

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

ASOCIACIÓN DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DEL EPSTEIN BARR Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN PACIENTES MEXICANOS

Biol. Adolfo González Carranza

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales¹

ASESORES:

Dr. Carlos Hernández Girón²

Dr. Vicente Madrid Marina¹

Centro de investigación sobre enfermedades infecciosas¹

Centro de investigación en salud poblacional²

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2013



El presente estudio derivado del proyecto madre: “Factores de Riesgo Asociados a la Esclerosis Múltiple en México: estudio multicéntrico”, se realizó bajo el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social: FOSISS-10-ST-159, proy: SALUD-2008-C01-87366.



COMITÉ SINODAL

Presidente: Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales

Secretario: Dr. Carlos Alfonso Hernández Girón

Primer Sinodal: Dr. José Moreno Rodríguez



AGRADECIMIENTOS

- Al Instituto nacional de salud pública por permitirme ser parte de su comunidad y por la enseñanza adquirida durante estos 2 años de programa de maestría.
- Al centro de investigación sobre enfermedades infecciosas (CISEI), y su planta de profesores que influyeron directamente en mi formación.
- Al grupo de trabajo del laboratorio 4 planta baja, por enriquecer este trabajo con sus acertados comentarios durante los seminarios. Especialmente, al Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales, por brindarme su confianza y el apoyo necesario, para la elaboración de este proyecto de tesis.
- Al Dr. Vicente Madrid Marina, por todo el apoyo otorgado para la elaboración de mi tesis de maestría.
- Al Dr. Carlos Alfonso Hernández Girón, Dr. José Moreno Rodríguez, por sus valiosos y acertados comentarios.
- A CONACYT, por el apoyo otorgado a través de la beca no. 319635.

INDICE GENERAL

Índice de figuras.....	I
Índice de tablas.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
Resumen.....	IV
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Enfermedad de la esclerosis múltiple (EM).....	3
2.2 Epidemiología de la esclerosis múltiple.....	5
2.3 Desarrollo de la enfermedad de la esclerosis múltiple.....	7
2.4 Signos y síntomas en el curso de la EM.....	8
2.5 Fisiopatología de la enfermedad de la EM.....	10
2.6 Respuesta inmune en la enfermedad de la EM.....	11
2.6.1 Inflamación.....	11
2.6.2 La esclerosis múltiple como enfermedad de origen autoinmune.....	13
2.6.3 El mimetismo molecular como factor desencadenante el proceso autoinmune.....	14
2.7 Base genética de la esclerosis múltiple.....	15
2.8 Factores ambientales asociados a la enfermedad de la EM.....	15
2.9 Los agentes virales asociados a procesos desmielinizantes.....	16
2.10 Modelos experimentales desarrollados para el estudio de la EM.....	17
2.11 El virus de Epstein- Barr (VEB) como factor de riesgo para el desarrollo de la EM.....	18
2.12 Características del virus de Epstein-Barr (VEB).....	19
2.13 Vía y mecanismos de infección del VEB en humanos.....	20
2.14 Evidencias de detección de DNA del VEB en suero de pacientes con EM.....	23
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivo general.....	25
6. Objetivos particulares.....	25
7. Metodología.....	26
7.1 Diseño del estudio de asociación entre el VEB y la EM.....	26
7.2 Purificación de DNA total a partir de sueros de pacientes con EM y controles.....	26
7.3 Detección del genoma del VEB en sueros de pacientes con EM por medio de la PCR en tiempo real.....	28

7.4 Detección de carga viral: VEB.....	28
8. Resultados.....	30
8.1 Descripción de la población de casos de pacientes con EM y controles.....	30
8.2 Amplificación del gen endógeno β -actina a partir del DNA total de sueros de pacientes con EM y controles, por medio de la PCR tiempo real.....	34
8.3 Amplificación del VEB a partir del DNA total de sueros de pacientes con EM, y controles, por PCR tiempo real.....	36
8.4 Curva estándar para detectar carga viral.....	37
9. Discusión.....	42
10. Conclusión.....	46
11. Perspectivas.....	47
12. Bibliografía.....	48

Glosario

Anexo 1. Carta de consentimiento informado de participación en estudio de factores de riesgo asociados a la esclerosis múltiple en México: estudio multicéntrico.

Anexo 2. Secuencia de los oligos para la amplificación del virus de Epstein-Barr.

Anexo 3 Cuestionario sociodemográfico. Correspondiente al proyecto madre Factores de riesgo asociados a la esclerosis múltiple en México: estudio multicéntrico.

Anexo 4 Cuestionario Clínico, correspondiente al proyecto madre Factores de riesgo asociados a la esclerosis múltiple en México: estudio multicéntrico.

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1	3
Figura 2	4
Figura 3	6
Figura 4	8
Figura 5	11
Figura 6	12
Figura 7	19
Figura 8	20
Figura 9	27
Figura 10	35
Figura 11	35
Figura 12	36
Figura 13	37
Figura 14	38
Figura 15	38
Figura 16	39
Figura 17	40
Figura 18	41
Figura 19	41

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1.....	9
Tabla 2.....	17
Tabla 3.....	29
Tabla 4.....	30
Tabla 5.....	31
Tabla 6.....	31
Tabla 7.....	32
Tabla 8.....	33
Tabla 9.....	34
Tabla 10.....	39

ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
CD	Grupo de diferenciación (Cluster of Differentiation)
CT	Copia umbral (Copy threshold)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
EBNA	Antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr
EM	Esclerosis múltiple
EM PP	Esclerosis múltiple primaria progresiva
EM PR	Esclerosis múltiple primaria remitente
EM RR	Esclerosis múltiple remitente recurrente ó brote remitente
EM SP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
Fc	Fracción cristizable
FCR	Fluido cefalorraquídeo
FIEM	Federación internacional de la esclerosis múltiple
HTLV	Virus linfotrópico de células T humano
HLA/MHC	Antígeno leucocitario humano/complejo mayor de histocompatibilidad
HHV-6	Herpes humano tipo 6
HHV-4	Virus herpes humano tipo 4
ICAM	Molécula de adhesión molecular
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
INNN	Instituto nacional de neurología y neurocirugía
IRM	Imagen de resonancia magnética

JCV	Virus de John Cunningham (Papovavirus)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
MI	Mononucleosis infecciosa
MOG	Glicoproteína de mielina del oligodendrocito
NF- κ B	Factor nuclear Kappa- β
ng	Nanogramos
ON	Oxido nítrico
ORF	Fragmento de lectura abierta
PBM	Proteína básica de la mielina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPL	Proteína proteolipídica
PTLD	Enfermedad linfoproliferativa postransplante
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
RNA	Ácido ribonucleico
SHAVEB	Síndrome hemofagocítico asociado al VEB
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SSPE	Panencefalitis esclerótica subaguda
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEB	Virus de Epstein-Barr
VENT	Virus de encefalitis murina de Theiler
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VMC	Virus del moquillo canino
VZV	Virus de varicela zoster
μ l	Microlitros



RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM), es la enfermedad inflamatoria desmielinizante más común del Sistema Nervioso Central, produce invalidez no traumática y afecta a personas durante la edad productiva laboralmente. Entre los factores de riesgo para el desarrollo de la EM, se encuentran los agentes infecciosos. Particularmente el virus de Epstein-Barr, se ha asociado con el inicio y desarrollo de la EM, debido a que diversos estudios seroepidemiológicos, han reportado la presencia de elevados títulos de anticuerpos contra el virus de Epstein-Barr, detectados en sueros de pacientes con EM. Con base en lo anterior, el presente estudio pretende establecer la asociación de la infección del virus de Epstein-Barr y esclerosis múltiple de una submuestra de 141 pacientes mexicanos con EM. En este sentido, a partir de sueros de pacientes con la enfermedad de la esclerosis múltiple, se llevó a cabo la detección del virus de Epstein-Barr; para lo cual, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real para detectar el genoma viral y para establecer la carga viral. El VEB solamente se detectó en 2 de 141 (1.4%) casos y 3 de 189 (1.5%) controles; la carga viral se estableció a partir de una regresión lineal logarítmica, usando los valores de las amplificaciones (CT's) del templado del VEB en una curva estándar, los pacientes con esclerosis múltiple tuvieron una media en número de copias igual a 4 y los controles sanos correspondió a una media de 14.6 en número de copias del VEB; En este sentido, al tener solamente 2 casos positivos al VEB y 3 controles positivos, no se encuentra una asociación de la infección del virus de Epstein-Barr y la esclerosis múltiple en una submuestra de 141 pacientes con EM.

1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM), es la enfermedad inflamatoria desmielinizante más común del sistema nervioso central (SNC), produce invalidez no traumática entre adultos jóvenes en edad productiva (Pirko, *et al*, 2012) y se desarrolla entre las edades de 15 y 45 años (Owens, *et al*, 2011). En el mundo se estima que la enfermedad afecta a 2.5 millones de personas (Hilas, *et al*, 2010), con una prevalencia variable de la enfermedad según la región geográfica, llegando a ser alta en los países del norte en un rango de entre 80 a 300/100,000 habitantes y baja en las regiones de África, Asia y Sudamérica donde las prevalencias se estiman alrededor de 5/100,000 habitantes (Carrillo y González, 2010).

En los Estados Unidos de América (EUA) la EM afecta a 350,000 personas (Welsh, *et al*, 2010), lo cual provoca alrededor de 3000 muertes por año con un costo estimado respecto a morbilidad anual de más de 2.5 billones de dólares (Owens, *et al*, 2011). En una revisión sistemática sobre estudios epidemiológicos realizados en América del Sur, se estimó que la prevalencia estaba en un rango de 1,48 a 17/100,000 habitantes, considerada como baja prevalencia (Carrillo y González, 2010). En México, la incidencia de la enfermedad no ha sido completamente determinada. Sin embargo, la prevalencia en México no ha tenido muchos cambios; en el año de 1970 se determinó en 1,6/100,000 habitantes (de la Maza, *et al*, 2000) y actualmente se establece en un rango entre 1,5 a 13/100,000 habitantes; por lo que se considera a México como un país de baja prevalencia. No obstante, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), revela un aumento en la frecuencia de nuevos casos durante el periodo comprendido entre 1973 a 1992 y un aumento de 10 veces en la frecuencia de nuevos casos para el periodo entre 1985 a 1994 (Velázquez, *et al*, 2003).

Por otro lado, la etiología de la EM es desconocida, pero es referida como la aparición de lesiones desmielinizantes, neurodegenerativas, crónicas del SNC y periférico. La EM es acompañada de desórdenes de la respuesta inmune que dependen del reclutamiento de linfocitos T reactivos al sistema nerviosos central, por lo cual es considerada como una enfermedad autoinmune (Ader, *et al*, 2001). Por otra parte, los estudios epidemiológicos han implicado a agentes infecciosos como posibles factores asociados a la EM (Welsh, *et al*, 2010; Libbey y Fujinami, 2010) como vulnerabilidad inmunológica durante la infancia y que posteriormente favorece el desarrollo de la enfermedad (Alotaibi, *et al*, 2004).

Dentro de estos agentes infecciosos se ha considerado al virus de varicela zoster (VZV), rubeolla, virus de la rabia, virus del moquillo y retrovirus; además de micoplasma y *Chlamidia pneumoniae*, debido a que pueden llegar a ser agentes patógenos potenciales para desarrollar la EM (Swanborg, *et al*, 202, Marrie, 2004). No obstante, los casos severos de la EM son frecuentemente precedidas por infecciones virales tales como: sarampión, parotiditis, parainfluenza tipo I, coronavirus, Epstein-Barr (VEB), herpes humano tipo 6 (HHV-6) (Welsh, *et al*, 2010); acompañados de elevados títulos de anticuerpos para los virus VEB y HHV-6 (Libbey y Fujinami, 2010). Particularmente, las infecciones de parotiditis, sarampión y VEB aumentan el riesgo del desarrollo de la EM; sobre todo, hay una mayor correlación entre el VEB con la EM cuando hay una infección primaria durante la adolescencia o la adultez temprana por el VEB. Esta correlación fue descrita con una fuerte tendencia entre las personas expuestas al VEB antes de 20 años de edad y EM (Gutiérrez, *et al*, 2008).

Por otro lado, debido a que el VEB es el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa (Libbey y Fujinami, 2010), se ha asociado un aumento en el riesgo de desarrollar EM en individuos con antecedentes de mononucleosis infecciosa por VEB (Marrie, 2004). Adicionalmente, diversos estudios seroepidemiológicos en pacientes con EM, han demostrado un aumento en la seroprevalencia de títulos de anticuerpos para VEB en sueros de pacientes con EM versus sus controles, además de que universalmente más del 99% de estos pacientes son seropositivos para el VEB y no para otros virus (Pender, 2012). Por lo tanto, hay diversas evidencias epidemiológicas que apoyan fuertemente la asociación de la infección por el VEB en el desarrollo de EM (Lassmann, *et al*, 2011); siendo la infección por el VEB un fuerte agente infeccioso que puede preceder al desarrollo de EM (Levin, *et al*, 2003; Levin, *et al*, 2005; Ascherio, *et al*, 2001). En este sentido, la detección oportuna del VEB y con la medición de la carga viral como herramienta para el diagnóstico (Parra, *et al*, 2010) puede ser usada para establecer la relación con el grado de avance o exacerbaciones de la enfermedad en pacientes con diagnóstico de esclerosis múltiple.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedad de la Esclerosis Múltiple (EM).

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC) (Fig. 1-A), que puede generar neurodegeneración asociada con la desmielinización de las neuronas (Lassmann, *et al*, 2011), con preservación relativa de los axones en la fase precoz y cicatrices en los astrocitos, aunque puede estar muy afectada en las fases agudas de la enfermedad (Carretero, *et al*, 2001). Las lesiones de desmielinización suelen ser múltiples en el SNC; en el cerebro característicamente tienen distribución perivenular y se localizan más frecuentemente en la sustancia blanca (Fig.1-B) periventricular del cerebro, cerebelo, médula espinal y con especial afinidad por los nervios ópticos (Carretero, *et al*, 2001).



Fig. 1-A

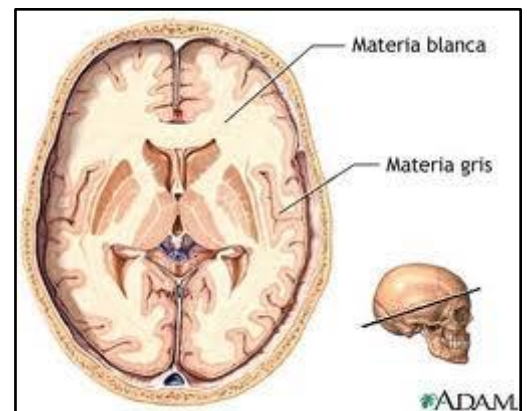


Fig. 1-B

Fig. 1. A) Anatomía del SNC: a.Cerebro, b.Mesencefalo, c.Cerebelo, d.Bulbo, e.Tronco encefálico, f.Médula espinal, g.Ganglio espinal, h.Duramadre espinal, i.Nervio espinal, j.Vértebra torácica, k.Vértebra sacra; tomado de Galiano y García, 2013. B). Ejemplo de vista de corte horizontal del cerebro ubicando los sitios específicos de la materia blanca y gris del cerebro; tomada de Jasmin y Zieve, 2012.

Las lesiones de desmielinización en el cerebro, se presentan con una morfología frecuentemente de tipo redondeado y oval, aunque a menudo presentan formas alargadas (conocidas como dedos de Dawson), que llegan a infiltrar vasos sanguíneos medianos y pequeños (Fig. 2). Principalmente, las lesiones son generadas por los linfocitos y macrófagos y la identificación de los productos de degradación de la mielina en macrófagos es el método de mayor fiabilidad para identificar lesiones activas. En este sentido, las lesiones de desmielinización son de dos tipos dependiendo de la actividad de la enfermedad (aguda y crónica). En las que se reconoce la lesión aguda, caracterizadas por la presencia de inflamación y en una lesión crónica se presenta una desmielinización progresiva que se acompaña de degeneración axonal y de gliosis (Carretero, *et al*, 2001).

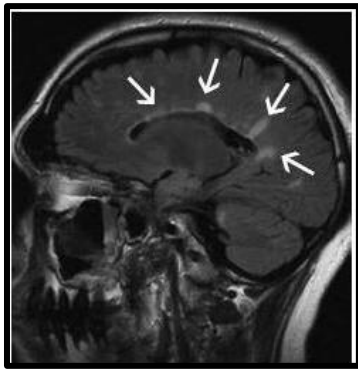


Fig.2-A

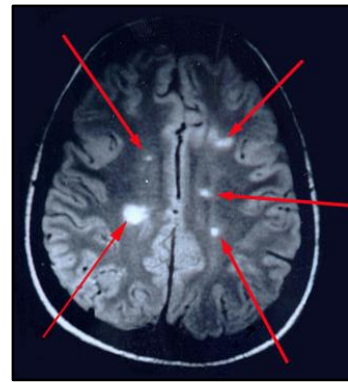


Fig.2-B

Fig. 2. Imágenes de resonancia magnética nuclear, lesiones características de la enfermedad de la EM. Las flechas blancas y rojas señalan las zonas de desmielinización (manchas en blanco). A). Vista sagital de una resonancia magnética nuclear con patrón de desmielinización conocida como dedos de Dawson; tomada de Warren y Catz, 2013; B). Vista axial de una resonancia magnética nuclear del cerebro; tomada de Ustarroz, *et al*, 2013.

2.2 Epidemiología de la Esclerosis Múltiple.

La EM, es una enfermedad que es común en áreas templadas y llega a ser rara en áreas tropicales. Kurtzke en 1975, definió tres zonas de prevalencia de EM en el mundo: a) prevalencia alta ($>30/100,000$) incluye el norte de Europa, EUA, Canadá, sur de Australia y Nueva Zelanda; b) prevalencia media ($5-30/100,000$), donde se incluyen el sur de Europa, sur de EUA y el norte de Australia y c) prevalencia baja ($<5/100,000$) se incluye Asia y América del norte (Kurtzke, 1975; Marrie, 2004). Adicionalmente, Koutsouraki y colaboradores en el 2010 determinaron, que en la década (2000-2009) se mantuvo un aumento en la incidencia de EM en varios países del continente Europeo.

En el continente americano, los países con mayores tasas de prevalencia e incidencia en número de casos de EM son: EUA y Canadá. En los EUA, Noonan en el 2002, reportó una prevalencia media de 85 casos por 100,000 habitantes (Noonan, *et al*, 2002). Sin embargo, la prevalencia variaba en determinadas localidades de Estados Unidos, se estimaron hasta 177 casos por cada 100,000 habitantes en Olmstead County, Minnesota, adicionalmente Mayr reportó una tasa de incidencia de 7,5 por 100 000 años- persona de 1985- 2000 (Mayr, *et al*, 2003). En Canadá se detectaron 20.9 casos en el 1990 a 23.9 casos en el 2004, esta incidencia fue registrada como la más alta del mundo a la que parecen contribuir principalmente el diagnóstico a edad más joven y la mayor supervivencia (Hernández, *et al*, 2011). Sin embargo, los reportes de la Federación Internacional de la Esclerosis Múltiple, con registros del 200 al 2013, reporta una prevalencia más alta en EUA y Canadá con $135/100,000$ y $291/100,000$ respectivamente; el resto de los países se encuentran en un rango de 0-60/100,000 (Fig. 3), (MSIF, 2013).

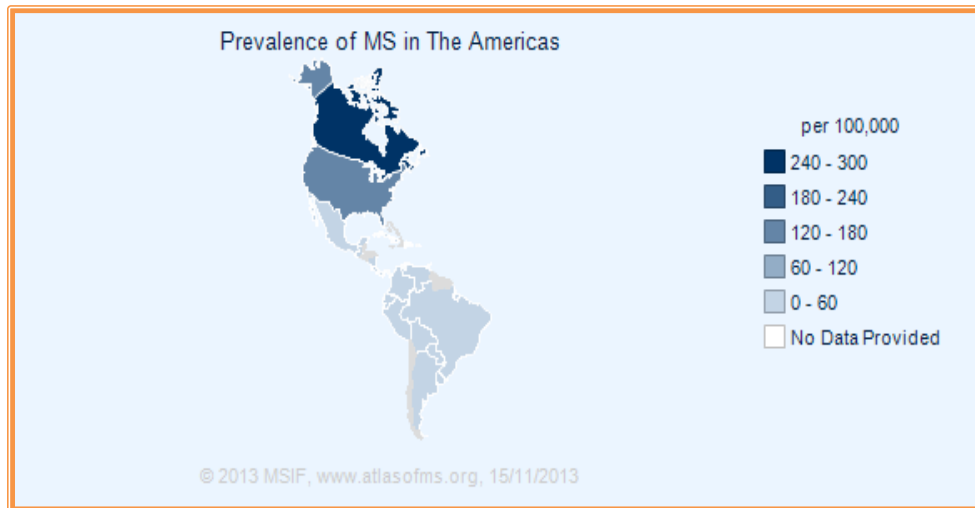


Fig. 3. Prevalencia de la esclerosis múltiple en el continente americano, con datos del año 2008 al 2013, a la derecha los rangos de prevalencia por cada 100 000 habitantes. Tomado de: Federación internacional de la esclerosis múltiple,(MSIF, 2013).

México es considerado un país de baja prevalencia en EM, con 1,5 y 13 casos por 100,000 habitantes (Velázquez, *et al*, 2003). A partir del año del 2008 la Federación Internacional de la Esclerosis Múltiple, reportó que la media para los casos de EM para México es de, 9 casos por cada 100,000 habitantes; sin embargo actualmente se reporta una media de 15 casos por 100,000 habitantes (MSIF, 2013). Cabe mencionar, que estos reportes son representativos de estudios aislados y de poblaciones pequeñas (Velázquez, *et al*, 2003), lo cual pudieran no reflejar un aumento evidente de los casos nuevos. Por otro lado, en un estudio multicéntrico hecho por Velázquez y colaboradores en el año 2003, si bien no resalta un aumento en la prevalencia e incidencia de casos de EM, contempla un tamaño de muestra mayor (337 pacientes) con EM, resaltando al estado de Morelos con el mayor número de casos (105), seguido por los estados de Chihuahua y Jalisco, con 51 y 90 casos respectivamente.

2.3 Desarrollo de la enfermedad de la Esclerosis múltiple.

La evolución clínica de la enfermedad es muy variada (Fig. 4), describiéndose principalmente cuatro tipos de evoluciones clínicas de la enfermedad; las cuales son; recurrente remitente (RR), primariamente progresiva (PP), secundariamente progresiva (SP) y progresiva recurrente (PR).

La EM-RR, se caracteriza por cuadros bien definidos de crisis o brotes agudos, de alteraciones de las funciones neurológicas con una remisión completa o parcial de los síntomas, permaneciendo sin progresión de los síntomas durante los periodos intercríticos, siendo esta variedad la más común que se presenta en los casos de pacientes con EM. El brote se define como el empeoramiento de los déficits neurológicos o la aparición de nuevos datos que persisten por lo menos 24 horas en ausencia de fiebre o elevación de temperatura. La forma PP se caracteriza por progresión de la enfermedad desde el inicio de los síntomas, con mesetas ocasionales y leves periodos de mejoría con un empeoramiento continuo y gradual y mínimas fluctuaciones, esto hace difícil su diagnóstico. Las variantes SP de la EM se caracteriza por tener una forma remitente recurrente inicial seguida de una progresión con o sin brotes ocasionales, mínimas remisiones o mesetas. Ésta tiene un curso tan prolongado como la RR, incluso 50% de los pacientes con EM RR progresa a una forma de EM SP que les condiciona brotes cada vez más severos y con mayores secuelas posteriores a cada brote, condicionando gran discapacidad. La variedad progresiva recurrente (PR) se define como la progresión desde el inicio de la enfermedad con desarrollo de exacerbaciones, con o sin recuperación, y que continua progresando en los periodos intercríticos, se considera la forma menos frecuente de EM (Porrás, *et al*, 2007).

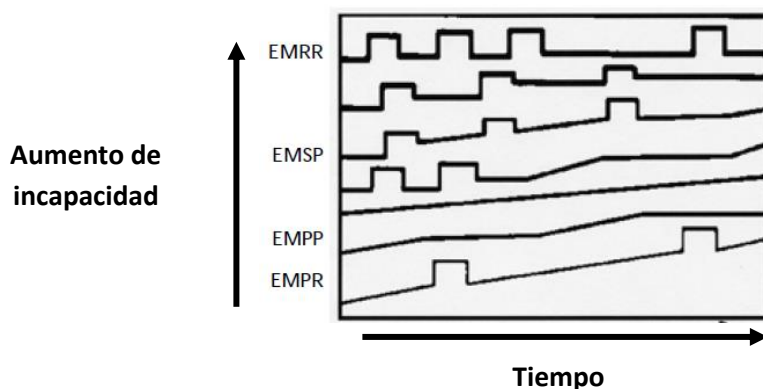


Fig.4. Evolución clínica de la enfermedad de la EM. Tomada de Porras, *Et al*, 2007.

2.4 Síntomas y signos en el curso de la enfermedad de la EM.

Las principales manifestaciones clínicas que se presentan en los pacientes con esclerosis múltiple son: fatiga, aumento de temperatura recurrente, depresión, neuritis óptica, diplopía, mareo, hemiparesia, paraparesia, espasticidad, parahipoestesia, parestesias, ataxia y disfunción vesical (Velázquez, *et al*, 2003). Además de dolor, convulsiones, disestesia, trastornos cognitivos, con afectación de la función verbal, el razonamiento conceptual, alteraciones del lenguaje, cualquier tipo de epilepsia, cuadros pseudotumorales, neuralgia del trigémino, narcolepsia, movimientos anormales coreo-atetósicos o balismo y alteraciones de los esfínteres, en la esfera sexual y en el sistema nervioso periférico (SNP). Particularmente, el aumento de la temperatura corporal puede bloquear la conducción de forma transitoria en los axones y ocasionar el “fenómeno de Uhthoff” (oscurecimiento visual transitorio) que tiene lugar tras el ejercicio o un baño caliente, lo que sugiere una enfermedad desmielinizante inflamatoria (Carretero, 2001).

Los criterios para determinar el diagnóstico de la EM, actualmente se basan en los criterios de McDonald (Tabla 1) basados en la clínica y en estudios de resonancia magnética (RM) (Porras, *et al*, 2007).

**Tabla 1. Criterios de McDonald para el diagnóstico de la esclerosis múltiple
(Tomada de McDonald, *et al*, 2001).**

Presentación clínica	Datos adicionales para el Diagnóstico
2 ó más ataques (recaídas) 2 o más lesiones objetivas	Ninguno; la evidencia clínica es suficiente (la evidencia adicional es deseable, pero debe Ser consistente con la EM)
2 o más ataques 1 lesión clínica objetiva	Diseminación en espacio, demostrada por IRM: dos o más lesiones consistentes con EM y un estudio de LCR Positivo o la presentación de datos clínicos que indican una localización diferente.
1 ataque 2 o más lesiones clínicas objetivas	Diseminación en el tiempo, demostrada por IRM o un segundo ataque clínico
1 ataque	Diseminación en espacio demostrada por IRM O en un estudio de LCR positivo y dos o mas Lesiones consistentes con EM por IRM
1 lesión clínica objetiva (presentación monosintomática)	Y Diseminación en el tiempo, demostrada por IRM O un segundo ataque clínico.
Progresión neurológica insidiosa sugestiva de EM (EM primariamente progresiva)	Un estudio de LCR positivo Y Diseminación en espacio demostrada por IRM Con evidencia de 9 o más lesiones cerebrales en secuencia T2 o 2 o más lesiones de la medula espinal o 4-8 lesiones cerebrales y una lesión de la medula espinal o PEV positivos con 4-8 lesiones IRM o PEV positivos con <4 lesiones cerebrales más de una lesión de la medula espinal Y Diseminación en el tiempo, demostrada por IRM o progresión continua por un año.

2.5 Fisiopatología de la enfermedad de la EM.

En la EM, una de las causas de la pérdida de la mielina que recubre los axones de las neuronas, puede desencadenar una falla en la conducción nerviosa, que se relaciona con cambios en el potencial de acción, los cuales permiten responder a estímulos en el ambiente; estos eventos biológicos se presentan en exacerbaciones clínicas de la enfermedad de la EM. En las primeras fases de la EM, uno de los eventos que se presenta es una disminución en la apertura y en el número de canales de Na^+ , generándose de esta manera un edema, seguido de un proceso inflamatorio y finalmente de un proceso de liberación de citocinas proinflamatorias. Los productos de adhesión celular (adhesinas: VCAM, ICAM) y otros productos como el óxido nítrico (ON), generan impedancia en la conducción del impulso nervioso a través de los axones (Carretero, *et al*, 2011). Así mismo, el ON priva al axón de su capacidad para restaurar la homeostasis del Na^+ , lo que da lugar al proceso desmielinizante (Bechtold y Smith, 2005). Por otra parte, se han realizados estudios en nervio óptico, donde quedó demostrado que una afluencia de Na^+ sostenida a través de los canales de Na^+ , activa la bomba Na^+/Ca^+ en sentido inverso (Craner, *et al*, 2004), sacando iones Na^+ y metiendo iones Ca^+ (Fig. 5), incrementando la concentración intracelular de calcio, lo cual, mediante este proceso también activa enzimas degradativas e inicia la degeneración axonal de tipo walleriano (Bechtold y Smith, 2005).

Los axones desmielinizados pueden emitir descargas espontáneas de impulsos nerviosos, originando fosfenos (sensaciones luminosas no inducidas por estímulos lumínicos) y la presión mecánica que se ejerce sobre ellos hace que ocasione el signo de L'hermitte (sensación eléctrica que desciende por la espalda o extremidades al flexionar el cuello). Adicionalmente, la transmisión efáptica que ocurre entre los axones desmielinizados contiguos, generan los síntomas de la EM, tales como: neuralgia del trigémino, ataxia, disartria y posturas tetánicas de las extremidades (Balicevic y Robles, 2006). No obstante, la capacitancia en los axones afectados puede recuperarse nuevamente mediante la síntesis mielina y nuevos canales de Na^+ para favorecer nuevamente los impulsos nerviosos (Craner, *et al*, 2004).

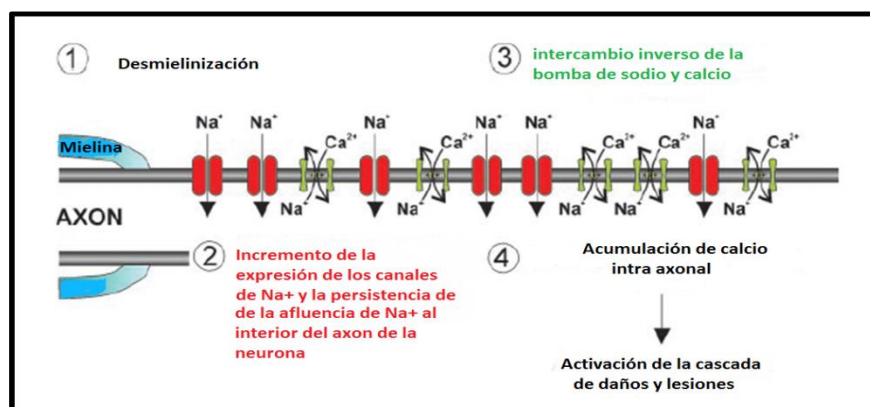


Fig. 5. Efecto inverso de la bomba de Na⁺/Ca²⁺ en el proceso de desmielinización axonal. Eventos ocurridos comúnmente en nervios ópticos. Figura tomada de Craner, *et al*, 2004

2.6 Respuesta inmune en la enfermedad de la EM.

2.6.1 Inflamación.

La inflamación mediada principalmente por la respuesta Th17: IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-9, IL-21, IL-22, IL-23, TNF, se ve acompañada por la presencia de altos niveles de IL-17, la cual contribuye a la patogénesis y a las exacerbaciones de la enfermedad. La IL-17, produce células T (CD4⁺ o CD8⁺) las cuales han sido detectadas en la EM agudas y crónicas, en los estados preclínicos de la enfermedad (Hernández, *et al*, 2013). En este sentido, la respuesta inmune en lesiones agudas es mediada por la activación de linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, células B, macrófagos, células gliales, astrocitos y microglía (Porrás, *et al*, 2007). En el cerebro, la microglía lleva a cabo los procesos de vigilancia inmunológica, cuando la microglía perivascular es activada hay una síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-2, TNF, IL-1 y por otra parte de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF-β (Ader, *et al*, 2001); así mismo en el cerebro, particularmente en la microglía, los linfocitos T CD4⁺ son activados como respuesta al reconocimiento de un antígeno presente en el complejo de HLA clase II, lo cual se divide en dos tipos de respuesta: Th1 y Th2 (Fig.6). Los linfocitos T Th1 liberan citocinas proinflamatorias (IL-10, IL-12, IFN γ, TNF) que activan a los macrófagos que intervienen en la destrucción de la mielina (Porrás, *et al*, 2007). Adicionalmente, estas citocinas proinflamatorias pueden ejercer un efecto sobre la barrera hematoencefálica (BHE), destruyéndola y haciéndola más permeable para los linfocitos periféricos activados (Murta y Ferrari, 2012).

La infiltración de células T dentro del cerebro induce la producción de IL-17, ejerciendo funciones patogénicas por una fuerte activación de la microglía, lo cual genera la producción de IL-6, MIP-2, ON, factores neurotróficos y moléculas de adhesión, que junto con la liberación la metaloproteinasa de matriz 3 (MMP-3) rompen también la barrera hematoencefálica y mejora el reclutamiento local de los neutrófilos al sitio de la inflamación; esto permite que un gran número de monocitos y macrófagos generen un daño axonal y daño crónico de la mielina (Hernández, *et al*, 2013). Los astrocitos por su parte apoyan la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en respuesta a estimulación de un superantígeno; además, a través de los receptores de Fc la microglía puede participar en la respuesta citotóxica celular dependiente de anticuerpos (Ader, *et al*, 2001).

Los linfocitos T Th2 por su parte secretan IL-4, IL-5 e IL-10; estas citocinas participan en regular las reacciones de hipersensibilidad, en las respuestas inflamatorias de baja regulación por inhibición de citocinas pro-inflamatorias (Martino, *et al*, 2000) para estimular a los linfocitos B y producir anticuerpos; los cuales se pueden unir a los auto-antígenos que se encuentran en la sustancia blanca; así mismo, se unen a oligodendrocitos para causar la desmielinización y la destrucción respectivamente; ya sea por la activación del complemento que induciría una citólisis ó la activación de macrófagos y células de la microglía (Fig. 6). Adicionalmente los linfocitos Th2 atacan la proteína básica de mielina (BMP), la proteína proteolipídica y la glucoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG) en pacientes afectados de EM (Porrás, *et al*, 2007).

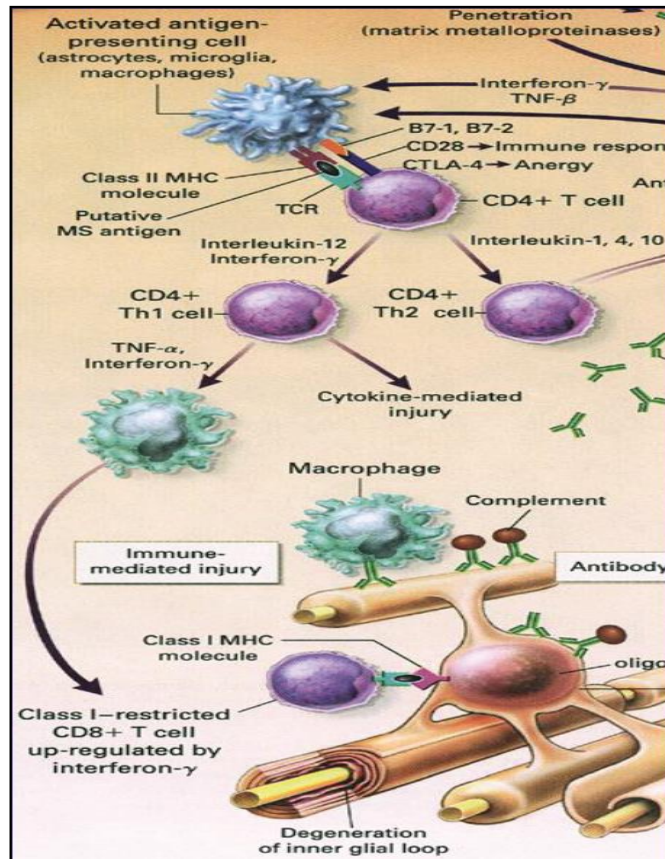


Fig. 6. Inicio de los eventos de desmielinización a partir de la activación de la microglía.

2.6.2 La esclerosis múltiple como enfermedad de origen autoinmune.

La EM, es la enfermedad desmielinizante autoinmune más prevalente en los seres humanos (Rojas, *et al*, 2010), la presencia de autoantígenos es el principal criterio por la cual la consideran como enfermedad autoinmune (Wootla, *et al*, 2012). La característica principal de las enfermedades autoinmunes, es el rompimiento de la tolerancia a los antígenos propios, dado por la fallas en los mecanismos de delección clonal, anergia clonal y mutación somática (Sánchez, *et al*, 2004). Las consecuencias de esta disfunción inmune, es la producción de auto-anticuerpos que reaccionan contra una gran variedad de proteínas propias, (Sánchez, *et al*, 2004). Los auto-anticuerpos y las células T activadas contra antígenos de mielina, como la proteína básica de mielina (PBM), proteína proteolipídica (PPL) y glicoproteína de oligodendrocito de mielina han sido detectados en pacientes con EM (Grigoriadis y Hadjigeorgiou, 2006).

En los fenómenos autoinmunes, se ha implicado que ciertos factores ambientales juegan un papel determinante para el desarrollo de la enfermedad de la EM. Además de que algunas enfermedades infecciosas pueden detonar los procesos autoinmunes (Sánchez, *et al*, 2004). En este sentido, las infecciones virales dentro del SNC ó en la periferia, podrían inducir las reacciones de tipo autoinmune, por diferentes mecanismos, estos incluyen: a) un daño directo del tejido blanco, tales como axones, mielina u oligodendrocitos y subsecuentes respuestas inmunes para la liberación de autoantígenos, b) daño indirecto por la vía de las células autoinmunes activadas que secretan citocinas proinflamatorias (Sospedra y Martin, 2006), las que resultarían en una enfermedad inflamatoria del SNC, modulado a través de 2 mecanismos: mimetismo molecular y activación inespecífica (bystander) (Libbey y Fujinami, 2010).

2.6.3 El mimetismo molecular como factor desencadenante del proceso autoinmune.

El mimetismo molecular se refiere principalmente al reconocimiento de determinadas estructuras sobre macromoléculas tales como lípidos, proteínas o motivos de azúcares, tanto el mimetismo molecular como el reconocimiento cruzado por las células T usualmente se refiere a respuestas de fragmentos de péptidos cortos, que son generados de proteínas propias ó extrañas por la maquinaria proteolítica de las APC y después son cargadas hacia el mismo complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o antígeno leucocitario humano (HLA) (Sospedra y Martin, 2006).

Cabe mencionar que se ha descrito un tercer mecanismo, llamado “expansión antigénica”. Este mecanismo consiste en la ampliación de una respuesta inmune que inicialmente estaba enfocada hacia un determinante antigénico para transformarla en una respuesta frente a diferentes epítomos de la misma molécula (intramolecular) o de otra molécula distinta (intermolecular). Este hecho se ha podido observar en infecciones por el virus de encefalitis murina de Theiler (VEMT). La infección de este picornavirus citolítico en ratones puede desarrollar la infección a través de dos mecanismos distintos según el tipo celular, al infectar oligodendrocitos, donde lo hace de una forma productiva, provocando la lisis y liberación de los viriones, o bien en los macrófagos, donde la infección es restrictiva, liberando pequeñas cantidades de virus durante el proceso, lo que permite la infección de más macrófagos y oligodendrocitos, aumentando así la destrucción de la mielina (Fazakerley y Walker, 2003).

2.7 Base genética de la Esclerosis Múltiple.

Actualmente se ha establecido que existe una asociación entre la EM y los antígenos leucocitarios humanos (HLA) (MSIF, 2006). Los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) determinan el riesgo de la susceptibilidad genética para desarrollar EM. Este riesgo ha sido muy bien asignado al haplotipo HLA-extendido DRB5 * 01:01, HLA-DRB1 * 15:01, HLA-DQA1 * 01:02, HLA-DQB1 * 06:02. Además los haplotipos de los antígenos leucocitarios humano (HLA) de clase II interactúan epistáticamente; por ejemplo, HLA-DRB1 * 14 haplotipos de base son protectores y reducen completamente el riesgo asociado a HLA-DRB1 * 15 (Burrell, *et al*, 2011). Cabe señalar que las asociaciones entre el haplotipo HLA-DR15 (el alelo DRB1 * 1501 y los alelos con las que está en desequilibrio de ligamiento: DQA1 * 0102, DQB1 y 0602 *) y EM se han descrito a lo largo de las poblaciones europeas y no europeas con EM (O' Gorman, *et al*, 2012). Estudios sobre la base de agregación familiar y parejas de gemelos han encontrado un mayor riesgo a los parientes con mayor relación. Es importante destacar que los estudios basados en medios hermanos, hijos adoptivos y hermanos de sangre no han encontrado efectos del microambiente familiar en riesgo de EM, lo que sugiere que los factores ambientales actúan a nivel de población (O'Gorman, *et al*, 2012).

2.8 Factores ambientales asociados a la enfermedad de la EM.

La exposición a diversos factores ambientales durante la infancia pueden ser determinante en el desarrollo de EM y así como en la vida adulta (Koutsouraki, *et al*, 2010). Entre estos factores ambientales son considerados: las infecciones, vacunas, estrés, clima, dieta, varios agentes virales (Marrie, 2004). Adicionalmente, en estudios prospectivos han demostrado que la baja ingesta de vitamina D ó el estado de vitamina D en suero, están asociados con un mayor riesgo de desarrollar EM. Adicionalmente, se ha considerado que el tabaquismo es un factor de riesgo para desarrollar la MS, la evidencia epidemiológica a partir de un estudios de casos y controles han determinado que el fumar está asociado con el desarrollo y recaídas de la EM (O'Gorman, *et al*, 2012). Vacunas e infecciones, especialmente la hepatitis B, el sarampión, parotiditis y la rubéola, pueden estar correlacionada con la aparición y progresión de la esclerosis múltiple. No hay evidencia de que las vacunas hayan influido en la incidencia de la EM.

Sin embargo, el aumento de la incidencia de la EM a fondo es de causa desconocida la puede haber ocultado una reducción en el riesgo de EM asociado con la vacunación masiva (Koutsouraki, *et al*, 2010).

2.9 Los agentes virales asociados a procesos desmielinizantes.

Las infecciones virales persistentes pueden causar enfermedades neurológicas crónica y así como las desmielinizantes. Por ejemplo, la panencefalitis esclerótica subaguda (SSPE), que es una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla en la materia gris y blanca del cerebro; en donde se ha podido detectar elevados títulos de anticuerpos para virus del sarampión en suero y fluido cefalorraquídeo (FCR). Así mismo, la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una enfermedad mortal humana desmielinizante que es causada por un papovavirus humano (JC) infecta a oligodendrocitos del cerebro (Owens, *et al*, 2011).

Algunos retrovirus exógenos humanos como el HTLV-I y el VIH, así como retrovirus endógenos en otras especies como: roedores, ovinos y aves, pueden ser causa de enfermedades neurológicas y malignas. Para el caso de los virus endógenos patógenos de humanos, estos tienen una relación entre la predisposición genética y factores ambientales como causantes de la enfermedad de la EM. (Krone y Grange, 2011). Por ejemplo, la infección por el virus de la encefalitis murina de Theiler (VEMT), produce desmielinización en ratones de la cepa SJL/J pero no en ratones de la cepa C57/BL (Owens, *et al*, 2011). El VEMT por su parte, al infectar ratones experimentales, persiste en los macrófagos, esto potencializa la desmielinización a través de la lisis de los macrófagos infectados y posteriormente infectando los oligodendrocitos (Owens, *et al*, 2011). Por otro lado, el virus del moquillo canino (VMC) causa una enfermedad desmielinizante multifocal en perros, ésta se produce dentro de la sustancia blanca del cerebelo, la materia blanca periventricular, las vías ópticas y la médula espinal. Las lesiones iniciales desmielinizantes agudas se asocian con la replicación viral dentro de las células gliales de la sustancia blanca con amplia infección de astrocitos e infección restringida (transcripción viral sin traducción) de los oligodendrocitos.

2.10 Modelos experimentales desarrollados para el estudio de la EM.

Los modelos animales disponibles para el estudio de la EM, consisten en una inducción activa, mediante procesos de inmunización, infecciones virales, o bien transferencia de células patogénicas del sistema inmune. Con la intención de desarrollar modelos de EM, se están desarrollando cepas de ratones transgénicos que pueden desarrollar la enfermedad de manera espontánea (García y Estivill, 2008). La inducción de la desmielinización en ratones de experimentación se logra con virus de diversas familias virales tales como: Coronaviridae, Picornaviridae, Rhabdoviridae y Togaviridae (Libbey and Fujinami, 2010).

Actualmente, el modelo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), es el modelo animal más usado para el estudio de la esclerosis múltiple. Clínicamente, en estos modelos animales con EAE (Tabla 2), presentan afectado el neuroeje y manifiestan una parálisis de los miembros, parcial o total, que asciende, generalmente, en sentido caudorostral, por la inyección con adyuvante de proteína completa o péptidos encefalitogénicos de antígenos del SNC. En este modelo se puede experimentar la transferencia adoptiva de encefalitis autoinmune experimental (TA-EAE), la cual consiste en generar pasivamente la respuesta correspondiente a la EAE mediante la inoculación de linfocitos T, CD4⁺ o CD8⁺, activadas contra epítomos de la mielina en lugar de inducirla directamente de manera activa a través de la inmunización frente a alguno de sus antígenos (García y Estivill, 2008).

**Tabla 2. Ejemplos seleccionados de distintas patologías y progresiones de EAE.
(Tomada de García y Estivill, 2008).**

Autoantígeno	Especie ó cepa	Especie ó cepa
MBP	Ratón/SJL/J Rata/Lewis Ratón/B10.PL o PL/J	Recurrente- remitente, con desmielinización Aguda, inflamatoria, sin desmielinización Aguda/crónica, monofásica y resistente a la reinducción y con daño axonal
MOG	Ratón/C57BL/6, 129/J Ratón/A.SW Rata/Brown Norway	Crónica/recurrente-remitente con desmielini. Aguda, progresiva, desmielinización, infiltrado de neutrófilos. Aguda, inflamatoria, sin desmielinización
PLP	Ratón/SJL/J o (SWRxSJL/J)F Ratón/129/J, C57BL/6 Ratón/Lewis	Recurrente- remitente, con desmielinización Aguda, inflamatoria Aguda, inflamatoria y desmielinizante

Otro modelo para el estudio de EM en animales, se ha desarrollado con la infección del VEMT en ratones (cepas SJL o DBA/1); la infección persistente en SNC produce anticuerpos capaces de reconocer galactocerebrósido, lo cual induce a una desmielinización crónica progresiva mediada por el sistema inmune. Este modelo ha servido como herramienta como blancos en inmunoterapias en remielinización (Gold, *et al*, 2000). Por otra parte, se han desarrollado modelos virales para caracterizar a la EM. Por ejemplo, la cepa JHM del virus de la hepatitis murina (coronavirus) es capaz de producir encefalomiелitis en la cepa de ratones BALB/c generando numerosas placas desmielinizantes dispersas en el cerebro y en la médula espinal dada por citopatología de oligodendrocitos (García y Estivill, 2008).

2.11 El Virus de Epstein-Barr (VEB) como factor de riesgo para el desarrollo de la EM.

El VEB ha sido asociado con diversos tumores malignos en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, los cuales presentan trastornos linfoproliferativos como linfoma de Hodgkin, cáncer nasofaríngeo, linfoma asociado a SIDA (Solórzano, 2010), linfomas de las células B y T (no Hodgkin), el linfomas de células B incluye el linfoma de Burkitt, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B de los ancianos, linfoma primario del sistema nervioso central y linfoma plasmablastico. Además el VEB se asocia a tumores mesenquimales, como tumores del músculo liso, los tumores de células dendríticas foliculares y miopericitomas (Michelow, *et al*, 2012). La asociación más clara del VEB es con la mononucleosis infecciosa (MI), donde se ha encontrado que un incremento en el riesgo de desarrollar EM es seguido previamente por una infección por mononucleosis (Ascherio, *et al*, 2001). Por otra parte, diversos estudios han reportado altas concentraciones de anticuerpos para el VEB en individuos con EM y que son seropositivos para este virus, tanto en pacientes adultos como en pacientes pediátricos, lo cual sugiere su posible asociación con el desarrollo de la enfermedad de la EM (Levin, *et al*, 2005, Alotaibi, *et al*, 2004, Ascherio, *et al*, 2001). Así mismo, el suero y el LCR de pacientes con EM muestran alta inmunoreactividad a las proteínas específicas de VEB: EBNA, BRRF2 y BRRF1 en aproximadamente 13% de los pacientes con EM (Owens, *et al*, 2011).

Particularmente, el virus de Epstein Barr (VEB) puede generar una autoinmunidad que evoluciona en los siguientes pasos: 1) deficiencia de linfocitos T CD8⁺, (2) infección primaria de VEB; (3) disminución del control del VEB por parte de las linfocitos TCD8⁺; (4) incremento de la carga del VEB e incremento de anticuerpos anti-VEB; (5) infección del VEB en el órgano blanco; (6) expansión clonal de las células B autoreactivas infectadas con el VEB en el órgano blanco; (7) infiltración de células T autoreactivas dentro del órgano blanco; y 8) desarrollo de folículos linfoides ectópicos en el órgano blanco (Pender, 2012).

2.12 Características del Virus de Eptein-Barr (VEB).

El VEB, es parte de la familia de los herpes gammavirus y también es conocido como el herpesvirus humano tipo 4(HHV-4) (Michelow, *et al*, 2012). El VEB es un virus ubicuo, es de los más comunes que infecta a los humanos y comúnmente producen latencia e infecciones recurrentes, además de que las reactivaciones de infecciones latentes han sido correlacionadas con complicaciones de la EM (Libbey y Fujinami, 2010). El VEB es un virus grande de 100 a 200 nm de diámetro, posee una nucleocapside con simetría icosaédrica de 164 capsómeros, rodeada por una cubierta externa de contiene lípidos (Parra, *et al*, 2010), El genoma consiste de una doble cadena de DNA (Ramasubramanyan, *et al*, 2011), de una longitud aproximada de 172 kb, que codifica aproximadamente 100 proteínas (Fig.7), contiene aproximadamente 85 marcos de lectura abiertos (ORF's por sus siglas en ingles open Reading frame) la gran mayoría de estos ORF's se expresan únicamente durante el ciclo lítico y solamente 11 de ellos se expresan durante la lantencia, de los cuales solo 9 se traducen (Rickinson y Kieff, 2007) la molécula de ADN está flanqueada en ambos extremos por un número variable de repeticiones terminales, cada una de ellas de una longitud aproximada de 500 pb (Parra, *et al*, 2010). La recombinación entre estas repeticiones terminales origina la formación de una molécula extracromosómica cerrada covalentemente o de forma episomal (Bellas, 1997).

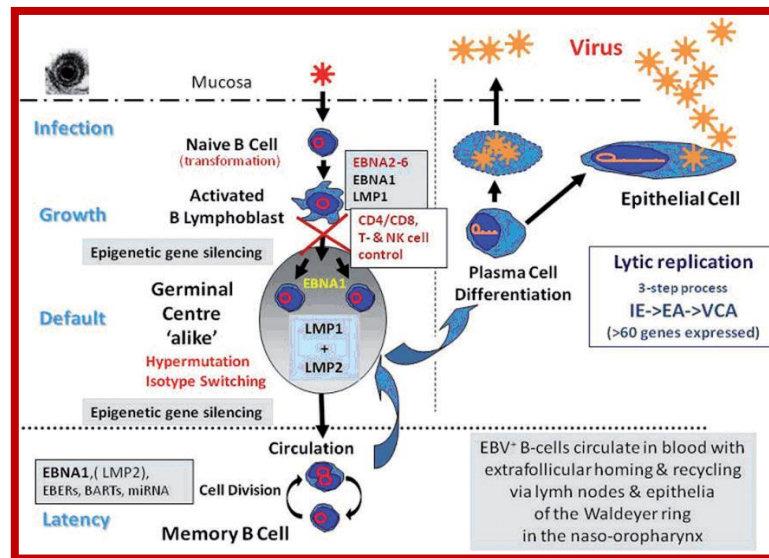


Fig.8. Representación esquemática de la infección del VEB y persistencia *in vivo*. Eventualmente, el virus se reactiva en linfocitos y entra a ciclo lítico, lo cual resulta en la liberación de virus infeccioso en la saliva, durante el proceso de infección del VEB. Tomado de Lassmann, *et al*, 2011.

Para infectar las células B, el VEB usa una glicoproteína (gp 350) para unirse al receptor del complemento CD21, que se encuentra en las células B, después de la infección el genoma viral es circularizado dentro de cápside 16-20 hrs posterior a la infección (Bornkamm y Hammerschmidt, 2001). La fusión con la membrana celular y la invasión de la célula huésped es facilitada por la unión de una segunda glicoproteína viral, gp 42, a las moléculas de MHC clase II y por la adición de otras tres glicoproteínas virales gB, gH y gL (Parra, *et al*, 2010).

El VEB produce una infección latente con reactivaciones esporádicas, debido a que la mayor parte de la población de los linfocitos B humanos infectados mantiene un estado latente de replicación y expresión genética viral, pero poca entra a una fase productiva del virus, a menos que el individuo se encuentre inmunosuprimido. Cuando esto sucede, el virus coloniza las células del epitelio nasofaríngeo donde establece su ciclo lítico de replicación, provocando una respuesta inflamatoria localizada que produce un exudado faríngeo. De esta manera, el virus es llevado por vía linfática hasta los ganglios locales, lo que ocasiona una viremia que desarrolla la linfadenopatía local y generalizada, así como esplenomegalia (Parra, *et al*, 2010).

Los genes expresados durante la infección latente codifican 6 proteínas nucleares, EBNA-1,-2,-3A, -3B, -3C y -LP, proteínas latentes de membrana: LMP-1, -2A y -2B, dos RNAs pequeños nucleares no poliadenilados, EBER-1, EBER-2 (Sample, *et al*, 1990). EBNA-2 y EBNA-LP son los primeros genes virales expresados después de la infección de las células B humanas con VEB, seguidas por EBNA-1, la expresión de las proteínas latentes de membrana LMP-1 y LMP-2B es controlada por EBNA-2, (Bornkamm y Hammerschmid, 2001; Vera, *et al*, 2003), en este sentido LMP1 es considerada la oncoproteína más fuerte y es esencial para la immortalización de las células B, además de que comparte propiedades funcionales con los miembros de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral, particularmente CD40 (Parra, *et al*, 2010); esto ocasiona la activación del factor nuclear de transcripción (NF- κ B) *in vitro* e *in vivo*, la activación de c-jun y la regulación de moléculas de adhesión, producción de citocinas y proliferación de células B (Vera, *et al*, 2003).

EBNA-1 es el primer producto del gen viral que immortaliza las células B y hace que se una a múltiples sitios en Ori-P que es requerido para una replicación episomal del genoma viral. Ambas funciones de EBNA-1, tanto en replicación como en la regulación de la transcripción, están mediadas por la habilidad de EBNA-1 para unirse al DNA y generar cambios en las uniones intra e intermolecularmente; EBNA-1 establece interacciones firmes entre proteína-proteína en sus sitios de unión a DNA (Bornkamm y Hammerschmidt, 2001).

Finalmente, la capacidad del VEB para evadir el sistema inmune, durante la infección aguda ó durante la reactivación viral, está en función de la síntesis de una citosina y el receptor de citosina, la proteína BCRF1, la cual comparte aproximadamente el 70% de la secuencia de aminoácidos de la interleucina 10 (IL-10); la cual, se ha observado *in vitro* que esta proteína imita la actividad de la IL-10 al inhibir la síntesis del INF- γ por las células mononucleares de sangre periférica, similarmente, la proteína BARF1, funciona como un receptor soluble para el factor estimulante de colonias 1, que también puede funcionar como un receptor que bloquea la acción de las citocinas, por su parte la proteína BHRF1 del VEB es homóloga de la proteína humana bcl-2, la cual bloquea la apoptosis, donde la LMP-1 regula la expresión de ésta y varias proteínas celulares que inhiben la apoptosis permitiendo la immortalización de las células B (Vera, *et al*, 2003)

El VEB, podría actuar como un disparador para el desarrollo de la EM en individuos genéticamente susceptibles, infectando las células B para mantenerse de manera latente. Las

células B reactivas del SNC no solamente producirían auto-anticuerpos patógenos, sino que podrían localizarse el SNC donde podrían actuar como células presentadoras de antígeno (APC). Estas APC infectadas con VEB podría presentar los antígenos del SNC a las células T CD4+, que han sido activados comúnmente por infecciones sistémicas en la periferia, y que puede ser una reacción cruzada para antígenos del SNC. Estos antígenos pueden ser reactivados por APC a medida que circulan a través del SNC, promoviendo así la supervivencia de las células T reactivas dentro del SNC. Las células T reactivas sobrevivientes del SNC, podrían organizar un ataque inmunológico sobre el SNC (Libbey y Fujinami, 2010).

2.14 Evidencias de detección de DNA del VEB en suero de pacientes con EM.

La medida de la carga viral de DNA del VEB, ha sido utilizada para tratar de caracterizar la historia natural de la enfermedad de la EM; Sin embargo, la normalización de las diversas medidas para establecer el valor predictivo de la carga viral está en relación a situaciones clínicas específicas que se requiere. El uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación del virus tiene la ventaja de una alta sensibilidad y reproducibilidad. Se puede determinar la dinámica de la proliferación viral, monitorear la respuesta al tratamiento e investigar la diferencia entre la infección latente y activa (Solorzano, 2010). Diversos estudios han detectado DNA del VEB en plasma sanguíneo y se ha encontrado que los pacientes con MI, MI fatal, infección crónica con VEB y así como el síndrome hemofagocítico asociado al VEB (SHAVEB) fueron positivos para el DNA de este virus. Adicionalmente se ha confirmado que la presencia de ADN del VEB en plasma es un fenómeno común en pacientes con MI, en donde su concentración parece determinar el grado clínico de estos pacientes (Yamamoto, *et al*, 1995). Adicionalmente, una serie de estudios mostró que unos altos niveles de DNA del VEB en sangre periférica de pacientes inmunosuprimidos indica el inicio de la enfermedad linfoproliferativa postransplante, además un descenso de DNA de VEB fue encontrado durante un tratamiento exitoso y regresión de la PTLD; los pacientes con PTLD tienen una media de carga viral de 19,200 copias de genoma de VEB/ μ g de DNA ó 3,225 copias de genoma de DNA del VEB/ μ g (Wagner, *et al*, 2001). La técnica de la PCR acoplado a tiempo real permite cuantificar el número de copias de forma rápida y precisa. Kimura y colaboradores han demostrado que el PCR en tiempo real ha sido aplicable a la cuantificación de la carga del VEB en pacientes con infecciones sintomáticas por VEB (Kimura, *et al*, 1999, Niesters, *et al*, 2000). Este método elimina las precauciones que se

deben tomar con la amplificación de productos, para evitar la contaminación debido a que el método se realiza en pozos absolutamente herméticos (Sabri, *et al*, 2000). Por medio de esta técnica se detectó el transcrito EBER-1 en las células infectadas de forma latente (Owens, *et al*, 2011).

En los pacientes con MI el DNA del VEB puede ser detectado en el suero, lo que indica replicación viral. Posteriormente coincidiendo, con la desaparición clínica de la enfermedad, la carga viral se hace indetectable en suero (Yamamoto, *et al*, 1995). Una vez pasada la infección, el VEB permanece de manera latente en las células B.

3. JUSTIFICACIÓN

Evidencias epidemiológicas sugieren que la EM puede estar asociada a un agente infeccioso. La presencia de algunos virus en el SNC y de anticuerpos contra proteínas virales en pacientes con EM, apoyan fuertemente la asociación de la infección viral con los procesos de inicio y desarrollo de la EM. Particularmente, el virus de Epstein Barr (VEB) se ha relacionado con el inicio y progresión de la enfermedad, en este sentido se ha descrito en la literatura que los elevados títulos de anticuerpos contra el VEB presentes en pacientes con EM y que previamente estuvieron expuestos a una infección por mononucleosis infecciosa, presentan un riesgo elevado para el inicio como para el desarrollo de la EM. Así mismo, durante la progresión de la enfermedad, puede estar acompañada por los eventos de mimetismo molecular empleados por el virus contra la proteína básica de mielina, lo que puede conllevar a la exacerbación de la enfermedad. Hasta ahora, son pocos los reportes que han identificado la presencia del genoma del virus tanto en el sistema nervioso central así como en suero de pacientes con EM; por lo cual este estudio, permitiría evidenciar aun más la relación de la persistencia y carga viral con el grado de avance de la enfermedad. En México es necesario tener evidencia científica y experimental que permita establecer la asociación del VEB y carga viral, de tal manera que este estudio contribuya a establecer las medidas pertinentes en las políticas de prevención, a través de la detección oportuna del virus (diagnóstico) y de las profilaxis hacia los pacientes con la enfermedad de la EM.

4. HIPÓTESIS

La presencia del virus de Epstein Barr y/o la carga viral está asociada con la esclerosis múltiple en pacientes mexicanos.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre la presencia del virus de Epstein Barr y/o la carga viral en una submuestra de pacientes mexicanos con esclerosis múltiple.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar la presencia del genoma viral a partir de muestras de sueros de pacientes con esclerosis múltiple.
- Cuantificar la carga viral del virus de Epstein-Barr, en las muestras de sueros de pacientes con esclerosis múltiple.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Diseño del estudio de asociación entre el VEB y la EM.

El presente estudio pretende establecer la asociación de la presencia del genoma del virus de Epstein-Barr en muestras de sueros de pacientes con esclerosis múltiple. El proyecto está anidado al proyecto madre titulado: “Factores de riesgo asociados a la Esclerosis múltiple en México: estudio multicéntrico”. El cual es un estudio epidemiológico transversal, en donde consideraron 300 casos confirmados de EM, y por cada caso se seleccionó 1 control, pareados por edad y sexo con respecto a los casos, estos fueron colectados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en la ciudad de México en los últimos 5 años. Sin embargo, para el presente estudio se consideró un submuestra de 141 casos y 189 controles recolectados en el primer año del estudio madre, considerando los mismos parámetros de selección.

Los casos se identificaron de los pacientes que acudieron al servicio de consulta externa con un diagnóstico presuntivo de EM. Además, se les aplicó un cuestionario que incluía una valoración clínica, diagnóstica y pronóstica (afección sensitiva, motora, cerebelosa, medular y alteración de pares craneales), considerando los criterios de McDonald (McDonald, *et al*, 2001). Para considerar a los controles, a los familiares de otros pacientes que acudieron al hospital se les invitó a participar en el estudio. Para ambos grupos (casos y controles) firmaron la carta de consentimiento informado para participar en el estudio (Anexo 1), y se les tomó una muestra sanguínea para posteriormente obtener suero total y generar un banco de sueros.

7.2 Purificación de DNA total a partir de sueros de pacientes con EM y controles.

Para el proceso de purificación de DNA total a partir de muestras de sueros de pacientes con EM, se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, 51106), siguiendo los pasos del protocolo. La cuantificación de las alícuotas obtenidas de DNA, se hizo mediante nanodrop lite (Thermo scientific), posteriormente se formó una base de datos con las concentraciones obtenidas de DNA total. Cabe mencionar, que durante el proceso de purificación de DNA, se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas, lo cual permitió obtener mayores concentraciones de DNA con respecto a las concentraciones obtenidas con el buffer de elución.

En este sentido, se seleccionaron las alícuotas de los casos y controles con mayor concentración de DNA, con las cuales se realizaron diluciones llevadas a una concentración de 5ng/μl, esto con la finalidad de homogenizar todas las muestras tanto de los casos como controles y posteriormente colocarlas en placas maestras de 96 pozos. Estas placas maestras facilitarían el proceso del montaje de las placas para PCR tiempo real (Fig.9).

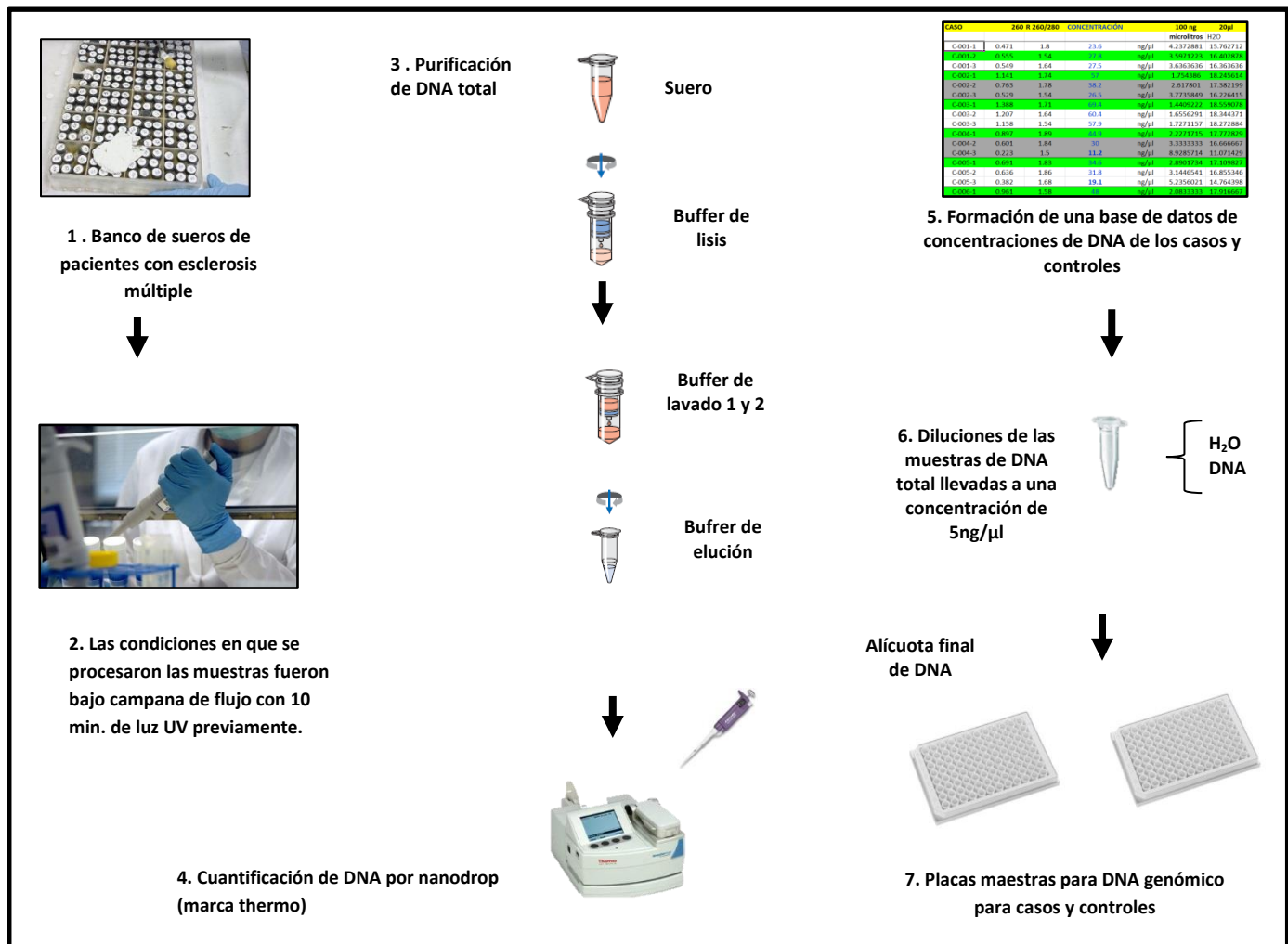


Fig. 9. Proceso de la purificación de DNA total a partir de sueros de pacientes con EM y controles.

7.3 Detección del genoma del VEB en sueros de pacientes con EM por medio de la PCR en tiempo real.

La detección del genoma del VEB a partir del DNA total obtenido de sueros de pacientes con EM y controles, se realizó por PCR en tiempo real con el kit de cuantificación del virus herpes humano tipo 4, Epstein-Barr (Genesig). La reacción de PCR se llevó a cabo en un equipo ABI-PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Previamente se preparó una placa maestra de 96 pozos conteniendo el DNA obtenido de los pacientes a una concentración de 5 ng/μl, a partir de la cual se tomó el DNA total para realizar la detección del gen de β-actina y del genoma del VEB.

Inicialmente se detectó el gen de β-actina en el DNA total para determinar la calidad del DNA y para evaluar las reacciones de PCR tiempo real. Las reacciones de PCR tiempo real para β-actina y para el VEB, se realizaron con una concentración de DNA total de 20 ng usando 5 μl del Fast Start Universal Probe Master Mix (Roche), 0.5 μl de una mezcla de oligonucleótidos y sonda Taqman (marcada con el fluoróforo FAM) en un volumen total de 10 μl. Las reacciones de PCR tiempo real se llevaron a cabo en en placas de 384 pozos, se incluyeron dos controles negativos constituidos por la mezcla de reacción pero sin templado y se corrieron con el siguiente programa de amplificación: 95°C durante 15 min, seguido de 50 ciclos de 95°C durante 10 seg y 60°C durante 1 min. El análisis de las muestras fue considerado como la amplificación del gen de β-actina para todas las muestras. Positivo (al VEB): detección del gen de β-actina y detección de amplificación para el VEB. Negativo (al VEB): detección del gen de β-actina y no detección de amplificación para el VEB.

7.4 Detección de carga viral (VEB).

Para determinar la carga viral (número de copias del templado de VEB) por PCR tiempo real, se realizó una curva estándar a partir de un templado de VEB que contiene el kit (control positivo) y del cual se realizaron diluciones seriadas (Tabla 3). Para ello, se colocaron 900μl de agua libre RNasa/DNasa en 5 tubos, se tomaron 100μl de templado del VEB original al tubo 2 e inmediatamente se vorticeó, los dos pasos anteriores se repitieron hasta completar la serie de diluciones. Indicando que por dilución se tiene una relación en número de copias del virus.

Tabla 3. Relación entre diluciones seriadas y número de copias del virus de Epstein Barr.

Dilución	no. de copias
Tubo 1 control positivo	2×10^5 por μl
Tubo 2	2×10^4 por μl
Tubo 3	2×10^3 por μl
Tubo 4	2×10^2 por μl
Tubo 5	20 por μl
Tubo 6	2 por μl

Las reacciones de PCR tiempo real se llevaron a cabo usando 1 μl de cada dilución, 5 μl de Fast start universal probe Master mix (Roche), 0.5 μl de mezcla de oligos específicos (Anexo 2) y sondas Taqman para la amplificación del VEB y ajustadas a un volumen de 10 μl con agua. Las mezclas de reacción se colocaron en placas de 96 pozos y se taparon con un film óptico. Las reacciones se realizaron con el equipo ABI-PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los parámetros de amplificación fueron: 95°C durante 15 min, seguido de 50 ciclos, 95°C durante 10 seg y 60°C durante 1 min para cada terminación. Para el análisis de la carga viral, se realizó una regresión lineal logarítmica, graficando los logaritmos de los valores del número de copias de cada dilución para el eje de las X's y los valores de CT's de cada dilución para el eje de las Y's (Tabla 10), la ecuación obtenida de la regresión lineal, se usará para extrapolar los valores de los CT's obtenidos de las reacciones de PCR tiempo real, de las muestras de casos y controles, sustituyendo los valores de los CT's para X en la ecuación de la recta y de esta manera establecer un número de copias aproximado del VEB a partir de la curva estándar.

8. RESULTADOS.

8.1 Descripción de la población de casos de pacientes con EM y controles.

A partir de la base de datos del proyecto madre “Factores de riesgo asociados a la Esclerosis múltiple en México: estudio multicéntrico”, que contenía la información clínica y sociodemográfica derivada a partir de las cartas de consentimiento informado de los casos (n=141) de controles (n=189). Inicialmente, se realizó un análisis general para describir a la población de estudio, para ello se utilizó el programa estadístico Stata old 2012 versión 319.12.1.875. En la tabla 4 se muestra que la edad promedio para ambos grupos fue de 33 y 32 años para casos y controles respectivamente. Además, se identificó que aproximadamente el 68% en los casos y controles corresponden al género femenino, lo cual evidentemente establece una relación 2 a 1.

Tabla 4. Descripción general de la población de estudio (Anexo 3 y 4)

	Casos	Controles
N	141	189
Edad (Media)	33 años	32 años
Género (Masculino)	45/141 (31%)	59/189 (31%)
Género (Femenino)	96/ 141 (68%)	130/189 (68%)

Por otro lado, de las características clínicas de los casos, en el apartado de antecedentes familiares, es de destacar que el 63.8% de los casos tienen familiares con antecedentes de Diabetes mellitus, el 10% de estos pacientes tienen familiares con diferentes enfermedades neurológicas, 2 pacientes tiene un familiar con EM, etc. (Tabla 5). Específicamente de las características clínicas de los casos, el 10% de los casos padece ó ha padecido alguna enfermedad autoinmune, el 20.5% ha tenido algún tipo de alergia (Tabla 6). Es importante señalar, que para el grupo de pacientes con EM, al 97% le han realizado resonancia magnética, al 62% se le han realizado estudios de bandas oligoclonales (BOC), siendo el 44% un resultado positivo para BOC, adicionalmente el 12.7% tuvieron estudios de anticuerpos contra mielina, siendo positivos solo el 5.6% (Tabla 6).

Tabla 5. Antecedentes familiares de los pacientes con EM

Enfermedad	Porcentaje
Esclerosis múltiple	2 (1.4%)
Artritis reumatoide	5 (3.5%)
Lupus	3 (2.1%)
Diabetes mellitus	90 (63.8%)
Epilepsia	8 (5.6%)
Parkinson	4 (2.8%)
Otras enfermedades neurológicas	14 (10%)
Esquizofrenia	6 (4.2%)
Asma	6 (4.2%)

Tabla 6. Historia clínica de los pacientes con EM

Historia clínica	Porcentaje														
	N = 141														
Ha tenido algún tipo de alergia	Si: 29 (20.5%)														
Le han diagnosticado alguna vez estas enfermedades autoinmunes: • Tiroiditis • Polineuropatías • HTA • Enfermedad Hepática • Migraña • Úlcera gástrica duodenal • Colitis	1 (0.7%) 1 (0.7%) 3 (2.1%) 2 (1.4%) 6 (4.2%) 5 (3.5%) 3 (2.1%)														
Le han realizado resonancia magnética	Si: 137 (97%)														
Le realizaron punción lumbar para confirmar diagnóstico de EM.	Si: 122 (86%)														
Se estudiaron bandas oligoclonales (BOC)	Si: 88 (62%) No: 18 (12.7%) No sabe: 12 (8.5%)														
Cuál fue el resultado de las BOC	Positivo: 62 (43.9%) Negativo: 21 (14.8%) No sabe: 5 (3.5%) Sin información: 53 (37.5%)														
Se estudiaron anticuerpos contra mielina	Si: 18 (12.7%) No: 77 (54.6%) Sin información: 39 (27.6%)														
Cuál fue el resultado de anticuerpos contra mielina	Positivo: 8 (5.6%) Negativo: 10 (7%) Sin información: 123 (87.2%)														
Que tipo de esclerosis múltiple tiene el paciente	Brote remisión (RR) 120 (85.8%) 1ria. Progresiva (PP) 6 (4.2%) 2ria. Progresiva (SP) 13 (9.2%)														
Cuántos brotes ha tenido desde la fecha del diagnóstico clínico	<table> <tr> <th>Brote</th><th>no. de pacientes</th></tr> <tr> <td>1</td><td>30 (21.2%)</td></tr> <tr> <td>2</td><td>16 (11.3%)</td></tr> <tr> <td>3</td><td>11 (7.8%)</td></tr> <tr> <td>4</td><td>8 (5.6%)</td></tr> <tr> <td>5</td><td>4 (2.8%)</td></tr> <tr> <td>7</td><td>4 (2.8%)</td></tr> </table>	Brote	no. de pacientes	1	30 (21.2%)	2	16 (11.3%)	3	11 (7.8%)	4	8 (5.6%)	5	4 (2.8%)	7	4 (2.8%)
Brote	no. de pacientes														
1	30 (21.2%)														
2	16 (11.3%)														
3	11 (7.8%)														
4	8 (5.6%)														
5	4 (2.8%)														
7	4 (2.8%)														

De los casos reclutados el 85% presentan un fenotipo de EM brote remitente (EM-RR), el 9.2% un fenotipo de EM secundaria progresiva (EM-SP) y el 4.2% corresponde a un fenotipo de EM primaria progresiva (EM-PP). En relación al número de brotes presentados desde la fecha del diagnóstico clínico; el 21.2% de los casos de EM presentaron 1 brote y el 11.3% presentaron 2 brotes y más de 2 brotes se presentaron en menor medida (Tabla 6). Así mismo, en referencia al grado de discapacidad al momento del diagnóstico (considerando un rango de 0 a 10 en la escala de Kurtzke (EDSS) por sus siglas en inglés, expanded Disability Status Scale y donde 8 representó el mayor grado de discapacidad). Para los 120 casos con EM-RR (que representa la mayor frecuencia 120/141, (85%), el 26% de estos pacientes tiene un fenotipo de EMRR con un grado de discapacidad de 0 a 1.5, y el 43% de este grupo de pacientes con EMRR tiene un grado discapacidad de 2 a 3.5 considerado como mínima a moderado (Tabla 7). Sin embargo, los 19 casos restantes están representados con frecuencias muy bajas y no se observa relación con el grado de discapacidad.

Tabla 7. Relación entre el grado de Discapacidad y el tipo de EM, en casos de pacientes con EM (Base de datos, cuestionario clínico - Anexo 4).

GRADO DE DISCAPACIDAD: ESCALA DE EDSS*					
TIPO DE EM	0 (0/1.5)	1 (2/3.5)	2 (4/5.5)	3 (6/8)	TOTAL 141
RR (1)	31/120 (26%)	52/120 (43%)	15/120 (12%)	22/120 (18%)	120 (85%)
PP (2)	1/6 (16%)	1/6 (16%)	0	4/6 (66%)	6 (4.2%)
SP (3)	1/13 (7%)	3/13 (23%)	1/13 (7%)	8/13 (61%)	13 (9.2%)
Total	34/139 (24%)	56/139 (40%)	16/139 (11%)	34/139 (24%)	139 (98%)

*EDSS:Anexo 4 pagina26

Para analizar el tipo de tratamiento, el análisis se hizo de acuerdo al número de recaídas (brotes) que presentaron los pacientes con EM, inicialmente se puede observar que el tratamiento más usado desde el momento que se presentó la primera recaída, fueron los esteroides, se puede observar que aproximadamente el 42% (59/141) de los pacientes con EM, reportaron haber sido tratados con esteroides, desde la primera recaída, hasta cuando se presentan 10 recaídas (brotes); y solamente el 1.4% (2/141) reporta haber tenido tratamiento con interferón. Llama la atención que el 32.6% (46/141) no reporta haber tenido ningún tipo de tratamiento desde que se presenta la primera recaída (Tabla 8).

Tabla 8. Tratamiento que recibieron los pacientes con EM relacionado con el brote.
Anexo 4

Brote	Tratamiento					
	Esteroides	Interferón	Otro	Ninguno	No contesta	Total N
0	0	0	0	0	28	28 (19.8%)
1	27/40 (67%)	2/40 (5%)	1/40 (2%)	10/40 (25%)	0	40 (28.3%)
2	11/27 (41%)	0	0	12/27 (44%)	4/27 (15%)	27 (19.1%)
3	8/18 (44%)	0	0	10/18 (55%)	0	18 (12.7%)
4	8/18 (44%)	0	1 (5%)	9/18 (50 %)	0	18 (12.7%)
5	1/4 (25%)	0	0	3/4 (75%)	0	4 (2.8%)
6	0	0	0	1/1 (100%)	0	1 (0.7%)
7	1/1 (100%)	0	0	0	0	1 (0.7%)
8	1/2 (50%)	0	0	1/2 (50%)	0	2 (1.4%)
9	1/1 (100%)	0	0	0	0	1 (0.7%)
10	1/1 (100%)	0	0	0	0	1 (0.7%)
	59 (42%)	2 (1.4%)	2 (1.4%)	46 (32.6%)	32 (22.6%)	141 (100%)

De acuerdo al estudio sociodemográfico (Anexo 3); no se presenta valores que establezcan una relación con el presente proyecto. Por ejemplo, se presentan las variables referentes a hábitos de consumo de alcohol, tabaco y si ha padecido alguna enfermedad de transmisión sexual. Sin embargo, no se presentan alguna relación de estas variables en los casos de EM, además de en muchos pacientes hay perdida de la información. Por lo tanto estas variables y otras no fueron tomadas en cuenta para su análisis en el proyecto (Tabla 9).

Tabla 9. Características sociodemográficas de los grupos de casos y controles. Base de datos, cuestionario sociodemográfico-anexo 3

	Casos		Controles	
	No.	%	No.	%
Alguna vez ha tomado alcohol				
Si	114	(85.7%)	164	(86.7%)
No	19	(14.2%)	25	(13.2%)
Total	133	(100%)	189	(100%)
Alguna vez ha fumado tabaco				
Si	85	(64%)	81	(43%)
No	48	(36%)	84	(44%)
Total	133	(100%)	165	(87%)
Ha tenido alguna enfermedad de transmisión sexual				
	Masculino		Masculino	
Si	4	(3%)	5	(2.6%)
No	43	(32.3%)	32	(16.9%)
Sin información	86	(64.6%)	86	(45.5%)
Total	133		123	
	Femenino		Femenino	
Si	3/133	(2.2%)	8	(4.2%)
No	72/133	(54%)	68	(35.9%)
Sin información	58/133	(43.6%)	8	(4.2%)
Total	133		84	

8.2 Amplificación del gen endógeno β -actina a partir del DNA total de sueros de pacientes con EM y controles, por medio de la PCR tiempo real.

Antes de realizar la detección del genoma del VEB, se realizó la detección del gen endógeno de β -actina por PCR tiempo real (como se describe en materiales y métodos) en el DNA de las muestras de casos de pacientes con EM y controles. Esta detección se realizó con la finalidad de asegurar que las muestras contenían DNA íntegro y suficiente para la detección del VEB. En las figuras 10 y 11 se muestran las curvas de amplificación para la detección del gen de β -actina de los casos y controles. El 100% de las muestras de DNA de casos y controles se detectó el gen de β -actina. Con 20 ng del DNA total fue suficiente para amplificar al gen de actina, no obstante las Cts detectados no fueron los mismos para los grupos de trabajo. Sin embargo, para este estudio en particular solo es representativo la presencia del gen.

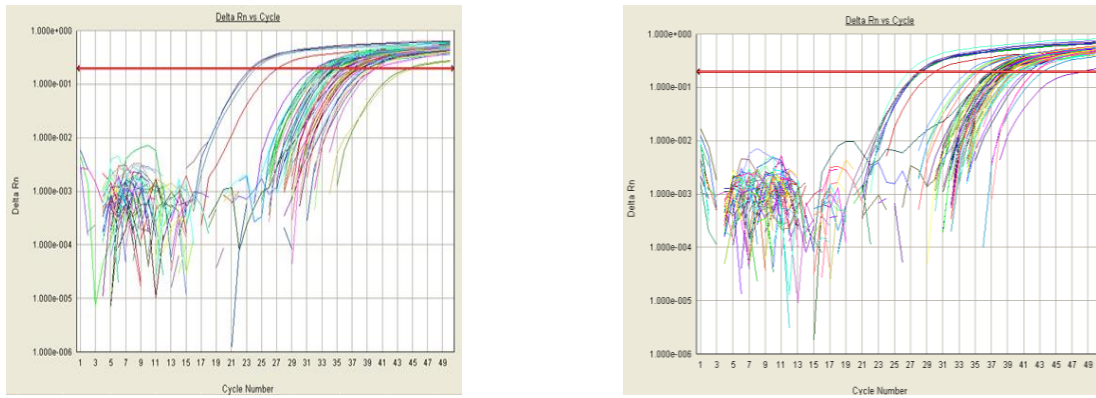


Fig. 10. Curvas de amplificación del gen endógeno β -actina, controles. placa para reacción en PCR tiempo real.

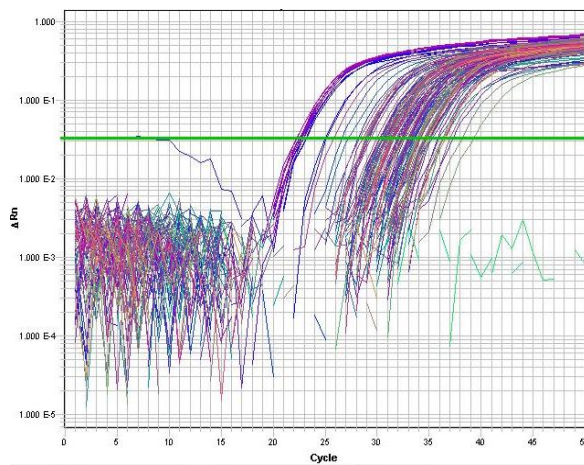


Fig. 11. Curvas de amplificación del gen endógeno β -actina, casos de pacientes con EM.

8.3 Amplificación del VEB a partir del DNA total de sueros de pacientes con EM y controles por PCR tiempo real.

Posterior a la detección del gen de actina en las muestras de casos y controles, se realizó la detección del virus de VEB y la carga viral. Para ello se utilizó el kit de cuantificación del VHH-4, Epstein-Barr (genesig) basado en PCR tiempo real, validado para la detección del genoma viral, como se describe en materiales y métodos. Es importante resaltar que durante el procedimiento del PCR tiempo real, se realizó la detección del virus de manera independiente para casos y controles, con la intención de no generar reacción cruzada. En la figura 12 y 13, se presentan las curvas de amplificación para detectar al virus en los controles y casos. Se observa que la mayoría de los DNAs de las muestras fueron negativos a la detección del VEB por PCR. Se utilizaron 20 ng de DNA total de las muestras de casos y controles para la reacción de PCR tiempo real, similar al utilizado para amplificar el gen de β -actina. Se detectaron 3 muestras positivas al VEB en los controles (3/189, 1.5%) con Cts de (31.36, 31.11, 32.89) y 2 muestras positivas al virus en los casos de los casos de EM (2/141, 1.3%) con Cts de (33.21, 34.05). En general se detectaron muy pocas muestras positivas al VEB, indicando su baja prevalencia y además no se observó diferencias en la detección del virus en casos y controles (figuras 12 y 13).

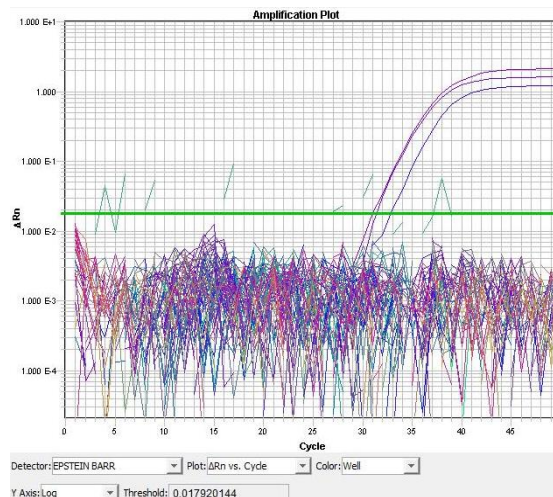


Fig. 12. Curvas de amplificación del VEB, Controles.

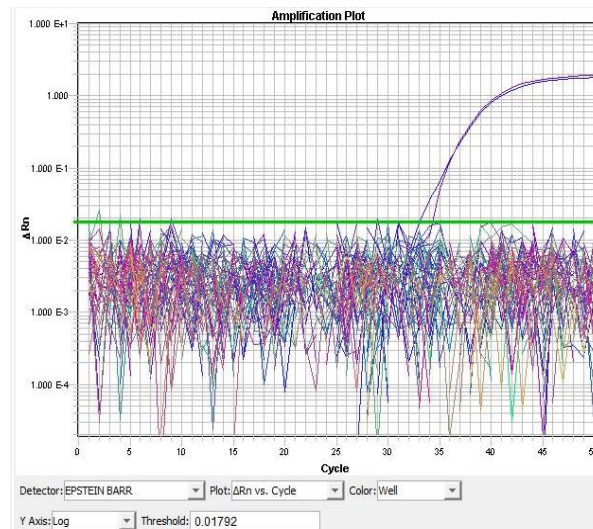


Fig. 13. Curvas de amplificación del VEB, casos de pacientes con EM.

8.4 Curva estándar para detectar carga viral.

Para determinar la carga viral en las muestras positivas al VEB, se realizó la carga viral comparándolo con una curva estándar a partir de un control positivo al VEB que contenía el KIT con una concentración de copias del virus conocida. A partir de control positivo, se realizaron diluciones seriadas y se amplificaron por PCR en tiempo real para detectar al VEB (ver metodología). En la figura 14, se representan las amplificaciones que fueron detectadas para cada dilución realizada, de tal manera que para cada concentración conocida de número de copias del VEB le corresponde un valor de Ct (amplificación). Las reacciones se realizaron por triplicado en tres distintas reacciones, para la reproducibilidad del ensayo. En este sentido, se pudo detectar la amplificación del VEB en cada dilución seriada, por lo que se tomaron los valores de Ct's, detectados en un menor tiempo de cada serie de dilución, con el fin de tener la caracterización de la curva estándar (Fig. 15), de manera que se generó una curva estándar a partir de los valores de Ct's de la curva ya caracterizada, además de que estos datos muestran que son estadísticamente significativos mostrando una R^2 de 0.98 (Fig. 16).

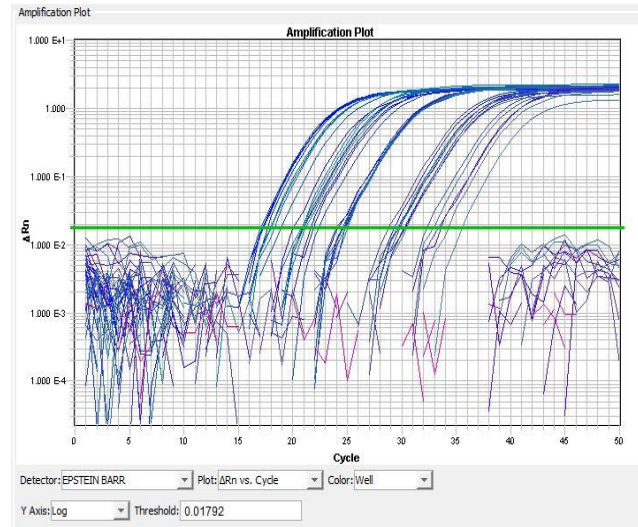


Fig. 14. Amplificación del templado del VEB usando las diluciones seriadas para el templado de VEB.

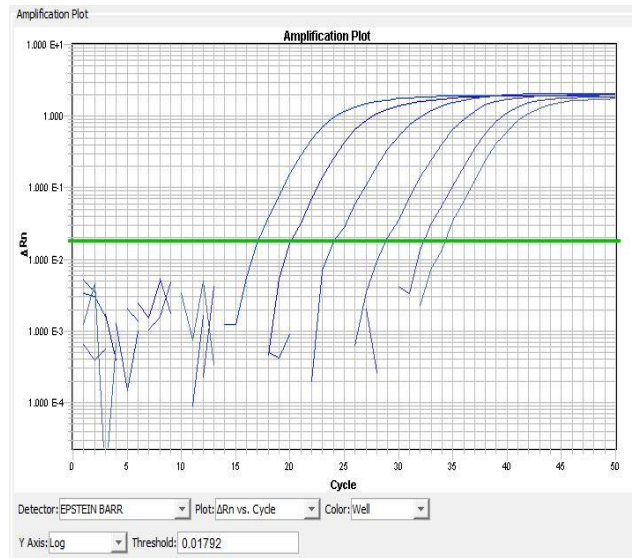


Fig. 15. Caracterización final de la Amplificación del templado del VEB.

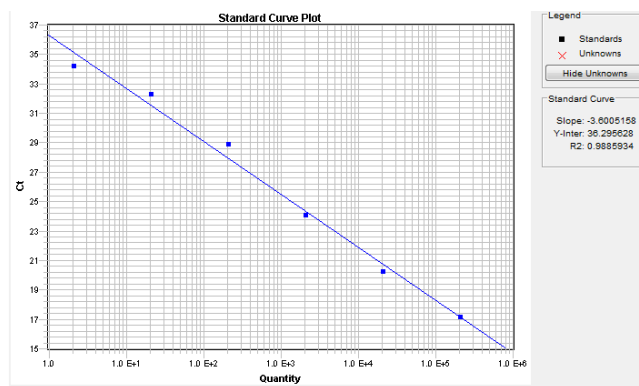


Fig. 16. Curva estándar de Ct's de las diluciones mediante una regresión lineal logarítmica, $R^2=0.98402$.

En la tabla 10, se representa las diluciones con el número de copias y los valores de Ct detectados en la reacción de PCR tiempo real. Adicionalmente se realizó una regresión lineal logarítmica usando los valores de LOG de cada amplificación correspondiente al número de copias para obtener la ecuación de la recta. La figura 17 muestra la regresión lineal del número de copias y Ct's, determinando una R^2 de 0.99, la cual es negativa y muy similar a la regresión lineal de figura 16. Usando el modelo de regresión lineal logarítmica, se realizó el cálculo para determinar la carga viral de las muestras positivas al virus de Epstein-Barr tanto en los casos como en controles.

Tabla 10. Curva estándar para la detección del VEB

LOG de No. Copias (X)	no. de copias	CT (Y)
0.30103	2 (Dil. 5)	34
1.30103	20 (Dil. 4)	32
2.30103	200 (Dil. 3)	28
3.30103	2000 (Dil. 2)	24
4.30103	20 000 (Dil. 1)	20
5.30103	200 000 (control positivo)	17

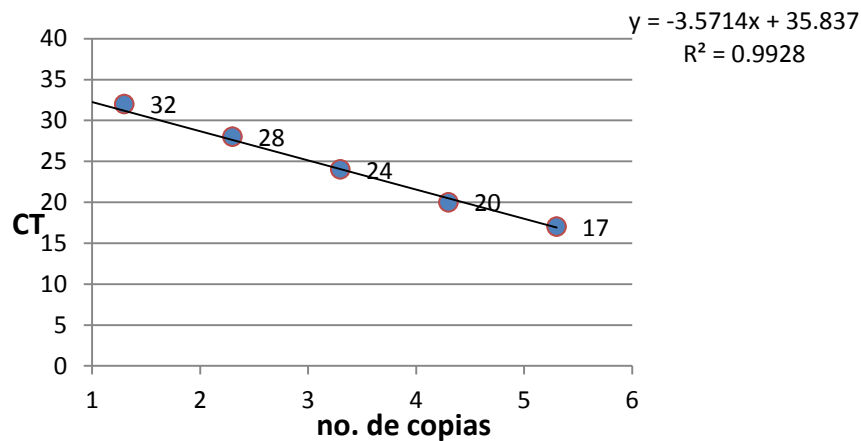


Fig. 17. Regresión lineal logarítmica de los valores de CT's de la curva estándar del VEB.

Para las 3 muestras de los controles que fueron positivos al VEB, con Cts de 31.11, 31.36 y 32.89, la carga viral calculada, usando de referencia el modelo de regresión lineal, corresponde a 21, 17 y 6 copias de VEB respectivamente y con una media $\bar{X}$ de 14.6. Para los casos, se detectaron dos muestras positivas con Cts de 33.21 y 34.05, que corresponden a 5 y 3 copias del VEB respectivamente y con una media de $\bar{X}= 4$. En la figura 18, se observa la comparación que se presentó entre los casos positivos tanto de casos de pacientes con EM y los controles sanos y en la figura 19 se observa la comparación de la carga viral del VEB en los grupos de casos de pacientes con EM y controles sanos.

Para establecer si hay una asociación, entre la carga viral del virus de Epstein Barr, en la submuestra de pacientes mexicanos con esclerosis múltiple y controles sanos, se realizó el análisis estadístico usando el programa Stata (old 2012 versión 319.12.1.875.). Para ello, se usó una prueba estadística no paramétrica de Mann–Whitney, en este sentido no se encontró ninguna diferencia significativa entre el grupo de casos y controles, al obtener un valor de $P=0.8882$ en relación número de positivos al VEB entre ambos grupos.

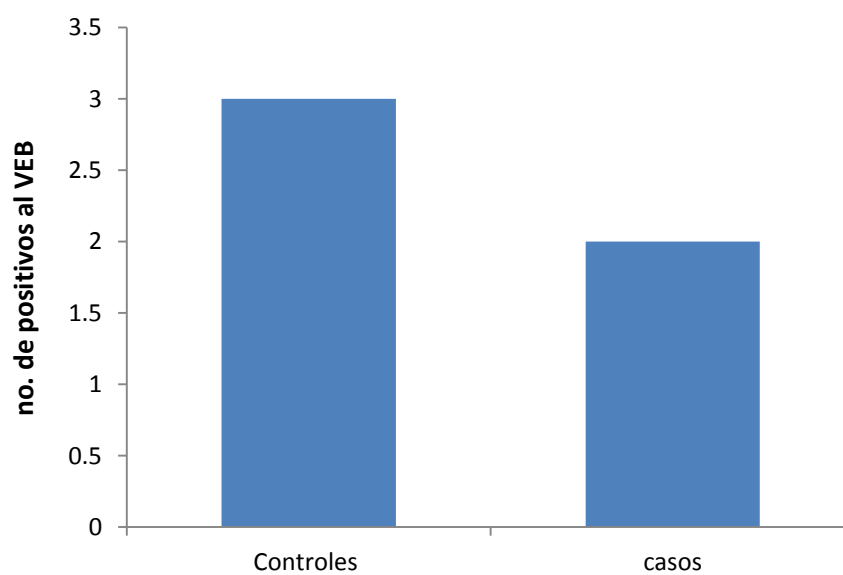


Fig. 18. Comparación en el número de pacientes con EM positivos al VEB y controles.

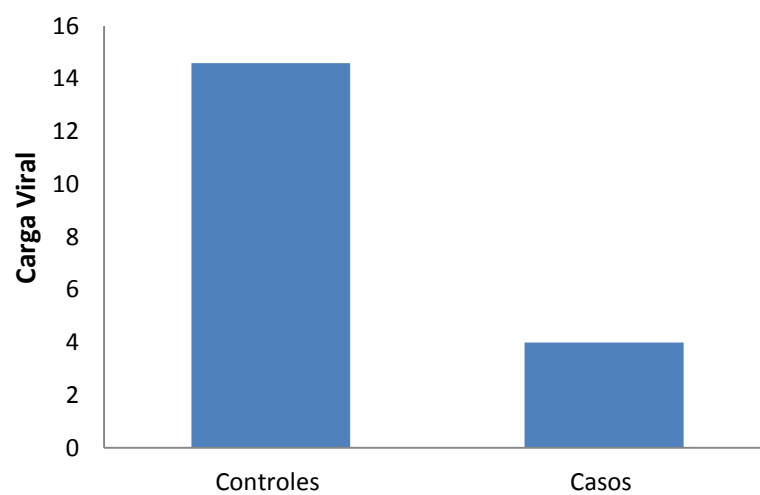


Fig. 19. Comparación de la carga viral del VEB, de sueros de pacientes con EM y controles.

9. Discusión

Los diversos estudios seroepidemiológicos, han establecido que los elevados títulos de anticuerpos contra el virus de Epstein Barr (VEB), detectados en suero de pacientes durante la enfermedad de esclerosis múltiple (EM), representan un riesgo para el inicio de la enfermedad así como para la exacerbación de la misma (Ascherio, *et al*, 2001). Adicionalmente, la detección de fragmentos de DNA del VEB en tejido cerebral postmortem de pacientes que tuvieron EM, pone en evidencia la posible asociación entre la infección VEB y la enfermedad de EM (Christensen, 2006). En este sentido, la cuantificación de la carga viral mediante el uso de PCR en tiempo real, como herramienta para el diagnóstico resulta de gran utilidad para detectar la infección activa por parte del VEB (Parra, *et al*, 2010), estableciendo una relación entre carga viral con el grado de avance o exacerbación de la enfermedad.

Con el objetivo de determinar, si la presencia del genoma del virus de Epstein Barr y/o la carga viral está asociada con la esclerosis múltiple en pacientes mexicanos, se hizo un estudio para detectar al genoma viral y carga viral a partir de un banco de sueros provenientes de pacientes con EM y controles sanos. Diversos estudios previamente, han reportado la presencia de elevados títulos de anticuerpos contra el virus de Epstein Barr en sueros de pacientes con EM adultos y pediátricos, (Alotaibi, *et al*, 2004; Levin, *et al*, 2003; Levin, *et al*, 2005). Así también, se ha descrito mayor riesgo para el inicio y desarrollo de EM en los pacientes que han cursado con un cuadro clínico por mononucleosis infecciosa; sugiriendo con ello la posible relación del VEB con la EM (Ascherio, *et al*, 2001). En este sentido la presencia de anticuerpos contra el virus de Epstein–Barr nos indicará que los pacientes han tenido contacto con el virus, sin considerar que la infección esté presente o está en fase activa. En México, son pocos los estudios que pretenden relacionar la carga viral del VEB y la EM, en este sentido, solamente el estudio de Sotelo y colaboradores en el 2007 reportan haber detectado DNA del VEB en pacientes con EM en bajas frecuencias (Sotelo, *et al*, 2007); sin embargo, los resultados no permiten establecer una asociación con esta submuestra de pacientes con esclerosis múltiple.

El presente estudio fue derivado de un proyecto madre: *Factores de riesgo asociados a la EM: estudio multicéntrico*. Se seleccionaron pacientes con EM y controles que acudieron en un periodo de un año al Instituto nacional de Neurología. En total para este estudio se utilizaron sueros de 141 de casos, 189 controles, considerando los criterios muy específicos tal cual se describen en la sección de metodología y los cuales están pareados por sexo y por edad. A partir del DNA total obtenido de los sueros, se realizó la detección del DNA del VEB por PCR tiempo real y la determinación de la carga viral. Se detectaron 2 pacientes positivos (1.4%) al VEB en el grupo de pacientes con EM y 3 muestras positivas al VEB (1.5%) en los controles sanos. Se esperaba encontrar mayor frecuencia de casos positivos al VEB en los pacientes con EM y no detectar al VEB en grupo de los controles. Lo cual indica que no se detectó una asociación de la presencia del VEB en pacientes con EM. Estos resultados pueden ser atribuidos a que el VEB puede mantenerse de manera latente sin provocar ningún síntoma por largos periodos de tiempo y no se puede detectar en sangre periférica; pero se sabe que tiene una alta frecuencia en la población mexicana (Romero, *et al*, 2004). De la misma manera se puede especular al igual que los pacientes con EM y positivos a la infección por VEB, que se puede tratar de una infección activa. Para completar el estudio, se tendría que evaluar anticuerpos contra el VEB en pacientes con EM, de esta manera se detectarían pacientes que tuvieron la infección en algún momento del desarrollo de la enfermedad. No obstante también se puede especular que los controles podrían no ser las mejores muestras, se tendría que realizar un análisis más minucioso basado en un estudio médico más detallado, debido a que estos controles no cuentan con el cuestionario clínico. En este sentido, queda establecido que para este estudio, los controles presentaron mayor carga viral con respecto a los casos con EM, con una media para los sueros positivos (en número de copias) de 14.6 para controles y 8 para casos. Adicionalmente, los controles positivos al VEB, tienen 1.8 veces más copias del virus que los casos con EM positivos al VEB, este valor es muy significativo, indicando que los controles positivos al VEB, posiblemente tendrían que tener manifestaciones clínicas de la enfermedad que no fueron detectadas. No obstante, se tiene que verificar los criterios de selección de los controles para poder realizar conjeturas más precisas.

La baja frecuencia del VEB en ambos grupos de trabajo, refleja que los pacientes presentan una infección activa, mas no se descarta la posibilidad que el virus este en forma latente en otros órganos o tejidos; ya que solo se detectaron al virus en suero de los pacientes. De acuerdo con el análisis basado en el historial clínico de los pacientes con EM, ninguno de ellos tiene antecedentes de haber padecido infección por mononucleosis infecciosa y que esté relacionada con la infección por el VEB. Por lo tanto, a pesar de tener al virus en forma activa no se ha desarrollado mononucleosis infecciosas y los dos pacientes no presentan sintomatología de severidad de la enfermedad.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos del presente estudio, comparados con los reportes del estudio de Wagner y colaboradores en el año 2004, son consistentes. En este estudio, detectaron el DNA del VEB en sueros de 9 de 31 casos de pacientes con EM lo cual corresponde a un 29% y en 10 de 62 controles correspondiente a un 10%. A pesar de que se detectaron más pacientes con EM positivos al VEB (Wagner, *et al*, 2004), no se establece una diferencia estadísticamente significativa con respecto a sus controles. Sin embargo, la presencia del VEB en plasma la asocian con incremento en el riesgo de tener EM (riesgo relativo = 2.5, 95% CI 0.78-7.8, $P = 0.12$). Adicionalmente, la presencia del DNA viral en el suero de estos pacientes con EM podría especular la presencia del virus en la circulación sanguínea, la cual correspondería a una infección activa (con copias bajas se puede decir que es activa también).

De acuerdo a algunos datos del Anexo 4, relacionado al historial clínico de los pacientes con EM, los dos casos corresponden al género femenino, la paciente 10 tiene edad de 29 años, y la paciente 13, 47 años de edad. El perfil clínico que mostraron los pacientes, establece que ninguno de los dos casos presentó información de estudios de anticuerpos contra la mielina, presentan un fenotipo de EM RR o brote remitente, los años de evolución desde que fue diagnosticado por 1ª vez el brote fue de 5 años para la paciente 10 y 0 años para la paciente 13. El grado de discapacidad que presentaron al momento de ser diagnosticadas por primera vez (la paciente número 10, tuvo un grado de discapacidad de 4.5 y la paciente 13 un grado de discapacidad de 1 (en escala EDSS). Finalmente, el número de brotes que han presentado desde la fecha que se hizo el diagnóstico clínico fue: para la paciente 10 solo ha presentado 1 brote y la paciente 13 no ha tenido ningún brote, en este sentido la paciente que presento 1 brote, tuvo tratamiento con esteroides y el paciente que no reporto ningún brote, no presenta datos referente al tipo de tratamiento.

Las condiciones clínicas que presentan los pacientes con EM, parecen no establecer una relación entre carga viral del VEB y el fenotipo de la enfermedad. Sin embargo, dentro de la metodología que implicó la toma de muestras sanguíneas para la generación del banco de sueros, no estableció la toma de la muestra durante la presencia de un brote ó exacerbación clínica de la enfermedad. Solamente se hizo la toma de muestra durante un lapso de recuperación, y para las dos muestras positivas al virus parece tener relación con el grado de avance de la enfermedad y la carga viral que presentan. Así mismo, ante la no asociación de VEB y EM, se descarta la posibilidad de que el tratamiento previo de los pacientes con esteroides (59/141, 41.8%) pudiera tener un efecto de inhibición del VEB ante su posible presencia. Adicionalmente, llama la atención que durante el análisis clínico de los pacientes con EM, casi el 100% de los pacientes tiene algún familiar que padece una enfermedad autoinmune, siendo la Diabetes mellitus la que tuvo más representatividad con un 64%, seguido de un 10% para otras enfermedades autoinmunes (Tabla 5), las cuales incluye: alzheimer, aneurisma cerebral, aparente consanguinidad en la familia, déficit de atención, distrofia muscular, entre otras; a pesar de la baja frecuencia para las otras enfermedades autoinmunes es evidente su presencia en la población mexicana, sobre todo resalta una elevada frecuencia de otras enfermedades autoinmunes en los familiares de pacientes con EM, sin embargo ante este hallazgo incidental, no se puede tener mayor información, ni dar pauta a posibles especulaciones en torno a la enfermedad de la EM, dado que tampoco se cuenta con un historial clínico de controles sanos en donde se pueda ver una diferencia significativa entre familiares con enfermedades autoinmunes de pacientes con EM y controles sanos, sin embargo se ha propuesto la existencia de genes de susceptibilidad comunes para este grupo de enfermedades, lo cual, se apoya la sospecha de una agregación familiar de las enfermedades autoinmunes en pacientes con EM (Alemany, *et al*, 2005).

Por otra parte, el análisis de los controles que fueron positivos para el virus de Epstein-Barr, no se cuenta con un historial clínico que permita obtener datos del estado físico de esas personas, y que de alguna manera el estudio pudiera servir como predictor de desarrollo de una posible enfermedad relacionada con el VEB.

Cabe mencionar que a pesar de que el VEB es un virus ubicuo en México, no existen datos contundentes sobre el porcentaje de individuos serológicamente positivos al virus y a mononucleosis infecciosa que se asocia con el VEB. Solo dos estudios refieren que los pacientes provienen de medio socioeconómico bajo y esto probablemente correlaciona con la alta probabilidad de exposición al VEB en edad temprana (Guadarrama, *et al*, 2012). Este trabajo es uno de los escasos estudios que se realizan en México para detectar al VEB en pacientes con EM, lo cual permite entender a la enfermedad desde un contexto infeccioso.

La limitante de este estudio y como se mencionó previamente, fue que se basó en detectar al genoma del virus solo en suero de pacientes con EM, y sería de mucha relevancia analizar los títulos de anticuerpos en contra de VEB en los mismos sueros. Este tipo de estudios nos podría ampliar las respuestas a los hallazgos encontrados y entender a la enfermedad de EM desde un contexto más integral, autoinmune e infeccioso.

10. Conclusión.

Se detectó la presencia del genoma del VEB en 2 muestras de pacientes con EM, 3 muestras de pacientes sanos; por lo cual no se encontró una asociación entre la presencia del genoma del virus de Epstein-Barr y la Esclerosis Múltiple en la submuestra de sueros de pacientes mexicanos con la enfermedad de EM.

Con respecto a la submuestra de pacientes con la enfermedad de EM, la relación entre hombres y mujeres que presentan la enfermedad fue, que por cada 2 mujeres con EM hay un hombre con la enfermedad; así mismo, para esta submuestra de pacientes con EM se encontró que la edad promedio de este grupo es de 33 años de edad, lo cual pone en evidencia, que la enfermedad sigue afectando a una población joven laboralmente, y que adicionalmente estos resultados concuerdan con estudios epidemiológicos similares.

11. Perspectivas.

- Se propone hacer evaluaciones de títulos de anticuerpos contra el VEB en muestras de sueros de pacientes con EM y controles sanos a partir del banco de sueros generado del proyecto: “Factores de riesgo asociados a la Esclerosis múltiple: estudio multicéntrico”.
- Identificar a controles que sean completamente sanos.
- Estudiar a pacientes con esclerosis múltiple, que tengan antecedentes por infección de mononucleosis infecciosa ó que presenten un cuadro clínico por infección de mononucleosis infecciosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ader R., Felten D., Cohen N., 2001, Psychoneuroimmunology, 3th edition, Academic press, USA, 2 (52) multiple sclerosis, pp. 433.
2. Alemany M., Aladro Y., Amela R., Pérez M., Reyes M., Déniz M., Sánchez F., 2005, Enfermedades autoinmunes y esclerosis múltiple, REV NEUROL, 40 (10), pp. 594-597.
3. Alotaibi S., Kennedy J., Tellier R., Stephens D., Banwell B., 2004, Epstein-Barr Virus in Pediatric Multiple Sclerosis, JAMA, 291, pp.1875-1879.
4. Ascherio A., Munger K., Lennette E., Spiegelman D., Hernán M., Olek M., Hankinson S., Hunter D., 2001, Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis, JAMA, 286(24), pp. 3083-3088.
5. Balicevic I., Robles A., 2007, Esclerosis múltiple, <http://www.diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/7122/1/ESCLEROSIS%20MULTIPLE.pdf>, Último acceso: 2013.
6. Bechtold D., Smith K., 2005, Sodium-mediated axonal degeneration in inflammatory demyelinating disease, J Neurol Sci., 233 (1-2), pp.27-35.
7. Bellas C., 1997, Virus Epstein-Barr (VEB) y neoplasia, 1er. Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, <http://www.conganat.org/congreso/conferencias/018/intro.htm>, último acceso: 14 de Noviembre del 2013.
8. Bornkamm G., Hammerschmidt W., 2001, Molecular virology of Epstein-Barr virus, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 356 (1408), pp. 437-459.
9. Burrell A., Handel A., Ramagopalan S., Ebers G., Morahan J., 2011, Epigenetic Mechanisms in Multiple Sclerosis and the Major Histocompatibility Complex (MHC), Discov Med, 11 (58), pp. 187-196.
10. Carrillo P., González A., 2010, Características clínicas y anticuerpos antifosfolipídicos (anticardiolipina- β 2GP-1) en líquido cefalorraquídeo y suero en una muestra de pacientes con esclerosis múltiple en México, Neurología, 25 (2), pp. 71-77.
11. Carretero J., Bowakim W., Acebes J., 2001, Actualización: esclerosis múltiple, MEDIFAM, 11, pp. 516-529.

12. Christensen T., 2006, The Role of EBV in MS Pathogenesis, *The International MS Journal*, 13, pp. 52–57.
13. Craner M., Newcombe J., Black J., Hartle C., Cuzner M., Waxman S., 2004, Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: Altered axonal expression of Na_v1.2 and Na_v1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger, *PNAS*, 101 (21), pp. 8168–8173.
14. De la Maza M., García J., Bernal J., Fuentes M., 2000, Revisión de la epidemiología de la esclerosis múltiple en México, *REV NEUROL*, 31 (5): 494-495.
15. Fazakerley J., Walker R., 2003, Virus demyelination., *Journal of NeuroVirology*, 9, pp.148–164.
16. Frank D., Cesarman E., Liu Y., Michler R, Knowles D., 1995, Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders Frequently Contain Type A and Not Type B Epstein-Barr Virus, *Blood*, 85 (5), pp. 1396-1403.
17. Galiano A., García J., 2013, Neurología,
<http://www.iqb.es/neurologia/visitador/v002.htm>, (imagen 1-A), último acceso: 14 de noviembre de 2013.
18. García B., Estivill G., 2008, Modelos de experimentación animal para la investigación en esclerosis múltiple, *Revista española de esclerosis múltiple*, 1 (7), pp. 5-19.
19. Gold R., Hartung H., Toyka K., 2000, Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system, *Disease models, Molecular medicine today*, 6, pp. 88-91.
20. Grigoriadis N., Hadjigeorgiou G., 2006, Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis, *Journal of Autoimmune Diseases*, 3 (1), pp. 1-8.
21. Gutierrez J., Koppel B., Kleiman A., Akfirat G., 2008, Multiple Sclerosis and Epstein Barr Virus: A Growing Association, *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 46 (6), pp. 639-642.
22. Hernández F., Romero J., Izquierdo G., 2011, ¿Está aumentando la incidencia de de esclerosis múltiple a nivel mundial?, *Revista Española de Esclerosis Múltiple*, (19), pp. 5-12.
23. Hernández N., Espinoza G., Pérez V., Pineda B., Sotelo J., 2013, Initial Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis: Innate Immune Response, *Clinical and Developmental Immunology*, pp. 1-15

24. Hilar O., Patel P., Lam S., 2010, Disease Modifying Agents for Multiple Sclerosis, *The Open Neurology Journal*, 4, pp.15-24.
25. Jasmin L., Zieve D., 2012, Medline Plus,
http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/18117.htm,
(Figura 1-B), último acceso: 14 de Noviembre del 2013.
26. Kimura H., Morita M., Yabuta Y., Kuzushima K., Kato K., Kojima S., Matsuyama T., Morishima T., 1999, Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay, *Journal of Clinic Microbiology*, 37, pp.132-136.
27. Koutsouraki E., Costa V., Baloyannis S., 2010, Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: A Review International, *Review of Psychiatry*, 22 (1) pp. 2–13.
28. Krone B., Grange J., 2011, Paradigms in multiple sclerosis: time for a change, time for a unifying concept, *Inflammopharmacol*, 19, pp.187–195.
29. Kurtzke J., 1975, A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand*; 51, pp.110–36.
30. Lassmann H., Niedobitek G., Aloisi F., Jaap M., 2011, Epstein–Barr virus in the multiple sclerosis brain: a controversial issue—report on a focused workshop held in the Centre for Brain Research of the Medical University of Vienna, Austria, *BRAIN, A JOURNAL OF NEUROLOGY*, 134, pp. 2772–2786.
31. Levin L., Munger K., Rubertone M., Peck C., Lennette E., Spiegelman S., Ascherio A., 2005, Temporal Relationship Between Elevation of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis, *JAMA*, 293 (20), pp. 2496-2500.
32. Levin L., Munger K., Rubertone M., Peck C., Lennette E., Spiegelman S., Ascherio A., 2003, Multiple Sclerosis and Epstein-Barr virus, *JAMA*, 293 (20), pp. 1533-1536.
33. Libbey J., Fujinami R., 2010, Potential Triggers of MS, *Results Probl Cell Differ*; 51, pp. 21–42.
34. Martino G., Furlan R., Brambilla E., Bergami A., Ruffini F., Gironi M., Poliani P., Grimaldi L., Comi G., 2000, Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis, *Journal of Neuroimmunology*, 109, pp. 3–9.
35. Marrie R., 2004, Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology, *Lancet Neurol*, 3, pp. 709-718.

36. Mayr W., Pittock S., McClelland R., Jorgensen N., Noseworthy J., Rodríguez M., 2003, Incidencia y prevalencia de la esclerosis múltiple en Olmsted County, Minnesota, 1985-2000, *Neurología*, 61 (10), pp. 1373-1377.
37. McDonald I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H., *et al*, 2001, Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis, 2001, *Annals of Neurology*, 50 (1), pp. 121- 127.
38. Michelow P., Wright C., Pantanowitz L., 2012, A Review of the Cytomorphology of Epstein-Barr Virus Associated Malignancies, *Acta Cytologica*; 56, pp.1–14.
39. MSIF, 2013, <http://www.atlasofms.org>, (Figura 3), último acceso 14 de noviembre del 2013.
40. MSIF, 2006, MS in focus-aspectos genéticos y hereditarios, no. 8, pp. 11.
41. Murta V., Ferrari C., 2012, Influence of Peripheral inflammation on the progression of multiple sclerosis: Evidence from the clinic and experimental animal models, *Mol. Cell. Neurosci*, 53, pp. 6-13.
42. Niester H., Esser J., Fries E., Wolthers K., Cornelissen J., Osterhaus A., 2000, Development of a Real-Time Quantitative Assay for Detection of Epstein-Barr Virus, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 38, pp. 712-715.
43. Noonan C, Kathman S, White M, Prevalence estimates for MS in the United States and evidence of an increasing trend in women, 2002, *Neurology*; 58(1), pp.136-138.
44. O’Gorman C., Lucas R., Taylor B., 2012, Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis: A Review with a Focus on Molecular Mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.*, 13, pp.11718-11752.
45. Owens G., Gilden D., Burgoon M., Yu X., Bennett J., 2011, Viruses and Multiple Sclerosis, *Neuroscientist*, 17(6), pp. 659–676.
46. Parra I., López B., Sánchez J., Vilchis A., Barrera L., 2010, Expresión atípica en la detección y cuantificación del virus de Epstein-Barr utilizando PCR en tiempo real, *Bol Med Hosp Infant Mex*, 67, pp. 416-42.
47. Pender M., 2012, CD8+ T-Cell Deficiency, Epstein-Barr Virus Infection, Vitamin D Deficiency, and Steps to Autoimmunity: A Unifying Hypothesis, *Autoimmune Diseases*, pp. 1-16
48. Pirko I., Cardin R., Chen Y., Lohrey A., Lindquist D., Dunn S., Zivadinov R., Johnson A., 2012, CMV Infection Attenuates the Disease Course in a Murine Model of Multiple Sclerosis, *PLOS ONE*, 7 (2), pp. 1-7.

49. Porras M., Nuñez L., Plascencia N., Quiñones S., Sauri S., 2007, Esclerosis múltiple, *Rev Mex Neuroci*, 8 (1), pp. 57-66.
50. Ramasubramanyan S., Osborn K., Flower K., Sinclair A., 2011, Dynamic Chromatin Environment of Key Lytic Cycle Regulatory Regions of the Epstein-Barr Virus Genome, 2011, *Journal of Virology*, 86 (3), pp. 1809–1811.
51. Rickinson A., Kieff E., 2007, Epstein Barr virus, In PMH D M Knipe (edit.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 2, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, pp. 2655-2700.
52. Rojas J., González S., Patrucco L., Cristiano E., 2010, Rol de las células T reguladoras en esclerosis múltiple, *MEDICINA*, 70 (1), pp. 79-86.
53. Romero M., Cruz H., Huetter M., Krueger G., Gathof B., Durán M., Rojo J., 2004, Prevalencia de los virus herpes humanos 4 (VEB) y 6 (HHV-6) en linfoma de Hodgkin, en pacientes estudiados en la Ciudad de México, *Rev Med Hosp Gen Mex*, 67 (3), pp.124-129.
54. Ruíz P., Aviles G., 2011, Virus de Epstein – Barr <http://www.microbitos.files.wordpress.com/2012/04/virus-epstein-barr-presentacion-pdf.pdf>, (Figura 7), último acceso: 14 de Noviembre del 2013.
55. Sabri S., Ghaffari H., Sadeghizadeh M., Alimoghaddam K., Ghavamzadeh A., 2005, Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus DNA Load in Bone Marrow Transplant Recipients By Using Real-Time PCR, *IJHOBMT*, 2 (6), pp. 27-29.
56. Sample J., Young L., Martin B., Chatman T., Kieff E., Rickinson A., Kieff E., 1990, Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes, *Journal of Virology*, 64 (9), pp. 4084-4092.
57. Sánchez S., Barajas G., Ramírez E., Moreno A., Barbosa O., 2004, El fenómeno de autoinmunidad: enfermedades y antígenos relacionados, *Rev Biomed*, 15, pp. 49-55.
58. Solórzano F, 2010, Epstein-Barr virus: beyond infectious mononucleosis, *Bol Med Hosp Infant Mex*, 67, pp.387-389.
59. Sospedra M., Martin R., 2006, Molecular mimicry in multiple sclerosis, *Autoimmunity*, 39 (1), pp. 3-8.
60. Sotelo J., Ordoñez G., Pineda B., 2007, Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis, *J Neurol*, 254 (4), pp. 493-500.
61. Swanborg R., Whittum J., Hudson A., 2002, Human Herpesvirus 6 and Chlamydia pneumoniae as etiologic agents in multiple sclerosis- a critical review, *Microbes Infect*, 4 (13), pp.1327-33.

62. Yamamoto M., kimura H., T Hironaka., **et al**, 1995, Detection and Quantification of Virus DNA in Plasma of Patients with Epstein-Barr Virus Associated Diseases, *Journal of clinical microbiology*, 33 (7), pp. 1765–1768.
63. Wagner H., Munger K., Ascherio A., 2004, Plasma viral load of Epstein–Barr virus and risk of multiple sclerosis, *European Journal of Neurology*, 11, 833–834.
64. Wagner H., Wessel M., Jabs W., Smets F., Fischer L., Offner G., Bucskey P., 2001, Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of epstein-barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction, *TRANSPLANTATION*, 72 (6), pp.1012–1019.
65. Warren K., Catz I., 2013, Esclerosis Múltiple en el Cerebelo: Presentación de un caso, United spinal's MS Scene, <http://www.unitedspinal.org/msscene/2009/03/03/spanish-translation-cerebellar-ms-a-case-study>, (Figura 2-A), último acceso: 14 de Noviembre del 2013.
66. Welsh C., Steelman A., Mi W., Young C., Dean D., Storts R., Welsh T., Meagher M., 2010, Effects of Stress on the Immune Response to Theiler's Virus – Implications for Virus Induced Autoimmunity, *Neuroimmunomodulation*, 17, pp.169–172.
67. Willis S., Stadelmann C., Rodig S., Caron T., Gattenloehner S., Mallozzi S., Roughan J., Almendinger S., Blewett M., Bruck W., Hafler D., Connor K., 2009, Epstein–Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain, *BRAIN, A JOURNAL OF NEUROLOGY*, 132, pp.3318–3328.
68. Ustarroz M., Arrizabalaga M., Unzurrunzaga J., 2013, ADEMGI: Asociación de Esclerosis múltiple de Gipuzkoa, http://www.ademgi.org/?page_id=450, (Figura 2-B), último acceso: 14 de noviembre del 2013.
69. Wootla B., Eriguchi M., Rodriguez M., 2012, Is Multiple Sclerosis an Autoimmune Disease?, *Autoimmune Diseases*, pp.1-12.
70. Velázquez M., Macías M., Rivera V., Lozano J., 2003, Esclerosis Múltiple en México: un estudio multicéntrico, *Rev Neurol*, 36 (11), pp. 1019-1022.
71. Vera D., Chávez N., Lizardi J., Méndez N., 2003, Monocleosis infecciosa, *Médica Sur México*, 10 (2), pp. 76-89.

GLOSARIO

Esclerosis.- El término fibrosis ó esclerosis hace referencia, por definición, al endurecimiento patológico de los órganos o del tejido debido a la creación de nuevas fibras de tejido conectivo.

Neuritis óptica.- La neuritis óptica es la inflamación aguda del nervio óptico que causa una reducción repentina de la visión en el ojo afectado.

Diplopía.- Enfermedad en la que las imágenes que perciben el ojo izquierdo y el derecho, no se procesan en el cerebro formando una única imagen espacial. La consecuencia es la visión doble.

Hemiparesia.- Es una condición caracterizada por la parálisis en un lado del cuerpo.

Paraparesia.- Pérdida del movimiento en los miembros inferiores sin llegar a la parálisis.

Espasticidad.- Es un trastorno del sistema nervioso en el que algunos músculos se mantienen permanentemente contraídos. Dicha contracción provoca la rigidez y acortamiento de los músculos e interfiere sus distintos movimientos y funciones: deambulación, manipulación, equilibrio, habla, deglución, etc.

Parahipoestesia.- Es la percepción por debajo de lo normal a la respuesta de una estimulación nerviosa, bien sea secundaria a un estímulo doloroso, térmico o táctil.

Parestesias.- Se define como la sensación anormal de los sentidos o de la sensibilidad general que se traduce por una sensación de hormigueo, adormecimiento, acorchamiento, producido por una patología en cualquier sector de las estructuras del sistema nervioso central o periférico. El entumecimiento y hormigueo son sensaciones anormales que se pueden producir en cualquier parte del cuerpo, pero son más usuales en las manos, pies, brazos y piernas.

Ataxia.- Es un problema con el control muscular o una incapacidad para coordinar los movimientos de una manera fina.

Disestesia.- Es una sensación anormal desagradable, independientemente de que sea espontánea o provocada. Una disestesia es una parestesia dolorosa.

Neuralgia del trigémino.- Es un trastorno nervioso que causa un dolor punzante o de tipo electrochoque en partes de la cara. El dolor de la neuralgia del trigémino proviene del nervio trigémino. Este nervio lleva las sensaciones de tacto y dolor desde la cara, los ojos, los senos paranasales y la boca hasta el cerebro. La enfermedad generalmente afecta a los adultos, pero puede afectar a cualquier persona a cualquier edad. La neuralgia del trigémino puede ser parte del proceso normal de envejecimiento.

Movimientos-coreoatetósicos (balismo).- El balismo es un trastorno hipercinético caracterizado por un movimiento de lanzamiento violento e involuntario de las extremidades. Consiste en una liberación excesiva de dopamina en el tálamo debido a una desinhibición de los núcleos talámicos, que afecta a nivel cortical y que produce una influencia excitadora sobre las áreas motoras de la corteza cerebral. Este tipo de afectación también produce otras alteraciones como los tics o la corea.

Resonancia magnética en secuencia T1 y T2 (RM).- Las secuencias T1 son útiles para evaluar la morfología y las secuencias T2 se utilizan con mayor frecuencia para detectar cuadros patológicos. El concepto de secuencias o imágenes ponderadas en T1 y T2 sirve para la comprensión de la escala de grises de las imágenes de RM.

Edema.- Es la acumulación de líquido en el espacio tejido intercelular o intersticial, además de las cavidades del organismo.

Impedancia.- Resistencia que presenta un circuito eléctrico al paso de una corriente alterna.

Conductancia.- Se denomina conductancia eléctrica (G) a la propiedad de transportar mover o desplazar uno o más electrones en su cuerpo; es decir, que la conductancia es la propiedad inversa de la resistencia eléctrica.

Transmisión efáptica.- Transmisión de un impulso nervioso desde una fibra nerviosa, axón o dendrita, hacia otra a través de las membranas.

Oligodendrocitos.- Son células de sostén pertenecientes a las células de la neuroglia que se encuentran en el cerebro y en la médula espinal. También conocidos como oligodendroglia, los oligodendrocitos tienen como función de proveer sostén a los axones y la de producir la vaina de mielina que los envuelven, aíslan y nutren

Epistaticamente.- De la palabra Epistasis; interacción entre alelos presentes en diferentes locus. Ocurre cuando 2 pares de genes afectan a la misma característica, pero uno de ellos en una determinada condición enmascara el efecto del otro par.

ANEXOS





ANEXO 1

Factores de riesgo asociados a la Esclerosis múltiple en México: estudio multicéntrico.

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN

FECHA: _____

FOLIO | | | | | | | | | |

HOSPITAL: _____

La Secretaría de Salud a través del Instituto Nacional de Salud Pública y el Instituto Nacional de Neurología está realizando un estudio para investigar las **características epidemiológicas, clínicas, dietéticas, e inmunogenéticas**, relacionados a la ocurrencia de la Esclerosis Múltiple (EM) en una muestra de pacientes mexicanos.

Usted ha sido seleccionada para participar en este proyecto. Por tal motivo deseáramos contar con su consentimiento para llevar a cabo una entrevista acerca de sus características sociodemográficas (nivel educativo, hábitos personales y familiares), clínicos (antecedentes médicos, patológicos y neurológicos), y hábitos alimenticios (frecuencia de consumo de alimentos), información que será **estrictamente confidencial** (se guardará la confidencialidad del informante, asegurando que utilicen claves de registro y folio para identificar a los participantes del estudio); la información obtenida será analizada para fines exclusivos de investigación.

Asimismo, le pedimos por favor que nos facilite tomarle una muestra de sangre (1 tubo de 15 ml = dos cucharaditas) con la que nos permitirá tener información sobre su estado nutricional. Esta muestra servirá para la creación de un banco de ADN, que nos permitirá en un futuro realizar otros estudios relacionados con investigaciones en salud pública (determinación de marcadores genéticos de enfermedades neurológicas). La toma de sangre será tomada con material nuevo y estéril y se llevará a cabo en el hospital, así como la aplicación de la entrevista. Esta muestra de sangre será tomada por la Sra. (ta): _____ enfermera y encuestadora de este proyecto. Finalmente le pediremos una muestra de heces de la mañana, con la que podremos obtener información sobre infecciones parasitarias.

RIESGOS Y MOLESTIAS POTENCIALES

La toma de muestra de sangre puede ser un poco dolorosa y en ocasiones dejar un moretón alrededor del sitio de la toma. Sin embargo, la persona encargada de tomarle la muestra es una enfermera con experiencia y tratará de que esto no suceda.

BENEFICIOS POTENCIALES:

Los resultados de este estudio permitirán conocer cuál es su estado con respecto a infecciones parasitarias y nutricional. En caso de que los resultados muestren que usted tiene deficiencia de uno o más nutrientes, usted será orientada en cuanto a su alimentación para mejorar su estado nutricional. Asimismo, si los resultados en las heces dan resultados sobre infección parasitaria, se le dará tratamiento oportuno así como recomendaciones de prevención y cuidado.



**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Instituto Nacional de Salud Pública**



PARTICIPACION:

Su participación es VOLUNTARIA y por lo tanto, puede dejar de contestar alguna pregunta, suspender la entrevista en cualquier momento o RETIRARSE del estudio en cualquier momento. En caso de que usted decida retirarse del estudio, esto no afectará de ninguna manera la calidad y cantidad de atención médica que recibe de parte de las Instituciones participantes. Le agradecemos de antemano su valiosa colaboración.

Para cualquier aclaración o duda respecto a este estudio, puede contactar con el Investigador principal, Dr Carlos Hernández Girón (teléfono Ciudad México: (55) 54 87 10 00 ext. 3229. E-mail: chernand@insp.mx). Para cualquier aclaración o duda sobre sus derechos como participante en este estudio de investigación, puede comunicarse con la Dra. Ivonne Castro, presidenta de la Comisión de Ética del Instituto Nacional de Salud Pública, (teléfono Ciudad de México: (55) 54 87 10 00 ext. 7424. Email: jcastro@insp.mx), de lunes a viernes de 10:00 a 18:00 hrs.

AUTORIZACIÓN

Leído lo anterior, acepto participar en el estudio descrito ya que los propósitos de este han sido explicados a mi satisfacción. Recibo copia de esta forma de consentimiento.

Acepto donar mi sangre para estudios de evaluación de mi estado nutricional **SI** **NO**

Acepto donar mi sangre para formar un banco de sueros para que realicen **SI** **NO**

estudios sobre alteraciones neurológicas, en el futuro.

Nombre: (entrevistado) _____ **Firma:** _____ **Fecha:** _____

Encuestador: _____ **Firma:** _____ **Fecha:** _____

Testigo 1 Nombre _____ **Firma:** _____ **Fecha:** _____

Dirección: _____ **Parentesco:** _____

Testigo 2: Nombre _____ **Firma:** _____ **Fecha:** _____

Dirección: _____ **Parentesco:** _____

ANEXO 2

Oligos seleccionados del genoma del virus Epstein-Barr para el ensayo de PCR en tiempo real usando sondas Taqman, los cuales codifican para una proteína no glicosilada de membrana BNRF-1 (p143)

Los oligos y la sonda fluorogénica, fueron diseñadas con el software Express Primer (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands), generando un producto de DNA de 74 pares de bases.

- Oligo forward que codifica para la proteína p143 del VEB:

(5'-GGA.ACC.TGG.TCA.TCC.TTG.C)

- Oligo reverse que codifica para la proteína p143 del VEB:

(5'-ACG.TGC.ATG.GAC.CGG.TTA.AT)

- Sonda fluorogenica

(5'-CGC.AGG.CAC.TCG.TAC.TGC.TCG.CT) fue sintetizada por PE Biosystems con una molécula reportera en FAM ligada al extremo 5' y un quencher TAMRA ligada al extremo 3'.