sistema de vacío hasta dejar un volumen residual de 5-10 ml. Se resuspendió el precipitado celular con ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se añadió suero fisiológico enriquecido hasta alcanzar un volumen de 25 ml. Centrifugamos de nuevo a 600g, durante 10 minutos, a 4°C. Y, por último, eliminamos el sobrenadante totalmente y resuspendimos el precipitado en 1 ml de RPMI completo.

**APARTADO 5-RECUENTO DE PBMCs EXTRAÍDAS A PARTIR
DE SANGRE COMPLETA**

Protocolo

El recuento de PBMCs se hizo utilizando una cámara de recuento y un microscopio invertido. En primer lugar, separamos 10 μ l de células resuspendidas en RPMI completo y le añadimos 90 μ l de suero fisiológico. De esta dilución tomamos 10 μ l y le añadimos 10 μ l de solución de azul tripano. Hechas estas diluciones recogimos 10 μ l y contamos 16 campos en una cámara de recuento. Tras el recuento y para conocer el número total de PBMCs aplicamos la siguiente fórmula:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ total de PBMCs} = \Sigma \text{ PBMC 16 campos contados} \times 1 \times 10 \times 2 \times 10.000}$$

Donde:

- 1:** es el volumen de RPMI completo en el cual hemos diluido las células
- 10:** es la dilución realizada con el suero fisiológico
- 2:** es la dilución realizada con la solución de azul tripano
- 10.000:** es el volumen de la cámara de recuento

APARTADO 6-ACTIVACIÓN DE PBMCs CON PHA

Protocolo

Para la activación de las PBMCs se añadió PHA, a una concentración de 1 mg/ml, a un cultivo de dichas células y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con el 5% de CO₂ durante 24 horas.

APARTADO 7- PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE PBMCs

Reactivos, material y equipamiento

<i>Reactivos y Material</i>	
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Tubos Falcon de 15 ml	BD Diagnostics
Pipetas serológicas graduadas estériles	Deltalab
Pipetas Pasteur de vidrio	Deltalab
Medio de cultivo RPMI 1640	Gibco
Agua para biología molecular	Sigma
Tampón fosfato salino (PBS)	GIBCO
2-mercaptoetanol	Sigma
Etanol 70%	Panreac
<i>Equipamiento</i>	
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Regulador de vacío Lagoon600 vasi	Air Liquide
Pipeteador	Integra Biosciences
Centrífuga 5417 R (con refrigeración)	Applied Biosystems
Puntas con Filtro ART (varios volúmenes)	VWR International
Pipetas Research (volumen variable)	Eppendorf
Espectrofotómetro GENEQUANT	Amersham Pharm

Protocolo

Para extraer el ARN tanto de las células en condiciones basales como de aquellas que fueron tratadas con PHA, utilizamos el kit de extracción *RNeasy* (Qiagen) que contiene pequeñas columnas rellenas de sílica con

capacidad selectiva para unirse a moléculas, centrifugación a elevada velocidad y soluciones con altas concentraciones salinas para extraer el ARN total de las células.

Las muestras biológicas son lisadas y homogeneizadas con un tampón desnaturante que contiene guanidina-tiocianato que, además, inactiva inmediatamente las ARNasas asegurándonos así un ARN de buena calidad. Posteriormente, el etanol crea las condiciones adecuadas que permiten la unión. La muestra se pone en contacto con la columna y es en este paso en el que el ARN total se une a la membrana de sílica y el resto de componentes son eluidos mediante soluciones. Con estas reacciones nos aseguramos la obtención de un ARN total formado por moléculas de más de 200 pb con lo que ARN ribosómicos como el 5,8S o el 5S o el ARN de transferencia con un tamaño menor a las 200 pb son eliminados.

De cada muestra se extrajo el ARN total de 5×10^6 PBMCs y para ello se siguió el protocolo recomendado por el fabricante.

APARTADO 8-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y LA PUREZA DEL ARN

Protocolo

Para la medida de la concentración y la pureza de las muestras de ARN obtenidas se utilizó una cubeta de cuarzo, que antes de ser usada fue tratada con una solución de NaOH a una concentración de 1M y, posteriormente, se limpió con agua MilliQ. Para ajustar el espectrofotómetro a cero se utilizó agua MilliQ y para calibrarlo se utilizaron 7 μ l de agua libre de ARNasas diluidos en 63 μ l de agua MilliQ. La longitud de onda a la que se midió la densidad óptica fue de 260 nm. Se realizaron tres mediciones de cada muestra de ARN para posteriormente obtener la concentración de la muestra realizando una media de estas tres medidas. Para conocer la pureza de la muestra se calculó el cociente entre la medida de densidad óptica obtenida a una longitud de onda de 260 nm y la obtenida a 280 nm.

Para los cálculos se tuvo en cuenta que cada unidad de densidad óptica (D.O.) equivale a 40 μ g de ARN/ml.

APARTADO 9-CONVERSIÓN DEL ARNm A ADN COMPLEMENTARIO

Reactivos, material y equipamiento

<i>Reactivos y Material</i>	
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems
Tubos de 0,2 ml	Eppendorf
Agua para biología molecular	Sigma
<i>Equipamiento</i>	
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Centrífuga 5417 R (con refrigeración)	Eppendorf
Puntas con Filtro ART (varios volúmenes)	VWR International
Pipetas Research (volumen variable)	Eppendorf
Termociclador GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems

Protocolo

Para el paso de ARNm a ADN complementario utilizamos el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) que basa su reacción en el uso de una enzima retrotranscriptasa inversa (MultiScribe Reverse Transcriptase).

Partimos de 60 ng de ARN total en 10 μ l a los que añadimos las cantidades de reactivos indicadas por el fabricante hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l. Además de las muestras que queremos transcribir, también incluimos un tubo con los mismos reactivos, pero cambiando la cantidad de ARN por agua y que actuará como control negativo. Para las reacciones de paso de ARN a ADN complementario utilizamos tubos de 0,2 ml que se centrifugaron a 500g durante 1 minuto para concentrar todo el volumen en el fondo del tubo. Posteriormente los introducimos en un termociclador

GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) y las sometemos a las siguientes condiciones:

	<i>Paso 1</i>	<i>Paso 2</i>	<i>Paso 3</i>	<i>Paso 4</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	25	37	85	4
<i>Tiempo</i>	10 min	120 min	5 sec	∞

Una vez finalizada la reacción de retrotranscripción el ADN complementario se guardó a -20°C hasta su uso.

**APARTADO 10-PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA
EXPRESIÓN GÉNICA DE BTG1 Y CASP8**

Reactivos, material y equipamiento

<i>Reactivos y Material</i>	
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 2000 reacc	Applied Biosystems
Taqman Gene Expression Assay	Applied Biosystems
Eukaryotic 18S rRNA Taqman Endogenous Control	Applied Biosystems
MicroAmp Optical 96-well reaction plate with Barcode (Code 128)	Applied Biosystems
Optical Adhesive Cover Started kit	Applied Biosystems
Agua para biología molecular	Sigma
Tubos 1.5 ml	Eppendorf
<i>Equipamiento</i>	
Centrífuga RT 6000 D	Sorvall
ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Centrífuga 5417 R (con refrigeración)	Applied Biosystems
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Pipetas Research (volumen variable)	Eppendorf
Puntas con Filtro ART (varios volúmenes)	VWR International
Software SDS 2.1	Applied Biosystems

Protocolo

Para ello en primer lugar preparamos en un tubo la cantidad necesaria de la mezcla de reactivos que vamos a utilizar, teniendo en cuenta el número de muestras, controles negativos y controles endógenos que vamos a incluir en la placa y añadiendo todos los reactivos menos las muestras de ADN. Para cada reacción pipetearemos las cantidades mostradas en la Tabla A.

Tabla A

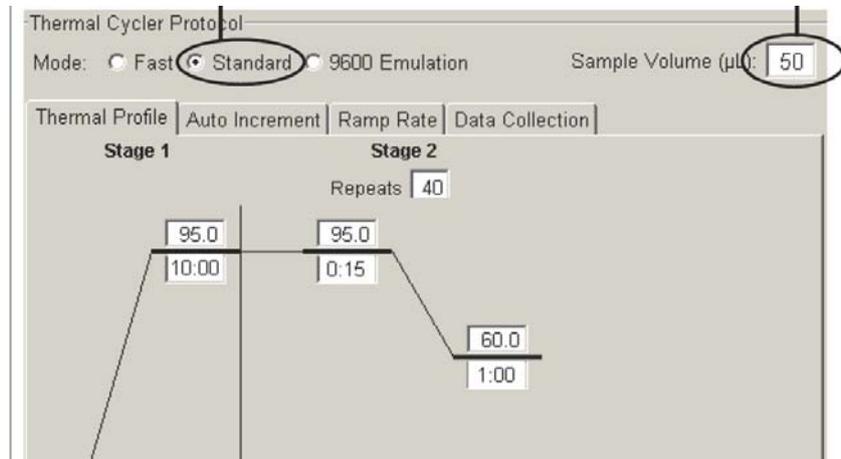
<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad por reacción</i>
TaqMan Gene Expression Assay (20x) o Taqman Endogenous Control	2,5 ml
Muestra de ADN complementario + H2O libre de ARNasas	2,9 ml + 19,6 ml
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) (with or without AmpErase UNG)	25,0 ml
Volumen final	50 ml

En la placa incluimos además de las muestras y los controles endógenos, un control negativo para confirmar que no existen contaminaciones. Cada una de las muestras, endógenos y controles negativos se repitió por triplicado y la cantidad de ADN complementario que se pipeteó en todos los pocillos, excepto en aquellos que contenían el control negativo, fue lo generado a partir de 20 ng de ARN total aislado.

Una vez pipeteado el contenido en cada uno de los pocillos, las placas fueron selladas con *Optical Adhesive Cover* (Applied Biosystems) y centrifugadas a 500g durante 1 minuto. Posteriormente se introdujeron en un ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* para llevar a cabo la PCR a

tiempo real y para ello se sometieron a las condiciones que se muestran en la siguiente figura (Figura B)

Figura B



Leyenda. Condiciones de la PCR a tiempo real. *ABI PRISM 7000 User Guide.*

**APARTADO 11-DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
DE PRF1**

Reactivos, material y equipamiento

<i>Reactivos y material</i>	
GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array	Affymetrix
Two Cycle cDNA Synthesis kit	Affymetrix
Ambion RNA Fragmentation reagents	Ambion
GeneChip Eukariotic hybridation Control	Affymetrix
Streptavidin-phicoerythrin	Molecular Probes
Puntas con Filtro ART (varios volúmenes)	VWR International
Pipetas Research (Volumen variable)	Eppendorf
Tubos 1,5 ml	Eppendorf
<i>Equipamiento</i>	
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Affimatrix GeneChip Hyb Oven 640	Affymetrix
Fluidic Station 450	Affymetrix
Agilent G3000 Gene Array	Agilent Technologies

Protocolo

La obtención de PMBCs a partir de sangre completa y la extracción del ARN total de estas células se hicieron con los mismos protocolos, materiales, kits y equipamiento que en el caso de los genes BTG1 y CASP8.

El ARN total, extraído a partir de las PBMCs, se utilizó para sintetizar ADN complementario de doble cadena usando para ello el kit Two Cycle cDNA

Synthesis. Para la obtención de ARN complementario de sentido opuesto marcado con biotina, se utilizó el mismo kit y 5 µg de ARN total junto con el cebador oligodT 5' GGCCAGTGA-ATTGTAATACGACTCACTATAGGGA GGCGG-(dT) 24. Después 20 µg del ARN complementario fue fragmentado a 94°C durante 30 minutos en 40 µl de 40 mM Tris-acetate, pH 8,1, 100 mM KOAc, y 30 mM Mg(OAc)₂. Se verificó la calidad de las muestras fragmentadas utilizando para ello el Bioanalyzer 2100 y después se les añadió la mezcla de hibridación compuesta por el oligonucleótido control B2 (50 pM) y controles de hibridación eucarióticos (BioB, BioC, BioD, cre) a 1,5, 5, 25 y 100 pM de concentración final respectivamente incluidos en el kit GeneChip Eukaryotic Hybridization Control; también se añadió ADN de esperma de arenque (0,1 mg/ml) y BSA acetilado (0,5 mg/ml). El *microarray* fue equilibrado a temperatura ambiente y fue pre-hibridado con tampón de hibridación 1x (100mM MES, 1M [Na⁺], 20mM EDTA, 0,01% Tween 20) a 45°C durante 10 minutos en rotación. Por otro lado, la muestra de hibridación se calentó a 99°C durante 5 minutos en un bloque térmico y luego fue transferida a otro bloque térmico durante 5 minutos que estaba a 45°C y se centrifugó en una microcentrífuga a máxima velocidad durante 5 minutos. Tras extraer el tampón de hibridación del *microarray* se le añadió 200 µl de mezcla de hibridación para rellenarlo. Cada uno de los *microarrays* fue hibridado a 45°C durante 16 horas en rotación utilizando el horno de Affymetrix GeneChip Hyb Oven 640. Tras este periodo y usando el protocolo EukGE-WS2-v5 proporcionado por Affymetrix los chips fueron lavados y marcados con ficoeritrina-estreptavidina en una Fluidics Station 450. Por último, los chips fueron escaneados en un escáner Agilent G3000 GeneArray.

APARTADO 12-PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PRF1 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Reactivos, material y equipamiento

<i>Reactivos y material</i>	
PerCP-conjugated mouse anti-human CD3	Becton Dickinson
FITC-conjugated mouse anti-human CD8	Becton Dickinson
FITC-conjugated mouse anti-human CD16	Becton Dickinson
FITC-conjugated mouse anti-human CD56	Becton Dickinson
PE-conjugated mouse anti-human perforin	Becton Dickinson
FITC-conjugated mouse IgG1 isotype control	Becton Dickinson
PE-conjugated mouse IgG1 isotype controls	Becton Dickinson
PerCP-conjugated mouse IgG1 isotype control	Becton Dickinson
Tubos BD Vacutainer SST	BD Diagnostics
FACS Lysing solution	Becton Dickinson
D-PBS	Invitrogen
Intrastain	Dako
Tubo para citómetro	Becton Dickinson
Dispensador de líquidos	Pressmatic
Puntas con Filtro ART (varios volúmenes)	VWR International
Pipetas Research (volumen variable)	Eppendorf

Tubos 1.5 ml	Eppendorf
<i>Equipamiento</i>	
Citómetro FACS Canto	Becton Dickinson
Programa DIVA	Becton Dickinson
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Centrífuga RT 6000 D	Sorvall

Protocolo

Para el estudio de la expresión de la proteína PRF1 se prepararon 12 reacciones distintas. Ocho de las reacciones se utilizaron para la compensación del citómetro ya que, al utilizar más de un anticuerpo para el marcaje celular, algunos de los fluorocromos que van unidos a estos anticuerpos solapan parte de su espectro de emisión con otros fluorocromos y esto debe de ser corregido para no perder información durante el estudio.

Para realizar las 12 reacciones se utilizaron 12 tubos para citometría y se distribuyeron los anticuerpos necesarios bien para la compensación de la máquina o bien para la determinación de la cantidad de PRF1 en linfocitos T CD8⁺ y en células NK de la siguiente forma:

Compensación del citómetro:

Tubo 1. Tubo sin anticuerpos

Tubo 2. IgG1 FITC + IgG2 PE + IgG1 perCP + IgG1 APC

Tubo 3. CD4 FITC

Tubo 4. CD8 PE

Tubo 5. CD3 PerCP

Tubo 6. CD4 APC

Tubo 7. CD4 FITC + CD8 PE + CD3 PerCP

Tubo 8. CD8 PE + CD3 PerCP + CD4 APC

Determinación de la PRF1 en linfocitos T CD8⁺ y en células NK:

Tubo 9. CD3 + CD8

Tubo 10. CD3 + CD8 + CD4

Tubo 11. CD3 + CD16 + CD56

Tubo 12. CD3 + CD16 + CD56

El volumen de anticuerpo que se añadió a cada tubo fue de 5 μ l a excepción del anticuerpo anti-CD4 APC del que añadimos 2,5 μ l.

Tras este paso, añadimos a cada tubo 100 μ l de sangre completa e incubamos los tubos durante 25 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Trascorrida la incubación, mezclamos bien el contenido de los tubos y añadimos 2,5 ml de FACS flow en cada tubo. Centrifugamos durante 5 minutos a temperatura ambiente a 500 g y decantamos el contenido del tubo quedándonos aproximadamente con 50 μ l de volumen. Mezclamos bien el contenido de los tubos y añadimos 100 μ l de la solución A fijadora permeabilizadora (Dako), mezclamos bien el contenido e incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, mezclamos el contenido de los tubos, añadimos 2,5 ml de FACS flow y centrifugamos 5 minutos a 500 g a temperatura ambiente. Decantamos los tubos quedándonos con un volumen aproximado de 50 μ l y añadimos 100 μ l de la solución B permeabilizadora fijadora (Dako). Mezclamos el contenido de los tubos y añadimos los anticuerpos intracelulares necesarios. A los tubos 9 y 11 le añadimos 10 μ l de isotipo de la PRF1 y a los tubos 10 y 12 le añadimos 10 μ l de anticuerpo antiperforina. Mezclamos e incubamos los tubos 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Mezclamos de nuevo, añadimos 2,5 μ l de FACS flow y centrifugamos a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Decantamos los tubos conservando un volumen de 50 μ l y añadimos 300 μ l de PBS mezclando antes de pasar el contenido de los tubos por el citómetro.

APARTADO 13-LECTURA DE LOS MARCAJES EN EL CITÓMETRO

Protocolo

En primer lugar, se pasó el tubo 1 (sin marcaje) con el fin de identificar las diferentes poblaciones celulares, teniendo en cuenta el tamaño y la rugosidad. Una vez ajustados todos los parámetros, seleccionamos mediante una ventana la población de linfocitos. Una vez seleccionada esta población realizamos el proceso de compensación con el fin de no perder información por el solapamiento de los espectros de emisión de los fluorocromos. Para este fin, creamos los tubos que incluyen un solo fluorocromo. Para verificar que los valores obtenidos para la compensación eran correctos y que las poblaciones positivas estaban bien compensadas utilizamos los tubos 7 y 8 que contienen varios fluorocromos. Una vez realizada la compensación, hicimos el estudio de la siguiente forma. Los linfocitos fueron seleccionados teniendo en cuenta su tamaño y rugosidad, y una vez seleccionados nos quedamos con los linfocitos T gracias al marcaje con CD3. Para la selección los linfocitos T CD8⁺ que expresan PRF1 utilizamos un marcaje CD3⁺ CD8⁺ PRF1⁺ y cuando lo que queríamos era seleccionar las células NK que expresan PRF1 el marcaje utilizado fue CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ PRF1⁺. El número de linfocitos adquiridos para el estudio fue de 200.000. El número de células que expresaron PRF1 se calculó restando a la señal producida por el anticuerpo anti-perforina la señal emitida por el isotipo de la PRF1.

APARTADO 14-ENSAYOS FUNCIONALES DE LA PRF1

<i>Reactivos y Material</i>	
Kit para aislamiento de células T CD8 ⁺ humanas	Miltenyi Biotec
IL-2	Sigma-Aldrich
PHA	Thermo Fisher
Isótopo Cr ⁵¹	Sigma-Aldrich
Anticuerpo anti-CD3 clon SPvT3b	Becton Dickinson
Anticuerpo anti-CD7 clon 3A1	Becton Dickinson
Anticuerpo anti-CD107 anti-FITC	Becton Dickinson
Monensina	Sigma-Aldrich
Anticuerpo anti-CD8 PE	Immunotools
<i>Equipamiento</i>	
Centrífuga RT 6000 D	Sorvall
Contador de radiación gamma	Perkin Elmer
Estufa	Selecta
Pipetas Research (volumen variable)	Eppendorf

Protocolo

Se obtuvieron células T CD8⁺ de cinco pacientes con formas de EMPP portadores de los haplotipos de riesgo (*GAA/AGA*; n=2) o protectores (*AGA/AGA*; n=3) para *PRF1*. Para su obtención se utilizaron dos protocolos diferentes.

Con el primer protocolo se aislaron PBMCs frescas mediante centrifugación utilizando el protocolo con Ficoll-Isopaque explicado en el apartado anterior y, posteriormente, fueron purificadas utilizando el kit de purificación para células T CD8⁺ humanas de Miltenyi Biotec mediante dos rondas de selección negativa. La pureza de las células humanas T CD8⁺

recuperadas fue de entre un 80-97%. Las células fueron estimuladas durante 48 horas con 1000 U/ml de IL-2 y directamente utilizadas como células efectoras en el ensayo funcional.

En el segundo protocolo, se utilizaron PBMCs congeladas de muestras extraídas de pacientes del sexo masculino con formas de EMPP que portaban haplotipos para *PRF1* de riesgo (*GAA/AGA*; n=1) o protectores (*AGA/AGA*; n=3). Las PMBCs fueron activadas con PHA a una concentración de 2mg/ml durante tres días y después crecieron durante seis días en presencia de IL-2 (250 U/ml). Las células T CD8⁺ fueron obtenidas mediante selección negativa, con una pureza del 93%, y utilizadas como células efectoras.

La actividad citolítica de las células T CD8⁺ activadas mediante IL-2 fue evaluada mediante un ensayo de lisis en células CD3⁺, usando para ello células P815 de mastocitoma murino tal y como describió *Gumá y cols., 2005*. De forma resumida, se utilizaron 5 x 10³ células P815 marcadas con Cr⁵¹, recubiertas con anticuerpo anti-CD3 (0,2 µg/ml, clon SPvT3b) o con anticuerpo control anti-CD7 (0,2 µg/ml, clon 3A1). Después fueron incubadas junto a células T CD8⁺ (E:T ratios 20:1 a 1,25:1) durante 4 horas. La radioactividad presente en el sobrenadante se midió mediante un contador de radiación gamma.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y de forma ciega. El Cr⁵¹ liberado fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{(Muestra liberada – Liberación espontánea)}}{\text{(Máximo liberado – Liberado espontáneo)}} \times 100$$

Paralelamente, las muestras fueron testadas utilizando un ensayo de degranulación descrito previamente por *Muntasell y cols., 2010*. De forma resumida, se trata de un ensayo en el que las células T CD8⁺ fueron incubadas

junto a células P815 marcadas con el anticuerpo anti-CD3 (E:T ratio 5:1) en presencia de 1 μ g de anticuerpo anti-CD107/anti-FITC y 5 ng/ml de monensina durante 4 horas a 37°C con 5% de CO₂. Después, las células fueron teñidas utilizando un anticuerpo anti-CD8-PE y se analizaron por citometría de flujo. Para detectar la degranulación espontánea se leyó también la muestra de células P815 marcada con anticuerpo control anti-CD7, 3A1.

APARTADO 15-DETECCIÓN DEL GENOMA DEL EBV

Reactivos, material y equipamiento

<i>Reactivos y Material</i>	
Tubos BD Vacutainer SST	BD Diagnostics
Kit Artus EBV RG PCR	Qiagen
Puntas con Filtro ART (varios volúmenes)	VWR International
Pipetas Research (volumen variable)	Eppendorf
Tubos 1,5 ml	Eppendorf
<i>Equipamiento</i>	
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Centrífuga RT 6000 D	Sorvall
NucliSens easyMAG™	Biomerieux-diagnostics
Smartcycler II	Cepheid

Protocolo

Se aisló el ADN de 1×10^6 PBMCs de los 10 pacientes incluidos en el estudio de citometría usando para ello el sistema automático NucliSens easyMAG. Una vez extraído el ADN, se realizó una PCR cuantitativa utilizando el kit Artus EBV RG PCR con el fin de conocer la carga de genoma viral de los pacientes gracias a la amplificación específica de una zona de 97 nucleótidos incluida en el genoma del EBV. Se utilizaron 10 μ l de las muestras de ADN que se mezclaron con 15 μ l de master mix que contenía dNTPs, cebadores, sondas, $MgCl_2$, ADN Taq polymerase, y un control interno necesario para identificar la posible inhibición de la PCR. Acto seguido se realizó la

amplificación utilizando para ello el Smartcycler II real-time PCR. Además se preparó una curva estándar, con soluciones estándar calibradas comerciales, para 50.000, 5.000, 500, 50, y 5 copias. El límite de detección del ensayo se estableció en 5.000 copias/ml.

**APARTADO 16-EXPRESIÓN EN PBMCS DE PRF1 POR SEXOS
EN CONDICIONES BASALES E INDUCIDAS MEDIANTE
HORMONAS SEXUALES**

Reactivos, material y equipamiento

<i>Reactivos y material</i>	
PerCP-conjugated mouse anti-human CD3	Becton Dickinson
FITC-conjugated mouse anti-human CD8	Becton Dickinson
FITC-conjugated mouse anti-human CD16	Becton Dickinson
FITC-conjugated mouse anti-human CD56	Becton Dickinson
PE-conjugated mouse anti-human perforin	Becton Dickinson
FITC-conjugated mouse IgG1 isotype control	Becton Dickinson
PE-conjugated mouse IgG1 isotype controls	Becton Dickinson
PerCP-conjugated mouse IgG1 isotype control	Becton Dickinson
Tubos BD Vacutainer SST	BD Diagnostics
FACS Lysing solution	Becton Dickinson
D-PBS	Invitrogen
Intrastain	Dako
Medio phenol-red-free RPMI 1640	Gibco
Charcoal Stripped FBS	Gibco
Dihidrotestosterona	Sigma
Estradiol	Sigma

Etanol 70%	Panreac
Tubo para citómetro	Becton Dickinson
Dispensador de líquidos	Pressmatic
Puntas con Filtro ART (varios volúmenes)	VWR International
Pipetas Research (volumen variable)	Eppendorf
Tubos 1,5 ml	Eppendorf
<i>Equipamiento</i>	
Citómetro FACS Canto	Becton Dickinson
Programa DIVA	Becton Dickinson
Agitador vibrador de tubos	Heidolph
Centrífuga RT 6000 D	Sorvall

Protocolo

La tinción para la detección de proteína PRF1 en células T CD8⁺ y células NK mediante citometría de flujo se hizo de la misma forma y utilizando los mismos anticuerpos marcados que en el estudio de citometría explicado previamente. Para disminuir la variación producida por las hormonas endógenas de los individuos incluidos, todos los estudios de determinación de PRF1 en mujeres se hicieron en PBMCs de sangre periférica recogida durante los primeros 10 días del ciclo menstrual.

ANEXO 2

Referencias de los artículos incluidos en la copia impresa

Camiña-Tato M, Morcillo-Suárez C, Bustamante MF, Ortega I, Navarro A, Muntasell A, López-Botet M, Sánchez A, Carmona P, Julià E, Tortola MT, Audí L, Oksenberg JR, Martín R, Montalban X, Comabella M. Gender-associated differences of perforin polymorphisms in the susceptibility to multiple sclerosis. *J Immunol.* 2010;185(9):5392-404.

Camiña-Tato M, Fernández M, Morcillo-Suárez C, Navarro A, Julià E, Edo MC, Montalban X, Comabella M. Genetic association of CASP8 polymorphisms with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010;222(1-2):70-5.

Camiña-Tato M, Morcillo-Suárez C, Navarro A, Fernández M, Horga A, Montalban X, Comabella M. Genetic association between polymorphisms in the BTG1 gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009 Aug 18;213(1-2):142-7.