

# Genética de la esclerosis múltiple: Papel del HLA-DRB1 en la susceptibilidad y expresión fenotípica

Lucía Romero Pinel

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
**FACULTAT DE MEDICINA**

**GENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE:  
PAPEL DEL HLA-DRB1 EN LA SUSCEPTIBILIDAD  
Y EXPRESIÓN FENOTÍPICA**

Tesis Doctoral presentada por  
Lucía Romero Pinel para acceder al grado  
de Doctor en Medicina y Cirugía

Barcelona, Septiembre de 2010

Directores de Tesis:

Dr. Txomin Arbizu Urdiain      Dr. Sergio Martínez-Yélamos



**TXOMIN ARBIZU URDIAIN,**

Profesor Asociado de Medicina de la Universidad de Barcelona,

Y

**SERGIO MARTÍNEZ-YÉLAMOS,**

Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Barcelona,

CERTIFICAMOS que la memoria titulada

**“GENÉTICA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE:**

**PAPEL DEL HLA-DRB1 EN LA SUSCEPTIBILIDAD**

**Y EXPRESIÓN FENOTÍPICA”,**

presentada por Lucía Romero Pinel, ha sido realizada bajo

nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones

necesarias para ser defendida ante el Tribunal correspondiente

para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Dr. Txomin Arbizu Urdiain

Dr. Sergio Martínez-Yélamos



## ABREVIATURAS

APC.....	Antigen Presenting Cell / Célula presentadora de antígeno
BOC .....	Bandas oligoclonales
CMH.....	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
EDMUS.....	European Database for Multiple Sclerosis
EDSS.....	Expanded Disability Severity Scale
EDTA.....	Ácido etilendiaminotetraacético
EM.....	Esclerosis múltiple
EMPP.....	Esclerosis múltiple primaria progresiva
EMRR.....	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EMSP.....	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
EVI5.....	Ecotropic viral integration site 5
GAMES.....	Genetic Analysis of Multiple Sclerosis in Europeans
GWAS.....	Genome-wide association studies.
HLA.....	Human leukocyte antigen / Antígeno leucocitario humano
IgG.....	Inmunoglobulina G
IL2R $\alpha$ .....	Receptor alfa de la interleuquina 2
IL7R $\alpha$ .....	Receptor alfa de la interleuquina 7
KIF1B.....	Kinesin family member 1B
Kpb.....	Kilo pares de bases
LCR.....	Líquido cefalorraquídeo
Mpb.....	Mega pares de bases
NAA.....	N-acetil-aspartato
OR.....	Odds Ratio
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-SSP.....	PCR específica de secuencia
RM.....	Resonancia magnética
TNF.....	Tumoral necrosis factor / Factor necrosis tumoral
VEB.....	Virus Epstein-Barr



## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación e interés actual del tema.....	15
1.2. Agregación familiar en esclerosis múltiple.....	17
1.2.1. Estudios de epidemiología genética.....	18
1.3. Marcadores genéticos y esclerosis múltiple.....	22
1.4. HLA y esclerosis múltiple.....	24
1.4.1. Sistema HLA.....	24
1.4.2. HLA y susceptibilidad a esclerosis múltiple.....	29
1.4.3. HLA DR2 y esclerosis múltiple.....	30
1.4.4. HLA y esclerosis múltiple en diferentes poblaciones.....	34
1.4.5. HLA y esclerosis múltiple en la población española.....	39
1.4.6. HLA y fenotipo clínico.....	42
1.4.7. HLA y factores paraclínicos.....	47
1.4.8. Epistasis genética.....	49
1.4.9. Interacción HLA y factores ambientales.....	51

### 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis.....	55
2.2. Objetivos.....	57

### 3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Pacientes y controles.....	61
3.2. Metodología.....	65



**4. RESULTADOS**

4.1. Trabajo 1: Anticipación en la edad de inicio de la enfermedad en pacientes con esclerosis múltiple familiar.....	73
4.2. Trabajo 2: Estudio del gen HLA-DRB1 en una población española con esclerosis múltiple: susceptibilidad genética y progresión de la discapacidad.....	79
4.3. Trabajo 3: Epistasis entre los alelos parentales del gen HLA-DRB1 en una cohorte española con esclerosis múltiple.....	87
4.4. Trabajo 4: Asociación del alelo HLA-DRB1*15 y bandas oligoclonales IgG en una cohorte española con esclerosis múltiple.....	95

**5. DISCUSIÓN**

5.1. Discusión general.....	113
5.2. Limitaciones del estudio.....	126
5.3. Consideraciones finales.....	127

**6. CONCLUSIONES..... 133****7. BIBLIOGRAFÍA..... 137**

---

## 1. INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. JUSTIFICACIÓN E INTERÉS ACTUAL DEL TEMA

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica del sistema nervioso central, de carácter autoinmune en la que se produce desmielinización asociada a daño axonal<sup>1</sup>. En el curso inicial de la enfermedad se produce inflamación transitoria seguida de remielinización, procesos que disminuyen a medida que la enfermedad avanza. Esto da lugar a que en la mayoría de los pacientes el inicio de la enfermedad se caracterice por episodios neurológicos que suelen remitir en mayor o menor grado y que en etapas posteriores se produzca una progresiva acumulación de discapacidad.

Se trata de la enfermedad neurológica que con una mayor prevalencia afecta a adultos jóvenes, con una edad de inicio típicamente entre los 20 y los 40 años. Se considera la segunda causa de discapacidad en este grupo de edad, tras los traumatismos por accidentes de tráfico, y da lugar, por tanto, a un importante impacto socio-económico y en especial a una pérdida en la calidad de vida tanto de los pacientes como de su entorno<sup>2</sup>.

La etiología es compleja y, aunque permanece desconocida, se sabe que es debida a la interacción de múltiples factores tanto genéticos como ambientales<sup>3-5</sup>. En la EM, como en otras enfermedades autoinmunes, es conocida su asociación genética con

el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)<sup>6</sup>. A pesar de que esta asociación fue descrita hace más de 30 años<sup>7</sup> y que numerosos estudios han sido realizados desde entonces, no se conocen con exactitud los mecanismos por los que el CMH, también conocido como HLA (*Human Leukocyte Antigen*), y en especial la región de clase II del mismo, incrementa la susceptibilidad a padecer la enfermedad.

Los múltiples estudios genéticos llevados a cabo en este sentido en los últimos años se han visto favorecidos por los avances en genética molecular pero a la vez dificultados por la heterogeneidad que caracteriza a una enfermedad con una penetrancia incompleta y una herencia poligénica. Además de la región correspondiente al HLA, otras regiones del genoma humano han sido demostradas, a raíz de amplios estudios de asociación realizados, como factores con cierta influencia en la predisposición a padecer la enfermedad aunque en menor medida que los correspondientes al HLA<sup>8-11</sup>. En el momento actual, se están realizando múltiples investigaciones acerca del concepto de epistasis, entendiendo éste como las interacciones genéticas o genético-ambientales que pueden influir en la expresión de un gen<sup>12</sup>.

En este contexto tanto los estudios con pacientes con formas familiares de la enfermedad como los estudios de factores genéticos y/o ambientales que pueden influir en la susceptibilidad a padecer la enfermedad así como en su expresión fenotípica son necesarios para profundizar en el conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos de la misma. Un conocimiento en profundidad de la genética y la

patogenia de la enfermedad nos permitiría establecer nuevas estrategias diagnósticas, terapéuticas e incluso preventivas.

## 1.2. AGREGACIÓN FAMILIAR EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La agregación familiar de la EM fue ya reconocida a finales del siglo XIX<sup>13</sup> y ésta ha sido bien documentada en los últimos años gracias a los estudios de epidemiología genética<sup>14</sup>. Con ello se ha demostrado la existencia de una susceptibilidad genética a padecer la enfermedad y se cree que ésta viene dada por una interacción heterogénea de múltiples genes independientes<sup>4,15</sup>. Se ha defendido la posibilidad de que en las familias con una alta recurrencia de casos actuaran un conjunto de pocos genes<sup>15</sup>, pero recientemente se ha especulado también con la hipótesis de una mayor agregación de alelos que incrementan la susceptibilidad a padecer EM en estas familias<sup>16</sup>.

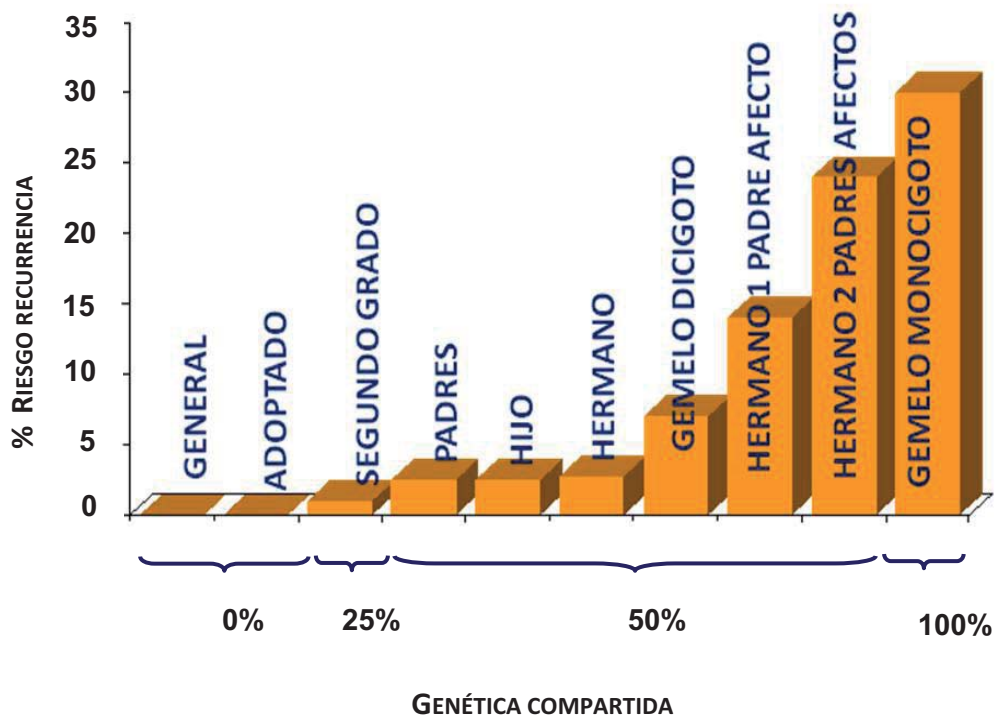
El estudio de las familias con varios pacientes con EM se ha llevado a cabo mayoritariamente con vistas a identificar los marcadores genéticos que pudieran ser transmitidos junto con la enfermedad. Así mismo también se ha estudiado si determinadas características clínicas se ven influenciadas por el hecho de tener más familiares con la enfermedad o si hay concordancia clínica entre los familiares de una misma familia. En el momento actual, está aún por demostrar que las formas familiares de EM tengan una particular historia natural debido a la influencia de factores genéticos o ambientales compartidos<sup>17,18</sup>.

### 1.2.1. ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA

Tal y como se ha comentado, han sido llevados a cabo numerosos estudios de epidemiología genética tanto familiares como poblacionales<sup>8,14,19</sup>. Los estudios familiares demuestran una alta prevalencia en familiares de primer grado con una relación directamente proporcional con el grado de parentesco, entendido como el grado de genes compartidos. El mayor riesgo relativo se ha observado en gemelos<sup>20</sup> y se han demostrado diferencias entre hermanos y hermanastros<sup>21</sup>. Los estudios poblacionales muestran una prevalencia de EM familiar que varía desde un 10% aproximadamente en estudios del sur de Europa<sup>22</sup> incluyendo los 3 estudios de estas características realizados en España<sup>23-25</sup> hasta un 20% en los estudios realizados en Canadá<sup>26,27</sup>.

En 1988 se publicaron los primeros resultados de una serie de estudios canadienses, sistematizados y ajustados por edad, del riesgo de recurrencia para los familiares de pacientes con EM<sup>27</sup>. En dichos estudios se halló que alrededor de un 20% de pacientes tenían algún familiar afectado. Se demostró así que en los familiares de pacientes el riesgo de padecer EM era mayor que en la población general. En estudios posteriores se demostró que además dicho riesgo se incrementaba según el grado de parentesco, siendo éste del 3-5%, ajustado por edad, en los familiares de primer grado y del 1% en los de segundo grado<sup>28,29</sup> (Figura 1). Además estas tasas se veían influenciadas por determinados factores. Así por ejemplo el sexo, la edad de inicio o el hecho de tener un progenitor afecto podía modificar el riesgo en

los hermanos<sup>30</sup>. Estos datos han sido confirmados por estudios posteriores realizados en otras poblaciones como, por ejemplo, en el Reino Unido<sup>31</sup>, Bélgica<sup>32</sup> o Cerdeña<sup>33</sup>.



**FIGURA 1.** Riesgo de recurrencia para familiares de pacientes con esclerosis múltiple en función del grado de genética compartida, modificado de Compston y Coles, 2002<sup>29</sup>.



Los estudios con gemelos, aunque con inevitables sesgos metodológicos, han sido de vital importancia en el estudio y evaluación de la contribución de factores genéticos y factores ambientales en la etiopatogenia de la enfermedad<sup>34</sup>. La mayoría de estos estudios han coincidido en demostrar una tasa de concordancia en gemelos monocigotos de aproximadamente el 25% y en dicigotos del 3% al 7%<sup>20,35</sup>.

Por otro lado, los estudios con personas adoptadas han demostrado que, aunque éstas hayan crecido desde la infancia junto a pacientes afectos de EM, no presentan un mayor riesgo de padecer la enfermedad que la población general<sup>36</sup>. Estos datos apoyan el hecho de que un mayor riesgo en los familiares se debe a factores genéticos más que a ambientales.

Del mismo modo, los estudios con hermanastros han resultado un método muy útil para evaluar el efecto parental específico así como para estimar la función relativa de los genes y del ambiente. Un estudio realizado en Canadá con una amplia serie de pacientes demostró que el riesgo en hermanastros era del 1,32%, significativamente menor que en hermanos de padre y madre, en los que el riesgo era del 3,46%<sup>37</sup>. No se demostraron diferencias cuando se evaluó si los individuos habían crecido o no juntos. Tampoco se hallaron diferencias en dicho estudio cuando se comparaba si los hermanastros lo eran de padre o de madre. Sin embargo, años más tarde, cuando se amplió esta misma serie, se demostró un mayor riesgo en los hermanastros con la misma madre en comparación con los que

compartían el mismo padre<sup>21</sup>. Este resultado sugiere un mayor efecto de los genes maternos o factores ambientales que estarían más representados en las madres.

Aunque los estudios sobre parejas en las que ambos cónyuges tienen EM no abundan en la literatura, en los registros publicados hasta el momento<sup>38,39</sup> no se ha demostrado un mayor riesgo por el hecho de tener el cónyuge afectado respecto a la población general. Sin embargo, el riesgo de los hijos con ambos progenitores afectados es mucho mayor que el de los hijos de un solo progenitor afecto (31% versus 2,7%)<sup>39</sup>. En un estudio posterior realizado también por el grupo canadiense se objetivó un riesgo de recurrencia elevado (9%) en hermanos con padres cosanguíneos<sup>40</sup>. Esto apoyaría el concepto que la interacción de determinados genes a nivel parental incrementa el riesgo de EM.

En resumen, teniendo en cuenta el riesgo en gemelos, adoptados, hermanastros, cónyuges e hijos de padres afectados, debemos asumir que la interacción de múltiples genes aumenta el riesgo a padecer la enfermedad. Por otra parte no se han detectado datos que apoyen el riesgo de transmisión de la EM mediante el contacto habitual familiar.

### 1.3. MARCADORES GENÉTICOS Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los estudios realizados en los últimos años en busca de genes asociados con la enfermedad han llevado a resultados múltiples y heterogéneos<sup>4</sup>. Los genes asociados con la enfermedad están mayoritariamente codificados en la región del CMH localizado en el cromosoma 6p21, pero no sólo en dicha localización<sup>8,10,11,41</sup>. Así, los estudios de genética molecular nos han proporcionado el conocimiento de muchos otros genes y regiones genéticas que incrementan la susceptibilidad a padecer EM<sup>9</sup>. Los ejemplos más notables de estas otras regiones son los genes que codifican para el receptor alfa de la interleuquina 7 (*IL7R $\alpha$* ), el receptor alfa de la interleuquina 2 (*IL2R $\alpha$* )<sup>42</sup>, *ecotropic viral integration site 5 (EVI5)*<sup>43</sup> y *kinesin family member 1B (KIF1B)*<sup>44</sup>.

La mayoría de los análisis realizados se han basado en estudios de asociación de genes candidatos, en los cuales, la frecuencia de marcadores alélicos son comparados en pacientes y en controles, y las diferencias analizadas estadísticamente. Estos marcadores se basan sobre todo, hoy en día, en polimorfismos de un solo nucleótido. Se sabe que estos estudios requieren el mayor número posible de casos para obtener los mejores resultados. Pero la mayoría de los estudios de asociación no han sido efectivos a pesar de haberse examinado más de 100 genes candidatos<sup>41</sup>. En la mayoría de los casos el fracaso en demostrar asociación se ha atribuido al estudio de muestras de pequeño tamaño para detectar efectos de ligeros a moderados que estos genes podrían tener en la EM<sup>9</sup>.

Los estudios de ligamiento en familias con varios miembros afectados se consideraron hace unos años una importante base para identificar marcadores genéticos utilizando polimorfismos de microsatélites que se transmitían junto con el rasgo de la enfermedad. Se realizaron varios estudios de este tipo tanto en EEUU, como en Canadá, Reino Unido y Finlandia<sup>45-48</sup>. Inicialmente se identificaron con estos estudios 70 regiones genómicas con una potencial implicación en la EM, pero posteriormente no se han replicado la mayoría de estos resultados<sup>49</sup> y se ha seguido demostrando la región correspondiente al CMH como la que de manera más consistente se asocia con la enfermedad<sup>50</sup>.

En los últimos años, las nuevas innovaciones en tecnología han permitido realizar los llamados “cribados genómicos aleatorios” entre los que destaca el estudio GAMES (*Genetic Analysis of Multiple Sclerosis in Europeans*) que coordinó los cribados genómicos, de ligamiento y asociación, realizados en 19 poblaciones de Europa y Australia incluyendo 9.629 individuos y en el que se analizaron más de 6.000 marcadores genéticos<sup>51</sup>. A pesar del esfuerzo realizado tan sólo 18 regiones genómicas fueron identificadas en relación con la EM y 5 de ellas correspondieron a loci del CMH. El avance constante tecnológico ha permitido que en los últimos tres años estén emergiendo estudios genómicos de asociación (*GWAS/genome-wide association studies*) que analizan cientos de miles de marcadores a la vez y que nos han confirmado, por ejemplo, la asociación con IL7R $\alpha$  y con IL2R $\alpha$ <sup>10,11,42,52</sup>.

## 1.4. HLA Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE

### 1.4.1. SISTEMA HLA

El sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) o antígeno leucocitario humano hace referencia al conjunto de glicoproteínas de membrana que determinan la especificidad del reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T. Los genes que codifican estas glicoproteínas se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (región 6p21.3), en un complejo génico denominado complejo principal o mayor de histocompatibilidad (CMH). Este complejo génico también se denomina indistintamente región genética HLA, aunque en realidad este término debiera reservarse para las glicoproteínas presentadoras de antígeno. Tradicionalmente se ha considerado que comprende 3,5 mega pares de bases (Mpb).

En la última década, gracias a la secuenciación automática, se ha ido mejorando el conocimiento del CMH. En 1999 se obtuvo el primer mapa genético del CMH<sup>53</sup> y en el año 2003 se consiguió la secuencia completa de todo el cromosoma 6<sup>54</sup>. Estos avances han permitido llegar al concepto de CMH extenso, que comprende 7.6 Mpb e incluye el CMH clásico y se extiende 2 Mpb más en dirección centromérica y 2 Mpb en dirección telomérica. Contiene 421 loci, de los cuales 252 (60%) son expresados y la mayoría de éstos tienen una función inmunológica principalmente relacionada con el procesamiento y presentación de antígenos<sup>55</sup>.

El CMH clásico se divide en tres regiones según la funcionalidad de sus productos (Figura 2).

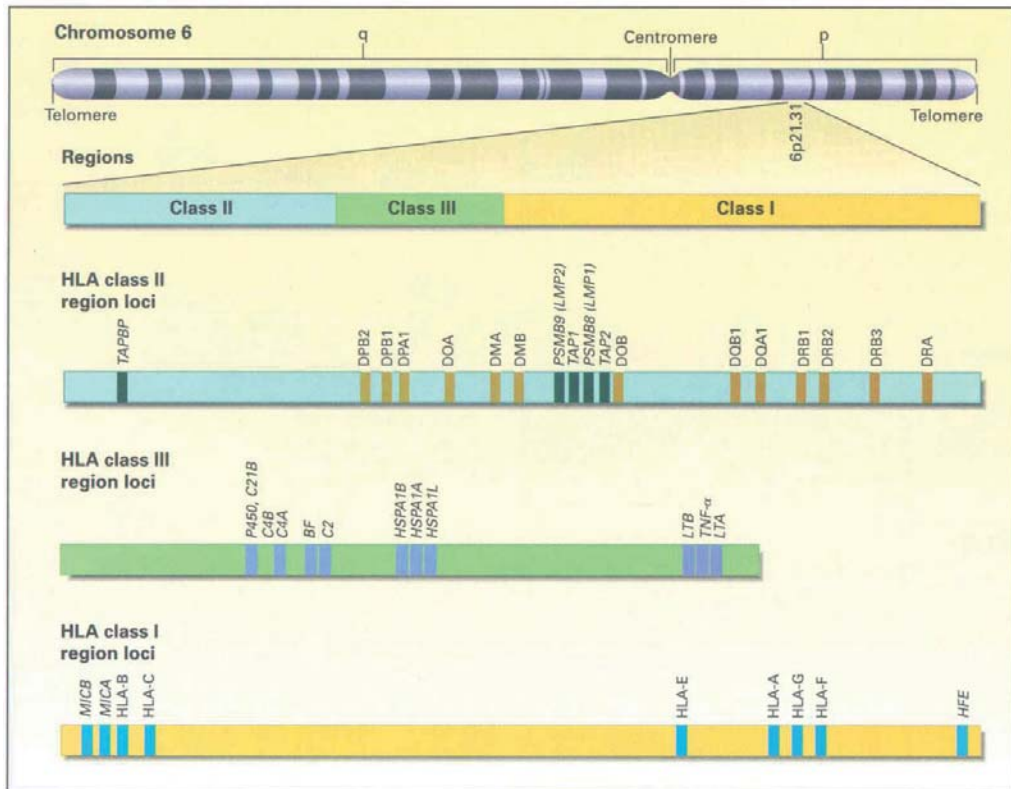


FIGURA 2. Localización y organización del CMH en el cromosoma 6, tomado de Klein y Sato, 2000<sup>56</sup>.

a) Región de clase I: Se extiende 1,8 Mpb, es la más telomérica y contiene los loci que codifican para la cadena  $\alpha$  de las tres moléculas de clase I principales: HLA-A, HLA-B y HLA-C. Estas moléculas se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, están unidas a la  $\beta$ 2-microglobulina, y funcionan como presentadores de antígeno a los linfocitos T CD8+ citotóxicos. A parte de las moléculas clásicas (A,B,C) hay otros loci que codifican para las moléculas HLA-E,

HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J y HLA-X, que son menos polimórficas y tienen una expresión más restringida de tejido.

b) Región de clase II: Se extiende 800 kilo pares de bases (Kpb), es la más centromérica del MHC. Se hallan los loci codificantes de las moléculas HLA de clase II: las principales son HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Estas moléculas se expresan en la membrana de las células presentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells, APC*) y presentan los antígenos a los linfocitos T CD4+. Las moléculas de clase II están formadas por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  y los genes que codifican para ambas cadenas se encuentran en la región de clase II. Se les denomina con el nombre del locus seguido de "A" o "B" (DRA y DRB) en función de si codifican para la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  respectivamente.

c) Región de clase III: Se extiende 730 Kpb y se encuentra entre las dos anteriores. Encontramos loci que codifican para funciones diversas como son los componentes del sistema del complemento o bien genes como el del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). A diferencia de las regiones de clase I y II, no encontramos loci que codifiquen para moléculas presentadoras de antígeno.

El CMH tiene una serie de características génicas que diferencia esta región del resto del genoma:

- El fuerte desequilibrio de ligamento: que da lugar a que diferentes loci de esta región se hereden en bloques o haplotipos<sup>57</sup>. Su tasa de recombinación es más baja que la mediana del genoma<sup>58</sup>.

- La duplicación génica o paralogía: ya que existen diferentes copias del mismo gen. Se han encontrado tres regiones parálogas del CMH en los cromosomas 1, 9 y 19. A la vez, dentro del propio CMH se encuentran diversos genes parálogos<sup>55</sup>.

- Polimorfismo: El polimorfismo junto con la paralogía aumentan en gran modo la variabilidad del CMH. El grado de polimorfismo que encontramos en el CMH es muy elevado, tal y como demuestra el gran número de alelos descritos según la *European Bioinformatics Institute IMGT/HLA Database*<sup>59</sup> ([www.ebi.imgt.org/hla](http://www.ebi.imgt.org/hla)) a fecha de Julio de 2010 (Tabla 1).

GENES	HLA CLASE I			HLA CLASE II		
	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Nº ALELOS	1.193	1.800	829	809	112	141

**TABLA 1.** Número de alelos de clase I y clase II (de los 3 loci más polimórficos).



El polimorfismo que encontramos en las moléculas CMH, tanto de clase I como de clase II, se centra en la región de unión al antígeno y esto conlleva una especificidad de unión al antígeno por parte de las diferentes moléculas HLA. Esta variabilidad es esencial en el rechazo que se puede producir en un trasplante así como en la susceptibilidad a un buen número de infecciones y de enfermedades autoinmunes<sup>60</sup>.

Los avances en las técnicas de biología molecular, principalmente desde el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han permitido llegar a la tipificación de alta resolución de los polimorfismos en los genes HLA. De este modo se ha ido describiendo un número cada vez mayor, y aún en el momento actual creciente, de alelos. Esta tipificación de alta resolución tiene una nomenclatura específica. El *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* fija las normas de nomenclatura y clasifica los nuevos alelos descritos<sup>61</sup>. Este sistema de nomenclatura consiste en el nombre del locus seguido por un asterisco y después hasta un total posible de ocho dígitos numéricos. Los dos primeros dígitos hacen referencia a la familia alélica y los dos siguientes a la variante alélica dentro de la misma familia. En caso de haber más dígitos, el quinto y el sexto hacen referencia a que el alelo presenta variantes que no provocan cambios de aminoácidos en la proteína y el séptimo y el octavo a que se han descrito polimorfismos en zonas no codificantes. Desde Abril de 2010 se añaden dos puntos (:) entre cada par de dígitos.

En la tipificación serológica o de baja resolución el nombre no se sigue de asterisco, sino únicamente de los dígitos de la familia alélica. Aunque la mayoría de laboratorios hoy en día utilizan métodos de tipificación a nivel génico, existe todavía un número significativo de registros que han sido realizados mediante técnicas serológicas<sup>62</sup>.

#### 1.4.2. HLA Y SUSCEPTIBILIDAD A ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Hasta ahora los genes del sistema HLA han sido los marcadores genéticos que de una manera más consistente y reiterada se han relacionado con la predisposición a padecer EM. Este hecho se ha confirmado en numerosos estudios ya desde 1972<sup>7</sup>, cuando se describió la asociación con los alelos HLA A3 y B7. Posteriormente, al progresar el conocimiento del sistema HLA y pasar del tipaje serológico a los métodos celulares y moleculares, más precisos, se ha ido perfilando mejor la asociación de la enfermedad con el sistema HLA. Se demostró que la asociación con el alelo HLA-A3 era secundaria a su desequilibrio de ligamiento con HLA-B7 y la asociación de éste con la esclerosis múltiple a su vez secundaria a su desequilibrio de ligamiento con los alelos de clase II HLA-DR2 y DQw6<sup>63</sup>. Estos alelos han sido posteriormente reclasificados como DR15 y DQ6, subtipos de DR2 y DQw6 respectivamente. En realidad, se corresponden con la expresión fenotípica del haplotipo DR2 (HLA-DRB5\*0101-DRB1\*1501-DQB1\*0602)<sup>64</sup>. Aunque la mayoría de haplotipos relacionados con la EM, sobre todo en las poblaciones caucásicas, incluyen el alelo HLA-DRB1\*1501, otros alelos HLA-DRB1 han sido también

asociados con la enfermedad, como factores de riesgo o también como protectores<sup>65,66</sup>.

Entre otras asociaciones halladas, aunque con menor potencia que la anterior, parecen tener importancia los haplotipos HLA-DR3 y HLA-DR4 en poblaciones del área mediterránea así como en las Islas Canarias<sup>67-69</sup>. Por ejemplo, en Cerdeña la asociación es predominante con los alelos HLA-DRB1\*0301, HLA-DRB1\*0405 y HLA-DRB1\*1303<sup>70</sup>.

Estudios recientes sugieren que regiones del HLA de clase I también tendrían un papel primario en la susceptibilidad a padecer EM<sup>71-73</sup>. Sin embargo, actualmente se considera que la asociación genética más consistente con la EM ha sido demostrada con la región HLA de clase II y en particular con el haplotipo HLA-DR2<sup>74</sup>.

### **1.4.3. HLA DR2 Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Hoy en día, se sabe que el haplotipo que con mayor frecuencia y consistencia se ha asociado con EM es el DR2 o DR15 (DRB1\*1501-DRB5\*0101-DQB1\*0602)<sup>74-77</sup>. Este haplotipo se ha asociado también con otras enfermedades como la narcolepsia o el lupus eritematoso sistémico. Se ha demostrado una fuerte asociación de la EM con este haplotipo, con un riesgo relativo de 2-4<sup>8</sup>. El riesgo puede llegar a ser mucho mayor (>10) para los homocigotos<sup>78</sup>. Este patrón de asociación es el habitualmente encontrado en poblaciones de origen caucásico, habiéndose objetivado asimismo

en la mayoría de otros grupos étnicos estudiados. Se puede hallar presente hasta en el 60% de los pacientes caucásicos con EM y tan sólo en el 20-30% de los individuos no afectados<sup>79</sup>.

Este haplotipo contiene tres genes asociados, DRB5\*0101, DRB1\*1501, y DQB1\*0602, que codifican para las cadenas  $\beta$  de las moléculas HLA de clase II DR2a, DR2b y DQ6, respectivamente. El intenso desequilibrio de ligamiento en esta región ha dado lugar a dificultades a la hora de dilucidar si el gen que está primariamente asociado con EM es el HLA-DRB1 o el HLA-DQB1<sup>74</sup>, especialmente con las poblaciones europeas y sobre todo norte-europeas. En todos los grupos étnicos estudiados, DRB1\*1501 y DRB5\*0101 son prácticamente inseparables. Este desequilibrio de ligamiento es menos pronunciado para DQ6. Estudios realizados con poblaciones afroamericanas, en las que existe una mayor diversidad haplotípica y el HLA-DRB1\*1501 y HLA-DQB1\*0602 no se hallan siempre en el mismo haplotipo, demostraron una asociación de la enfermedad con HLA-DRB1 independiente de HLA-DQB1\*0602<sup>80</sup>.

Dado que DRB1\*1501 y DRB5\*0101 se heredan juntos por desequilibrio de ligamiento, no ha sido posible establecer de una manera concluyente cuál de ellos es el principal factor de riesgo y qué papel exacto juega cada uno de ellos en la etiopatogenia de la enfermedad. En un estudio reciente con ratones transgénicos con EM se mostró que existía una interacción epistática funcional entre ambos alelos<sup>79</sup>.

En cuanto a los estudios de casos y controles en los que se relaciona el haplotipo DR2 con la EM, prácticamente todos los que analizan la asociación con el alelo DRB1\*1501 muestran una frecuencia significativamente mayor en los pacientes respecto a los controles, incluso en determinadas poblaciones con una prevalencia baja de DRB1\*1501<sup>77,80</sup>. Además, en estudios con poblaciones de Europa y de América del Norte se ha objetivado un riesgo mayor en homocigotos que en heterocigotos<sup>78,81</sup> para este alelo, el cual parece ser transmitido con mayor probabilidad por vía materna<sup>82</sup>.

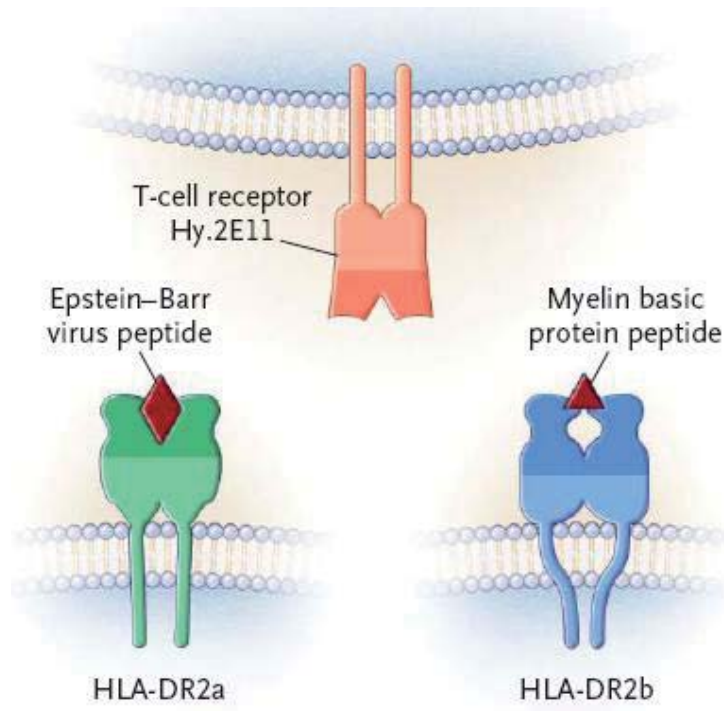
En la mayoría de los estudios en los que se evaluó la asociación de la enfermedad con el alelo DQA1\*0102, se detectó una mayor prevalencia en los pacientes que en los controles, sin embargo, en algunos de estos estudios esta asociación no alcanzó significación estadística<sup>68,83</sup>.

En los estudios con familias, los resultados fueron consistentes con los hallados en los de casos y controles<sup>77</sup>. En diferentes investigaciones, tanto de casos y controles como de ligamiento en familias, se ha demostrado que la asociación con HLA de clase II está presente tanto en EM esporádica como familiar<sup>84,85</sup>.

Las moléculas HLA de clase II están implicadas en la presentación de los péptidos derivados de la mielina a los linfocitos T CD4+ y se ha demostrado la presencia de complejos DRB1\*1501-proteína básica de la mielina (PBM) (85-99) en lesiones crónicas y activas de pacientes DR2 positivos<sup>86</sup>. Además se ha demostrado que en los pacientes con DRB1\*1501 se halla un menor porcentaje de células T CD4+CD25

en LCR, lo cual reflejaría una menor concentración de células reguladoras<sup>87</sup>. Este hecho se da junto con niveles mayores de inflamación en LCR, reflejado por una mayor síntesis de IgG y niveles elevados de actividad de metaloproteinasa-9<sup>88</sup>. Esta exacerbación de la inflamación a nivel intratecal junto con la alteración de la activación de células T podría implicar un incremento de susceptibilidad a padecer EM en presencia del alelo DRB1\*1501. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que otras moléculas (como por ejemplo, DRB5\*0101 y/o DQB1\*0602) pudieran estar también involucradas en respuestas autoinmunes que desencadenarían la EM.

El concepto de mimetismo molecular tendría también importancia en la etiopatogenia de la enfermedad en relación con el HLA-DR2. Se ha sugerido la necesidad en la EM de un antígeno determinado que junto con el HLA específico estimularía el receptor de la célula T desencadenando una respuesta inmune<sup>89,90</sup>. Este antígeno podría ser ambiental, como por ejemplo el virus Epstein-Barr, pero también podría estar genéticamente determinado. Se trata de un antígeno que al ser presentado por el HLA-DRB5\*0101 desencadenaría una respuesta cruzada, por el mismo tipo de célula T autorreactiva, con el péptido de la PBM presentado por el HLA-DRB1\*1501, debido a la similitud estructural entre la fracción de ambos antígenos que es presentada por el HLA (Figura 3).



**FIGURA 3.** Representación del concepto de mimetismo molecular en la EM.  
Tomado de Wekerle y cols. 2003<sup>90</sup>.

#### 1.4.4. HLA Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN DIFERENTES POBLACIONES

La asociación entre el sistema HLA y la EM varía en función de las etnias y características geográficas de las poblaciones estudiadas. El haplotipo HLA-DR15 es la región genética que se ha asociado de manera más consistente con la EM en la mayoría de poblaciones estudiadas, sobre todo en las de origen caucásico<sup>77</sup>, pero no es la única, tal y como se ha comentado.

La importancia de conocer la diversidad de asociaciones entre los haplotipos y/o alelos del sistema HLA con la EM en el mayor número posible de poblaciones radica en el hecho de que esto nos permitirá conocer mejor la etiopatogenia de la

enfermedad. Las diferencias entre poblaciones pueden deberse a diferencias genéticas como, por ejemplo, las diferentes frecuencias alélicas halladas de los diferentes genes del HLA. Pero también podrían deberse a diferencias ambientales geográficas que interaccionarían de diferente manera con el sistema HLA, comportando a la vez una susceptibilidad diferente a padecer la enfermedad por parte de los diferentes alelos. Por otro lado, el diferente patrón de desequilibrio de ligamiento hallado en las diferentes poblaciones ha permitido dilucidar qué alelos se asocian en mayor o menor medida con la enfermedad.

El alelo DRB1\*1501 es el que se ha asociado en mayor medida con la enfermedad, encontrándose en alrededor del 50% de poblaciones caucásicas estudiadas. El mayor riesgo asociado a este alelo se ha demostrado en series del norte de Europa<sup>91,92</sup>, aunque se han detectado también asociaciones muy significativas en poblaciones del area del Mediterráneo como en Italia Continental<sup>85</sup>, Sicilia<sup>93</sup>, Malta<sup>94</sup> o del sur de Europa, como sería el ejemplo de Portugal<sup>95</sup>. Del mismo modo se han hallado resultados significativos de asociación de la EM con DRB1\*1501 en poblaciones de América del Norte pero también del Sur de este continente<sup>96-98</sup>. Un estudio publicado recientemente con pacientes australianos también demostró una fuerte asociación de la EM con este alelo y ésta fue mayor para los homocigotos<sup>99</sup>. También se ha hallado el haplotipo HLA-DR15 con una mayor prevalencia en casos que en controles en poblaciones de afroamericanos<sup>80</sup>, judíos Ashkenazi y no Ashkenazi residentes en Israel<sup>100</sup>, así como indios asiáticos residentes en Inglaterra<sup>101</sup>. El estudio de las poblaciones afroamericanas ha permitido demostrar la asociación del HLA-DRB1\*15 independiente del alelo DQB1\*0602<sup>80</sup>. Al contrario



de lo hallado en poblaciones afrobrasileñas con una asociación significativa con DQB1\*0602, mientras DRB1\*1501 estaba sólo presente en una minoría de pacientes y de controles<sup>102</sup>. Sin embargo, en general el alelo DQB1\*0602, ha sido hallado, al igual que los otros dos alelos del haplotipo DR15, asociado a la enfermedad en las poblaciones europeas y caucásicas estudiadas<sup>77</sup>.

En un estudio con pacientes de origen turco se hallaron los haplotipos HLA-DR2 y HLA-DR4 asociados con la enfermedad<sup>68</sup>, éste último haplotipo se ha relacionado en varias poblaciones mediterráneas, como la de Cerdeña, en la que se halla asociación con los haplotipos HLA-DR4 y HLA-DR3. Estos haplotipos se corresponden con los alelos DRB1\*0405-DQA1\*0501-DQB1\*0301 y DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201<sup>67,70</sup>. Además en esta población también se ha correlacionado el alelo DRB1\*13 con la EM<sup>70</sup>. El clásico haplotipo HLA-DR2 es raro (1,5%) en Cerdeña<sup>103</sup> y por lo tanto contribuye poco en la susceptibilidad de la enfermedad en dicha población. Se trata de una población que se ha hallado históricamente aislada, por lo que posee una estructura genética que difiere en gran medida de otras poblaciones caucásicas.

Otro alelo que se ha relacionado con la susceptibilidad es el DRB1\*08 pero únicamente cuando se halla en conjunción con el DRB1\*15 en el otro alelo parental, tal y como se comentará más adelante al tratar el concepto de epistasis genética<sup>65,66,81</sup>.

Por otro lado, además de los factores de riesgo a padecer EM, también se han encontrado haplotipos y alelos del sistema HLA que protegerían de padecer la enfermedad en diferentes poblaciones caucásicas, como es el caso de los alelos DRB1\*01, \*09, \*10, \*11 y \*14, por sí mismo o debido a la epistasis con otros alelos<sup>65,66,104</sup> (Tabla 2).

Al estudiar poblaciones asiáticas nos encontramos con diferencias respecto a las occidentales. Entre los japoneses, se han reportado asociaciones con DR2 con la forma occidental de la enfermedad pero no con la óptico-espinal o forma asiática<sup>105,106</sup>. La forma óptico-espinal o forma asiática se asoció con los alelos DPA1\*0202 y DPB1\*0501<sup>107</sup>. Recientemente se ha publicado un estudio en el que el alelo DRB1\*15 interaccionaría con el DRB1\*09 para proteger de EM en pacientes sin anticuerpos antiacuaporina-4 y con el DRB1\*12 para aumentar el riesgo de EM en presencia de dichos anticuerpos<sup>108</sup>. Un estudio reciente publicado con población del Sur de China no objetiva asociación entre EM convencional y el alelo HLA-DRB1\*1501 y en cambio el alelo DPB1\*0501 y el haplotipo DRB1\*1602-DPB1\*0501 sí se mostrarían como factores de riesgo<sup>109</sup>. Aunque inicialmente se describieron varias asociaciones entre alelos DP y la EM en poblaciones como Noruega, Suecia, Japón y China, en estudios contemporáneos no se han confirmado la mayoría de ellas<sup>110</sup>.

ALELOS HLA-DRB1	AUTORES	POBLACIÓN	SUSCEPTIBILIDAD
<b>*01</b>	Dyment et al. 2005 (*01/15) <sup>65</sup>	Canadá	↓
	Ramagopalan et al. 2007 (*01/15) <sup>66</sup>	Canadá	↓
	Fernández et al. 2009 <sup>111</sup>	País Vasco	↓
<b>*03</b>	Marrosu et al. 1997 <sup>67</sup>	Cerdeña	↑
	Masterman et al. 2000 <sup>92</sup>	Suecia	↑
	Weatherby et al. 2001 <sup>112</sup>	UK	↑
	Dyment et al. 2005 <sup>65</sup>	Canadá	↑
	Silva et al. 2007 <sup>95</sup>	Portugal	↑
	Stankovich et al. 2009 <sup>99</sup>	Australia	↑
<b>*04</b>	Marrosu et al. 1997 <sup>67</sup>	Cerdeña	↑
<b>*07</b>	Masterman et al. 2000 <sup>92</sup>	Suecia	↓
	Ballerini et al. 2004 <sup>85</sup>	Italia	↓
	Wu et al. 2010 <sup>113</sup>	Australia	↓
<b>*08</b>	Dyment et al. 2005 (*08/15) <sup>65</sup>	Canadá	↑
	Barcellos et al. 2006 (*08/15) <sup>81</sup>	USA, UK, Italia, España	↑
	Ramagopalan et al. 2007 (*08/15) <sup>66</sup>	Canadá	↑
<b>*09</b>	Masterman et al. 2000 <sup>92</sup>	Suecia	↓
	Silva et al. 2007 <sup>95</sup>	Portugal	↓
	Matsuoka et al. 2008 <sup>114</sup>	Japón	↓
	Isobe et al. 2010 (*09/15) <sup>108</sup>	Japón	↓
<b>*10</b>	Ballerini et al. 2004 <sup>85</sup>	Italia	↑
	Dyment et al. 2005 <sup>65</sup>	Canadá	↓
	Ramagopalan et al. 2007 (*10/15) <sup>66</sup>	Canadá	↓
<b>*11</b>	Ramagopalan et al. 2007 <sup>66</sup>	Canadá	↓
	DeLuca et al. 2007 <sup>104</sup>	Canadá	↓
<b>*13</b>	Kwon et al. 1999 <sup>100</sup>	Israel	↑
	Marrosu et al. 2001 <sup>70</sup>	Cerdeña	↑
<b>*14</b>	Dyment et al. 2005 <sup>65</sup>	Canadá	↓
	Barcellos et al. 2006 <sup>81</sup>	US, UK, Italia, España	↓
	Ramagopalan et al. 2007 <sup>66</sup>	Canadá	↓
<b>*15</b>	Schmidt et al. 2007 (revisión) <sup>77</sup>	Caucásicos	↑
	Ramagopalan et al. 2009(revisión) <sup>74</sup>	Caucásicos	↑
	Kwon et al. 1999 <sup>100</sup>	Israel	↑
	Masterman et al. 2000 <sup>92</sup>	Suecia	↑
	Barcellos et al. 2002 <sup>96</sup>	América del Norte	↑
	Ballerini et al. 2004 <sup>85</sup>	Italia Continental	↑
	Oksenberg et al. 2004 <sup>80</sup>	Afroamericanos	↑
	Brassat et al. 2005 <sup>93</sup>	Sicilia	↑
	Silva et al. 2007 <sup>95</sup>	Portugal	↑
	Brum et al. 2007 <sup>97</sup>	Brasil	↑
	Dean et al. 2008 <sup>94</sup>	Malta	↑
	Stankovich et al. 2009 <sup>99</sup>	Australia	↑
	Patrucco et al. 2009 <sup>98</sup>	Argentina	↑
	Isobe et al. 2010 (*12/15) <sup>108</sup>	Japón	↑
	Isobe et al. 2010 (*09/15) <sup>108</sup>	Japón	↓
<b>*16</b>	Wu et al. 2009 <sup>109</sup>	China	↑

**TABLA 2.** Alelos HLA-DRB1 y susceptibilidad a padecer EM en diferentes poblaciones.

### 1.4.5. HLA Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA

En la población española aunque los estudios realizados sobre la asociación HLA y esclerosis múltiple son pocos, éstos han demostrado de forma mayoritaria asociación de la EM con el haplotipo DR2<sup>115-118</sup>.

Los primeros estudios realizados en España en busca de asociaciones entre el HLA y la esclerosis múltiple se realizaron hacia el final de los años 70 utilizando el tipaje serológico, que fue la técnica mayoritaria hasta la década de los 90 en que empezó a utilizarse la técnica molecular<sup>116</sup>. Los primeros estudios realizados en la población española con esclerosis múltiple no hallaron asociación significativa de la enfermedad con el antígeno HLA-DR2, aunque puede ser que esta falta de asociación fuera debido a la utilización de muestras de pequeño tamaño<sup>119,120</sup>. Al estudiar muestras mayores, en general, se demostró una asociación significativa con el DR2 tanto en estudios realizados con tipaje serológico<sup>115,121</sup> como molecular en los que la asociación fue mayoritaria con DR15/DQ6<sup>111,115,117,118,122-126</sup> (Tabla 3).

Algunos estudios recientes han demostrado una fuerte asociación con el alelo DQB1\*0602 en poblaciones españolas aunque de diferente origen antropológico entre ellas<sup>111,118,125</sup>. Se trata, por un lado de dos estudios realizados en Málaga, el primero de ellos demostró asociación con DRB1\*1501, DQA1\*0102 y DQB1\*0602 y en el modelo de regresión logística tan sólo el DQB1\*0602 mantuvo su asociación

REFERENCIA	Nº PACIENTES	REGIÓN HLA CLASE II & SUSCEPTIBILIDAD EM
Clerici et al. 1992 <sup>126</sup>	143	DR15-DQ6
Uría et al. 1993 <sup>122</sup>	96	DR15-DQ6
De la Concha et al. 1997 <sup>123</sup>	135	DRB1*1501
Coraddu et al. 1998 <sup>69</sup>	53	DR15, DR4
Pina et al. 1999 <sup>115</sup>	31	DR15
Villoslada et al. 2002 <sup>117</sup>	194	DRB1*1501-DQB1*0602
Fernández et al. 2004 <sup>118</sup>	149	DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602
Fernández et al. 2008 <sup>125</sup>	12 (etnia gitana)	DRB1*1501, DQB1*0602, DQB1*0608
Fernández et al. 2009 <sup>111</sup>	197	DQB1*0602

**TABLA 3.** Estudios HLA y susceptibilidad a EM en la población española.

con EM<sup>118</sup>. El segundo se realizó con una población de origen gitano del sur de España y se trata del primer estudio realizado con esta etnia en nuestro país para estudiar la relación HLA-EM<sup>125</sup>. En ella se demuestra asociación de los alelos DRB1\*1501, DQB1\*0602 y DQB1\*0608 así como del haplotipo DRB1\*1501-DQB1\*0602 con la enfermedad.

La tercera población que muestra asociación significativa con el alelo DQB1\*0602 es una población vasca<sup>111</sup>, población ésta en la que se han descrito peculiaridades

genéticas como es el hecho de ser la población con mayor frecuencia de DR7<sup>127</sup>. En este trabajo en concreto, el primero realizado que estudia la asociación de la población vasca con EM y el HLA, se muestra una falta de asociación significativa tanto con el haplotipo DR15 como con el alelo DRB1\*1501 a pesar de que en él se estudia una amplia población<sup>111</sup>. Se objetiva en este estudio asociación con el alelo DQB1\*0602 y los haplotipos DRB1\*0402-DQA1\*0301-DQB1\*0302 y DRB1\*1303-DQA1\*05-DQB1\*0301, que en parte o totalmente habían sido descritos en otras poblaciones en relación con la EM. El alelo DRB1\*0101 se halló con menor frecuencia entre los pacientes respecto a los controles tal y como ya había sido también objetivado en otra población del norte de España<sup>115</sup>.

En las Islas Canarias se halló una asociación primaria con DR15 y DQ6 y secundaria con DR4 (DRB1\*0402/0404)<sup>69</sup>. Esta asociación con DR4 coincide con los hallazgos en poblaciones del área mediterránea como la de Cerdeña<sup>67</sup>, tal y como se ha comentado anteriormente. Tan sólo otro estudio español halló asociación significativa con DR4 y en concreto con tres alelos que comparten valina en la posición 86 de la cadena beta (DRB1\*0402, \*0403, \*0404)<sup>123</sup>.

En cuanto a la asociación con alelos de clase I, los resultados han sido mucho más heterogéneos. En un estudio realizado en nuestra unidad de esclerosis múltiple del Hospital Universitario de Bellvitge se halló asociación positiva con el HLA-B27<sup>128</sup>. Esta misma asociación fue descrita junto con la del HLA-B7 por otro grupo del norte de España<sup>120</sup>. Además, el B7 se había hallado previamente asociado con la enfermedad<sup>119</sup> pero contrariamente esta asociación no fue encontrada en otros

estudios<sup>121,129</sup>. En estudios recientes realizados en Asturias, se ha hallado correlación entre el gen MICA y la expresión del gen MICB y la EM. Aunque los genes MIC (cadena relacionada al CMH de clase I) no forman parte del sistema HLA están muy cercanamente relacionados estructural y funcionalmente<sup>130,131</sup>.

En los estudios realizados en España no se ha observado una clara correlación entre el HLA y los factores clínicos estudiados<sup>116,118</sup>. Sin embargo, algunos estudios hallaron que el DR4 se asociaría con las formas primariamente progresivas<sup>122,123,129</sup> y las formas benignas al DR2<sup>123</sup>.

Al estudiar la relación con los datos de resonancia magnética (RM), no se ha hallado asociación entre la distribución de lesiones en sustancia blanca en RM y el HLA-DR2<sup>132</sup>. En los estudios en los que se ha investigado la respuesta al tratamiento inmunomodulador tampoco se ha hallado asociación alguna con el genotipo HLA<sup>117,133</sup>.

#### **1.4.6. HLA Y FENOTIPO CLÍNICO**

Al igual que sucede en la población española, en el resto de poblaciones estudiadas el análisis de asociación entre el HLA y el fenotipo clínico de la enfermedad ha dado lugar a resultados muy diversos y, en ocasiones, contradictorios. A pesar de ello, hay datos que evidencian cierta concordancia en el curso clínico entre familiares con EM<sup>17,134</sup>, lo que hace pensar que los factores genéticos implicados en la

enfermedad ejercen influencia sobre la evolución de la misma. Es posible que en ocasiones la disparidad entre los resultados encontrados se deba a la heterogeneidad de la propia enfermedad y en otras a diferencias metodológicas entre los diferentes estudios. Por ejemplo, un tamaño muestral insuficiente puede llevar a que no se encuentren diferencias aunque las hubiera. Así mismo, diferentes clasificaciones de la cohorte para analizar una determinada característica clínica puede conllevar diferencias en los resultados encontrados.

Como ejemplo de lo contradictorios que pueden llegar a ser los resultados publicados, está la investigación inicial llevada a cabo por Barcellos y cols.<sup>96</sup> que no halló efecto alguno del haplotipo DR2 en la evolución de la enfermedad. A continuación, este mismo grupo objetivó que los homocigotos para el DR2 presentaban una evolución más severa<sup>78</sup>, resultado que no pudo ser confirmado al estudiar una cohorte más amplia<sup>81</sup>. Este grupo recientemente ha sugerido que HLA-DRB1\*15 influencia la severidad tal y como indican las medidas de espectroscopia de RM<sup>135</sup>.

A pesar de las diferencias encontradas, se cree que al igual que la susceptibilidad, el fenotipo clínico de la esclerosis múltiple también está influenciado por el HLA<sup>136</sup>. Las características clínicas que mayoritariamente han sido estudiadas en busca de asociaciones con un determinado HLA son el sexo, la edad de inicio de la enfermedad así como el curso clínico y la severidad de la discapacidad. Los resultados han sido diversos para cada una de estas variables tal y como se detalla a continuación y se resume en la Tabla 4:



VARIABLE CLÍNICA	RESULTADOS	REFERENCIAS
<b>Distribución por sexos</b>	DR15 y sexo femenino	Weatherby et al. 2001 <sup>112</sup> , Hensiek et al. 2002 <sup>137</sup>
	Transmisión mayor de DRB1*15 materno	Ramagopalan et al. 2008 <sup>82</sup>
	Sin diferencias	Ballerini et al. 2004 <sup>85</sup> , Fernández et al. 2004 <sup>118</sup> , Silva et al. 2007 <sup>95</sup>
<b>Edad de inicio</b>	DRB1*15 y edad de inicio inferior	Masterman et al. 2000 <sup>92</sup> , Hensiek et al. 2002 <sup>137</sup> , Smestad et al. 2007 <sup>138</sup> , Ramagopalan et al. 2009 <sup>139</sup>
	DRB1*1501/0401, DRB1*0801 y edad de inicio inferior	Wu et al. 2010 <sup>140</sup>
	Sin diferencias	Barcellos et al 2006 <sup>81</sup> , Ballerini et al. 2004 <sup>85</sup> , Fernández et al. 2004 <sup>118</sup>
<b>Curso clínico</b>	DR4 con EMPP	De la Concha et al. 1997 <sup>123</sup> , Weinshenker et al. 1998 <sup>141</sup> , Smestad et al. 2007 <sup>138</sup>
	Sin diferencias	Celius et al. 2000 <sup>142</sup> , Hensiek 2002 <sup>137</sup> , Kantarci et al 2002 <sup>143</sup> , Fernández et al 2004 <sup>118</sup>
<b>Progresión de la discapacidad</b>	DRB1*15 con peor pronóstico	Cournu-Rebeix et al. 2008 <sup>144</sup> , Vasconcelos et al. 2009 <sup>145</sup> , Wu et al, 2010 <sup>146</sup>
	DR2 en homocigosis con peor pronóstico	Barcellos et al. 2003 <sup>78</sup>
	DRB1*15 y mejor pronóstico	Silva et al. 2007 <sup>95</sup>
	DRB1*01 y DRB1*04 y mejor pronóstico	DeLuca et al. 2007 <sup>104</sup>
	Sin diferencias	Weinshenker 1998 <sup>141</sup> , Masterman et al., 2000 <sup>92</sup> , Weatherby et al., 2001 <sup>112</sup> , Hensiek et al 2002 <sup>137</sup> , Barcellos et al 2006 <sup>81</sup>
<b>Respuesta al tratamiento</b>	Sin diferencias	Fusco et al. 2001 <sup>147</sup> , Villoslada et al. 2002 <sup>117</sup> , Fernández et al. 2005 <sup>148</sup> , Comabella et al. 2009 <sup>133</sup>

**TABLA 4.** Resultados de estudios que relacionan HLA y variables del fenotipo clínico.

- Sexo: Los resultados han sido inconsistentes al tratar de relacionar el HLA con la distribución por sexos de las cohortes analizadas. La mayoría no han hallado diferencias<sup>85,95,118</sup>, mientras algunos estudios encuentran una mayor representación del haplotipo DR15 en el sexo femenino<sup>112,137</sup>. Se ha descrito una transmisión mayor desde un origen materno de HLA-DRB1\*15 respecto al paterno en familias con esclerosis múltiple<sup>82</sup>.

- Edad de inicio: Dado que se trata de un factor que se ha demostrado que se correlaciona en los familiares con EM<sup>149</sup>, es razonable pensar que los factores genéticos puedan influenciarlo. Se han llevado a cabo varios estudios que, de manera consistente, relacionarían una edad de inicio inferior con la presencia de HLA-DR15<sup>92,137-139</sup> y parece que esta sería más marcada cuando el alelo HLA-DRB1\*1501 se transmite por vía materna<sup>139</sup>. Sin embargo, otros estudios no habrían hallado dicha asociación<sup>81,85,118</sup>. Recientemente en una población australiana se ha demostrado asociación también con una edad de inicio inferior del alelo DRB1\*0801 y el DRB1\*1501 pero éste último sólo combinado con el DRB1\*0401 en el otro alelo parental<sup>140</sup>, lo que hace pensar en la influencia de la epistasis entre alelos no sólo en la susceptibilidad sino también en el fenotipo clínico.

- Curso clínico: No se ha hallado una clara asociación entre el curso clínico inicial de la enfermedad, remitente recurrente (EMRR) versus primariamente progresiva (EMPP), y los diferentes locus del sistema HLA estudiados<sup>118,137,142,143</sup> a pesar de haberse demostrado concordancia en el curso evolutivo entre

familiares<sup>17,150</sup>. No obstante, se ha descrito una tendencia que no siempre ha sido significativa y que asociaría diferentes subtipos o alelos de DR4 con la EMPP<sup>123,138,141</sup>. El alelo DRB1\*15 se asocia tanto en las EMPP como en las EMRR al comparar con controles en diferentes poblaciones<sup>91,113</sup>.

- Progresión de la discapacidad: Hay datos que sugieren que la progresión de la discapacidad puede estar influenciada por factores genéticos dado que se ha demostrado concordancia intrafamiliar<sup>151</sup>. Sin embargo, los estudios que han tratado de relacionar los diferentes locus del sistema HLA y la progresión de la discapacidad han dado lugar hasta el momento a resultados controvertidos<sup>136</sup>. Por un lado, hay estudios publicados que no han hallado asociación entre diferentes alelos, incluyendo el HLA-DRB1\*15 y la progresión de la enfermedad a pesar de utilizar muestras de gran tamaño<sup>81,92,112,137,141</sup>. Tal y como se ha comentado previamente, uno de estos grupos había asociado el DR2 en homocigosis con una progresión más severa de la enfermedad<sup>78</sup>. Además de éste, otros estudios han demostrado recientemente la asociación del HLA-DRB1\*15 con un peor pronóstico<sup>144-146</sup>. En cambio, un estudio realizado en Portugal demostró una evolución mejor para los pacientes con el HLA-DRB1\*15<sup>95</sup>. Otros alelos que también se han relacionado con una evolución menos agresiva de la enfermedad son los HLA-DRB1\*01 y HLA-DRB1\*04 en un interesante estudio en el que se evalúan pacientes con una evolución extrema tanto benigna como maligna de la enfermedad<sup>104</sup>. Estos son grupos de pacientes que suelen no incluirse en este tipo de estudios por utilizar series hospitalarias y no poblacionales. Otro aspecto que se

considera en este estudio es el de la interacción entre ambos alelos parentales tal y como se describe más adelante.

- Respuesta al tratamiento: No se ha hallado correlación entre los diferentes alelos del HLA y la respuesta al tratamiento inmunomodulador en los estudios realizados<sup>117,133,147,148</sup>.

#### 1.4.7. HLA Y FACTORES PARACLÍNICOS

La presencia de bandas oligoclonales de inmunoglobulinas G (BOC) en líquido céfaloorraquídeo (LCR) así como de lesiones desmielinizantes en RM son fundamentales a la hora del diagnóstico de la enfermedad, estando estrechamente relacionados con la etiopatogenia y la actividad inflamatoria de la misma. Por lo que es lógico pensar que el sistema genético que con más consistencia se ha relacionado con la susceptibilidad a padecer la EM, como es el HLA, pueda influenciar en dichos factores paraclínicos.

Las BOC se hallan en una proporción variable de pacientes, de un 21% a un 77% en las poblaciones asiáticas y hasta superior a un 95% en las poblaciones nórdicas y del Reino Unido<sup>152</sup>, siendo éste un hecho que también contribuye a pensar que se trate de un rasgo determinado genéticamente. Se han realizado estudios, aunque no han sido muchos, en este sentido buscando la asociación entre diferentes locus del HLA, sobre todo del HLA-DR2, y la presencia de BOC en LCR. En diferentes

poblaciones como, por ejemplo, la sueca, la japonesa, la turca y la australiana, se ha demostrado asociación entre la presencia de BOC y el alelo HLA-DRB1\*15<sup>153-156</sup>. Por otro lado, se ha relacionado la ausencia de BOC con el HLA-DRB1\*04 también en las poblaciones sueca y japonesa, así como en la sarda<sup>153,154</sup>. El alelo HLA-DRB1\*03 también se ha relacionado con una frecuencia inferior de BOC en la población australiana, en la que además se ha estudiado la interacción de ambos alelos parentales con la presencia de BOC<sup>156</sup>.

En cuanto a la correlación de los diferentes alelos HLA y las lesiones en RM los resultados no han sido unánimes. A pesar de ello, la mayoría de trabajos han correlacionado la presencia del alelo HLA-DRB1\*15 con una mayor carga lesional cerebral así como menor volumen en técnicas de RM convencional cerebral y reducción de NAA (N-acetil-aspartato) en técnicas de espectroscopia<sup>135,154,157</sup>. Además se ha relacionado el HLA-DRB1\*15 con mayor número de lesiones desmielinizantes a nivel medular<sup>158</sup>. Otros alelos del gen HLA-DQB1 también se habrían relacionado con un peor pronóstico en cuanto a medidas de RM<sup>157</sup>. Sin embargo, hay trabajos en los que no se ha hallado asociación entre el HLA-DR2 y la distribución de lesiones en sustancia blanca<sup>132</sup>. Además, determinados factores del MHC de clase I se han relacionado con datos de RM. En un trabajo publicado recientemente, el HLA B\*44 se muestra como un factor protector, tanto al estudiar la susceptibilidad como el pronóstico a nivel de RM, preserva el volumen cerebral y se relaciona con un número menor de lesiones en T2<sup>159</sup>.

### 1.4.8. EPISTASIS GENÉTICA EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Se define epistasis como la interacción entre diferentes factores genéticos o entre factores genéticos y ambientales. La epistasis es esencial en el conocimiento de la genética de la EM<sup>12</sup>. Los haplotipos con HLA-DRB1\*15 no actúan de manera aislada dando lugar al incremento en la susceptibilidad de la EM, aunque se reconocen como los que de manera aislada ejercen un mayor efecto. Por tanto, ha sido necesario estudiar familias sin el HLA-DRB1\*15 para poder descubrir qué alelos ejercen también su influencia en el riesgo a padecer EM. De este modo se han hallado varios tipos de epistasis entre los diferentes alelos del gen HLA-DRB1:

- Epistasis sinérgica: Este tipo de epistasis tiene lugar cuando un factor genético que en solitario tendría sólo un efecto marginal, en presencia de otro determinado multiplica su efecto. Se ha observado que el alelo HLA-DRB1\*08, que comporta poco riesgo de manera individual, incrementa en conjunto con el HLA-DRB1\*15 en el otro haplotipo parental más del doble el riesgo a padecer EM con respecto a los pacientes con una sola copia del alelo HLA-DRB1\*15<sup>65,66</sup>.

- Epistasis negativa dominante: Se trata de la influencia que produce un determinado factor genético en reducir el riesgo a que otro daría lugar de manera individual. El alelo HLA-DRB1\*14, protector dominante, tiene un importante efecto en reducir el riesgo a que da lugar el HLA-DRB1\*15 cuando se heredan en conjunto<sup>81</sup>. Esto mismo sucede con el alelo HLA-DRB1\*11<sup>66</sup>. Por otro lado, nos

encontramos con alelos como el HLA-DRB1\*01 y el HLA-DRB1\*10 que se han observado como protectores en presencia del alelo HLA-DRB1\*15<sup>65,66</sup>.

- Epistasis y fenotipo clínico: Se ha demostrado que determinados alelos interaccionan entre ellos modificando de este modo el curso clínico de la enfermedad. Nos encontramos, por ejemplo, con que el alelo HLA-DRB1\*01 interacciona con el DRB1\*15 produciendo un curso más benigno de la enfermedad<sup>104</sup>. También se han hallado interacciones que modificarían la edad de inicio de la enfermedad, como por ejemplo, que el HLA-DRB1\*0401 se ha asociado con una edad de inicio inferior cuando se hereda en combinación con el HLA-DRB1\*1501 y sin embargo con una edad superior cuando se combina con el HLA-DRB1\*0801 en el otro alelo parental<sup>140</sup>. La epistasis entre ambos alelos parentales también parece influir en otros aspectos como la presencia de bandas oligoclonales en LCR<sup>156</sup>.

También se conocen interacciones epistáticas entre los diferentes alelos del haplotipo HLA DR2 (HLA-DRB5\*0101-HLA-DRB1\*1501-HLA-DQA1\*0102-HLA-DQB1\*0602) que determinan el riesgo a padecer EM. Así por ejemplo se ha hallado que HLA-DQA1\*0102 aumenta el riesgo a padecer EM cuando se combina con HLA-DRB1\*1501 *en trans*<sup>160</sup>. Recientemente se ha demostrado que también determinados alelos HLA de clase I interaccionan con HLA-DRB1\*15 modificando el grado de susceptibilidad a la enfermedad<sup>161</sup>.

Pero no sólo se dan interacciones genéticas entre los diferentes alelos del sistema HLA, sino que también se ha demostrado interacciones entre otros genes implicados en la inflamación y a pesar de que algunos de ellos no demuestren tener influencia de manera individual, sí que la tienen al interactuar con otros<sup>162</sup>.

#### 1.4.9. INTERACCIÓN HLA Y FACTORES AMBIENTALES

Los estudios epidemiológicos realizados en la EM han permitido establecer su distribución geográfica con una mayor prevalencia en las zonas más alejadas del ecuador, aunque con algunas excepciones como sería la isla de Cerdeña. Estos datos junto con los estudios migratorios y los de epidemiología genética nos han proporcionado suficiente evidencia de que la enfermedad se presenta como consecuencia de la interacción de factores genéticos y factores ambientales<sup>163</sup>.

Entre los factores ambientales relacionados con la EM destaca la infección por el virus Epstein-Barr (VEB) y en particular la infección primaria manifestada como mononucleosis infecciosa<sup>164</sup>. A nivel molecular, el concepto de mimetismo molecular podría explicar que tanto el DRB1\*15 como el VEB se relacionen con la EM tal y como se ha comentado anteriormente<sup>89,90</sup>. Además se ha demostrado un efecto sinérgico del HLA-DRB1\*15 con el antecedente de mononucleosis infecciosa dando lugar a un claro aumento del riesgo a padecer EM comparando con el riesgo que confieren ambos factores de manera aislada<sup>165,166</sup>. Un efecto



similar se ha hallado entre el HLA-DRB1\*15 y títulos elevados de anticuerpos contra el antígeno nuclear 1 del VEB (anti-EBNA-1)<sup>167,168</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado la asociación de niveles bajos de vitamina D con un mayor riesgo a padecer EM<sup>169</sup>. Este hecho estaría en acuerdo con la distribución geográfica de la enfermedad, con una menor exposición solar en las zonas de mayor prevalencia y por tanto menor síntesis de vitamina D. Esta asociación tiene su explicación en que además de su función en la homeostasis del calcio, la vitamina D también se ha visto implicada recientemente en funciones del sistema inmune así como del desarrollo del sistema nervioso central<sup>170</sup>. En un estudio reciente se ha objetivado que la vitamina D interacciona específicamente con el HLA-DRB1\*1501 influyendo en la expresión del mismo<sup>171</sup>.

---

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 2.1. HIPÓTESIS

En la patogenia de la esclerosis múltiple intervienen tanto factores genéticos como factores ambientales. Hay enfermedades de carácter genético que presentan diferencias en el fenotipo clínico entre las formas familiares y las esporádicas. Al estudiar si existen diferencias clínicas entre las formas familiares de EM y las esporádicas podremos conocer diferencias entre ambos tipos de esclerosis múltiple que nos orienten hacia qué factores genéticos podrían estar asociados con la etiopatogenia de la enfermedad.

Los genes de la región HLA de clase II son los que de manera reiterada han sido confirmados como marcadores genéticos de la predisposición a padecer esclerosis múltiple. Pero hasta ahora, ningún antígeno HLA asociado a una enfermedad se ha encontrado únicamente presente en los individuos enfermos o ausente en los sanos. Si conocemos qué alelos y/o genotipos HLA se asocian con la susceptibilidad a padecer la enfermedad, podremos a posteriori correlacionarlo con otros antígenos (ambientales o autoantígenos) que presumiblemente interaccionan con el HLA para desencadenar una respuesta inmune.

Los factores genéticos implicados en la enfermedad pueden influir en la expresión fenotípica de la esclerosis múltiple. El sistema HLA, como principal marcador genético y conociendo su implicación en la respuesta autoinmune, podría por lo tanto, verse implicado en los factores clínicos y paraclínicos de la enfermedad y ser un marcador pronóstico de progresión de discapacidad.



## 2.2. OBJETIVOS

1. Analizar la prevalencia de esclerosis múltiple familiar en nuestra serie y realizar un estudio clínico de los pacientes con uno o más familiares diagnosticados de esclerosis múltiple valorando diferencias clínicas entre las formas familiares y las esporádicas de EM.
2. Evaluar las frecuencias de los diferentes alelos HLA-DRB1 en una amplia población española con esclerosis múltiple esporádica y correlacionarlas con la susceptibilidad a padecer la enfermedad así como analizar el impacto de cada uno de los alelos en el fenotipo clínico con especial interés en la progresión de la discapacidad.
3. Evaluar las frecuencias de los diferentes genotipos HLA-DRB1 en pacientes con esclerosis múltiple esporádica, teniendo en cuenta la posible interacción epistática entre ambos alelos parentales, su correlación con la susceptibilidad a padecer la enfermedad y su influencia en el fenotipo clínico con especial interés en la progresión de la discapacidad.
4. Correlacionar los alelos y genotipos HLA-DRB1 con la presencia o ausencia de bandas oligoclonales IgG (BOC) en líquido cefalorraquídeo (LCR).



---

### **3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**





### 3.1. PACIENTES Y CONTROLES

Los pacientes de este trabajo son controlados en la Unidad de Esclerosis Múltiple del Hospital Universitario de Bellvitge. Se trata del centro de referencia para enfermedades desmielinizantes del área Barcelona Metropolitana Sur. Esta área contaba con una población de 1.366.000 habitantes en diciembre de 2008. En ese momento la prevalencia hospitalaria cruda de esclerosis múltiple era de 77.1 por 100.000 habitantes. Todos los pacientes seleccionados para este trabajo habían sido diagnosticados de esclerosis múltiple según los criterios de Poser<sup>172</sup> o los criterios McDonald<sup>173,174</sup>, según se especifica en cada uno de los estudios.

Todos los pacientes fueron visitados por un neurólogo cualificado y especializado en EM cada 6 meses y siempre que se sospechara un nuevo brote de la enfermedad. Se utilizó la base de datos EDMUS (*European Database for Multiple Sclerosis*)<sup>175</sup> para registrar y hacer un seguimiento prospectivo de todos nuestros pacientes, por lo que las variables clínicas de los pacientes fueron introducidas de forma prospectiva inmediatamente después de cada visita y posteriormente fueron analizadas de forma retrospectiva. Los datos de la exploración neurológica se evaluaron según la EDSS o Escala de Discapacidad de Kurtzke<sup>176</sup> por su escasa variabilidad interobservador y por ser la escala de cuantificación de discapacidad utilizada universalmente en la esclerosis múltiple hasta este momento.

Para cumplir con el objetivo 1, de toda la población de pacientes que había sido incluida en la base de datos EDMUS desde 1993 hasta el 30 de Junio de 2005 se seleccionó un total de 1.110 pacientes diagnosticados de esclerosis múltiple clínicamente definida o probable según los criterios de Poser<sup>172</sup>. Las características basales de estos pacientes están resumidas en la Tabla 5.

Nº PACIENTES	1.110
Edad de inicio	30,6 (±10,44)
Tiempo de evolución	9,7 (±8,49)
Edad	40,4 (±11,96)
Sexo (mujer / hombre)	60,5% / 39,5%
Curso clínico (RR / PP)	93,3% / 6,7%
EM definida / EM probable	80,2% / 19,8%

**TABLA 5.** Características basales de los 1.110 pacientes incluidos para cumplir el objetivo 1.

Para cumplir con los objetivos 2 y 3 se seleccionaron 380 pacientes diagnosticados de esclerosis múltiple según los criterios de McDonald<sup>173,174</sup> y que dieron su consentimiento para ser incluidos en el estudio de HLA. Se seleccionaron pacientes con esclerosis múltiple esporádica, descartando aquellos con esclerosis múltiple familiar con el fin de evitar posibles sesgos. Los pacientes fueron incluidos en el estudio desde Junio de 2005 hasta Diciembre de 2008 tras previa firma de consentimiento informado. Las características clínicas de estos 380 pacientes están resumidas en la Tabla 6.

Nº PACIENTES	380
Edad de inicio	29,6 (±9,9)
Tiempo de evolución	11,7 (±8,1)
Sexo (mujer / hombre)	64,5% / 35,5%
Curso clínico (RR / SP / PP)	362 / 31 / 17

**TABLA 6.** Características clínicas basales de 380 pacientes con EM esporádica para cumplir los objetivos 2 y 3.

Para cumplir con el objetivo 4 se seleccionaron del grupo anterior de 380 pacientes, los 268 pacientes a los que se les había realizado una punción lumbar como método diagnóstico para la detección de BOC en LCR. Las características clínicas de estos 268 pacientes están resumidas en la Tabla 7.

Nº PACIENTES	268
Edad de inicio	30,3 ( $\pm$ 9,87)
Tiempo de evolución	6,22 ( $\pm$ 4,19)
Sexo (mujer / hombre)	64,2% / 35,8%
Curso clínico inicial (RR / PP)	257/ 11

**TABLA 7.** Características clínicas basales de 268 pacientes con EM esporádica para cumplir el objetivo 4.

El grupo control de los trabajos 2, 3 y 4 comprende los tipajes HLA de 1.088 individuos sanos del *Banc de Cordó Umbilical de Barcelona (Banc de Sang i Teixits)*.

## 3.2. METODOLOGÍA

### 3.2.1. TIPOS DE ESTUDIO

Para poder alcanzar los objetivos, se realizan dentro de este proyecto dos tipos diferentes de estudios según su metodología:

1. Estudio observacional retrospectivo en el que se analiza la prevalencia de EM familiar en nuestra cohorte así como si existen diferencias clínicas entre las formas familiares y las esporádicas de la enfermedad.
2. Estudio casos y controles. Se realizan 3 estudios de este tipo: en ellos se comparan pacientes con esclerosis múltiple esporádica versus controles en cuanto a los alelos HLA-DRB1, los genotipos HLA-DRB1 y la presencia de BOC en combinación con los alelos HLA-DRB1, respectivamente.

### 3.2.2. VARIABLES CLÍNICAS

En el trabajo 1 estudiamos la prevalencia de esclerosis múltiple familiar, definida como pacientes con al menos otro familiar de primer o segundo grado diagnosticado de esclerosis múltiple. En caso contrario, los pacientes fueron considerados como esclerosis múltiple esporádica. Para confirmar el diagnóstico de

esclerosis múltiple en los familiares que no estaban siguiendo los controles en nuestra unidad obtuvimos informes médicos realizados por su neurólogo habitual.

La edad de inicio de la enfermedad fue definida como la edad en la que los pacientes presentaron el primer síntoma sugestivo de esclerosis múltiple. En las formas familiares comparamos la edad de inicio entre los dos miembros de parejas de diferentes generaciones dentro de una misma familia para establecer la existencia de anticipación. También se comparó la mediana de la edad de inicio entre las formas familiares y esporádicas. Las otras variables clínicas comparadas entre las formas familiares y las esporádicas fueron la distribución por sexos, el tiempo de evolución de la enfermedad y la progresión de la discapacidad.

En los trabajos 2, 3 y 4 las variables clínicas analizadas incluyeron la edad de inicio de la enfermedad, la distribución por sexos, los síntomas de inicio, el curso clínico inicial (remitente recurrente versus primaria progresiva), la progresión de la discapacidad considerando el tiempo hasta alcanzar un EDSS de 3 y de 6 así como el tiempo hasta alcanzar la fase progresiva de la enfermedad.

### 3.2.3. RECOGIDA DE MUESTRAS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO

Para los trabajos 2, 3 y 4 se realizó a cada uno de los 380 pacientes una extracción de sangre periférica. Se recogieron 10 ml de sangre por paciente en 2 tubos de 5 ml con EDTA como anticoagulante. A partir de ese momento la elaboración de las muestras se realizó en el Laboratorio de nuestra Unidad de Esclerosis Múltiple localizado en el Laboratorio de Investigación Translacional del Hospital Duran i Reynals.

#### EXTRACCIÓN DE DNA

Se realizó la extracción de DNA de leucocitos de sangre periférica utilizando el kit comercial de extracción de DNA QIAmp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para todas las muestras de sangre periférica obtenidas, se realizó una extracción y cuantificación de DNA y se criopreservaron 2 alícuotas para cada muestra en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , dando así lugar a una DNAteca.



### TIPAJE DEL HLA-DRB1

La tipificación de los diferentes alelos del locus HLA-DRB1 se realizó mediante una PCR específica de secuencia o PCR-SSP que permitió la amplificación selectiva del alelo presente. Se utilizaron '*primers*' específicos de secuencia para cada alelo, haciendo uso del kit comercial Dynal All Set SSP-DR Low resolution<sup>177</sup>. El tipaje de cada muestra se realizó mediante PCRs de tipaje en formatos de 24 reacciones que dio lugar al genotipado de los alelos HLA-DRB1\*01, DRB1\*03, DRB1\*04, DRB1\*07, DRB1\*08, DRB1\*09, DRB1\*10, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*13, DRB1\*14, DRB1\*15 y DRB1\*16.

### ANÁLISIS DE BOC EN LCR

Se les realizó a los pacientes del trabajo 4 una punción lumbar a la vez que una extracción de muestra sanguínea como parte del proceso diagnóstico de la EM. Se analizaron las muestras mediante enfoque isoeléctrico e inmunofijación específica para la detección de BOC IgG<sup>178</sup> según el procedimiento que se realiza de rutina en el Laboratorio de Inmunología del Hospital de Bellvitge.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables clínicas y biológicas fueron exportadas al paquete estadístico SPSS para Windows versión 14.0. Se procedió al análisis de los datos mediante los métodos estadísticos que se detallan en cada trabajo. En todos los trabajos se estableció un nivel de significación estadística de  $p < 0.05$  y se utilizó el método de Bonferroni para corrección de múltiples comparaciones.

## ASPECTOS ÉTICOS

Los diferentes estudios del presente trabajo obtuvieron la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario de Bellvitge. Los pacientes fueron informados sobre estos estudios y firmaron un consentimiento informado para ser incluidos en ellos. Las bases de datos de los pacientes fueron anonimizadas.



---

## 4. RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. TRABAJO 1: ANTICIPACIÓN EN LA EDAD DE INICIO DE LA ENFERMEDAD EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE FAMILIAR

**Romero-Pinel L, Martínez-Yélamos S, Gubieras L, Matas E, Bau L, Kremenchutzky M, Arbizu T. Anticipation of age at onset in familial multiple sclerosis. Eur J Neurol 2010; 17: 572-5. Impact Factor 2009 = 2.51 / Cuartil 1 – Neurology (clinical).**

En este primer trabajo se analizó la prevalencia de EM familiar en nuestra serie y se compararon características clínicas entre las formas familiares y esporádicas de EM.

Se objetivó una prevalencia cruda de EM familiar de 7,84%. Se objetivó una edad de inicio inferior en las formas familiares de la enfermedad respecto a las esporádicas (25 años vs 29 años,  $p=0,042$ ). En las generaciones más jóvenes de las formas familiares de EM se halló también una edad de inicio inferior (22 años vs 30 años,  $p<0,001$ ). No se encontraron diferencias en la progresión de la discapacidad entre formas familiares y esporádicas.

Este trabajo fue presentado como comunicación oral en el *17th Meeting of the European Neurological Society*, en Rodas en el año 2007 y en el mismo año como comunicación tipo póster en la *LIX Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología* en Barcelona en la que fue merecedor del *Premio al mejor póster de enfermedades desmielinizantes*.



# Anticipation of age at onset in familial multiple sclerosis

L. Romero-Pinel<sup>a</sup>, S. Martínez-Yélamos<sup>a</sup>, L. Gubieras<sup>a</sup>, E. Matas<sup>a</sup>, L. Bau<sup>a</sup>, M. Kremenchutzky<sup>b</sup> and T. Arbizu<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Neurology Department, Multiple Sclerosis Unit, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, Barcelona, Spain; and

<sup>b</sup>Clinical Neurosciences Department, The University of Western Ontario, London, ON, Canada

## Keywords:

age at onset, anticipation, epidemiology, familial, multiple sclerosis

Received 25 August 2009

Accepted 2 October 2009

**Background and objective:** Anticipation of age at onset in the younger generations is a widely known characteristic of many diseases with genetic inheritance. This study was performed to assess whether there is anticipation of age at onset in younger generations of familial multiple sclerosis (MS) in a Spanish population and to compare clinical characteristics of familial and sporadic MS.

**Methods:** We studied a cohort of 1110 patients diagnosed with MS and followed-up in our MS Unit. Patients were considered as familial MS if they had in their family at least one relative of first or second degree diagnosed with MS. Otherwise, patients were considered to have sporadic MS. We compared the age at onset between relatives from different generations, and we also compared the age at onset of familial and sporadic MS.

**Results:** A lower age at onset in the younger generations was found (median 22 years vs. 30 years,  $P < 0.001$ ) and a significant lower age at onset of the disease in familial MS comparing to sporadic MS (median 25 years vs. 29 years,  $P = 0.042$ ).

**Conclusions:** There is an anticipation of the age at onset of MS in the younger generations of patients with familial MS. There is also a lower age at onset in familial versus sporadic MS.

## Introduction

Anticipation of age at onset in the younger generations is a widely known characteristic of many diseases with genetic inheritance. Up to date, although observed in several studies, only in the Sardinian cohort of familial multiple sclerosis (MS), an anticipation of age at onset in the younger generations has been published [1].

Familial aggregation in MS was already known at the end of the XIX century [2]. It has been very well studied in the recent years by means of genetic epidemiology including familial studies as well as population studies [3,4].

Studying families with multiple cases of MS would allow us to identify genetic markers that may be transmitted together with the disease as well as other relevant clinical characteristics. It has yet to be proven whether familial forms of MS have a particularly

different natural history because of genetic influence or other factors [5,6].

The objectives of our study are to assess whether or not there is anticipation of age at onset in the younger generations of familial MS and to compare clinical characteristics of familial and sporadic MS in a Spanish population.

## Methods

Our MS clinic is the reference centre for demyelinating diseases in the region of Costa de Ponent, in Catalonia, in the north-east of Spain. This area had 1 115 495 inhabitants on 31 December 2004. At that time, the crude hospital-based prevalence of MS was 77.1 per 100 000 inhabitants. Patients are registered using the European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) [7] and followed-up on a 6-monthly basis. This was a retrospective observational study, which was approved by the ethics committee of the Bellvitge University Hospital. The population of the study were the patients who had been included in the EDMUS since 1993 until 30 June 2005.

We selected all the patients who fulfilled the Poser criteria [8] for clinically definite or probable MS. One

Correspondence: T. Arbizu Urdiain, Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Gran Via s/n, km 2,7, Hospital Duran i Reynals, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (tel.: +34 93 2607813; fax: +34 93 2607778; e-mail: lromeropinel@gmail.com, unitatem@bellvitgehospital.cat).



thousand one hundred and ten patients were eligible for our study. Eight hundred and eighty-two (80.2% of patients) fulfilled the Poser criteria for clinically definite MS. The clinical course was relapsing remitting (RR) in the 93.3% of the patients and primary progressive (PP) in the other 6.7%, according to Lublin *et al.* [9] and Thomson *et al.* [10], respectively. Sixty per cent were women. The mean time of evolution of the disease was 9.7 years (standard deviation = 8.49), considered as the time from the first symptom attributable to MS until the moment of the last examination recorded in the EDMUS at time of the study.

We studied the prevalence of familial MS, defined as patients with at least one relative of first or second degree diagnosed with MS. Otherwise, patients were considered to have sporadic MS. To confirm the diagnosis of MS in the relatives who were not followed-up in our unit, we obtained medical records of the assessments performed by the patient's MS neurologist.

The age at onset was defined as the age at which patients presented the first neurological symptom attributable to MS. Within the familial MS group, we selected pairs of patients from different generations belonging to the same family. We compared the age at onset between the members of each pair to establish if there is anticipation. We also compared the median age at onset of the patients with familial MS and the sporadic MS.

We also compared other clinical variables between patients with familial and sporadic MS: gender, time of evolution of the disease and time to reach an EDSS of 3.

The statistical methods used included the Wilcoxon rank test to compare the age at onset between the members of each pair of patients with familial MS. The Kaplan–Meier (log rank) method was used to compare the median age at onset as well as the time to reach an EDSS of 3 between patients with the familial MS and the sporadic MS. To compare the gender proportion and the time of evolution of the disease between these two groups, the chi-square test and the Student's *t*-test were performed, respectively. Statistical significance was established for two-sided *P* value < 0.05.

## Results

We found 87 from 1110 patients with one or more relatives diagnosed with MS. Therefore, the crude point prevalence of familial MS in our cohort is 7.84%.

These 87 patients belong to 65 families with more than one relative diagnosed with MS. From these 65 families, eight had more than two members affected, two families had more than three members affected and one family had eight members affected from two

different generations. Thirty-nine families had relatives of first degree affected, in 20 of them we found the parent–child relation and in 19 they were siblings. Thirty-one families had relatives of second degree and five families of first and second degree simultaneously.

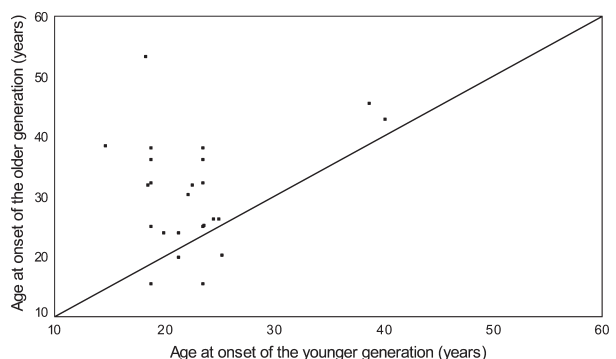
When we compared the age at onset within the members of 24 pairs composed of two relatives from different generations (parent–child and uncle/aunt–nephew/niece), we found a lower age at onset in the younger generations (median 22 years vs. 30 years,  $P < 0.001$ ) (Fig. 1). Moreover, our study showed a significant lower age at onset of the disease in the 87 patients with familial MS comparing with the 1023 patients with sporadic MS (median survival estimated by Kaplan–Meier 25 years vs. 29 years,  $P = 0.042$ ) (Fig. 2).

We found no significant differences in other clinical features when comparing familial and sporadic MS such as the sex distribution, the time of evolution of the disease or the time to reach an EDSS of 3 (median 22.80 years vs. 27.08 years,  $P = 0.49$ ). In the two groups, the percentage of treated patients with disease modifying treatments was also similar (26% in the familial MS vs. 28% in the sporadic group).

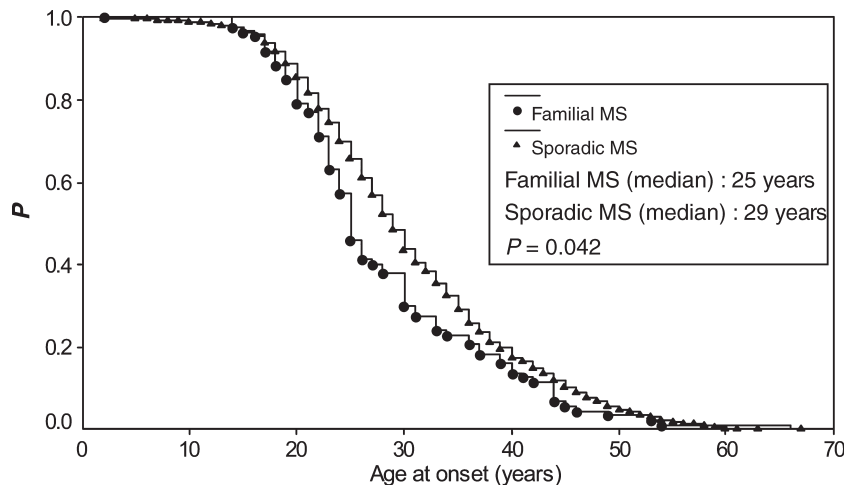
## Discussion

In our series, the crude prevalence of familial MS is 7.84%. This result is similar to others found previously in series from the south of Europe [11] which are next to 10%. In other populations, such as in the Sardinian [1] and the Canadian [12], the prevalence is higher, and it could be because of genetic or other factors not yet clarified.

The main objective of this study was to show whether there is anticipation of age at onset in younger generations of familial MS. We found in fact that when



**Figure 1** Each point shows the age at onset of a pair of relatives from different generations with familial MS. Wilcoxon rank test,  $P < 0.001$ .



**Figure 2** Age at onset of the disease comparing familial MS with sporadic MS (median survival estimated by Kaplan–Meier: 25 vs. 29,  $P = 0.042$ ).

comparing pairs of relatives from different generations, the younger generations have a lower age at onset.

We found that there actually is anticipation of age at onset in younger generations of people with MS, where the age at onset may be genetically determined. Anticipation is a well-known characteristic of the diseases in which expanded triplets are present. Although it is accepted that MS is caused by the interaction of environment and multiple genes, the fact that anticipation is found in familial MS, let us think about the possibility that an expanded triplet could be one of the genetic factors that play a role in disease development or even causation. In the Sardinian study [1], the authors hypothesized that the MS-permissive genetic structure in their population along with recent changes in the environment might shorten the preclinical phase of the disease. We have no reasons to assume that environmental factors are substantially different in Sardinia and Catalonia, both being Mediterranean populations.

Moreover, our study shows a significant lower age at onset in the familial versus the sporadic MS populations. It could be hypothesized that a greater genetic load would shorten the preclinical phase of the disease and predispose to a lower age at onset. Recent studies have found a younger age at onset in patients with familial primary progressive MS when comparing with non-familial [13]. Although this is a controversial subject in which not all the studies performed find the same results, differences have not been found in other studies when comparing familial and sporadic MS [14–16]. However, it seems that there may be a genetic control of the age at onset because intrafamilial concordance has also been reported [5,15]. Other published studies, in agreement with this thought, have reported a lower age at onset in correlation with the HLA DR15 haplotype, which is a known familial risk factor [17,18].

As already published in other series, we could not find significant differences comparing familial MS and sporadic MS in the sex distribution or the progression of disability [5,12,14]. Other authors have found intrafamilial concordance considering the natural history of the disease [19] and the severity of disability [20].

Nevertheless, we are aware of the possibility that in our results a follow-up time bias can be present. In the younger generation group, there may be some people who still have not had time to develop the symptoms of the disease at the time of this study. Moreover, a possible ascertainment bias in the familial MS cohort could have an additional influence on the results [16].

In conclusion, we find that there is in fact an anticipation of the age at onset of MS in the younger generations of patients with familial MS. There is also a lower age at onset in familial versus sporadic MS.

### Acknowledgement

The authors thank Susana Pobla for technical assistance for editing the manuscript.

### Disclosure of conflict of interest

Dr L. Romero-Pinel received honoraria for lecturing from Biogen Idec and Sanofi-Aventis and for serving on the scientific advisory board of Sanofi-Aventis.

Dr S. Martínez-Yélamos received honoraria for lecturing and serving on the scientific advisory board from Merck-Serono, Sanofi-Aventis/Teva, Biogen Idec and Bayer-Schering.

Dr M. Kremenutzky received research support from the MS Society of Canada, Bayer, Berlex, Biogen Idec, Boehringer-Ingelheim, BMS, Elan, Genzyme, GSK, GW, PDL, Novartis, Roche, Sanofi-Aventis, Schering, Serono, Teva.

Dr T. Arbizu received honoraria for lecturing and serving on the scientific advisory board from Novartis, Merck-Serono, Sanofi-Aventis/Teva, Biogen Idec and Bayer-Schering.

## References

- Cocco E, Sardu C, Lai M, Spinicci G, Contu P, Marrosu MG. Anticipation of age at onset in multiple sclerosis. A Sardinian cohort study. *Neurology* 2004; **62**: 1794–1798.
- Eichhorst H. Veber infantile und hereditare multiple sklerosis. *Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin* 1896; **146**: 173–192.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; **3**: 104–110.
- Kenealy SJ, Pericak-Vance MA, Haines JL. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; **143**: 7–12.
- Hensiek AE, Seaman SR, Barcellos LF, *et al.* Familial effects on the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 2007; **68**: 376–383.
- Oturai A, Ryder L, Fredrikson S, *et al.* Concordance for disease course and age of onset in Scandinavian MS co-affected sib pairs. *Mult Scler* 2004; **10**: 5–8.
- Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; **55**: 671–676.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, *et al.* New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; **13**: 227–231.
- 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**: 907–911.
- Thompson AJ, Montalban X, Barkhof F, *et al.* Diagnostic criteria for progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol* 2000; **47**: 831–835.
- Sazdovitch V, Verdier-Taillefer MH, Heinzl O, Alamo-witch S, Roulet E. Familial multiple sclerosis: study of 357 consecutive patients. *Rev Neurol (Paris)* 2000; **156**: 638–640.
- Ebers GC, Koopman WJ, Hader W, *et al.* The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 8: familial multiple sclerosis. *Brain* 2000; **123**: 641–649.
- Koch M, Uyttengoogaart M, Heerings M, Heersema D, Mostert J, De Keyser J. Progression in familial and nonfamilial MS. *Mult Scler* 2008; **14**: 300–306.
- AMSG, 1998. Clinical demographics of multiplex families with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; **43**: 530–534.
- Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC, Risch NJ. Effect of age at onset and parental disease on sibling risks for MS. *Neurology* 1998; **50**: 719–723.
- Sadovnick AD, Yee IM, Guimond C, Reis J, Dyment DA, Ebers GC. Age of onset in concordant twins and other relative pairs with multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 2009; **170**: 289–296.
- Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; **48**: 211–219.
- Smestad C, Brynedal B, Jonasdottir G, *et al.* The impact of HLA-A and -DRB1 on age at onset, disease course and severity in Scandinavian multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2007; **14**: 835–840.
- Robertson NP, Clayton D, Fraser M, Deans J, Compston DA. Clinical concordance in sibling pairs with multiple sclerosis. *Neurology* 1996; **47**: 347–352.
- Brassat D, Azais-Vuillemin C, Yaouanq J, *et al.* Familial factors influence disability in MS multiplex families. French Multiple Sclerosis Genetics Group. *Neurology* 1999; **52**: 1632–1636.

## 4.2. TRABAJO 2: ESTUDIO DEL GEN HLA-DRB1 EN UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE: SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y PROGRESIÓN DE LA DISCAPACIDAD

Romero-Pinel L, Pujal JM, Martínez-Yélamos S, Gubieras L, Matas E, Bau L, Torrabadella M, Azqueta C, Arbizu T. HLA-DRB1: genetic susceptibility and disability progression in a Spanish multiple sclerosis population. *Eur J Neurol* 2010; in press. Impact Factor 2009 = 2.51 / Quartil 1 – *Neurology (Clinical)*.

En este segundo trabajo se evaluaron las frecuencias de los alelos HLA-DRB1 en 380 pacientes con EM esporádica y se compararon con las de 1.088 controles para correlacionarlas con la susceptibilidad a padecer la enfermedad, así mismo se analizó el impacto de los alelos en diferentes variables clínicas con especial interés en la progresión de la discapacidad.

El alelo HLA-DRB1\*15 se asoció a la susceptibilidad a padecer EM, encontrándose con una frecuencia de 18,9% en pacientes vs 10,1% en controles con una OR=2,07 (95% IC=1,64-2,60),  $p<0,001$ . En el análisis multivariante se correlacionaron con un peor pronóstico hasta alcanzar un EDSS de 6 los alelos HLA-DRB1\*01 (OR=3,18, 95%IC=1,59-6,35,  $p=0,001$ ) y HLA-DRB1\*04 (OR=2,70, 95%IC=1,38-5,45,  $p=0,004$ ).

Este trabajo fue presentado como comunicación oral en el *19th Meeting of the European Neurological Society*, en Milán en el año 2009 y en el mismo año como comunicación tipo póster en *la LIX Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología* en Barcelona.



# HLA-DRB1: genetic susceptibility and disability progression in a Spanish multiple sclerosis population

L. Romero-Pinel<sup>a</sup>, J. M. Pujal<sup>a</sup>, S. Martínez-Yélamos<sup>a</sup>, L. Gubieras<sup>a</sup>, E. Matas<sup>a</sup>, L. Bau<sup>a</sup>, M. Torrabadella<sup>b</sup>, C. Azqueta<sup>b</sup> and T. Arbizu<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL; and <sup>b</sup>Banc de cordó umbilical, Banc de sang i teixits, Barcelona, Spain

---

## Keywords:

alleles, genetics, HLA-DR, multiple sclerosis, phenotype, prognosis

Received 27 January 2010

Accepted 31 May 2010

**Background and objective:** The association of HLA-DRB1\*15 with susceptibility to multiple sclerosis (MS) has been consistently reported although its effect on the clinical phenotype is still controversial. The objectives of this study are to investigate the influence of the HLA-DRB1 alleles on the genetic susceptibility to MS and to study their impact on disability progression in a Spanish population.

**Methods:** HLA-DRB1 typing was performed by PCR-SSP in 380 patients with sporadic MS and 1088 unrelated healthy controls. Allelic frequencies were compared between groups. We studied the correlation between the different alleles and the progression of MS.

**Results:** The HLA-DRB1\*15 allele in patients with MS had a statistically significant higher frequency when compared with controls (18.9% in patients vs. 10.1% in controls, Odds ratio (OR) = 2.07, 95% CI = 1.64–2.60,  $P < 0.001$ ). In the univariate analysis, the DRB1\*01 and DRB1\*04 alleles were associated with a worse prognosis when considering the time to reach an EDSS of 6, whereas the DRB1\*03 was correlated with a better outcome. In the multivariate analysis, the alleles\*01 and \*04 were demonstrated to be independent factors to have a worse prognosis.

**Conclusions:** HLA-DRB1\*15 is associated with MS when comparing patients with unrelated healthy controls in a Spanish population. The HLA-DRB1\*01 and HLA-DRB1\*04 alleles are related to a worse prognosis when considering the time taken to reach severe disability.

---

## Introduction

Both polygenic inheritance and environmental factors have been demonstrated to be involved in multiple sclerosis (MS) with the disease susceptibility [1,2] by means of epidemiological studies [3].

The genes associated with the disease are mostly encoded in the major histocompatibility complex (MHC) region located on chromosome 6p21, but not only [4–6]. Molecular genetic studies have provided the knowledge of many other genes and genetic regions which also raises the susceptibility of having MS [7–10].

However, the strongest and most consistent genetic association with the disease is demonstrated to be with the human leukocyte antigen (HLA) class II region [11,12]. The most frequent haplotype associated with MS in Caucasian populations is the DR2 haplotype (DRB1\*1501-DRB5\*0101-DQA1\*0102-DQB1\*0602) [13]. When studying the HLA-DRB1 gene, several alleles have shown to increase the risk of MS and others have been considered to be protective [14,15].

The HLA-DRB1\*15 allele has been repeatedly associated with the susceptibility of MS in different populations. However, it is very important to point out the recently studied concept of epistasis, or interaction amongst genes or genes–environmental factors, which has an important effect in determining susceptibility in MS by the complex interactions within the different HLA loci [14,16,17]. This concept is also widely considered between the different DRB1 alleles as it was shown in recent studies [18,19].

---

Correspondence: T. Arbizu, Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Gran Via s/n, km 2,7, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (tel.: +34 93 2607813; fax: +34 93 2607778; e-mails: lromerpinel@gmail.com; unitatem@bellvitgehospital.cat).

The published studies in Spain have confirmed the association between MS and the DR2 haplotype [20–23], showing some of them an strong association with DQB1\*0602 in populations with different anthropological origin [23–25].

Our area is located in the surroundings of Barcelona in Catalonia, north-east of Spain, with a population that is genetically representative of the Spanish population because of historic migrations to this area from all over the country [26,27].

In other respects, the association of HLA and the clinical phenotype is still controversial although many studies have approached this aim [18,28].

The primary objective of this study was to investigate the frequencies of the HLA-DRB1 alleles in a Spanish MS population and its influence on the genetic susceptibility to develop the disease. Moreover, a second objective was to study the impact of the different alleles on the clinical phenotype with special interest in the disability progression of MS.

## Materials and methods

### Patients and controls

This study included 380 unrelated patients diagnosed with MS. We selected patients with sporadic MS to avoid any bias with familial MS. The patients were recruited from June 2005 to December 2008 in the MS clinic of the Bellvitge University Hospital. The ethics committee of the same hospital approved the study. Our MS clinic is the reference center for demyelinating diseases of the health district of *Gerencia Territorial Barcelona Metropolitana Sud* in Catalonia, north-east of Spain. This region had 1.366.000 inhabitants in December 2008. Patients are registered using the European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) [29] and followed up on a 6-monthly basis.

All patients selected for this study fulfilled the McDonald criteria for Multiple Sclerosis [30,31]. The mean age at onset was 29.55 (SD 9.97), 64.5% were women, the mean disease duration was 11.7 years (SD 8.15, range 0.13–45.2) and median Extended Disability Status Scale (EDSS) score was 2 (range 0–8.5). The clinical course was relapsing remitting (RR) in 332 patients, secondary progressive in 31 patients and primary progressive (PP) in 17 patients [32].

The control group comprised the HLA-DRB1 typing from 1088 healthy individuals blood donors from the *Banc de cordó umbilical de Barcelona (Banc de sang i teixits)*.

### Clinical variables

All patients were visited by a qualified neurologist who performed a neurological examination assessing the disease severity by the Expanded Disease Status Scale (EDSS) [33] at least once each 6 months and whenever they had a relapse. The clinical data were introduced prospectively after each visit in EDMUS database. The clinical variables analyzed in this study comprised sex, age at onset, symptoms at onset (optic nerve, pyramidal, cerebellar, brainstem, sensory, sphincteric or mental), initial clinical course (RR versus PP), time to reach an irreversible EDSS score of 3 and 6, and time to reach the progressive phase from onset in those with RR initial course.

### Samples

All patients were given and signed a written informed consent specifically performed for this study. After that, peripheral blood samples (10 ml) from patients with MS were collected in EDTA.

### DNA analysis

The genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes using the QIAamp Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's recommendations. The samples were genotyped at the HLA-DRB1 gene locus using a low-resolution sequence-specific PCR amplification method [34]. Each sample was genotyped by a set of 24 PCRs, which resolved HLA-DRB1\*01, DRB1\*03, DRB1\*04, DRB1\*07, DRB1\*08, DRB1\*09, DRB1\*10, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*13, DRB1\*14, DRB1\*15, DRB1\*16.

### Statistical analysis

For univariate analysis, Pearson chi-square test and *t*-Student test were performed as appropriate. The relative predispositional effects of the different alleles were analyzed [35].

We explored the time to reach the progressive phase from onset and time to EDSS score of 3 and 6 comparing each allele with the rest of them by means of Kaplan–Meier survival analysis (log rank).

The cohort was shown to be in Hardy-Weinberg equilibrium. A difference of  $P < 0.05$  was considered statistically significant for every comparison. Bonferroni's method was used for correction for multiple comparisons.

Cox logistic regression method was performed to detect independent factors for reaching an EDSS of 6.

**Table 1** Frequencies of the alleles for patients with sporadic multiple sclerosis (MS) and controls

HLA-DRB1 alleles	Alleles of 380 patients with sporadic MS (n = 760)	Alleles of 1088 controls (n = 2176)	OR (95% IC) MS versus controls	P	P <sub>c</sub>
*01	75 (9.9%)	223 (10.2%)	0.95 (0.72–1.26)	0.780	ns
*03	122 (16.1%)	273 (12.5%)	1.34 (1.06–1.69)	0.014	ns
*04	91 (12.0%)	268 (12.3%)	0.97 (0.75–1.25)	0.822	ns
*07	110 (14.5%)	366 (16.8%)	0.84 (0.67–1.06)	0.138	ns
*08	22 (2.9%)	77 (3.5%)	0.82 (0.50–1.32)	0.403	ns
*09	3 (0.4%)	21 (1.0%)	0.41 (0.12–1.37)	0.134	ns
*10	15 (2.0%)	31 (1.4%)	1.39 (0.75–2.60)	0.290	ns
*11	66 (8.7%)	270 (12.4%)	0.67 (0.51–0.89)	0.006	ns
*12	5 (0.7%)	22 (1.0%)	0.65 (0.25–1.72)	0.383	ns
*13	82 (10.7%)	273 (12.5%)	0.83 (0.64–1.09)	0.176	ns
*14	16 (2.1%)	72 (3.3%)	0.63 (0.36–1.09)	0.096	ns
*15	144 (18.9%)	220 (10.1%)	2.07 (1.64–2.60)	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
*16	9 (1.2%)	60 (2.8%)	0.42 (0.21–0.86)	0.014	ns

OR, Odds ratio; 95% CI, confidence interval at 95%; P, significance level; P<sub>c</sub>, P corrected: significance level after Bonferroni's method. Statistically significant associations are given in bold.

Only those variables found significant in univariate analysis were included in multivariate analysis.

## Results

### DRB1 alleles and MS susceptibility

The frequencies of the HLA-DRB1 alleles are shown in Table 1 for patients with sporadic MS and controls. The HLA-DRB1\*15 allele was the most frequent allele observed in patients. The HLA-DRB1\*15 was found with a significantly higher frequency in patients than in controls (18.9% in patients versus 10.1% in controls, Odds ratio (OR) = 2.07, 95% CI = 1.64–2.60,  $P < 0.001$ ) as well as HLA-DRB1\*03 (16.1% versus 12.5%, OR = 1.34, CI = 1.06–1.69,  $P = 0.014$ ). On the contrary, the frequency of HLA-DRB1\*11 was lower in patients when compared with controls (8.7% vs. 12.4%, OR = 0.67, 95%CI = 0.51–0.89,  $P = 0.006$ ) as well as HLA-DRB1\*16 (1.2% vs. 2.8%, OR = 0.42, 95%CI = 0.21–0.86,  $P = 0.014$ ). The other alleles did not demonstrate significant differences in their frequencies between patients with MS and controls. However, when we applied the Bonferroni's method only the HLA-DRB1\*15 allele maintained its statistical significance ( $P < 0.001$ ). After subtracting the HLA-DRB1\*15, only the HLA-DRB1\*03 allele was associated with the disease ( $P < 0.001$ ). After removing the HLA-DRB1\*03 allele, no other association was observed.

### DRB1 alleles and clinical variables

No statistically significant differences were found between the alleles and sex distribution, age or symptoms at onset of the disease.

No HLA-DRB1 allele was associated with the initial course of the disease, RR versus PP. DRB1\*12 allele was overrepresented in PP patients when compared with RR (40% vs. 4%,  $P = 0.017$ ). This association did not survive correction for multiple testing.

When we considered the time from the relapsing onset to reach the progressive phase, the alleles did not show any influence. When we analyzed the time to reach an EDSS score of 3 (from the 380 patients, 113 reached this outcome), we did not find any statistically significant relation. Nevertheless, when we studied the time to reach an EDSS score of 6 (from the 380 patients, 38 reached this outcome), DRB1\*01 and DRB1\*04 alleles were associated with a shorter time to reach the endpoint with statistically significant differences ( $P = 0.004$  and  $P = 0.02$ , respectively). We calculated the time to reach the outcome by 25% of patients with the alleles DRB1\*01 ( $n = 38$ ) and DRB1\*04 ( $n = 46$ ) (Figs 1 and 2). We could not calculate the median time because 50% of patients did not reach the outcome. On the contrary, the patients with DRB1\*03 had a longer time to reach an EDSS of 6 ( $P = 0.025$ ). This endpoint was not reached by 25% of patients with DRB1\*03 allele.

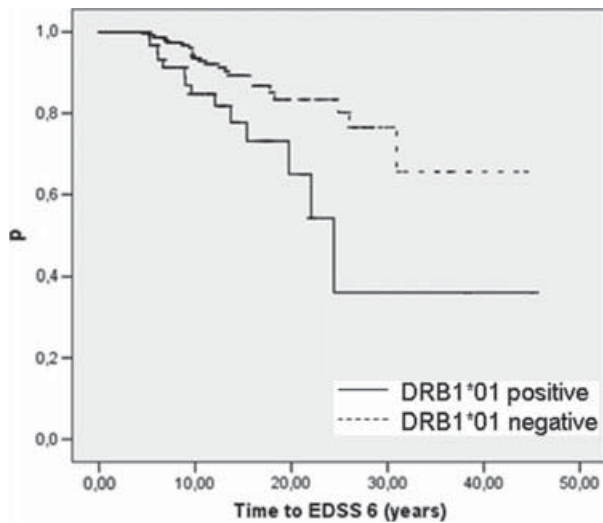
In the multivariate analysis, the DRB1\*01 (OR = 3.18, 95%CI = 1.59–6.35,  $P = 0.001$ ) and DRB1\*04 (OR = 2.70, 95%CI = 1.38–5.45,  $P = 0.004$ ) alleles were demonstrated to be independent factors to take a shorter time to reach an EDSS of 6.

## Discussion

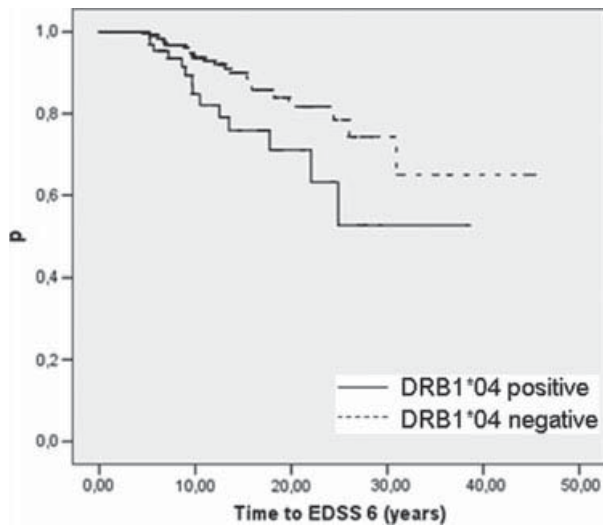
### DRB1 alleles and MS susceptibility

We have shown that HLA-DRB1\*15 allele is associated with MS susceptibility in our cohort of Spanish





**Figure 1** Twenty-five percent of patients with the HLA-DRB1-01 allele reached an Extended Disability Status Scale of 6 after 15.37 years from the onset and the same percentage of patients without this allele reached the outcome after 30.95 years ( $P = 0.004$ ), estimated by Kaplan–Meier.



**Figure 2** Twenty-five percent of patients with the HLA-DRB1-04 allele reached an Extended Disability Status Scale of 6 after 17.58 years from the onset, and the same percentage of patients without this allele reached the outcome after 26.03 years ( $P = 0.020$ ), estimated by Kaplan–Meier.

patients. This association has been already well established in most studied cohorts and specially the Caucasian populations [13]. The highest odds-ratios have been reported in northern European series [36,37], but also there are examples of significant associations in Mediterranean populations [38–40] as well as North and South American ones [41–43]. Recently, a large sample of Australian patients with MS showed also a strong association [44].

We report the largest cohort of patients with MS which HLA-DRB1 alleles have been genotyped in Spain. Our results about the association of HLA-DRB1\*15 with the disease are consistent with previous studies published from other Spanish series [21–23,45].

The HLA-DRB1\*03 is the second allele in frequency associated with MS, although this association after correction for multiple comparisons lost its significance. The association with this allele has been already described in other populations [37,44,46,47].

Several alleles were underrepresented in patients although differences were not statistically significant. The DRB1\*11 allele has been already observed in other series as a possible protective factor [15,18]. The higher frequency amongst controls can be interpreted as that they are protective factors by themselves or because of their interaction with those alleles that imply susceptibility to develop the disease [48].

#### DRB1 alleles and clinical variables

In a previous study, we found a lower age at onset in familial MS when comparing with sporadic MS, which could be interpreted as related with a possible genetic factor [49]. However, we did not find any relation between age at onset and the different alleles. Some other studies, as our, did not find any association with age at onset, including some Spanish series [22,23]. On the contrary, several studies found a significant association between a lower age at onset and the HLA-DR15 haplotype, the DRB1\*15 allele [37,46,50,51] and other DRB1 alleles [52].

The HLA-DRB1\*01 and HLA-DRB1\*04 alleles are independently associated with a worse prognosis when considering the time taken to reach severe disability. To our knowledge, this is the first time that DRB1\*01 and DRB1\*04 alleles are related to a more rapid progression of disability. The studies published that try to associate the natural history of the disease and the HLA genotype has led to controversial results [11,13,18,22,28,37,46–48,50]. In a recent study, the DRB1\*01 allele protected against reaching severe disability. However, this protection happened in sibling pairs in the presence of the HLA-DRB1\*15 allele [18]. Epistatic interactions between alleles could explain the contradiction when comparing with our results.

Our study is concordant with others in which no relation was found between the DRB1\*15 allele and the disease aggressiveness [37,48,50,53,54]. Several groups recently demonstrated that patients with HLA-DRB1\*15 were related to a worse prognosis [55–57], conversely in a Portuguese study, the DRB1\*15 allele was associated with a better outcome [47]. A relevant aspect to consider in all these studies is if they have

enough statistical power to detect the reported effects. Another issue that could be behind those contradictory results is the different criteria used for selecting, categorizing and subdividing patients.

To our knowledge, this is the largest cohort of Spanish patients with MS to study the association between HLA-DRB1 gene and the disease. The association of MS with the DRB1\*15 allele is confirmed in our population. The relation of the DRB1\*01 and DRB1\*04 alleles with a worse prognosis when considering the time taken to reach severe disability adds further information to the controversial results of the correlation amongst the HLA genotype–phenotype in MS.

### Acknowledgement

The authors thank Susana Pobla and Dr Victor Volpini for technical assistance for editing the manuscript. The Health Department of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya) provided a grant for this project.

### Disclosure of conflict of interest

Dr L Romero-Pinel received honoraria for lecturing from Biogen Idec and Sanofi-Aventis and for serving on the scientific advisory board of Sanofi-Aventis. Dr S Martínez-Yélamos received honoraria for lecturing and serving on the scientific advisory board from Merck-Serono, Sanofi-Aventis/Teva, Biogen Idec and Bayer-Schering. Dr T Arbizu received honoraria for lecturing and serving on the scientific advisory board from Novartis, Merck-Serono, Sanofi-Aventis/Teva, Biogen Idec and Bayer-Schering.

### References

- Ramagopalan SV, Ebers GC. Genes for multiple sclerosis. *Lancet* 2008; **371**: 283–285.
- Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; **7**: 268–277.
- Ramagopalan SV, Dymment DA, Ebers GC. Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 2008; **31**: 645–652.
- Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, *et al.* A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 1996; **13**: 472–476.
- Dymment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; **3**: 104–110.
- Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, *et al.* Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 767–778.
- Sawcer S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain* 2008; **131**: 3118–3131.
- Hafler DA, Compston A, Sawcer S, *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; **357**: 851–862.
- Hoppenbrouwers IA, Aulchenko YS, Ebers GC, *et al.* EVI5 is a risk gene for multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008; **9**: 334–337.
- Aulchenko YS, Hoppenbrouwers IA, Ramagopalan SV, *et al.* Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nat Genet* 2008; **40**: 1402–1403.
- Ramagopalan SV, Knight JC, Ebers GC. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Curr Opin Neurobiol* 2009; **22**: 219–225.
- Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, *et al.* A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2005; **37**: 1108–1112.
- Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2007; **165**: 1097–1109.
- Dymment DA, Herrera BM, Cader MZ, *et al.* Complex interaction among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 2019–2026.
- Ramagopalan SV, Morris AP, Dymment DA, *et al.* The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet* 2007; **3**: 1607–1613.
- Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, *et al.* Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7542–7547.
- Ramagopalan SV, Ebers GC. Epistasis: multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Neurology* 2009; **72**: 566–567.
- DeLuca GC, Ramagopalan SV, Herrera BM, *et al.* An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 20896–20901.
- Chao MJ, Bernardo MC, Lincoln MR, *et al.* HLA class I alleles tag HLA-DRB1\*1501 haplotypes for differential risk in multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 13069–13074.
- Pina MA, Ara JR, Lasierra P, Larrad L, Modrego PJ. Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS. *Neurology* 1999; **52**: 1923–1924.
- Uriá DF. HLA y esclerosis múltiple. Estudios en la población española. *Rev Neurol* 2000; **31**: 1066–1070.
- Villoslada P, Barcellos LF, Rio J, *et al.* The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2002; **130**: 194–201.
- Fernández O, Fernández V, Alonso A, *et al.* DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol* 2004; **251**: 440–444.
- Fernández O, Fernández V, Martínez-Cabrera V, *et al.* Multiple sclerosis in gypsies from southern Spain: prevalence, mitochondrial DNA haplogroups and HLA class II association. *Tissue Antigens* 2008; **71**: 426–433.
- Fernández O, R-Antigüedad A, Pinto-Medel MJ, *et al.* HLA class II alleles in patients with multiple sclerosis in the Biscay province (Basque Country, Spain). *J Neurol* 2009; **256**: 1977–1988.
- Official statistics website of Catalonia. <http://www.idescat.cat> (accessed 25/03/2010).

27. Flores C, Maca-Meyer N, González AM, *et al.* Reduced genetic structure of the Iberian peninsula revealed by Y-chromosome analysis: implications for population demography. *Eur J Hum Genet* 2004; **12**: 855–863.
28. Ramagopalan SV, Deluca GC, Degenhardt A, Ebers GC. The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008; **202**: 183–199.
29. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; **55**: 671–676.
30. McDonald WI, Compston A, Edan G, *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; **50**: 121–127.
31. Polman CH, Reingold SC, Edan G, *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 2005; **58**: 840–846.
32. 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**: 907–911.
33. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; **33**: 1444–1452.
34. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; **39**: 225–235.
35. Payami H, Joe S, Farid NR, *et al.* Relative Predispositional Effects (RPEs) of marker alleles with disease: HLA-DR alleles and Graves disease. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 541–546.
36. McDonnell GV, Mawhinney H, Graham CA, Hawkins SA, Middleton D. A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis. *J Neurol Sci* 1999; **165**: 77–83.
37. Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; **48**: 211–219.
38. Ballerini C, Guerini FR, Rombolà G, *et al.* HLA-multiple sclerosis association in Continental Italy and correlation with disease prevalence in Europe. *J Neuroimmunol* 2004; **150**: 178–185.
39. Brassat D, Salemi G, Barcellos LF, *et al.* The HLA locus and multiple sclerosis in Sicily. *Neurology* 2005; **64**: 361–363.
40. Dean G, Yeo TW, Goris A, *et al.* HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Malta. *Neurology* 2008; **70**: 101–105.
41. Barcellos LF, Oksenberg JR, Green AJ, *et al.* Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis. *Brain* 2002; **125**: 150–158.
42. Brum DG, Barreira AA, Louzada-Junior P, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Association of the HLA-DRB1\*15 allele group and the DRB1\*1501 and DRB1\*1503 alleles with multiple sclerosis in White and Mulatto samples from Brazil. *J Neuroimmunol* 2007; **189**: 118–124.
43. Patrucco L, Larriba J, Redal MA, Rojas JI, Argibay PF, Cristiano E. HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Argentina. *Eur J Neurol* 2009; **16**: 427–429.
44. Stankovich J, Butzkueven H, Marriott M, *et al.* HLA-DRB1 associations with disease susceptibility and clinical course in Australians with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2009; **74**: 17–21.
45. De la Concha EG, Arroyo R, Crusius JBA, *et al.* Combined effect of HLA-DRB1\*1501 and interleukin-1 receptor antagonist gene allele 2 in susceptibility to relapsing/remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997; **80**: 172–180.
46. Smestad C, Brynedal B, Jonasdottir G, *et al.* The impact of HLA-A and -DRB1 on age at onset, disease course and severity in Scandinavian multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2007; **14**: 835–840.
47. Silva AM, Pereira C, Bettencourt A, *et al.* The role of HLA-DRB1 alleles on susceptibility and outcome of a Portuguese multiple sclerosis population. *J Neurol Sci* 2007; **258**: 69–74.
48. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, *et al.* Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 2813–2824.
49. Romero-Pinel L, Martínez-Yélamos S, Gubieras L, *et al.* Anticipation of age at onset in familial multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2010; **17**: 572–575.
50. Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R, *et al.* HLA-DR15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; **72**: 184–187.
51. Cree BA, Reich DE, Khan O, *et al.* Modification of multiple sclerosis phenotypes by African ancestry at HLA. *Arch Neurol* 2009; **66**: 226–233.
52. Wu JS, Qiu W, Castley A, *et al.* Modifying effects of HLA-DRB1 allele interactions on age at onset of multiple sclerosis in Western Australia. *Mult Scler* 2010; **16**: 15–20.
53. Weinshenker BG, Santrach P, Bissonet AS, *et al.* Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study. *Neurology* 1998; **51**: 742–747.
54. Runmarker B, Martinsson T, Wahlström J, Andersen O. HLA and prognosis in multiple sclerosis. *J Neurol* 1994; **241**: 385–390.
55. Vasconcelos CC, Fernández O, Leyva L, Thuler LC, Alvarenga RM. Does the DRB1\*1501 allele confer more severe and faster progression in primary progressive multiple sclerosis patients? HLA in primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009; **214**: 101–103.
56. Cournu-Rebeix I, Génin E, Leray E, *et al.* HLA-DRB1\*15 allele influences the later course of relapsing remitting multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008; **9**: 570–574.
57. Wu JS, James I, Qiu W, *et al.* HLA-DRB1 allele heterogeneity influences multiple sclerosis severity as well as risk in Western Australia. *J Neuroimmunol* 2010; **219**: 109–113.

### 4.3. TRABAJO 3: EPISTASIS ENTRE LOS ALELOS PARENTALES DEL GEN HLA-DRB1 EN UNA COHORTE ESPAÑOLA CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Romero-Pinel L, Pujal JM, Martínez-Yélamos S, Gubieras L, Matas E, Bau L, Torrabadella M, Azqueta C, Arbizu T. Epistasis between HLA-DRB1 parental alleles in a Spanish cohort with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2010; in press.

Impact Factor 2009=2.324 / Quartil 1- Neurology (clinical).

En este tercer trabajo se evaluaron las frecuencias de los genotipos HLA-DRB1 teniendo en cuenta la epistasis entre alelos parentales en 380 pacientes con EM esporádica y 1088 controles, correlacionándolas con la susceptibilidad a padecer EM y su influencia en la progresión de la discapacidad.

Los genotipos que predisponían a padecer EM contenían tres de ellos el alelo HLA-DRB1\*15 (DRB1\*03/15, DRB1\*04/15, DRB1\*08/15), siendo el cuarto homocigoto para el alelo DRB1\*03. La mayor OR fue la del genotipo DRB1\*08/15 (OR=3,88, 95% IC=1,83-8,26,  $p<0,01$ ), seguido por DRB1\*03/03 (OR=3,15, 95% IC=1,93-5,14,  $p<0,01$ ), DRB1\*03/15 (OR=2,72, 95% IC=1,88-3,94,  $p<0,01$ ) y DRB1\*04/15 (OR=2,54, 95% IC=1,64-3,98,  $p<0,01$ ). Los genotipos DRB1\*01/04 y DRB1\*15/15 se asociaron con peor pronóstico, considerando el tiempo hasta alcanzar un EDSS de 6.

Este trabajo fue presentado como comunicación tipo póster en el *20th Meeting of the European Neurological Society*, en Berlín en el año 2010.





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jns](http://www.elsevier.com/locate/jns)

## Epistasis between HLA-DRB1 parental alleles in a Spanish cohort with multiple sclerosis

Lucía Romero-Pinel<sup>a</sup>, Josep María Pujal<sup>a</sup>, Sergio Martínez-Yélamos<sup>a</sup>, Laura Gubieras<sup>a</sup>, Elisabet Matas<sup>a</sup>, Laura Bau<sup>a</sup>, Marta Torrabadella<sup>b</sup>, Carmen Azqueta<sup>b</sup>, Txomin Arbizu<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Banc de Cordó Umbilical, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 June 2010

Received in revised form 26 July 2010

Accepted 29 July 2010

Available online xxx

#### Keywords:

Multiple sclerosis

Genetics

HLA-DR

Genotypes

Epistasis

Susceptibility

Prognosis

### ABSTRACT

**Background and objective:** Multiple sclerosis (MS) has been consistently associated with the HLA-DR2 haplotype and particularly with the HLA-DRB1\*15 allele. Epistatic interactions between both parental alleles in the DRB1 loci have been shown to modify the MS susceptibility risk. This study investigated the frequencies of various HLA-DRB1 genotypes, their impact on MS susceptibility and their correlation with the clinical severity in a Spanish population.

**Methods:** A genotype was considered as the combination of the two parental DRB1 alleles. We compared the frequencies of the genotypes in a sporadic MS population (n = 380) with those of an unrelated healthy control cohort (n = 1088). We correlated the different genotypes with the age at onset, gender distribution, symptoms at onset, course of the disease and progression severity by means of the time to reach the progressive phase and EDSS scores of 3 and 6.

**Results:** We found 81 different genotypes. There were four different MS-predisposing genotypes. Three of them contained the DRB1\*15 allele (DRB1\*03/15, DRB1\*04/15, and DRB1\*08/15) and the fourth was homozygote for the DRB1\*03 allele. The highest odds ratio was found with the genotype DRB1\*08/15 (OR = 3.88, 95% CI = 1.83–8.26, p < 0.01), followed by DRB1\*03/03 (OR = 3.15, 95% CI = 1.93–5.14, p < 0.01), DRB1\*03/15 (OR = 2.72, 95% CI = 1.88–3.94, p < 0.01) and DRB1\*04/15 (OR = 2.54, 95% CI = 1.64–3.98, p < 0.01). The DRB1\*01/04 and the DRB1\*15/15 genotypes were associated with a shorter time to reach an EDSS score of 6.

**Conclusions:** Our results show the importance of epistatic interactions among the HLA-DRB1 alleles, modifying the risk for MS as well as its clinical severity.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Epistasis, defined as the interaction among genes or between genes and the environment, is essential to understand the genetics of multiple sclerosis (MS) [1]. MS is an autoimmune demyelinating complex genetic disease in which both genetic and environmental factors contribute to its pathogenesis. The association of MS with the HLA-DRB1\*15 allele has been well established [2,3], although the relevance of other HLA-DRB1 alleles as well as other loci within the major histocompatibility complex (MHC) [4] and outside this region [5–7] is also well known.

In recent years many studies have been performed to demonstrate the importance of epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci

to determine MS susceptibility [8,9]. Additionally, the evaluation of large cohorts has permitted the discovery of interactions among different HLA-DRB1 alleles [10–12]. Those interactions can result in a synergistic epistasis when the conjunction of the two parental alleles increases the risk of MS as it has been shown in several studies with the HLA-DRB1\*08/15 genotype [11,12]. In those studies also several resistance alleles have been found, such as DRB1\*01, DRB1\*10, DRB1\*11 and DRB1\*14. They exert their protection against MS interacting with the risk alleles, particularly with DRB1\*15, by various mechanisms. The DRB1\*11 and DRB1\*14 protective alleles act reducing the risk associated with DRB1\*15 when they are inherited together. The DRB1\*01 and DRB1\*10 are protective only when they interact in *trans* with the DRB1\*15-bearing haplotypes [11]. However, no functional explanation can be given to those interactions that imply protection or to those that synergistically increase the risk of MS, therefore there is a need for research in this area.

Recently, several studies have shown the importance of exploring the influence of DRB1 allele interactions on the clinical phenotype, e.g. the age at onset of the disease [13] or on the frequency of OCB (oligoclonal banding) [14].

\* Corresponding author. Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Gran Via s/n, km 2,7, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2607813; fax: +34 93 2607778.

E-mail addresses: [unitatem@bellvitgehospital.cat](mailto:unitatem@bellvitgehospital.cat), [lromeropinel@gmail.com](mailto:lromeropinel@gmail.com) (T. Arbizu).

The primary objective of this study was to investigate the frequencies of the HLA-DRB1 genotypes considering both parental HLA-DRB1 alleles in a large Spanish MS population and its influence on the genetic susceptibility to develop the disease and its association with the clinical phenotype.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and controls

This study included 380 unrelated patients diagnosed with MS and 1088 healthy controls. The patients were recruited from June 2005 to December 2008 in the MS clinic of the Bellvitge University Hospital. All patients who accepted to participate in the study were included in a consecutive manner as they were coming to their visits. Our MS clinic is the reference center for demyelinating diseases of the health district of *Gerencia Territorial Barcelona Metropolitana Sud* in Catalonia, north-east of Spain. As of December 2008, this region had 1,366,000 inhabitants. Patients were registered using the European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) [15] and were followed up every six months.

All patients selected for this study fulfilled the McDonald criteria for Multiple Sclerosis [16]. The mean age at onset was 29.55 years (SD 9.97), 64.5% were female, the mean disease duration was 11.7 years (SD 8.15, range 0.13–45.2) and the median Extended Disability Status Scale (EDSS) score was 2 (range 0–8.5). There were 332 relapsing–remitting (RR) MS patients, 31 secondary progressive (SP) MS patients and 17 primary progressive (PP) MS patients [17].

The control group comprised the HLA-DRB1 typing from 1088 healthy individuals blood donors from the *Banc de Cordó Umbilical de Barcelona (Banc de Sang i Teixits)*. The blood samples were collected from umbilical cords of newborns from the same area where our study was performed. The controls did not have different ethnic backgrounds comparing to our patients. Moreover, we excluded all patients who had any personal or familial known disease.

The study was approved by the local Ethics Committee. All the patients were duly informed about the study. They were provided with a written informed consent which they signed.

### 2.2. Clinical variables

A qualified neurologist visited all patients and performed a neurological examination assessing the disease severity using the Expanded Disease Status Scale (EDSS) [18] at least once every six months and whenever a relapse occurred. After each visit, clinical data were prospectively entered in the EDMUS database. The clinical variables analyzed in this study were: gender, age at onset, symptoms at onset (optic nerve, pyramidal, cerebellar, brainstem, sensory, sphincteric or mental), initial clinical course (RR vs. PP), time to reach EDSS scores of 3 and 6, and time to reach the progressive phase from onset in those with an RR initial course. The EDSS scores included in the study were only those considered residual EDSS, maintained at least during six months.

### 2.3. HLA-DRB1 typing

Peripheral blood samples (10 ml) from MS patients were collected in EDTA. The genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes using the QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's recommendations.

Samples were genotyped at the HLA-DRB1 gene locus using a low-resolution sequence-specific PCR amplification method [19] which resulted in HLA-DRB1\*01, DRB1\*03, DRB1\*04, DRB1\*07, DRB1\*08, DRB1\*09, DRB1\*10, DRB1\*11, DRB1\*12, DRB1\*13, DRB1\*14, DRB1\*15, and DRB1\*16.

A genotype was considered as the combination of the two parental DRB1 alleles. All patients and controls were classified based on their genotype.

### 2.4. Statistical analysis

We compared the frequencies of the HLA-DRB1 genotypes in unrelated patients and controls using the Pearson chi-squared test. In addition we tested the differences between the age at onset and the various genotypes, using the Student's t test. We studied the relation between the various genotypes and gender distribution, symptoms at onset, and relapsing vs. progressive course at onset, using the Pearson Chi-squared test or Fisher's exact test as appropriate. We explored the time to reach the progressive phase of the disease from the onset and the time to reach Extended Disability Status Scale (EDSS) scores of 3 and 6 by comparing each genotype with the others using Kaplan Meier survival analysis (log rank).

The cohort was shown to be in Hardy–Weinberg equilibrium. A difference of  $p < 0.05$  was considered statistically significant for each comparison. Bonferroni's method was used for multiple comparisons correction. We show only the  $p$ -value corrected after using Bonferroni's method.

## 3. Results

### 3.1. DRB1 genotypes and MS susceptibility

We found 81 different genotypes considering homozygous as well as heterozygous combinations of the two parental alleles that were found in patients and/or controls. Table 1 shows the frequencies of the HLA-DRB1 genotypes with statistically significant differences between MS patients and controls. HLA-DRB1\*03/15 was the most frequent genotype observed in patients and it was found with a significant higher frequency in patients than in controls (OR = 2.72, 95% CI = 1.88–3.94,  $p < 0.01$ ). The next two more frequently genotypes found in patients were also bearing the HLA-DRB1\*15 allele which was found in combination with DRB1\*04 and DRB1\*07. Out of them, DRB1\*04/15 was significantly more frequent in patients than in controls (OR = 2.54, 95% CI = 1.64–3.98,  $p < 0.01$ ). The fourth most frequent genotype found in patients was the homozygous combination of DRB1\*03, which was also more frequently found in patients than in controls (OR = 3.15, 95% CI = 1.93–5.14,  $p < 0.01$ ). Genotype DRB1\*08/15, although not frequently found, showed to be associated with MS with the highest odds ratio among all genotypes found (OR = 3.88, 95% CI = 1.83–8.26,  $p < 0.01$ ).

Three genotypes were less frequently found in patients than in controls. They were bearing the DRB1\*07 allele and they were DRB1\*03/07, DRB1\*07/08 and DRB1\*07/16. Nevertheless, the supposed protective genotypes lost their significance after applying the Bonferroni's method.

**Table 1**

Frequencies of the genotypes with statistically significant differences between sporadic MS patients and controls (OR: Odds ratio; 95% CI: confidence interval at 95%; P-value: significance level after Bonferroni's method).

HLA-DRB1 genotypes	MS patients (n = 380)	Controls (n = 1088)	OR	95% CI	P-value
*03/15	7.4%	2.8%	2.72	1.88–3.94	<0.01
*04/15	5%	2%	2.54	1.64–3.98	<0.01
*08/15	2.1%	0.6%	3.88	1.83–8.26	<0.01
*03/03	4.5%	1.5%	3.15	1.93–5.14	<0.01

### 3.2. DRB1 alleles and clinical variables

No statistically significant differences were found between each of the different HLA-DRB1 genotypes and patient's gender, age or symptoms at disease onset.

None of the HLA-DRB1 genotypes was found to be more frequent when compared with the initial course of the disease, RR vs. PP. We studied the association between the various HLA-DRB1 genotypes and the progression of disability in MS patients. When we considered the time from the relapsing onset to reach the progressive phase of the disease, the various combinations of the two parental alleles did not show any influence. When we analyzed the time to reach an EDSS score of 3 (113 patients achieved this outcome) only the DRB1\*04/07 genotype was associated with a shorter time to reach the endpoint. The median time to reach the EDSS score of 3 was 11.83 (SD 3.12) years for the patients with DRB1\*04/07 in comparison with 22.38 (SD 3.40) years for the patients without that genotype (OR = 2.16, 95%CI = 1.05–4.45,  $p = 0.031$ ), however this result did not survive after correction for multiple testing. Moreover, when we studied the time to reach an EDSS score of 6 (38 patients achieved this outcome) the DRB1\*01/04 and DRB1\*15/15 genotypes were associated with a shorter time to reach the endpoint ( $p = 0.001$ ). In the multivariate analysis the DRB1\*01/04 (OR = 6.17, 95%CI = 1.87–20.33,  $p = 0.003$ ) and DRB1\*15/15 (OR = 4.55, 95%CI = 1.08–19.17,  $p = 0.039$ ) genotypes showed to be independent factors in taking a shorter time to reach an EDSS score of 6 (Fig. 1).

## 4. Discussion

To our knowledge this is the first study in which the interactions between both parental DRB1 alleles are explored in a Spanish population. We have shown that several genotypes containing the HLA-DRB1\*15 allele are associated with MS susceptibility in our cohort. We demonstrated the association of the disease with the HLA-DRB1\*15 allele [20]. The association of MS with DRB1\*15 has been well established [3] although it is known that the interaction of this allele with other alleles as well as other loci and even with environmental factors play an important role in increasing or decreasing the MS susceptibility.

In this study, taking into account the interaction between the two parental DRB1 alleles, patients who had DRB1\*08 in the other parental allele in conjunction with the DRB1\*15 had the highest risk of having MS (OR = 3.88) in comparison with controls. Other groups have already described the same result with the DRB1\*08/15 genotype [1,11,12,21]. However, to our knowledge, this is the first time it has been found in a Spanish population.

The DRB1\*03/15 genotype was also significantly more frequent in patients than in controls although when we considered each allele independently from the other, the DRB1\*03 allele did not reach significance after multiple testing correction [20]. The DRB1\*03 allele had been found related with MS susceptibility in several cohorts [22–24]. The association of this genotype with MS can be reflecting a synergistic epistasis between both alleles. Similarly the DRB1\*04/15

genotype was also significantly more frequent in patients than in controls. Although in the Australian population the DRB1\*04 allele was found to be protective [24], in various Mediterranean series it was observed to be associated with the disease [25–27]. In a recent study in an Australian population the combination of DRB1\*15 and DRB1\*04 was related with a lower age at onset [13]. Taking together the association with the lower age at onset in that study and the higher susceptibility in our cohort it could be interpreted that a greater genetic load can shorten the preclinical phase of the disease.

We did not find an association between MS and homozygote patients for the DRB1\*15 allele as it would have been expected based on previous studies [11,21,28]. In an Italian study, no DR15 dose effect on MS susceptibility was found [29]. Maybe a common ancestral origin in the Mediterranean basin could be behind that fact.

DRB1\*03 homozygote patients (\*03/03 genotype) were shown to be at higher risk of having MS (OR = 3.146). It has been already described in other populations the dose effect of the DRB1\*03 allele when found in a homozygous combination in comparison with those having DRB1\*03 in conjunction with any allele [21,24].

There are three different genotypes less frequent in MS patients in comparison with controls (DRB1\*03/07, DRB1\*07/08 and DRB1\*07/16) although their significance was lost after applying the multiple testing correction. Interestingly, the allele DRB1\*07 allele was present in all those genotypes. The DRB1\*07/15 was the second in frequency among patients and it was the only genotype among the first four more frequent genotypes that did not represent a risk for having the disease. One could hypothesize that the DRB1\*07 allele exerts an epistatic effect along with the DRB1\*15 but in an opposite direction which neutralizes this genotype. The DRB1\*07 allele has its highest prevalence in the Basque Country and in the study performed in that area a protective haplotype containing this allele was found, although that result did not survive the Bonferroni's method [30]. It had been previously reported as a protective allele in other populations in Northern Europe [31] and in Italy [29].

Regarding the clinical phenotype, we found a significant association between the DRB1\*01/04 genotype and a worse prognosis considering the time to reach an EDSS score of 6. The HLA-DRB1\*01 and HLA-DRB1\*04 alleles had been previously found independently associated with a worse prognosis also when considering the time taken to reach severe disability [20]. Therefore, an additive epistatic influence may be present in patients with those two parental alleles in conjunction. We found also an association with the DRB1\*15/15 genotype and the disease aggressiveness. The homozygote patients for the DRB1\*15 allele had also a worse prognosis when considering the time to reach an EDSS score of 6. That result was not found when considering the DRB1\*15 allele independently from the other parental allele [20], that would be in accordance with an association of HLA-DRB1\*1501 dose effect and the risk and severity as recently shown in other cohorts of MS patients [28,32].

Although several previous studies had not found any relationship between DRB1\*15 and disease severity [21,33], recent studies in different populations did find it related with a worse prognosis [32,34,35]. The results of a recent research suggest that the DRB1\*1501 allele increases the disease severity by facilitating the development of T2 lesions in MRI [36].

The present study is the first study in a Spanish population which explores the interactions between both parental DRB1 alleles. The combination of the two parental DRB1 alleles by epistasis may increase their influence on the susceptibility and the phenotype as previously shown in other populations (Table 2).

In conclusion, our findings indicate that several genotypes including the DRB1\*15 allele together with DRB1\*03, DRB1\*04 or DRB1\*08 in the other parental allele as well as the homozygote genotypes for DRB1\*03 are associated with a higher risk of developing MS. The patients with a homozygote genotype for DRB1\*15 and those with DRB1\*01 in combination with DRB1\*04 in the other parental

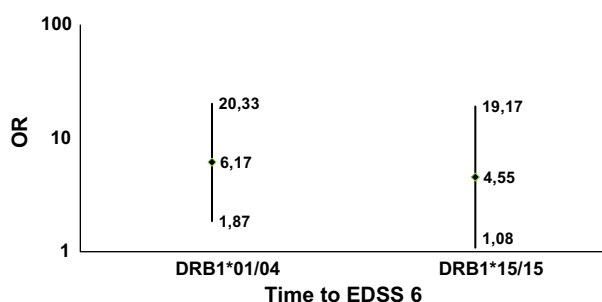


Fig. 1. Odds ratio of genotypes associated with a shorter time to reach an EDSS score of 6.



**Table 2**  
HLA-DRB1 genotypes related with MS susceptibility risk, prognosis and age at onset comparing with published data.

HLA-DRB1 genotypes	Reference	Population	Susceptibility	Prognosis	Age at onset
*01/04	Romero-Pinel et al. 2010 [pr]	Spain	No effect	Worse	No effect
*01/15	Barcellos et al. 2006 [21]	US, UK, Italy, Spain	↑	No effect	No effect
	Ramagopalan et al. 2007 [11]	Canada	↓(a)	–	–
*03/03	DeLuca et al. 2007 [10]	Canada	–	Better	–
	Barcellos et al. 2006 [21]	US, UK, Italy, Spain	↑(b)	No effect	No effect
	Stankovich et al. 2009 [24]	Australia	↑(b)	–	–
*03/15	Romero-Pinel et al. 2010 [pr]	Spain	↑	No effect	No effect
	Barcellos et al. 2006 [21]	US, UK, Italy, Spain	↑	No effect	No effect
*04/15	Romero-Pinel et al. 2010 [pr]	Spain	↑	No effect	No effect
	Barcellos et al. 2006 [21]	US, UK, Italy, Spain	↑	No effect	No effect
*04/08	Romero-Pinel et al. 2010 [pr]	Spain	↑	No effect	No effect
	Wu et al. 2010 [13]	Australia	–	–	Earlier
*08/15	Wu et al. 2010 [13]	Australia	–	–	Later
	Dyment et al. 2005 [12]	Canada	↑	–	–
*10/15	Barcellos et al. 2006 [21]	US, UK, Italy, Spain	↑	No effect	No effect
	Ramagopalan et al. 2007 [11]	Canada	↑(a)	–	–
	Romero-Pinel et al. 2010 [pr]	Spain	↑	No effect	No effect
*11/15	Ramagopalan et al. 2007 [11]	Canada	↓(a)	–	–
*14/15	Ramagopalan et al. 2007 [11]	Canada	↓(a)	–	–
	Barcellos et al. 2006 [21]	US, UK, Italy, Spain	↓	–	No effect
*15/15	Ramagopalan et al. 2007 [11]	Canada	↓	–	–
	Barcellos et al. 2003 [28]	US	↑(c)	Worse	No effect
	Ballerini et al. 2004 [29]	Italy	No dose effect	–	–
	Barcellos et al. 2006 [21]	US, UK, Italy, Spain	↑(c)	No effect	No effect
	Ramagopalan et al. 2007 [11]	Canada	↑(c)	–	–
	Wu et al. 2010 [13,32]	Australia	↑	Worse	No effect
	Romero-Pinel et al. 2010 [pr]	Spanish	No effect	Worse	No effect

↑ Increased MS susceptibility, ↓ decreased MS susceptibility, and – not explored.

(a) Compared to DRB1\*15/X genotype, (b) dose effect in homozygous combination (DRB1\*03/03) compared to DRB1\*03/X genotype, (c) dose effect in homozygous combination (DRB1\*15/15) compared to DRB1\*15/X and [pr] present reference.

allele show a more rapidly disabling progression of the disease. These results add further information to the current knowledge of the complex genetic epistasis in MS.

### Disclosure of source of support

The Health Department of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya) provided a grant for this project.

### Acknowledgement

The authors thank Susana Poblá and Xavi Linares for technical assistance in editing the manuscript.

### References

- [1] Ramagopalan SV, Ebers GC. Epistasis: multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Neurology* 2009;72:566–7.
- [2] Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004;3:104–10.
- [3] Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2007;165:1097–109.
- [4] Chao MJ, Barnardo MC, Lincoln MR, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dyment DA, et al. HLA class I alleles tag HLA-DRB1\*1501 haplotypes for differential risk in multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13069–74.
- [5] Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007;357:851–62.
- [6] Sawcer S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain* 2008;131:3118–31.
- [7] Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, et al. Genomewide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009;18:767–78.
- [8] Fernández O, Fernández V, Alonso A, Caballero A, Luque G, Bravo M, et al. DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol* 2004;251:440–4.
- [9] Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, Herrera BM, DeLuca GC, Orton SM, et al. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:7542–7.
- [10] DeLuca GC, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dyment DA, Lincoln MR, Montpetit A, et al. An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis

severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20896–901.

- [11] Ramagopalan SV, Morris AP, Dyment DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet* 2007;3:1607–13.
- [12] Dyment DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, et al. Complex interaction among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet* 2005;14:2019–26.
- [13] Wu JS, Qiu W, Castley A, James I, Mastaglia FL, Christiansen FT, et al. Modifying effects of HLA-DRB1 allele interactions on age at onset of multiple sclerosis in Western Australia. *Mult Scler* 2010;16:15–20.
- [14] Wu JS, Qiu W, Castley A, James I, Joseph J, Christiansen FT, et al. Presence of CSF oligoclonal bands (OCB) is associated with the HLA-DRB1 genotype in a West Australia multiple sclerosis cohort. *J Neurol Sci* 2010;288:63–7.
- [15] Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:671–6.
- [16] Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 2005;58:840–6.
- [17] 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;46:907–11.
- [18] Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444–52.
- [19] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative serological DR typing in clinical practice including donor–recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225–35.
- [20] Romero-Pinel L, Pujal JM, Martínez-Yélamos S, Gubieras L, Matas E, Bau L, et al. HLA-DRB1: genetic susceptibility and disability progression in a Spanish multiple sclerosis population. *Eur J Neurol* in press, doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03148.x.
- [21] Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, et al. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2006;15:2813–24.
- [22] Silva AM, Pereira C, Bettencourt A, Carvalho C, Couto AR, Leite MI, et al. The role of HLA-DRB1 alleles on susceptibility and outcome of a Portuguese multiple sclerosis population. *J Neurol Sci* 2007;258:69–74.
- [23] Weatherby SJ, Thomson W, Pepper L, Donn R, Worthington J, Mann CL, et al. HLA-DRB1 and disease outcome in multiple sclerosis. *J Neurol* 2001;248:304–10.
- [24] Stankovich J, Butzkueven H, Marriot M, Chapman C, Tubridy N, Tait BD, et al. HLA-DRB1 associations with disease susceptibility and clinical course in Australians with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2009;74:17–21.
- [25] Marrosu MG, Murrù MR, Costa G, Murrù R, Muntioni F, Cucca F. DRB1, DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in Sardinian population. *Hum Mol Genet* 1998;7:1235–7.

- [26] Saruhan-Direskeneli G, Esin S, Baykan-Kurt B, Ornek I, Vaughan R, Eraksoy M. HLA-DR and -DQ associations with multiple sclerosis in Turkey. *Hum Immunol* 1997;55:59–65.
- [27] Coraddu F, Reyes-Yanez MP, Parra A, Gray J, Smith SI, Taylor CJ, et al. HLA associations with multiple sclerosis in the Canary Islands. *J Neuroimmunol* 1998;87:130–5.
- [28] Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, et al. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet* 2003;72:710–6.
- [29] Ballerini C, Guerini FR, Rombolà G, Rosati E, Massacesi L, Ferrante P, et al. HLA-multiple sclerosis association in Continental Italy and correlation with disease prevalence in Europe. *J Neuroimmunol* 2004;150:178–85.
- [30] Fernández O, R-Antigüedad A, Pinto-Medel MJ, Mendibe MM, Acosta N, Oliver B, et al. HLA class II alleles in patients with multiple sclerosis in the Biscay province (Basque Country, Spain). *J Neurol* 2009;256:1977–88.
- [31] Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000;48:211–9.
- [32] Wu JS, James I, Qju W, Castley A, Christiansen FT, Carroll WM, et al. HLA-DRB1 allele heterogeneity influences multiple sclerosis severity as well as risk in Western Australia. *J Neuroimmunol* 2010;219:109–13.
- [33] Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R, Deans J, Mander A, Akesson E, et al. HLA-DR15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:184–7.
- [34] Cournu-Rebeix I, Génin E, Leray E, Babron MC, Cohen J, Gout C, et al. HLA-DRB1\*15 allele influences the later course of relapsing remitting multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008;9:570–4.
- [35] Vasconcelos CC, Fernández O, Leyva L, Thuler LC, Alvarenga RM. Does the DRB1\*1501 allele confer more severe and faster progression in primary progressive multiple sclerosis patients? HLA in primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;214:101–3.
- [36] Okuda DT, Srinivasan R, Oksenberg JR, Goodin DS, Baranzini SE, Beheshtian A, et al. Genotype–phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by <sup>1</sup>HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain* 2009;132:250–9.



#### 4.4. TRABAJO 4: ASOCIACIÓN DEL ALELO HLA-DRB1\*15 Y BANDAS OLIGOCLONALES IgG EN UNA COHORTE ESPAÑOLA CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

**Romero-Pinel L, Martínez-Yélamos S, Bau L, Matas E, Gubieras L, Pujal JM, Arbizu T. HLA-DRB1\*15 allele is associated with oligoclonal immunoglobulin G bands in a Spanish cohort with multiple sclerosis. Submitted.**

En este cuarto trabajo se correlacionaron los alelos y los genotipos HLA-DRB1 con la presencia o ausencia de bandas oligoclonales IgG (BOC) en líquido cefalorraquídeo (LCR) en 268 pacientes con EM esporádica. Los tipajes de HLA-DRB1 en pacientes con BOC y sin ellas fueron comparados con 1.088 controles sanos.

El alelo HLA-DRB1\*15 se halló en una frecuencia mayor en los 206 pacientes con BOC positivas respecto a los 62 con BOC negativas y la diferencia fue estadísticamente significativa (39,3% vs 16,1%, OR=1,38 95% IC=1,18-1,61,  $p<0,001$ ). Al comparar los alelos HLA-DRB1 entre pacientes y controles, el HLA-DRB1\*15 se asoció con la enfermedad sólo en el grupo de pacientes con BOC positivas (20,4% vs 10,1%, OR=2,28, 95% IC=1,726-3,004,  $p<0,001$ ). Ninguno de los 55 genotipos encontrados mostró asociación con la presencia o ausencia de BOC en LCR.

Este trabajo es presentado como comunicación tipo póster en el *26th ECTRIMS Congress*, en Gotemburgo en el año 2010.



# **ASSOCIATION OF HLA-DRB1\*15 ALLELE AND CSF OLIGOCLONAL BANDS IN A SPANISH MULTIPLE SCLEROSIS COHORT**

## **AUTHORS**

Lucía Romero-Pinel, Sergio Martínez-Yélamos, Laura Bau, Elisabet Matas, Laura Gubieras, Josep María Pujal, Txomin Arbizu.

## **AUTHORS' AFFILIATION**

Multiple Sclerosis Unit. Neurology Department. Hospital Universitari de Bellvitge. IDIBELL. Barcelona. Spain.

## **CORRESPONDING AUTHOR**

### **Txomin Arbizu Urdiain**

Multiple Sclerosis Unit. Neurology Department. Hospital Universitari de Bellvitge. Gran Via s/n, km 2,7. Hospital Duran i Reynals. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. Spain.

Tlf: +34 93 2607813

Fax: +34 93 2607778

E-mail: unitatem@bellvitgehospital.cat, lromeropinel@gmail.com.

## **NUMBER OF TABLES: 1**

**KEYWORDS:** genetics, HLA, multiple sclerosis, oligoclonal bands, susceptibility.

**WORD COUNT:** 1427

**RUNNING TITLE:** HLA-DRB1\*15 AND OLIGOCLONAL BANDS IN MULTIPLE SCLEROSIS

## **ABSTRACT**

**Background and objective:** The HLA-DRB1\*15 allele is considered the most important genetic risk factor of multiple sclerosis (MS). This study investigated the association between HLA-DRB1 alleles and the presence of oligoclonal immunoglobulin G bands (OCB) in the cerebrospinal fluid (CSF) in a Spanish population with MS.

**Methods:** The HLA-DRB1 typing was performed in 268 sporadic MS patients and the detection of OCB in CSF. HLA-DRB1 allelic frequencies were compared between OCB-positive and OCB-negative patients and both groups were also compared with 1088 unrelated healthy controls. Moreover, we correlated the various HLA-DRB1 genotypes, considering all the combinations of both parental alleles found with the presence or absence of OCB.

**Results:** We found 206 OCB-positive and 62 OCB-negative patients. The HLA-DRB1\*15 allele in OCB-positive patients had a higher frequency when compared with OCB-negative patients (39.3% in OCB-positive vs. 16.1% in OCB-negative, OR=1.38 95% CI=1.18-1.61,  $p < 0.001$ ). The other alleles did not show differences. When we compared with controls, the HLA-DRB1\*15 allele was associated with the disease only in the OCB-positive patients group. None of the 55 genotypes found showed any association with the presence or absence of OCB.

**Conclusions:** HLA-DRB1\*15 allele is associated with OCB-positive MS patients when studying a Spanish MS population.

## 1. INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating complex genetic disease in which the association of MS with the HLA-DR2 haplotype has been well established in most studied populations (1). However, the mechanism by which the risk susceptibility is increased has not been well elucidated yet.

The presence of oligoclonal immunoglobulin G bands (OCB) in the cerebrospinal fluid (CSF) constitutes the most characteristic biochemical marker of MS and it is usually determined during the diagnosis process (2,3). They are present in 95% of northern European MS patients and in a lower proportion in other populations (3-5).

An association between the presence of OCB and the HLA-DRB1\*15 allele has been observed in various populations from Sweden, Japan and Australia (4-6). An association between the absence of OCB and the HLA-DRB1\*04 allele in the Swedish, the Sardinian and the Japanese cohorts has also been shown (4,6). It is unknown if those associations are also present in other European MS populations, such as the Spanish one, whose disease is less prevalent than in the Northern European population, with less frequent presence of HLA-DRB1\*15 and a lower proportion of positive OCB.

In the present study our purpose is to determine whether there is an association between the HLA-DRB1 alleles and genotypes and the OCB status.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

Our MS clinic is the reference centre for demyelinating diseases in the health district of *Gerencia Territorial Barcelona Metropolitana Sud* in Catalonia, in North-Eastern Spain. As of December 2008, this region had 1.366.000 inhabitants. The crude hospital-based prevalence of MS was 77.1 per 100.000 inhabitants on 31<sup>st</sup> of December 2004. Patients were registered using the European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) (7) and were followed-up on a six-monthly basis. From June 2005 to December 2008, the MS clinic of the Bellvitge University Hospital recruited 380 unrelated patients diagnosed with MS to participate in the MS HLA study (8).

We selected for this study all patients who had undergone a lumbar puncture for diagnostic purposes and fulfilled the McDonald criteria for Multiple Sclerosis (9). In our study, 268 patients were eligible. The initial clinical course was relapsing remitting (RR) in 257 patients and primary progressive (PP) in the other 11 patients. The mean age at onset was 30.33 years (SD 9.87), 64.2% were female and the mean disease duration was 6.22 years (SD 4.19, range 0.13-37.8), defined as the time from the first symptom attributable to MS until the moment of the last examination recorded in the EDMUS at the time of the study.

The study was approved by the local Ethics Committee. All patients were duly informed about the study. They were provided with a written informed consent form which they signed.

## **HLA-DRB1 typing**

Peripheral blood samples (10ml) from MS patients were collected in EDTA. The genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes using the QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's recommendations. Samples were genotyped at the HLA-DRB1 gene locus using a low-resolution sequence-specific PCR amplification method (10). A genotype was considered as the combination of the two parental DRB1 alleles.

## **CSF analysis**

All patients underwent a lumbar puncture and a plasma sample collection at the same time for diagnostic purposes. Matched CSF and plasma samples were analyzed by isoelectric focusing and specific immunofixation for G immunoglobulin oligoclonal bands following the technique described originally by Walker et al (11). OCB-positive patients were defined as those with 2 or more bands in CSF and with no bands in plasma. The OCB analyses were performed by the Immunology Department of our hospital.

## **Statistical analysis**

We analyzed the frequencies of OCB-positive and OCB-negative patients and we compared the age at onset, the gender distribution, the initial course (RR versus PP), the disease duration or mean EDSS between OCB-positive and OCB-negative patients. We also compared the frequencies of the HLA-DRB1

alleles and genotypes between OCB-positive and OCB-negative patients. Moreover, both groups, OCB-positive and OCB-negative patients, were compared with 1088 unrelated healthy controls regarding HLA typing. We performed those comparisons using Pearson Chi-squared test and Student's t test, as appropriate.

The cohort was shown to be in Hardy-Weinberg equilibrium. A difference of  $p < 0.05$  was considered statistically significant for each comparison. Bonferroni's method was used for multiple comparisons correction.

## **2. RESULTS**

We found 206 OCB-positive patients out of the 268 patients selected for this study. The other 62 patients were OCB-negative. Therefore, 76.9% of our cohort was comprised by OCB-positive patients. There were no statistical differences between the gender distribution or the age at onset and the OCB status. No differences were found either between OCB-positive or negative patients regarding the initial course of the disease (RR vs PP), the duration of disease or the mean EDSS.

The frequency of patients with at least one HLA-DRB1\*15 allele in this cohort was 34%. The frequency of the HLA-DRB1\*15 allele in OCB-positive MS patients was statistically significantly higher when compared with OCB-negative patients (39.3% versus 16.1%, OR=1.38, 95% CI=1.18-1.61,  $p < 0.001$ ) (Table 1). This association survived after applying Bonferroni's method. The other

alleles did not show statistically significant differences regarding their frequencies in OCB-positive patients versus OCB-negative patients.

When selecting the OCB-positive patients and comparing their allelic frequencies with controls, DRB1\*15 was the only allele associated with the disease (20.4% versus 10.1%, OR=2.28, 95% CI=1.726-3.004,  $p<0.001$ ). Nevertheless when selecting the OCB-negative patients and comparing them with controls, we could not demonstrate any association. The DRB1\*03 allele was related with OCB-negative patients when comparing this group with controls, however that association did not survive after the correction for multiple comparisons.

The presence or absence of OCB did not show any influence on the frequency of any of the 55 genotypes found, considering both the homozygous and the heterozygous combinations of the two parental alleles found in patients.

### **3. DISCUSSION**

To our knowledge, this is the first study in which the interaction between DRB1 genotyping and the OCB-status is explored in a Spanish population. We have shown that the HLA-DRB1\*15 allele is associated with OCB-positivity in MS when compared with OCB-negative patients, in accordance with previous reports (4-6,12).

We already demonstrated the association of the disease with the DRB1\*15 allele in Spanish MS patients when compared with controls.[8] In the present study we observed that association only in OCB-positive MS patients as it had been shown in previous studies (4,6). However, in other cohorts DRB1\*15 was found to predispose to MS in OCB- positive as well as OCB-negative patients although with a stronger association in the positive group (5,12). We are aware that the reduced total number of OCB-negative patients in our cohort might limit us to find any statistical association with this group, if any. Nevertheless we should point out that the percentage of OCB-negative patients in our cohort seems to be inexplicably higher when compared to other European populations (3). In a recent Spanish cohort the percentage was similar to ours, however patients had a diagnosis of clinically isolated syndrome (CIS) at the time of the study (13).

Despite the differences among studies, the DRB1\*15 allele is consistently related with the presence of OCB. The mechanism by which the DRB1\*15 and the OCB are associated is an intriguing issue. We could hypothesize that the DRB1\*15 allele predisposes to the synthesis of OCB in CSF after observing that DRB1\*15 patients had a higher percentage of OCB-positivity in our study compared with patients carrying other alleles. This hypothesis may be supported by previous published results in which DRB1\*1501 patients showed elevated levels of inflammation in CSF such as higher IgG synthesis levels, matrix metalloproteinase-9 activity and an altered T-cell activation status (14). However, those results alone cannot exclude the fact that the DRB1\*15 acts synergistically with OCB in MS patients. This plausible theory was defended in an interesting study in which the OCB and DRB1\*1501 typing were analyzed in

patients and siblings without MS and it was shown that only patients had both factors (15). Therefore there might be a need for further investigations studying CSF in controls to determine if DRB1\*15 in this group is also related with OCB without predisposing to MS.

In conclusion, our findings indicate that DRB1\*15 is associated with OCB-positivity in Spanish MS patients, whether with a cause-effect relation or with a synergistic one. These results add further information to the current knowledge of the complex immunogenetic pathogenesis in MS.

**Table 1.**

Demographic, clinical and genotyping data of OCB-positive and OCB-negative patients.

	<b>OCB + patients N= 206</b>	<b>OCB – patients N=62</b>	<b>p</b>
<b>Female rate (%)</b>	63.6%	66.1%	ns
<b>Age at onset (years); mean</b>	30.01	31.41	ns
<b>Relapsing onset rate (%)</b>	96.8%	95.6%	ns
<b>Duration of disease (years); mean</b>	5.92	7.25	ns
<b>EDSS; mean</b>	2.29	2.29	ns
<b>HLA-DRB1*15 allele (%)</b>	39.3%	16.1%	<0.001

OCB: oligoclonal bands; p: significance level after Bonferroni's method; ns: not significant.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Susana Pobra for technical assistance in editing the manuscript. We would also like to thank Dr.Jordi Bas from the Immunology Department of Bellvitge University Hospital for his support with CSF oligoclonal band testing.

## **DISCLOSURE OF SOURCES OF FUNDING**

The Health Department of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya) provided a grant for this project.

## REFERENCES

1. SCHMIDT H, WILLIAMSON D, ASHLEY-KOCH A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2007;**165**:1097-109.
2. FREEDMAN MS, THOMPSON EJ, DEISENHAMMER F et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005;**62**:865-70.
3. LINK H, HUANG YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006;**180**:17-28.
4. KIKUCHI S, FUKAZAWA T, NIINO M et al. HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. *Neurology* 2003;**60**:647-51.
5. WU JS, QIU W, CASTLEY A et al. Presence of CSF oligoclonal bands (OCB) is associated with the HLA-DRB1 genotype in a West Australia multiple sclerosis cohort. *J Neurol Sci* 2010;**288**:63-7.
6. Imrell K, Landtblom AM, Hillert J, Masterman T. Multiple sclerosis with and without CSF bands: Clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology* 2006;**67**:1062-4.
7. CONFAVREUX C, COMPSTON DA, HOMMES OR, MCDONALD WI, THOMPSON AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;**55**:671-676.



8. ROMERO-PINEL L, PUJAL JM, MARTÍNEZ-YÉLAMOS S et al. HLA-DRB1: genetic susceptibility and disability progression in a Spanish multiple sclerosis population. *Eur J Neurol* 2010;in press.
9. POLMAN CH, REINGOLD SC, EDAN G et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 2005;**58**: 840-6.
10. OLERUP O, ZETTERQUIST H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;**39**:225-35.
11. WALKER RW, KEIR G, JOHNSON MH, THOMPSON EJ. A rapid method for detecting oligoclonal IgG in unconcentrated CSF, by agarose isoelectric focusing, transfer to cellulose nitrate and immunoperoxidase staining. *J Neuroimmunol* 1983;**4**:141-8.
12. IDIMAN E, OZAKBAS S, DOGAN Y, KOSEHASANOGULLARI G. The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis: relevance of demographic and clinical features, and immunogenetic backgrounds. *J Neuroimmunol* 2009;**212**:121-4.
13. TINTORÉ M, ROVIRA A, RÍO J et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 2008;**70**:1079-83.

14. SELLEBJERG F, JENSEN J, MADSEN HO, SVEJGAARD A. HLA DRB1\*1501 and intrathecal inflammation in multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2000;**55**:312-8.
  
15. CALLANDER M, HAGHIGHI S, LANDTBLOM AM et al. Multiple sclerosis immunopathic trait and HLA-DR(2)15 as independent risk factors in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007;**13**:441-5.



---

## 5. DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. DISCUSIÓN GENERAL

La EM es una enfermedad en cuya etiología, aunque desconocida, sabemos que intervienen factores genéticos y ambientales<sup>5</sup>. La agregación familiar ha sido bien documentada en los últimos años gracias a los estudios de epidemiología genética<sup>14</sup> y se ha demostrado que los genes del sistema HLA y en concreto los correspondientes al haplotipo HLA-DR2 son los que se han asociado al riesgo de padecer la enfermedad con una mayor consistencia<sup>77</sup>. Sin embargo, si la historia natural de la enfermedad se ve modificada en las formas familiares debido a la influencia genética es un tema bajo discusión y que ha llevado a resultados contradictorios<sup>17,179</sup>. Del mismo modo sigue siendo controvertido si determinados genes modifican el fenotipo clínico de la EM<sup>136,180</sup>.

En este trabajo analizamos la prevalencia de EM familiar en una amplia cohorte de pacientes y su asociación a determinadas características clínicas de la enfermedad, así como la existencia de asociación del gen HLA-DRB1 con la susceptibilidad a padecer EM o con determinados factores clínicos, fundamentalmente de progresión de la discapacidad, o paraclínicos como es la presencia de BOC en LCR. Nuestros resultados muestran que existe asociación entre las formas familiares de EM y una edad de inicio inferior de la enfermedad y que determinados alelos y genotipos del

gen HLA-DRB1 se asocian no sólo con el riesgo a padecer EM sino también con una progresión más rápida de la discapacidad así como con la presencia de BOC.

*En el TRABAJO 1 se demuestra que la prevalencia de EM familiar en nuestra cohorte es de 7,84% y que la edad de inicio de la enfermedad es inferior en las generaciones más jóvenes de pacientes con EM familiar así como en las formas familiares cuando comparamos con las formas esporádicas.*

La prevalencia de EM familiar hallada en nuestra serie de pacientes con EM es similar a la de otros estudios realizados en el sur de Europa, tres de ellos en España, y que situarían dicha prevalencia en torno al 10%<sup>22-25</sup> (Tabla 8). En otras poblaciones, sin embargo, nos encontramos con prevalencias mucho más elevadas, como por ejemplo en Canadá con una prevalencia de alrededor del 20%<sup>26,27</sup>. Estas diferencias podrían deberse a factores genéticos o ambientales no aclarados hasta el momento. Estos mismos factores también podrían explicar la prevalencia de EM familiar tan baja, del 2%, hallada en Hungría<sup>181</sup>. Aunque por otro lado, no hay que olvidar que en todos estos estudios podemos encontrarnos con diferencias metodológicas que expliquen en parte la disparidad de algunos resultados. Así, por ejemplo, hay estudios de base poblacional y otros de base hospitalaria, siendo los primeros estudios de mayor validez.

REFERENCIA	PAÍS	Nº PACIENTES	PREVALENCIA EM FAMILIAR
Sadovnick et al. 1988 <sup>27</sup>	Canadá	815	20%
Carton et al. 1997 <sup>32</sup>	Bélgica	674	15%
Landete et al. 1998 <sup>23</sup>	España (Valencia)	127	10%
Fernández-Pérez et al. 1999 <sup>24</sup>	España (Andalucía)	308	7.47%
Ebers et al. 2000 <sup>26</sup>	Canadá	1044	19.8%
Sazdovitch et al. 2000 <sup>22</sup>	Francia	357	10%
Amela-Peris et al. 2004 <sup>25</sup>	España (Islas Canarias)	266	13.9%
Fricska-Nagy et al. 2007 <sup>181</sup>	Hungría	1500	2%
Romero-Pinel et al. 2010	España (Cataluña)	1110	7.8%

**TABLA 8.** Prevalencias de EM familiar en diferentes series publicadas.

Por otro lado, en este trabajo detectamos que existe anticipación en la edad de inicio de la enfermedad en la EM familiar. Se compararon parejas de familiares de diferentes generaciones y encontramos que la generación más joven tiene una edad de inicio inferior de la enfermedad.

La edad de inicio es una característica clínica que puede estar genéticamente determinada y además la anticipación es una característica conocida de las enfermedades causadas por la expansión de tripletes. La EM sabemos que se debe a la interacción de factores genéticos y ambientales, y el hecho de hallar anticipación en la EM nos hace pensar en la posibilidad de que algunos de los factores genéticos implicados en la enfermedad influyan en la edad de inicio de la misma.



En un estudio realizado en Cerdeña<sup>182</sup> en el que también se objetiva anticipación en la edad de inicio en las generaciones más jóvenes, los autores hipotetizan que, además de las características genéticas de su población, también determinados cambios recientes medio-ambientales podrían estar implicados en este hecho. Dado que Cataluña y Cerdeña son ambas poblaciones mediterráneas, podríamos pensar que esos mismos factores ambientales estarían dando lugar a la anticipación en la edad de inicio.

Hay que destacar la posibilidad de que en estos resultados se halle presente un sesgo de seguimiento, ya que en las generaciones más jóvenes puede haber personas que aún no hayan iniciado la enfermedad en el momento del estudio. Cabría repetir el análisis en un futuro cuando tengamos un número suficiente de formas familiares para intentar evitar dicho sesgo, tal y como se ha demostrado en otro estudio de nuestra Unidad<sup>183</sup>.

Por otro lado hemos objetivado una edad de inicio inferior en las formas familiares de la enfermedad respecto a las esporádicas. Podríamos pensar que una carga genética mayor podría estar acortando la fase preclínica de la enfermedad en las formas familiares. Cabe destacar el hecho de que en las formas familiares puede darse un sesgo que influya en nuestros resultados debido a una mayor vigilancia por parte de estos pacientes que les lleve a consultar antes. Aunque este sesgo pensamos que no puede ser corregible fácilmente se ve mitigado por el hecho de que hemos considerado para nuestros análisis siempre la edad de inicio de la enfermedad y no la del diagnóstico.

Estudios recientes han hallado también una edad de inicio inferior en las formas PP de la EM comparando formas familiares y esporádicas<sup>179,184</sup>. Sin embargo, otros estudios no habían obtenido diferencias entre las formas familiares y las esporádicas<sup>149,185,186</sup>. No obstante, parece demostrado que la edad de inicio está bajo control genético dado que de manera repetida se ha encontrado concordancia intrafamiliar para esta variable<sup>17,18,149,186</sup>. Además, en la literatura se ha correlacionado una edad de inicio inferior con el HLA-DR15 que es el principal factor genético de riesgo<sup>92,138,139</sup>.

No hallamos diferencias significativas en cuanto a la distribución por sexos o la progresión de la discapacidad entre formas familiares y esporádicas, al igual que en estudios previos<sup>17,26,185</sup>. En cambio, otros estudios sí han encontrado concordancia intrafamiliar en el curso clínico de la enfermedad<sup>17,150</sup> y en la progresión de la discapacidad<sup>151</sup>. Las diferencias metodológicas a la hora de incluir pacientes así como de clasificarlos pueden explicar en parte la disparidad de resultados hallados en este tipo de estudios. Por un lado, algunos trabajos han utilizado muestras de pequeño tamaño que han dado lugar a subgrupos que a la hora de analizarlos tienen un bajo poder estadístico. Por otro lado, algunos estudios han considerado la discapacidad teniendo en cuenta el índice de progresión del EDSS en función del tiempo de evolución<sup>151</sup> mientras otros han considerado el EDSS en un corte transversal sin considerar el tiempo de evolución<sup>134,150</sup>.

*En el TRABAJO 2 demostramos que existe asociación del alelo HLA-DRB1\*15 con el riesgo de padecer esclerosis múltiple y de los alelos HLA-DRB1\*01 y HLA-DRB1\*04 con un peor pronóstico de la enfermedad considerando la velocidad de progresión de la discapacidad.*

Además de ser el estudio más amplio realizado en la población española respecto al tipaje HLA-DRB1, nuestro estudio tiene el valor de haber sido realizado en un área que ha recibido en las últimas décadas una importante proporción de población migratoria desde muchas otras áreas de España. Por este motivo los resultados hallados pueden ser interpretados como representativos de los pacientes españoles con EM.

En nuestro estudio se objetiva que el alelo HLA-DRB1\*15 es el más frecuente en los pacientes con EM y que este alelo se asocia con la susceptibilidad a padecer la enfermedad cuando comparamos con controles sanos. Estos resultados son consistentes con los publicados de la mayoría de poblaciones caucásicas estudiadas<sup>77</sup>, en los que se ha demostrado una fuerte asociación con este alelo. Lo mismo sucede con la mayoría de series publicadas en España<sup>116-118,123</sup>, aunque un estudio reciente con población vasca no halló dicha asociación<sup>111</sup>.

El alelo HLA-DRB1\*03 es el segundo en frecuencia en los pacientes de nuestra serie aunque la asociación con la enfermedad no fue estadísticamente significativa, a diferencia de lo descrito en otras poblaciones<sup>92,95,99,138</sup>.

No se halló significación estadística en cuanto a la frecuencia del alelo DRB1\*04 tal y como se podría haber esperado debido al hecho de que en otras series del sur de Europa el haplotipo DR4 se demostró asociado con la enfermedad<sup>67-69</sup>.

Ninguno de los alelos que estaban menos representados en los pacientes que en los controles mostraron significación estadística. El alelo DRB1\*11 que era uno de ellos, se había observado en otras series como un posible factor protector<sup>66,104</sup>. La frecuencia más elevada en controles se puede interpretar como que son factores protectores en sí o debido a su interacción con otros alelos que incrementan el riesgo a padecer la enfermedad<sup>81</sup>.

El hecho de que en nuestro trabajo previo se demostrara una edad de inicio inferior en las formas familiares, lo relacionamos, tal y como se ha comentado previamente, con posibles factores genéticos. Por dicho motivo, esperábamos hallar alguna asociación entre los diferentes alelos y la edad de inicio de la enfermedad, pero no fue así. En otros estudios tampoco se demostró asociación con la edad de inicio<sup>117,118</sup>. Por el contrario, otros autores hallaron relación entre una edad de inicio inferior y el haplotipo HLA-DR15, el alelo DRB1\*15<sup>92,137,187</sup> y con otros alelos del gen HLA-DRB1<sup>140</sup>.

Hemos demostrado que los alelos HLA-DRB1\*01 y HLA-DRB1\*04 se asocian de manera independiente con un peor pronóstico al considerar el tiempo hasta alcanzar discapacidad severa, considerada ésta como un EDSS de 6. Tal y como comentábamos previamente en este sentido los resultados publicados hasta el

momento han sido contradictorios<sup>74,77,81,92,95,104,136-138</sup>. Así en un estudio reciente el alelo HLA-DRB1\*01, en contraposición con nuestro resultado, protegía de alcanzar discapacidad severa<sup>104</sup>. En este estudio, en las parejas de hermanos el alelo DRB1\*01 conllevaba un mejor pronóstico en presencia de HLA-DRB1\*15, por lo que pensamos que las interacciones epistáticas entre alelos podría explicar la contraposición con el resultado de nuestro trabajo.

Nuestros resultados son concordantes con los de otros autores en cuanto a la ausencia de relación del alelo DRB1\*15 con la agresividad de la enfermedad<sup>81,92,137,141,188</sup>. Dos grupos recientemente demostraron asociación del alelo DRB1\*15 con un peor pronóstico<sup>144,145</sup> mientras otro lo relacionaba con una mejor evolución<sup>95</sup>. Un aspecto a considerar y que podría explicar estas contradicciones, como ya habíamos comentado, son las diferencias en los criterios utilizados a la hora de seleccionar y categorizar a los pacientes.

*En el TRABAJO 3 demostramos la importancia de las interacciones epistáticas entre ambos alelos parentales HLA-DRB1, modificando la susceptibilidad de padecer EM así como la severidad clínica.*

Detectamos cuatro genotipos que aumentan la susceptibilidad a padecer EM, tres de ellos contienen el alelo DRB1\*15 en combinación en el otro alelo parental con DRB1\*03, DRB1\*04 o DRB1\*08 y el cuarto es homocigoto para el alelo DRB1\*03. Los pacientes homocigotos para el alelo DRB1\*15 y aquellos con el DRB1\*01 en

combinación con DRB1\*04 en el otro alelo parental muestran una más rápida progresión de la enfermedad.

El hecho de que varios genotipos de los que aumentan la susceptibilidad a padecer EM contengan el alelo HLA-DRB1\*15, está en concordancia con nuestro resultado del trabajo 2 en el que se demuestra la asociación de este alelo con la enfermedad. Sin embargo, podría no ser así ya que sabemos que la interacción de este alelo con otros alelos o incluso con factores ambientales puede hacer variar esta predisposición.

Es destacable el hecho de que el genotipo HLA-DRB1\*08/15 de lugar a la OR más alta (OR=3,88) al comparar pacientes con controles, dado que el alelo DRB1\*08 de forma independiente en nuestra cohorte no está relacionado con la enfermedad. Otros grupos han descrito este mismo resultado<sup>65,66,81</sup> (Tabla 9), siendo lógico intuir que tiene lugar una epistasis sinérgica entre ambos alelos. Es la primera vez que se describe esta asociación en una población española con EM, ya que en un estudio previo había pacientes españoles junto con los de otras poblaciones y no se analizaron de manera independiente<sup>81</sup>.

GENOTIPOS HLA-DRB1	REFERENCIA	POBLACIÓN	SUSCEPTIBILIDAD	PRONÓSTICO	EDAD DE INICIO
<b>*01/04</b>	Romero-Pinel et al. 2010	España	No efecto	Peor	No efecto
<b>*01/15</b>	Barcellos et al. 2006 <sup>81</sup> Ramagopalan et al. 2007 <sup>66</sup> DeLuca et al. 2007 <sup>104</sup>	US,UK,Italia,España Canadá Canadá	↑ ↓(a) --	No efecto -- Mejor	No efecto -- --
<b>*03/03</b>	Barcellos et al. 2006 <sup>81</sup> Stankovich et al. 2009 <sup>99</sup> Romero-Pinel et al. 2010	US,UK,Italia,España Australia España	↑(b) ↑(b) ↑	No efecto -- No efecto	No efecto -- No efecto
<b>*03/15</b>	Barcellos et al. 2006 <sup>81</sup> Romero-Pinel et al. 2010	US,UK,Italia,España España	↑ ↑	No efecto No efecto	No efecto No efecto
<b>*04/15</b>	Barcellos et al. 2006 <sup>81</sup> Romero-Pinel et al. 2010 Wu et al. 2010 <sup>140</sup>	US,UK,Italia,España España Australia	↑ ↑ --	No efecto No efecto --	No efecto No efecto Inferior
<b>*04/08</b>	Wu et al. 2010 <sup>140</sup>	Australia	--	--	Superior
<b>*08/15</b>	Dyment et al. 2005 <sup>65</sup> Barcellos et al. 2006 <sup>81</sup> Ramagopalan et al. 2007 <sup>66</sup> Romero-Pinel et al. 2010	Canadá US,UK,Italia,España Canadá España	↑ ↑ ↑(a) ↑	-- No efecto -- No efecto	-- No efecto -- No efecto
<b>*10/15</b>	Ramagopalan et al. 2007 <sup>66</sup>	Canadá	↓(a)	--	--
<b>*11/15</b>	Ramagopalan et al. 2007 <sup>66</sup>	Canadá	↓(a)	--	--
<b>*14/15</b>	Barcellos et al. 2006 <sup>81</sup> Ramagopalan et al. 2007 <sup>66</sup>	US,UK,Italia,España Canadá	↓ ↓	-- --	No efecto --
<b>*15/15</b>	Barcellos et al. 2003 <sup>78</sup> Ballerini et al. 2004 <sup>85</sup>  Barcellos et al. 2006 <sup>81</sup> Ramagopalan et al. 2007 <sup>66</sup> Wu et al. 2010 <sup>140,146</sup> Romero-Pinel et al. 2010	US Italia  US,UK,Italia,España Canadá Australia España	↑(c) No efecto de dosis ↑(c) ↑(c) ↑ No efecto	Peor --  No efecto -- Peor Peor	No efecto --  No efecto -- No efecto No efecto

**TABLA 9.** Genotipos HLA-DRB1 relacionados con la EM, en cuanto a susceptibilidad, pronóstico y edad de inicio. (a) Comparado con DRB1\*15/X, (b) efecto de dosis en homocigosis (DRB1\*03/03) comparado con DRB1\*03/X, (c) efecto de dosis en homocigosis (DRB1\*15/15) comparado con DRB1\*15/X, -- no explorado.

El genotipo DRB1\*03/15 también lo hallamos asociado con la susceptibilidad a padecer EM. En este caso el DRB1\*03 en solitario en nuestra cohorte no mostró asociación estadísticamente significativa con la enfermedad, aunque sí se halla descrito asociado con el riesgo de enfermedad en otras cohortes<sup>95,138</sup>. En este caso también podríamos hallarnos ante otro ejemplo de epistasis sinérgica. El genotipo DRB1\*03/03 se encuentra en nuestra serie asociado a la susceptibilidad a padecer EM. Este efecto de dosis del alelo DRB1\*03 en homocigosis ya ha sido descrito en otras poblaciones<sup>81,99</sup>.

Lo mismo sucedería con el genotipo DRB1\*04/15, ya que el alelo DRB1\*04 tampoco se asocia con la enfermedad en nuestra serie. Este genotipo recientemente se ha relacionado con una edad de inicio inferior de la enfermedad<sup>140</sup>, hecho que estaría de acuerdo con nuestros resultados del primer trabajo en el que demostramos una edad de inicio inferior en las formas familiares en relación a una mayor carga genética. Podríamos afirmar que hay datos que sugieren que los marcadores genéticos de susceptibilidad también condicionarían cierta anticipación en la edad de inicio de la enfermedad.

En cuanto a la epistasis negativa dominante, nos encontramos con un claro ejemplo en nuestra cohorte. El genotipo DRB1\*07/15 fue el segundo hallado en frecuencia y el único entre los cuatro más frecuentes en pacientes que no se ha hallado asociado con la susceptibilidad. Por lo que pensamos que el alelo DRB1\*07, observado en algunas series como un alelo protector<sup>85,92,140</sup>, neutralizaría en nuestra población el aumento del riesgo a que da lugar el alelo DRB1\*15.



En cuanto a la expresión fenotípica, encontramos una asociación significativa entre el genotipo DRB1\*01/04 y un peor pronóstico al considerar el tiempo hasta alcanzar un EDSS de 6. En nuestro trabajo anterior hallamos estos alelos de forma independiente asociados con este mismo *endpoint*, por lo que en este sentido presentarían también epistasis sinérgica. El genotipo DRB1\*15/15 se asocia también con un tiempo menor hasta alcanzar un EDSS de 6, por lo que podríamos hablar de un efecto de dosis de este alelo, que del mismo modo que en nuestro trabajo, recientemente se ha relacionado con un peor pronóstico<sup>135,144-146</sup>.

*En el TRABAJO 4 demostramos la asociación existente entre el alelo HLA-DRB1\*15 y un factor paraclínico como es la presencia de BOC en LCR en pacientes con EM.*

En este trabajo se demuestra que el alelo HLA-DRB1\*15 se asocia con la positividad de BOC en LCR al comparar pacientes con y sin BOC en LCR y, aunque esta asociación se ha reportado en diversas poblaciones<sup>153-156</sup>, no así en la española, en la que no se había explorado hasta el momento.

Con los resultados de nuestro segundo trabajo se confirma que el HLA-DRB1\*15 se asocia también en nuestra población con la susceptibilidad a padecer EM. En el trabajo 4 vemos que al subdividir la cohorte entre pacientes con BOC positivas y negativas, sólo los pacientes con presencia de BOC en LCR mantendrían dicha asociación entre el alelo DRB1\*15 y la susceptibilidad de padecer la enfermedad al comparar con controles sanos, en concordancia con estudios previos<sup>153,154</sup>. De todos

modos, pensamos que el reducido número de pacientes con BOC negativas podría limitarnos el encontrar asociaciones en este grupo en caso de existir.

El mecanismo por el que el DRB1\*15 y las BOC se asocian no está aclarado. Podemos hipotetizar que el DRB1\*15 predispone para la síntesis de BOC en LCR, basándonos en otros estudios en los que este mismo alelo se ha asociado con otros marcadores de inflamación a nivel del LCR<sup>88</sup>. Sin embargo, estas observaciones no excluyen que el alelo DRB1\*15 pueda actuar de manera sinérgica con las BOC en los pacientes con EM. Esta teoría fue defendida en un interesante estudio con pacientes y hermanos sanos en el que se demostró que únicamente los pacientes tenían ambos factores presentes<sup>189</sup>.

## 5.2. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. Respecto a la existencia de anticipación en las formas familiares, ya hemos comentado en la discusión que nos podemos hallar con dos sesgos. Por una parte el tiempo de exposición al riesgo es diferente en las diferentes generaciones. Por otro lado podría existir una mayor vigilancia por parte de las formas familiares.

2. El hecho de que algunas de las formas familiares no sigan los controles en nuestra Unidad y hayamos tenido que valernos de los datos recogidos en informes clínicos, que siempre pueden comportar variaciones en su interpretación.

3. En los estudios de tipaje de HLA-DRB1 la muestra no ha sido seleccionada aleatoriamente.

4. El reducido tamaño muestral en el estudio con BOC no nos permite descartar la existencia de otras asociaciones con el HLA-DRB1, especialmente en aquellos con BOC negativas.

### 5.3. CONSIDERACIONES FINALES

Consideramos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes trabajos expuestos, que la esclerosis múltiple tiene un importante componente genético y en especial del HLA-DRB1 en su etiopatogenia que condiciona tanto la susceptibilidad como la expresión fenotípica de la enfermedad. Se trata de uno de los estudios con un mayor número de pacientes que en nuestro país analizan tanto las formas familiares como el tipaje del gen HLA-DRB1 y el primero que analiza la epistasis entre alelos parentales de dicho gen. Dado que nos encontramos en un medio en el que la tasa de inmigración desde otras regiones del estado ha sido muy elevada en las últimas décadas, pensamos que nuestros resultados son extrapolables a los pacientes con EM de la población española en general, con algunas excepciones, por ejemplo vascos o gitanos, que probablemente tengan un origen genético diferente.

Confirmamos que la tasa de EM familiar es similar a la de otras regiones estudiadas, en torno al 10%, y que las formas familiares tienen características específicas de la enfermedad. En nuestro estudio hallamos una edad de inicio inferior en las formas familiares y esto mismo se ha descrito en pacientes con EMPP familiar<sup>179</sup>. Además este resultado está en consonancia con la teoría que hay cierto control genético de la edad de inicio de la enfermedad, corroborado por resultados en los que se objetiva concordancia intrafamiliar en esta variable<sup>17</sup>.

En segundo lugar corroboramos que en nuestra población la susceptibilidad a padecer EM se asocia con el alelo DRB1\*15, al igual que en la mayoría de poblaciones caucásicas estudiadas<sup>77</sup>, aunque no sea así en todas las poblaciones españolas estudiadas<sup>111</sup>. Hemos observado además cuatro genotipos asociados también a la susceptibilidad a padecer la enfermedad y tres de ellos contienen dicho alelo DRB1\*15. El cuarto es homocigoto para el alelo DRB1\*03, alelo que en otras poblaciones se habría relacionado con la enfermedad<sup>138</sup>. El que se muestra con una mayor OR asociado con la enfermedad es el genotipo DRB1\*08/15, que ya se habría hallado relacionado con la susceptibilidad en otras poblaciones<sup>66</sup>. Destaca el hecho de que el alelo HLA-DRB1\*08 no muestra asociación de manera individual con la EM. Estos resultados nos indican que podría existir epistasis o interacción sinérgica entre ambos alelos parentales del gen HLA-DRB1 incrementando el riesgo que condicionarían en solitario determinados alelos<sup>12</sup>.

En cuanto a la expresión fenotípica de la enfermedad, objetivamos que determinados alelos que no se asocian con el riesgo a padecer la enfermedad en nuestra población, sí lo hacen de manera clara con la progresión de la discapacidad. Se trata de los alelos HLA-DRB1\*01 y HLA-DRB1\*04 que se asocian a un tiempo menor hasta llegar a un EDSS de 6, tanto de manera individual como cuando los hallamos en combinación en un mismo genotipo. El genotipo HLA-DRB1\*15/15 también lo hallamos asociado con un peor pronóstico al considerar el tiempo hasta alcanzar discapacidad severa, lo que nos indica que la epistasis también condiciona la expresión fenotípica de la enfermedad ya que por sí solo el alelo DRB1\*15 en nuestra cohorte no se relacionaría con la evolución de la enfermedad.

Con nuestro último trabajo, presentamos el primer estudio con una población española cuyo objetivo es relacionar la presencia o ausencia de BOC en LCR con los diferentes alelos HLA-DRB1. El alelo DRB1\*15 se asocia con la presencia de BOC en LCR al igual que en otras poblaciones<sup>153</sup>.

Con los datos de estos trabajos aportamos información a los resultados hasta el momento controvertidos en cuanto a la relación genotipo-fenotipo en EM y suponen un avance en el conocimiento de la compleja patogenia inmunogenética de la EM. Un conocimiento en profundidad de la genética y la patogenia de la enfermedad nos permitiría establecer nuevas estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas en vistas a implementar el uso de la farmacogenómica en la práctica habitual de la EM. Si somos capaces de prever con marcadores genéticos qué pacientes van a tener una evolución peor, podremos en un futuro anticiparnos a ello con una terapéutica adecuada y más dirigida a cada paciente.



---

## 6. CONCLUSIONES





## 6. CONCLUSIONES

1. a) La prevalencia cruda de esclerosis múltiple familiar en nuestra cohorte es similar a la de otras poblaciones estudiadas.  
  
b) La edad de inicio es inferior en las formas familiares de esclerosis múltiple si la comparamos con la de las formas esporádicas de la enfermedad. No se han hallado diferencias en cuanto a la progresión de la discapacidad comparando formas familiares y esporádicas de esclerosis múltiple
2. a) El alelo HLA-DRB1\*15 se asocia con una mayor susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple.  
  
b) Los alelos HLA-DRB1\*01 y HLA-DRB1\*04 confieren peor pronóstico evaluado como el tiempo hasta alcanzar una discapacidad severa.
3. a) Los genotipos que incluyen el alelo DRB1\*15 junto con el DRB1\*03, DRB1\*04 o el DRB1\*08 en el otro alelo parental así como los homocigotos para el alelo DRB1\*03 se asocian con una mayor susceptibilidad a padecer esclerosis múltiple.  
  
b) Los genotipos DRB1\*01/04 y DRB1\*15/15 se asocian con peor pronóstico en cuanto al tiempo hasta alcanzar una discapacidad severa.
4. El alelo HLA-DRB1\*15 se asocia con la presencia de BOC en LCR en los pacientes con esclerosis múltiple.



---

## 7. BIBLIOGRAFÍA



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502-17.
2. Casado V, Romero L, Gubieras L, Alonso L, Moral E, Martínez-Yélamos S, et al. An approach to estimating the intangible costs of multiple sclerosis according to disability in Catalonia, Spain. *Mult Scler* 2007; 13:800-4.
3. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 2010; 9: 727-39.
4. Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Semin Immunol* 2009; 21:328-33.
5. Lincoln JA, Cook SD. An overview of gene-epigenetic-environmental contributions to MS causation. *J Neurol Sci* 2009; 286:54-7.
6. Lie BA, Thorsby E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:526-31.
7. Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HLA antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1972; 1:1240-1.
8. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; 3:104-10.
9. Sawcer S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain* 2008; 131:3118-31.
10. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009; 18:767-78.
11. Hoffjan S, Akkad DA. The genetics of multiple sclerosis: An update 2010. *Mol Cell Probes* 2010; in press.
12. Ramagopalan SV, Ebers GC. Epistasis: multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Neurology* 2009; 72:566-7.

13. Eichhorst H. Veber infantile und hereditare multiple sklerosis. *Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medicin* 1896; 146:173-92.
14. Ramagopalan SV, Dymment DA, Ebers GC. Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 2008; 31: 645-52.
15. Herrera BM, Ebers GC. Progress in deciphering the genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2003; 16:253-8.
16. D'Netto MJ, Ward H, Morrison KM, Ramagopalan SV, Dymment DA, DeLuca GC, et al. Risk alleles for multiple sclerosis in multiplex families. *Neurology* 2009; 72:1984-8.
17. Hensiek AE, Seaman SR, Barcellos LF, Oturai A, Eraksoi M, Cocco E, et al. Familial effects on the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 68:376-83.
18. Oturai AB, Ryder LP, Fredrikson S, Myhr KM, Celius EG, Harbo HF, et al. Concordance for disease course and age of onset in Scandinavian multiple sclerosis coaffected sib pairs. *Mult Scler* 2004; 10:5-8.
19. Kenealy SJ, Pericak-Vance MA, Haines JL. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Journal Neuroimmunol* 2003; 143:7-12.
20. Willer CJ, Dymment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:12877-82.
21. Ebers GC, Sadovnick AD, Dymment DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet* 2004; 363:1773-4.
22. Sazdovitch V, Verdier-Taillefer MH, Heinzlef O, Alamowitch S, Roullet E. Familial multiple sclerosis: study of 357 consecutive patients. *Rev Neurol (Paris)* 2000; 156:638-40.
23. Landete L, Casanova B, Burguera JA. Esclerosis múltiple familiar: estudio de 6 familias. *Rev Neurol* 1998; 27:43-7.

24. Fernández-Pérez MJ, Barakat O, García-Moreno JM, Lucas M, Navarro G, Gata JM, et al. Características clínicas de la esclerosis múltiple familiar en España. *Rev Neurol* 1999; 29:693-6.
25. Amela-Peris R, Aladro Y, Conde-Sendín MA, Alemany-Rodríguez MJ, Muñoz-Fernández C, Reyes-Yáñez MP, et al. Esclerosis múltiple en Canarias. *Rev Neurol* 2004; 39:911-4.
26. Ebers GC, Koopman WJ, Hader W, Sadovnick AD, Kremenchutzky M, Mandalfino P, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 8: familial multiple sclerosis. *Brain* 2000; 123:641-9.
27. Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH. Multiple Sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 1988; 29:533-41.
28. Sadovnick AD. Genetic epidemiology of multiple sclerosis: a survey. *Ann Neurol* 1994; 36 Suppl 2:S194-S203.
29. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2002; 359: 1221-31.
30. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Factors influencing sib risks for multiple sclerosis. *Clin Genet* 2000; 58:431-5.
31. Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 1996; 119:449-55.
32. Carton H, Vlietinck R, Debruyne J, De Keyser J, D'Hooghe MB, Loos R, et al. Risks of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62:329-33.
33. Montomoli C, Prokopenko I, Caria A, Ferrai R, Mander A, Seaman S, et al. Multiple sclerosis recurrence risk for siblings in an isolated population of central Sardinia, Italy. *Genet Epidemiol* 2002; 22:265-71.
34. Hawkes CH, Macgregor AJ. Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Mult Scler* 2009; 15:661-7.



35. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 1994; 44:11-15.
36. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 1995; 377:150-1.
37. Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment D, Risch NJ. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 1996; 347:1728-30.
38. Robertson NP, O’Riordan JI, Chataway J, Kingsley DP, Miller DH, Clayton D, et al. Offspring recurrence rates and clinical characteristics of conjugal multiple sclerosis. *Lancet* 1997; 349:1587-90.
39. Ebers GC, Yee IM, Sadovnick AD, Duquette P. Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol* 2000; 48:927-31.
40. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Recurrence risks to sibs of MS index cases: impact of consanguineous matings. *Neurology* 2001; 56:784-5.
41. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2008; 9:516-26.
42. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; 357:851-62.
43. Hoppenbrouwers IA, Aulchenko YS, Ebers GC, Ramagopalan SV, Oostra BA, van Duijn CM, et al. EVI5 is a risk gene for multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008; 9:334-7.
44. Aulchenko YS, Hoppenbrouwers IA, Ramagopalan SV, Broer L, Jafari N, Hillert J, et al. Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nat Genet* 2008; 40:1402-3.

45. Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, et al. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* 1996; 13:464-8.
46. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, et al. A full genome search in multiple sclerosis. *Nature Genet* 1996; 13:472-6.
47. Kuokkanen S, Gschwend M, Rioux JD, Daly MJ, Terwilliger JD, Tienari PJ, et al. Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families. *Am J Hum Genet* 1997; 61:1379-87.
48. Chataway J, Feakes R, Corradu F, Gray J, Deans J, Fraser M, et al. The genetics of multiple sclerosis: principles, background and update results of the United Kingdom systematic genome screen. *Brain* 1998; 121:1869-87.
49. Kenealy SJ, Babron MC, Bradford Y, Schnetz-Boutaud N, Haines JL, Rimmler JB, et al. A second-generation genomic screen for multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004; 75:1070-8.
50. Sawcer S, Ban M, Marian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A, et al. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2005; 77:454-67.
51. GAMES and the Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative. A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 143:39-46.
52. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat genet* 2009; 41:776-82.
53. MHC Sequencing Consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; 401:921-3.
54. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 2003; 425:805-11.
55. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 2004; 5:889-99.

56. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:702-9.
57. Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, Hunt S, et al. A high-resolution linkage-disequilibrium of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2005; 76:634-46.
58. Cullen M, Perfetto SP, Klitz W, Nelson G, Carrington M. High-resolution patterns of meiotic recombination across the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet* 2002; 71:759-76.
59. Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:311-4.
60. Bakker PI, Mcvean G, Sabeti PC, Miretti MM, Green T, Marchini J, et al. A high resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet* 2006; 38:1166-72.
61. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010; 75:291-455.
62. Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Noreen HJ, Kempenich JH, et al. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 2009; 73:95-170.
63. Olerup O, Carlsson B, Wallin J, Olsson T, Fredrikson S, Ernerudh J, et al. Genomic HLA-typing by RFLP-analysis using DR beta and DQ beta cDNA probes reveals normal DR-DQ linkages in patients with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 1987; 30:135-8.
64. Fodgell A, Hillert J, Sachs C, Olerup O. The multiple sclerosis- and narcolepsy-associated HLA class II haplotype includes the DRB5\*0101 allele. *Tissue Antigens* 1995; 46:333-6.
65. Dymant, DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, et al. Complex interaction among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum. Mol Genet* 2005; 14:2019-26.

66. Ramagopalan SV, Morris AP, Dyment DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet* 2007; 3:1607-13.
67. Marrosu MG, Murru MR, Costa G, Cucca F, Sotgiu S, Rosati G, et al. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet* 1997; 61:454-7.
68. Saruhan-Direskeneli G, Esin S, Baykan-Kurt B, Ornek I, Vaughan R, Eraksoy M. HLA-DR and -DQ associations with multiple sclerosis in Turkey. *Hum Immunol* 1997; 55:59-65.
69. Corradu F, Reyes-Yanez MP, Parra A, Gray J, Smith SI, Taylor CJ, et al. HLA associations with multiple sclerosis in the Canary Islands. *J Neuroimmunol* 1998; 87:130-5.
70. Marrosu MG, Murru R, Murru MR, Costa G, Zavattari P, Whalen M, et al. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2907-16.
71. Fogdell-Hahn A, Ligers A, Gronning M, Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* 2000; 55:140-8.
72. Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, Roos IM, Akesson E, Palmgren J, et al. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* 2007; 2:e664.
73. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007; 61:228-36.
74. Ramagopalan SV, Knight JC, Ebers GC. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Curr Opin Neurol* 2009; 22:219-25.
75. Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15, DQ6, Dw2 haplotype. *Neurology* 1993; 43:163-8.

76. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymment DA, Tiislar M, et al. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2005; 37:1108-12.
77. Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2007; 165:1097-109.
78. Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, et al. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet* 2003; 72:710-6.
79. Etzensperger R, McMahon RM, Jones EY, Fugger L. Dissection of the multiple sclerosis associated DR2 haplotype. *J Autoimmun* 2008; 31:201-7.
80. Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, et al. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet* 2004; 74:160-7.
81. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, et al. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2006; 15:2813-24.
82. Ramagopalan SV, Herrera BM, Bell JT, Dymment DA, Deluca GC, Lincoln MR, et al. Parental transmission of HLA-DRB1\*15 in multiple sclerosis. *Hum Genet* 2008; 122:661-3.
83. Ciusani E, Allen M, Sandberg-Wollheim M, Eoli M, Salmaggi A, Milanese C, et al. Analysis of HLA-class II DQA1, DQB1, DRB1 and DPB1 in Italian multiple sclerosis patients. *Eur J Immunogenet* 1995; 22:171-8.
84. Kellar-Wood HF, Wood NW, Holmans P, Clayton D, Robertson N, Compston DA. Multiple sclerosis and the HLA-D region: linkage and association studies. *J Neuroimmunol* 1995; 58:183-90.
85. Ballerini C, Guerini FR, Rombolà G, Rosati E, Massacesi L, Ferrante P, et al. HLA-multiple sclerosis association in continental Italy and correlation with disease prevalence in Europe. *J Neuroimmunol* 2004; 150:178-85.

86. Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Cannella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, et al. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* 2000; 191:1395-412.
87. Svejgaard A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics* 2008; 60:275-86.
88. Sellebjerg F, Jensen J, Madsen HO, Svejgaard A. HLA DRB1\*1501 and intrathecal inflammation in multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2000; 55:312-8.
89. Lang HLE, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2002; 3:940-3.
90. Wekerle H, Hohlfeld R. Molecular Mimicry in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2003; 349:185-6.
91. McDonnell GV, Mawhinney H, Graham CA, Hawkins SA, Middleton D. A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis. *J Neurol Sci* 1999; 165:77-83.
92. Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann. Neurol* 2000; 48:211-9.
93. Brassat D, Salemi G, Barcellos LF, McNeill G, Proia P, Hauser SL. The HLA locus and multiple sclerosis in Sicily. *Neurology* 2005; 64:361-3.
94. Dean G, Yeo TW, Goris A, Taylor CJ, Goodman RS, Elian M, et al. HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Malta. *Neurology* 2008; 70:101-5.
95. Silva AM, Pereira C, Bettencourt A, Carvalho C, Couto AR, Leite MI, et al. The role of HLA-DRB1 alleles on susceptibility and outcome of a Portuguese multiple sclerosis population. *J Neurol Sci* 2007; 258:69-74.
96. Barcellos LF, Oksenberg JR, Green AJ, Bucher P, Rimmler JB, Schmidt S, et al. Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125:150-8.

97. Brum DG, Barreira AA, Louzada-Junior P, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Association of the HLA-DRB1\*1501 and DRB1\*1503 alleles with multiple sclerosis in White and Mulato samples from Brazil. *J Neuroimmunol* 2007; 189:118-24.
98. Patrucco L, Larriba J, Redal MA, Rojas JI, Argibay PF, Cristiano E. HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Argentina. *Eur J Neurol* 2009; 16:427-9.
99. Stankovich J, Butzkueven H, Marriott M, Chapman C, Tubridy N, Tait BD, et al. HLA-DRB1 associations with disease susceptibility and clinical course in Australians with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2009; 74: 17-21.
100. Kwon OJ, Karni A, Israel S, Brautbar C, Amar A, Meiner Z, et al. HLA class II susceptibility to multiple sclerosis among Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews. *Arch Neurol* 1999; 56:555-60.
101. Kelly MA, Jacobs KH, Penny MA, Mijovic CH, Nightingale S, Barnett AH, et al. An investigation of HLA-encoded genetic susceptibility to multiple sclerosis in subjects of Asian Indian and Afro-Caribbean ethnic origin. *Tissue Antigens* 1995; 45:197-202.
102. Caballero A, Alvéz-Leon S, Papais-Alvarenga R, Fernández O, Navarro G, Alonso A. DQB1\*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens* 1999; 54:524-6.
103. Marrosu MG, Cocco E, Lai M, Spinicci G, Pischedda MP, Contu P. Patients with multiple sclerosis and risk of type 1 diabetes mellitus in Sardinia, Italy: a cohort study. *Lancet* 2002; 359:1461-5.
104. DeLuca GC, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dymment DA, Lincoln MR, Montpetit A, et al. An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:20896-901.
105. Ma JJ, Nishimura M, Mine H, Saji H, Ohta M, Saida K, et al. HLA-DRB1 and tumor necrosis factor gene polymorphisms in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 1998: 92:109-12.

106. Ono T, Zambenedetti MR, Yamasaki K, Kawano Y, Kamikawaji N, Ito H, et al. Molecular analysis of HLA class I (HLA-A and -B) and HLA class II (HLA-DRB1) genes in Japanese patients with multiple sclerosis (Western type and Asian type). *Tissue Antigens* 1998; 52:539-42.
107. Ito H, Yamasaki K, Kawano Y, Horiuchi I, Yun C, Nishimura Y, et al. HLA-DP-associated susceptibility to the optico-spinal form of multiple sclerosis in the Japanese. *Tissue Antigens* 1998; 52:179-82.
108. Isobe N, Matsushita T, Yamasaki R, Ramagopalan SV, Kawano Y, Nishimura Y, et al. Influence of HLA-DRB1 alleles on the susceptibility and resistance to multiple sclerosis in Japanese patients with respect to anti-aquaporin 4 antibody status. *Multiple Sclerosis* 2010; 16:147-55.
109. Wu XM, Wang C, Zhang KN, Lin AY, Kira J, Hu GZ, et al. Association of susceptibility to multiple sclerosis in Southern Han Chinese with HLA-DRB1, -DPB1 alleles and DRB1-DPB1 haplotypes: distinct from other populations. *Mult Scler* 2009;15:1422-30.
110. Compston A, Wekerle H. The genetics of multiple sclerosis. In: Compston A editor. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 4th Edition. London: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 113-81.
111. Fernández O, R-Antigüedad A, Pinto-Medel MJ, Mendibe MM, Acosta N, Oliver B, et al. HLA class II alleles in patients with multiple sclerosis in the Biscay province (Basque Country, Spain). *J Neurol* 2009; 256:1977-88.
112. Weatherby SJ, Thomson W, Pepper L, Donn R, Worthington J, Mann CL, et al. HLA-DRB1 and disease outcome in multiple sclerosis. *J Neurol* 2001; 248:304-10.
113. Wu JS, James I, Qiu W, Castley A, Christiansen FT, Carroll WM, et al. Influence of HLA-DRB1 allele heterogeneity on disease risk and clinical course in a West Australian MS cohort: a high-resolution genotyping study. *Mult Scler* 2010; 16:526-32.
114. Matsuoka T, Matsushita T, Osoegawa M, Kawano Y, Minohara M, Mihara F, et al. Association of the HLA-DRB1 alleles with characteristic MRI features of Asian multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14:1181-90.



115. Pina MA, Ara JR, Lasierra P, Modrego PJ, Larrad L. Study of HLA as a Predisposing Factor and Its Possible Influence on the Outcome of Multiple Sclerosis in the Sanitary District of Calatayud, Northern Spain. *Neuroepidemiology* 1999; 18: 203-209.
116. Uría DF. HLA y esclerosis múltiple. Estudios en la población española. *Rev Neurol* 2000; 31:1066-70.
117. Villoslada P, Barcellos LF, Rio J, Begovich AB, Tintore M, Sastre-Garriga J, et al. The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2002; 130:194-201.
118. Fernández O, Fernández V, Alonso A, Caballero A, Luque G, Bravo M, et al. DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol* 2004; 251:440-4.
119. Burguera JA, Montoro JA, Coret F, Soler MA, Blasco R, López Arlandis J. Estudio HLA, A, B y DR en 20 pacientes con esclerosis múltiple. *Arch Neurobiol* 1988; 51:278-81.
120. López-Larrea C, Uría DF, Coto E. HLA antigens in multiple sclerosis of northern Spanish population. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry* 1989; 52:434-5.
121. Clerici N, Hernández M, Fernández M, Rosique J, Alvarez-Cermeño J. Multiple sclerosis is associated with HLA-DR2 antigen in Spain. *Tissue Antigens* 1989; 34:309-11.
122. Uría DF, Gutiérrez V, Menes BB, Arribas JM, López-Larrea C. HLA class II susceptibility and resistance genes in patients with multiple sclerosis from Northern Spain, by DNA-RFLP genotyping. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56:722-3.
123. De la Concha EG, Arroyo R, Crusius JB, Campillo JA, Martin C, Varela de Seijas E, et al. Combined effect of HLA-DRB1\*1501 and interleukin-1 receptor antagonist gene allele 2 in susceptibility to relapsing/remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997; 80:172-8.
124. Pina MA, Ara JR, Lasierra P, Larrad L, Modrego PJ. Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS. *Neurology* 1999; 52:1923-4.

125. Fernández O, Fernández V, Martínez-Cabrera V, Mayorga C, Alonso A, León A, et al. Multiple sclerosis in gypsies from southern Spain: prevalence, mitochondrial DNA haplogroups and HLA class II association. *Tissue Antigens* 2008; 71:426-33.
126. Clerici N, Fernández M. Restriction fragment length polymorphism analysis of HLA-DR-DQ-linked alleles in multiple sclerosis in Spain. *J Neuroimmunol* 1992; 41:245-8.
127. Comas D, Mateu E, Calafell F, Pérez-Lezaun A, Bosch E, Martínez-Arias R, et al. HLA class I and class II DNA typing and the origin of Basques. *Tissue Antigens* 1998; 51:30-40.
128. Arbizu T: La Esclerosis Múltiple en el Baix Llobregat: tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 1993.
129. Fernández O: La esclerosis múltiple en la provincia de Málaga: tesis doctoral. Universidad de Málaga, 1990.
130. Fernandez-Morera JL, Rodriguez-Rodero S, Tunon A, Martinez-Borra J, Vidal-Castineira JR, Lopez-Vazquez A, et al. Genetic influence of the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule MICB in multiple sclerosis susceptibility. *Tissue Antigens* 2008; 72:54-9.
131. Fernández-Morera JL, Rodríguez-Rodero S, Lahoz C, Tuñon A, Astudillo A, Garcia-Suarez O, et al. Soluble MHC class I chain-related protein B serum levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum Immunol.* 2008; 69:235-40.
132. Sepulcre J, Masdeu JC, Palacios R, Goñi J, Moreno B, Tainta M, et al. HLA-DR2 and white matter lesion distribution in MS. *J Neuroimaging* 2008; 18:328-31.
133. Comabella M, Fernández-Arquero M, Río J, Guinea A, Fernández M, Cenit MC, et al. HLA class I and II alleles and response to treatment with interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009; 210:116-9.
134. Chataway J, Mander A, Robertson N, Sawcer S, Deans J, Fraser M, et al. Multiple sclerosis in sibling pairs: an analysis of 250 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001; 71:757-61.

135. Okuda DT, Srinivasan R, Oksenberg JR, Goodin DS, Baranzini SE, Beheshtian A, et al. Genotype-Phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by <sup>1</sup>HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain* 2009; 132:250-9.
136. Ramagopalan SV, DeLuca G, Degenhardt A, Ebers GC. The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008; 201-202: 183-99.
137. Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R, Deans J, Mander A, Akesson E, et al. HLA-DR15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72:184-7.
138. Smestad C, Brynedal B, Jonasdottir G, Lorentzen AR, Masterman T, Akesson E, et al. The impact of HLA-A and -DRB1 on age at onset, disease course and severity in Scandinavian multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2007; 14:835-40.
139. Ramagopalan SV, Byrnes JK, Dymont DA, Guimond C, Handunnetthi L, Disanto G, et al. Parent-of-origin of HLA-DRB1\*1501 and age of onset of multiple sclerosis. *J Hum Genet* 2009; 54:547-9.
140. Wu JS, Qiu W, Castley A, James I, Mastaglia FL, Christiansen FT, et al. Modifying effects of HLA-DRB1 allele interactions on age at onset of multiple sclerosis in Western Australia. *Mult Scler* 2010; 16:15-20.
141. Weinshenker BG, Santrach P, Bissonet AS, McDonnell SK, Schaid D, Moore SB, et al. Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study. *Neurology* 1998; 51:742-7.
142. Celius EG, Harbo HF, Egeland T, Vartdal F, Vandvik B, Spurkland A. Sex and age at diagnosis are correlated with the HLA-DR2, DQ6 haplotype in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2000; 178:132-5.
143. Kantarci OH, de Andrade M, Weinshenker BG. Identifying disease modifying genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002; 123:144-59.
144. Cournu-Rebeix I, Génin E, Leray E, Babron MC, Cohen J, Gout C, et al. HLA-DRB1\*15 allele influences the later course of relapsing remitting multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008; 9:570-4.

145. Vasconcelos CC, Fernández O, Leyva L, Thuler LC, Alvarenga RM. Does the DRB1\*1501 allele confer more severe and faster progression in primary progressive multiple sclerosis patients? HLA in primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009; 214:101-3.
146. Wu JS, James I, Qiu W, Castley A, Christiansen FT, Carroll WM, et al. HLA-DRB1 allele heterogeneity influences multiple sclerosis severity as well as risk in Western Australia. *J Neuroimmunol* 2010; 219:109-13.
147. Fusco C, Andreone V, Coppola G, Luongo V, Guerini F, Pace E, et al. HLADRB1\*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57:1976-9.
148. Fernández O, Fernández V, Mayorga C, Guerrero M, León A, Tamayo JA, et al. HLA class II and response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2005; 112:391-4.
149. Sadovnick AD, Yee IM, Guimond C, Reis J, Dyment DA, Ebers GC. Age of onset in concordant twins and other relative pairs with multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 2009; 170:289-96.
150. Robertson NP, Clayton D, Fraser M, Deans J, Compston DA. Clinical concordance in sibling pairs with multiple sclerosis. *Neurology* 1996; 47: 347-52.
151. Brassat D, Azais-Vuillemin C, Yaouanq J, Semana G, Reboul J, Cournu I, et al. Familial factors influence disability in MS multiplex families. *Neurology* 1999; 52:1632-6.
152. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006; 180:17-28.
153. Imrell K, Landtblom AM, Hillert J, Masterman T. Multiple sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology* 2006; 67:1062-4.
154. Kikuchi S, Fuzakawa T, Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, et al. HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. *Neurology* 2003; 60:647-51.

155. Idiman E, Ozakbas S, Dogan Y, Kosehasanogullari G. The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis: relevance of demographic and clinical features, and immunogenetic backgrounds. *J Neuroimmunol* 2009; 212:121-4.
156. Wu JS, Qiu W, Castley A, James I, Mastaglia FL, Christiansen FT, et al. Presence of CSF oligoclonal bands (OCB) is associated with the HLA-DRB1 genotype in a West Australian multiple sclerosis cohort. *J Neurol Sci* 2010; 288: 63-7.
157. Zivadinov R, Uxa L, Bratina A, et al. HLA-DRB1\*1501, -DQB1\*0301, -DQB1\*0302, -DQB1\*0602, and -DQB1\*0603 alleles are associated with more severe disease outcome on MRI in patients with multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 79:521-35.
158. Sombekke MH, Lukas C, Crusius JB, Tejedor D, Killestein J, Arteta D, et al. HLA-DRB1\*1501 and spinal cord magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66:1531-6.
159. Healy BC, Liguori M, Tran D, Chitnis T, Glanz B, Wolfish C, et al. HLA B\*44: Protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures. *Neurology* 2010; 75:634-40.
160. Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, Herrera BM, Deluca GC, Orton SM, et al. Epistasis among HLA-DRB1, and HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:7542-7.
161. Chao MJ, Barnardo M, Lincoln MR, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dymont DA, et al. HLA class I alleles tag HLA-DRB1\*1501 haplotypes for differential risk in multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:13069-74.
162. Motsinger AA, Brassat D, Caillier SJ, Erlich HA, Walker K, Steiner LL, et al. Complex gene-gene interactions in multiple sclerosis: a multifactorial approach reveals associations with inflammatory genes. *Neurogenetics* 2007; 8:11-20.
163. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7:268-77.
164. Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sorensen PS, et al. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 2007; 64:72-5.

165. Nielsen TR, Rostgaard K, Askling J, Steffensen R, Oturai A, Jersild C, et al. Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1\*15 in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15:431-6.
166. Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC, Giovannoni G. Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1\*15 in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16:127-8.
167. De Jager PL, Simon KC, Munger KL, Rioux JD, Hafler DA, Ascherio A. Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology* 2008; 70:1113-8.
168. Sundström P, Nyström M, Ruuth K, Lundgren E. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA-DRB1\*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009; 215:102-7.
169. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama* 2006; 296:2832-8.
170. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol* 2008; 194:7-17.
171. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dymont DA, et al. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000369.
172. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13:227-31.
173. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-7.
174. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58:840-6.

175. Confavreux C, Compston DA, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55:671-6.
176. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444-52.
177. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39:225-35.
178. Walker RW, Keir G, Johnson MH, Thompson EJ. A rapid method for detecting oligoclonal IgG in unconcentrated CSF, by agarose isoelectric focusing, transfer to cellulose nitrate and immunoperoxidase staining. *J Neuroimmunol* 1983; 4:141-8.
179. Koch M, Zhao Y, Yee I, Guimond C, Kingwell E, Rieckmann P, et al. Disease onset in familial and sporadic primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16: 694-700.
180. Sombekke MH, Arteta D, van de Wiel MA, Crusius JB, Tejedor D, Killestein J, et al. Analysis of multiple candidate genes in association with phenotypes of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16:652-9.
181. Fricska-Nagy Z, Bencsik K, Rajda C, Füvesi J, Honti V, Csépany T, et al. Epidemiology of familial multiple sclerosis in Hungary. *Mult Scler* 2007; 13: 260-1.
182. Cocco E, Sardu C, Lai M, Spinicci G, Contu P, Marrosu MG. Anticipation of age at onset in multiple sclerosis: a Sardinian cohort study. *Neurology* 2004; 62:1794-8.
183. Alonso-Magdalena L, Romero-Pinel L, Moral E, Carmona O, Gubieras L, Ramón JM, et al. Anticipation of age at onset in multiple sclerosis: methodologic pitfalls. *Acta Neurol Scand* 2010; 121:426-8.
184. Koch M, Uyttenboogaart M, Heerings M, Heersema D, Mostert J, De Keyser J. Progression in familial and nonfamilial MS. *Mult Scler* 2008; 14:300-6.

185. AMMSG, 1998. Clinical demographics of multiplex families with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; 43:530-4.
186. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC, Risch NJ. Effect of age at onset and parental disease on sibling risks for MS. *Neurology* 1998; 50:719-23.
187. Cree BA, Reich DE, Khan O, De Jager PL, Nakashima I, Takahashi T, et al. Modification of Multiple Sclerosis Phenotypes by African Ancestry at HLA. *Arch Neurol* 2009; 66:226-33.
188. Runmarker B, Martinsson T, Wahlström J, Andersen O. HLA and prognosis in multiple sclerosis. *J Neurol* 1994; 241:385-90.
189. Callander M, Haghighi S, Landtblom AM, Ahlgren CE, Nilsson SI, Rydberg L, et al. Multiple sclerosis immunopathic trait and HLA-DR(2)15 as independent risk factors in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007; 13:441-5.







