



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Esclerosis múltiple en pacientes mexicanos: análisis de la secuencia de la glicoproteína E
del virus Varicela-Zóster

TESIS

Que presenta

Biól. Hugo David González Conchillos

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de la tesis: Dra. Martha Espinosa Cantellano

Ciudad de México

AGOSTO, 2016

“El que no posee el don de maravillarse ni de entusiasmarse más le valdría estar muerto, porque sus ojos están cerrados.”

Albert Einstein

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). En el laboratorio 1 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Martha Espinosa Cantellano.

Agradecimientos.

A la Dra. Martha Espinosa por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría, por confiar en mis capacidades, por todo su apoyo y enseñanzas durante todo este trabajo, por su paciencia y sus palabras que me motivaron a seguir adelante

A mis asesores la Dra. Rosa María del Ángel y el Dr. Martínez Palomo por brindarme parte de sus conocimientos y su tiempo, son un ejemplo a seguir siempre inspirándome a ser el mejor.

A la Dra. Lorena Gutiérrez y a la Dra. Cleo Cancio por permitirme trabajar en su laboratorio, por su amistad y apoyo, porque siempre estuvieron ahí cuando las necesité, resolviendo mis dudas y compartiendo sus valiosas experiencias. No hay palabras suficientes para agradecer todo su apoyo.

A la M. en C. Graciela Ordoñez por permitirme trabajar en su laboratorio, porque trabajamos codo a codo y por compartirme su experiencia.

Gracias a mi familia, que es lo más preciado que tengo en esta vida.

A mi mamá, que siempre tienes una sonrisa y que a pesar de todos mis errores y locuras, me sigues apoyando y dando ánimos para que pueda cumplir mis sueños y metas.

A mi papá, por ser como eres, por ser ese ejemplo a seguir que me inspira a nunca darme por vencido y a dar todo por la familia.

A mi hermano, por ser esa fuente de inspiración que me impulsa a ser una mejor persona, por todas esas veces que me has dicho que yo puedo llegar a ser alguien y por toda esa confianza que depositas en mí.

A mis amigos del CINVESTAV y Neurología que hicieron de la maestría una de las experiencias más enriquecedoras e inolvidables de mi vida.

Índice.

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PRONÓSTICO.....	4
PATOLOGÍA Y PATOGÉNESIS.....	5
CLASIFICACIÓN DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	9
ETIOLOGÍA.....	10
<i>La participación de virus de varicela-zóster en la esclerosis múltiple.....</i>	<i>12</i>
HERPESVIRUS.....	13
<i>Virus varicela-zóster.....</i>	<i>14</i>
<i>Glicoproteína E.....</i>	<i>17</i>
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	38

Resumen.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por desmielinización y degeneración axonal, está mediada por una respuesta anormal del sistema inmune. Los mecanismos de activación de este trastorno se desconocen, pero se cree que son causados por una compleja interacción de factores genéticos y ambientales. La búsqueda del agente causante ha llevado a proponer a distintos virus como posibles candidatos, tales como el virus de Epstein-Barr (EBV), detectado en los pacientes con EM; sin embargo, en pacientes mexicanos la evidencia parece señalar al virus varicela-zóster (VZV). A pesar de la conocida estabilidad genómica del VZV, la glicoproteína E (gE) puede presentar una mutación en su ectodominio, que provoca la pérdida del epítipo de células B y favorece la infectividad del virus.

Objetivo: Identificar posibles mutaciones en la secuencia del gen que codifica para la glicoproteína E del VZV, aislado del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM.

Estrategia experimental: Se realizó la extracción de DNA de LCR de pacientes con EM en fase de brote y de líquido vesicular de pacientes con herpes zóster. Se confirmó la presencia del VZV mediante la amplificación de la glicoproteína E con oligonucleótidos externos a la secuencia para obtener el gen completo en presencia de una polimerasa de alta fidelidad. Se clonó la secuencia de gE en el vector pJET1.2/blunt para utilizarla como control positivo de los ensayos de PCR. Los productos de PCR fueron purificados para su posterior secuenciación. La secuencia de los pacientes con EM se comparó tanto con las cepas reportadas de VZV como con las secuencias del virus aislado de pacientes con zóster.

Resultados: Se clonó y se secuenció la glicoproteína E como control positivo de los ensayos de PCR. La secuencia de gE pudo ser amplificada en el 39% de los pacientes con EM y en el 100 % de los pacientes con zóster.

Abstract.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination and axonal degeneration, mediated by an abnormal immune system response. The activation mechanisms of this disorder are unknown, but involves a complex interaction of genetic and environmental factors. The search for the causative agent has led to propose various viruses as potential candidates, such as the Epstein-Barr virus (EBV) which has been detected in most patients with MS; however, in Mexican patients, evidence suggest the participation of the Varicella-Zoster virus (VZV). Although genetically stable, VZV glycoprotein E (gE) may present a mutation in its ectodomain resulting in the loss of B cell epitope that enhances virus infectivity.

Objective: To identify possible mutations in the genetic sequence of the glycoprotein E in VZV isolated from CSF of MS patients.

Experimental strategy: DNA extraction was performed from CSF of patients with MS in relapse phase and from the vesicular fluid of patients with zoster. The presence of VZV was confirmed by amplifying the sequence of VZV gE gene using external oligonucleotides using a high fidelity polymerase. The gE sequence was cloned in pJET1.2/blunt Cloning Vector to use it as a positive control of PCR assays. The PCR products were purified for subsequent sequencing. The sequence of MS patients was compared with the reported VZV strains and with the sequences of VZV gE isolated from patients with zoster.

Results: The gE sequence was amplified in 39% of patients with MS and in 100% of patients with zoster. Glycoprotein E was cloned and sequenced for use as a positive control of PCR assays.

Introducción.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por la desmielinización y degeneración axonal, acompañada de deterioro neurológico y discapacidad [1]. Esta enfermedad es mediada por una respuesta anormal del sistema inmune que se dirige contra el sistema nervioso central. Dentro del sistema nervioso central, el sistema inmune ataca a la mielina, así como a las mismas fibras nerviosas, esto se ve reflejado en una de las manifestaciones clínicas iniciales más comunes en la EM, la neuritis óptica (NO), causando pérdida de la visión debido al adelgazamiento de las fibras nerviosas de la retina [2, 3]. Donde se encuentra la mielina dañada, se forma una cicatriz (esclerosis), que le da a la enfermedad su nombre. Cuando la cubierta de mielina o la fibra nerviosa es dañada o destruida, los impulsos nerviosos que viajan hacia y desde el cerebro y la médula espinal se distorsionan o interrumpen, produciendo una amplia variedad de síntomas [4].

Aproximadamente el 80% de los pacientes presentan, en un principio, una forma de la enfermedad caracterizada por episodios recurrentes de desmielinización y lesiones axonales, que se cree pueden ser provocados por procesos infecciosos o estrés[5]. En las fases iniciales de la EM el SNC tiene la capacidad de reparar las regiones afectadas, este proceso lo llevan a cabo células de la glía conocidas como oligodendrocitos (OL), sin embargo, con el tiempo esta capacidad de reparación disminuye debido a que las células precursoras de oligodendrocitos (CPO) no pueden migrar a las zonas desmielinizadas o bien el microambiente evita la diferenciación de estas células [6, 7].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial, la prevalencia media estimada de EM es de 30 por cada 100,000 habitantes. A nivel regional, la prevalencia media estimada es mayor en Europa (80 por cada 100,000), seguida por el Mediterráneo Oriental (14.9), las Américas (8.3), el Pacífico Occidental (5), Asia Sudoriental (2.8) y África (0.3) (**Fig. 1**).

Los países que reportaron la prevalencia más alta incluyen Hungría (176 por 100,000), Eslovenia (150), Alemania (149), Estados Unidos de América (135), Canadá (132.5), República Checa (130), Noruega (125), Dinamarca (122), Polonia (120) y Chipre (110) [8]. Esta prevalencia sigue un gradiente latitudinal, y varía de menos de 5/100.000 en zonas de bajo riesgo (África y Asia del Este), a más de 100/100.000 en zonas de alto riesgo (Europa del norte y central, América del Norte y el sureste de Australia) [9].

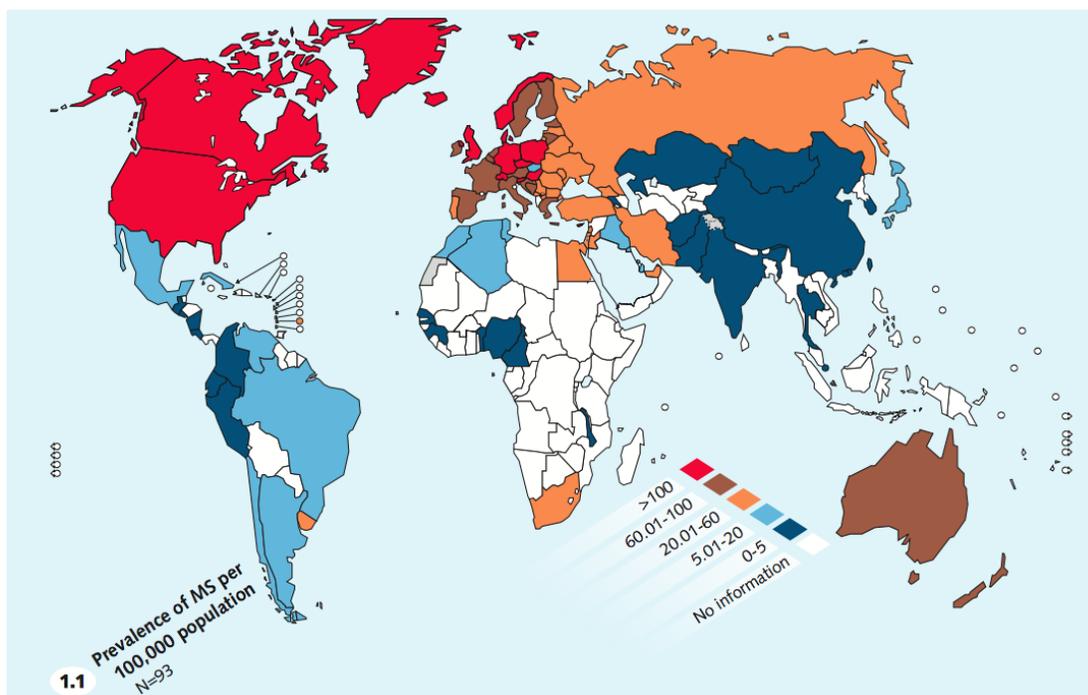


Figura 1. Prevalencia de esclerosis múltiple por cada 100,000 habitantes. Fuente: Atlas: Multiple Sclerosis Resources in the World 2008, WHO.

La EM afecta principalmente a los jóvenes, con un comienzo habitual de 20-50 años y una edad media de inicio de 30 años, aunque la enfermedad puede desarrollarse también en la infancia y después de los 60 años, y es 3 veces más común en mujeres que en hombres. El número total de personas que viven con EM se estima en 2,5 millones.

Manifestaciones clínicas y pronóstico de la EM.

Los pacientes con EM muestran una amplia variedad de síntomas neurológicos que se relacionan con los sitios afectados en el SNC. Los síntomas más comúnmente son parestesias o entumecimiento, debilidad motora, alteraciones visuales monoculares, diplopía,

incoordinación, alteraciones de la marcha, mareos y vértigo. Otros síntomas pueden incluir fatiga, espasticidad, ataxia, nistagmo, pérdida de la sensibilidad, dolor neuropático, urgencia urinaria o retención, disfunción sexual, depresión u otros cambios emocionales, intolerancia al calor, signo de Lhermitte (sensación semejante a un choque eléctrico que se irradia desde la parte posterior de la cabeza y baja hacia la columna vertebral cuando se dobla el cuello hacia adelante) y disfunción cognitiva [9].

La esclerosis múltiple raramente es fatal y la esperanza de vida se acorta por sólo unos pocos meses. La preocupación principal del pronóstico se basa en la calidad de vida y las perspectivas de discapacidad, ya que la EM es una enfermedad progresiva y frecuentemente incapacitante. Con el tiempo la mayoría de los pacientes que han padecido una recaída, desarrollan una enfermedad secundaria-progresiva, donde la discapacidad aumenta gradualmente independiente de las recaídas. El 15% de los pacientes presentan esclerosis múltiple primaria-progresiva, donde hay un aumento gradual de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad, sin recaídas [10]. La progresión de la discapacidad es muy variable, sin embargo, la evidencia sugiere que la progresión en la mayoría de los pacientes es lenta. El tiempo medio desde el inicio de la enfermedad a la EDSS 6 (Expanded Disability Status Scale) (es necesario un bastón para caminar) es de 27.9 años; la media de edad desde el nacimiento hasta la EDSS 6 es de 59 años. En promedio, 15 años después de la aparición de los primeros síntomas de EM, sólo un 20% de pacientes estarán postrados en cama u hospitalizados [11].

Patología y patogénesis.

Las placas desmielinizantes de la EM pueden localizarse en cualquier parte del sistema nervioso central, pero se observan con mayor frecuencia en la sustancia blanca alrededor de los ventrículos, los nervios ópticos, el cuerpo calloso, los pedúnculos cerebelosos, los tractos largos y en las regiones subpiales de la médula espinal y el tronco cerebral. También se han encontrado en la sustancia gris.

En las lesiones de EM, se pueden observar 3 patrones patológicos diferentes que resultan en desmielinización: el tipo I: la desmielinización es inducida por macrófagos que pueden provocar un daño debido a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) o produciendo citocinas que facilitan la entrada de células T. En el tipo II:

participan las células T que promueven la maduración de las células B y la producción de anticuerpos; es el patrón histológico (o patológico) más comúnmente observado en las lesiones de EM; en este caso, la desmielinización es causada por anticuerpos específicos y complemento. La lesión tipo III: se debe a un daño citotóxico de los oligodendrocitos debido a la pérdida de mielina y la exposición del axón a especies de oxígeno reactivas, haciendo lentos o bloqueando los potenciales de acción [12].

Se considera que los agentes infecciosos pueden desempeñar un papel importante en el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes. En este contexto, una interferencia entre el sistema inmune innato y adaptativo podría ser relevante: los agentes infecciosos pueden activar a las células presentadoras de antígenos (APC) a través de receptores tipo Toll (TLR). Las APCs a su vez pueden contribuir a la activación de las células T autorreactivas. Similitudes estructurales entre los antígenos de agentes infecciosos y proteínas de la mielina (mimetismo molecular) pueden inducir una activación de las células T autorreactivas naive que reconocen péptidos derivados de agentes infecciosos y antígenos propios[13].

Las células T CD4⁺ son consideradas como las principales iniciadoras de la patogénesis de la EM ya que se ha observado que en presencia de antígenos que reaccionan de forma cruzada con componentes de SNC como la mielina, existe una expansión clonal de células Th1 y Th17 autoreactivas. Sin embargo, aún no está claro qué subconjunto de células T ejerce una influencia en la patogénesis de la enfermedad [14].

Los linfocitos T naive se diferencian a linfocitos Th1 en presencia de IL-12. Durante la fase de brote, esta población aumenta y libera citocinas pro-inflamatorias como interleucina-2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), en sangre periférica y en las zonas de lesión, además, existe evidencia de que las células Th1 son activadas por la microglia en SNC, donde macrófagos activados median el daño de mielina a través de la fagocitosis y la secreción de mediadores tóxicos, incluyendo TNF- α , óxido nítrico, proteasas y radicales libres de oxígeno. Las células T maduran a la subpoblación Th17 debido a citocinas como IL-1 y 23 producidas por APCs y macrófagos. La frecuencia de células Th17 aumenta en las fases activas de la EM y se caracterizan por la producción de citocinas efectoras como IL-17, 21, 22, 23 y TNF α . Estas citocinas incrementan la función de los neutrófilos, inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas, además, IL-17 promueve la permeabilidad de la barrera hematoencefálica lo que permite la

entrada de células Th1 al sistema nervioso central donde van a potenciar la inflamación. [15, 16].

Las células T reguladoras se encargan de suprimir la actividad de las células T autorreactivas. En los pacientes con EM, no parece haber una reducción en el número de células T reguladoras. Sin embargo, hay cierta evidencia de que las células T reguladoras son menos eficientes en suprimir las células T autorreactivas y tienen una frecuencia más baja de clonación comparadas con las células T reguladoras de los controles sanos [17].

Si bien se ha demostrado que las células T desempeñan un papel central en la patogénesis de la esclerosis múltiple, también existe evidencia que apoya un papel patogénico de las células B. Esta evidencia incluye: la presencia de bandas oligoclonales (OCB); la expansión clonal de células B en el líquido cefalorraquídeo (LCR); cambio de isotipo de los anticuerpos dependientes de antígeno y depósito de inmunoglobulinas (Ig) y complemento en las lesiones [18]. La mayoría de las bandas oligoclonales son del isotipo IgG, es decir, han sido objeto de recombinación de cambio de clase y de hipermutación somática (SHM) en los centros germinales. Las propiedades de las bandas oligoclonales de IgG sugieren una respuesta inmune iniciada por un antígeno, pero los antígenos blanco son hasta ahora en gran parte desconocidos [19]. Aparte de su capacidad para secretar anticuerpos, las citocinas secretadas por las células B también pueden influir en la proliferación de células T en pacientes con EM. Aunque las células B de los pacientes con EM pueden montar una respuesta normal de citocinas, bajo ciertas condiciones de activación, en otros contextos de activación, incluyendo la exposición a agentes infecciosos (que generan respuestas Th1), pueden desencadenar respuestas anormales en las cuales las células B producen citocinas pro-inflamatorias como TNF- α y linfotoxina (LT) y estas a su vez, contribuyen a un aumento de las respuestas de tipo Th1 y Th17 [20]. Un aspecto adicional es que las células B pueden servir como APCs. Su capacidad de amplificación clonal les permite activar células T [21].

La inflamación activa y la ruptura de la barrera hematoencefálica pueden ser detectadas en los cerebros de pacientes con esclerosis múltiple. En estas lesiones se pueden distinguir distintas zonas:

- i) Zona de materia blanca periférica a la placa. La sustancia blanca de apariencia normal adyacente a la lesión contiene infiltrados inflamatorios perivasculares dispersos, pero sólo pocos linfocitos, principalmente células T CD3⁺/CD8⁺. Esto

va acompañado por la activación de la microglia, que se refleja por la expresión de CD68 en un subconjunto de estas células.

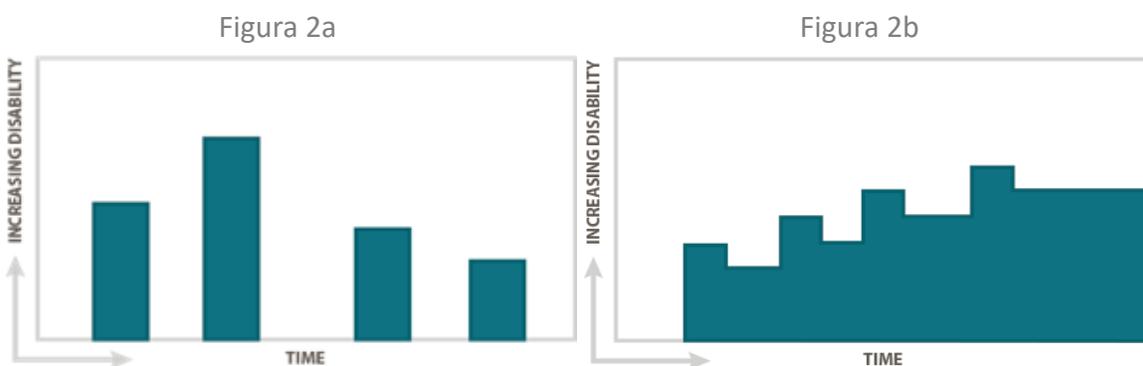
- ii) Zona de lesión inicial pre-fagocítica. Al acercarse al borde de la lesión, aumenta la densidad de microglia. La mielina está todavía intacta. En las lesiones graves y agresivas hay pérdida de proteínas de los oligodendrocitos, tales como la glicoproteína asociada a la mielina. Se observa condensación nuclear y fragmentación en los oligodendrocitos, lo que sugiere una muerte celular apoptótica. Esta zona también contiene un número considerable de esferoides axonales. Se observan pocas células T CD8⁺ y la lesión tisular se asocia con la presencia de microglia activada.
- iii) Zona de lesión activa temprana. En esta zona la mielina se ha perdido y los restos de mielina son fagocitados por los macrófagos. En esta área hay una gran cantidad de esferoides axonales y los oligodendrocitos son escasos. Hay un reclutamiento secundario de células T, células B y macrófagos durante la degradación de la mielina. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno derivadas de macrófagos/microglia provocan las lesiones axonales.
- iv) Zona de lesión activa tardía. Hacia el centro de la placa, la densidad de macrófagos disminuye en comparación a la observada en lesiones activas tempranas. La mielina se pierde por completo y los macrófagos terminan las últimas etapas de la degradación de la mielina (proteína básica de la mielina). Los axones se reducen en densidad. Un subconjunto de lesiones contiene un número sustancial de oligodendrocitos, esto se asocia con las primeras etapas de la remielinización [22].

En el cerebro humano el hierro se almacena principalmente como ferritina en las vainas de mielina. Se acumula fisiológicamente con la edad, alcanzando una meseta entre los 40 a 50 años. La destrucción de la mielina y la subsiguiente fagocitosis de los restos de mielina se encuentran en lesiones activas de esclerosis múltiple. Se ha sugerido que el hierro liberado en el espacio extracelular durante el curso de la ruptura de mielina amplifica la primera ola de estrés oxidativo en lesiones de EM. Finalmente, el hierro es absorbido por los macrófagos y microglia, sin embargo, estas células degeneran y liberan su contenido de hierro en el espacio extracelular, que inicia una onda adicional de estrés oxidativo [23].

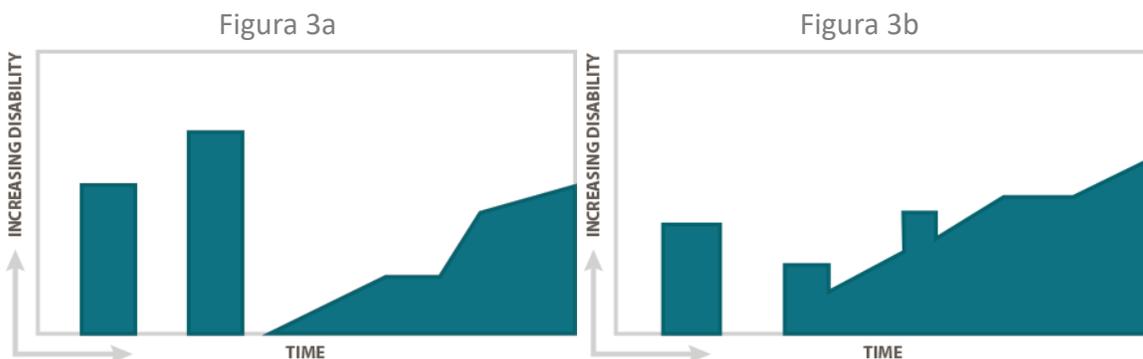
Clasificación de la Esclerosis Múltiple.

Se han identificado cuatro cursos de la enfermedad en la esclerosis múltiple: EM recurrente-remitente (EMRR), EM primaria progresiva (EMPP), EM secundaria progresiva (EMSP) y EM progresiva recurrente (EMPR). Cada uno de estos cursos de la enfermedad puede ser leve, moderado o grave.

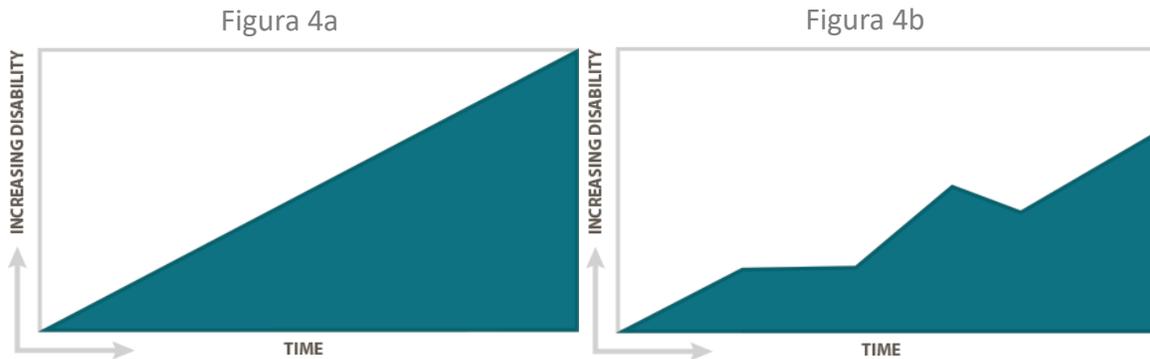
- EMRR se caracteriza por ataques de empeoramiento de la función neurológica. Estos ataques (también llamados recaídas o exacerbaciones) son seguidos por períodos de recuperación (remisiones), durante los cuales los síntomas mejoran parcial o totalmente y no hay aparente progresión de la enfermedad (**figuras 2a y b**). Aproximadamente el 85% de las personas con EM se diagnostica inicialmente con EM remitente-recurrente.



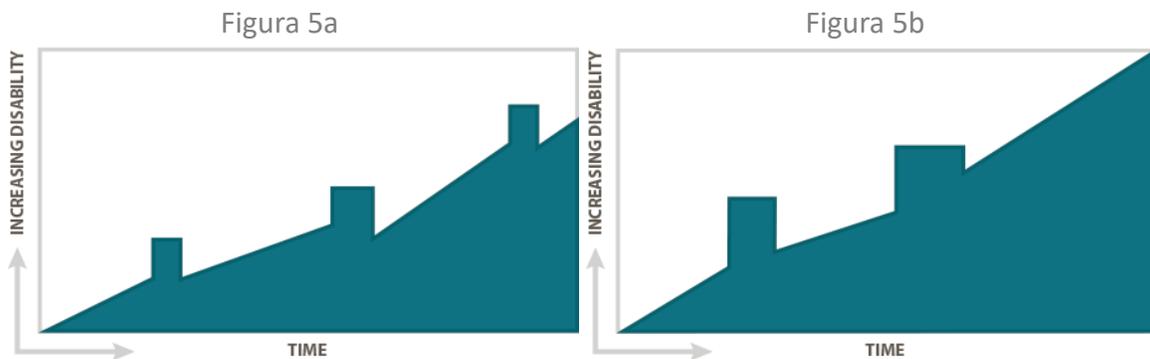
- EMSP. El nombre de este curso viene del hecho de que se sigue después del curso remitente-recurrente. La mayoría de las personas que son diagnosticadas inicialmente con EMRR eventualmente tienen una transición a EMSP, lo que significa que la enfermedad comienza a progresar en forma más constante (aunque no necesariamente más rápidamente), con o sin recaídas (**figuras 3a y b**).



- EMPP. Se caracteriza por el empeoramiento de la función neurológica de manera constante desde el principio. Aunque la tasa de progresión puede variar con el tiempo, con mesetas ocasionales y mejoras temporales, no hay recaídas o remisiones. Alrededor del 10% de las personas con EM presentan EMPP (**figuras 4a y b**).



- EMPR. El menos común de los cuatro cursos de la enfermedad, se caracteriza por que la enfermedad avanza de manera constante desde el principio con exacerbaciones ocasionales a lo largo del tiempo. Las personas con esta forma de EM pueden o no experimentar cierta recuperación tras cada ataque; la enfermedad continúa progresando sin remisiones (**figuras 5a y b**).



Etiología.

1. Factores genéticos

A pesar de numerosos estudios experimentales, genéticos y epidemiológicos, los mecanismos de activación de este trastorno autoinmune no se conocen. La esclerosis múltiple es causada por una compleja interacción de factores genéticos y ambientales. Los componentes genéticos de la EM son bastante complejos, y los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II (6p21.3) desempeñan un papel importante en la determinación del riesgo de EM. Los estudios realizados en Norteamérica y las poblaciones europeas revelaron una

asociación entre los alelos HLA-DRB1*15:01, -DQA1*01:02, -DQB1*06:02, -DRB5*01:01(DR2) y el desarrollo de la EM [24]. Diversos estudios han sugerido que los genes de susceptibilidad muestran los mismos patrones geográficos de distribución de EM. Por ejemplo, el aumento de prevalencia de EM en Escocia en comparación con Inglaterra se ha atribuido a una mayor frecuencia del haplotipo DR2 en la población escocesa [25]. La esclerosis múltiple es una enfermedad cuya etiología sigue siendo desconocida, en la que participan factores genéticos y ambientales. Las diferencias raciales y geográficas juegan un papel importante en la incidencia y características de la esclerosis múltiple. México se encuentra en una zona geográfica transicional y está poblada por individuos mestizos que presentan un fondo genético derivado principalmente de habitantes nativos Americanos (51%) y de colonizadores Europeos (45%), con una mínima contribución de la población del oeste de África (3.7%).[26, 27] Es probable que los indios americanos están protegidos contra la EM u otros trastornos desmielinizantes como la neuromielitis óptica (NMO), en parte debido a su perfil genético [28]

2. Factores ambientales

La importancia de los factores ambientales en la patogénesis de la esclerosis múltiple se ve reflejada en estudios que muestran que más del 80% de los pacientes con esclerosis múltiple no tienen familiares afectados, y alrededor del 75% de gemelos idénticos de pacientes con EM, no desarrollan la enfermedad. Además, el mundo parece estar dividido en zonas de alto y bajo riesgo, una división que puede reflejar la influencia del clima, factores ambientales, sanitarios o socioeconómicos que interactúan con agentes infecciosos.

Es claro que no sólo los factores genéticos son los responsables del desarrollo de esta enfermedad, sino que también intervienen factores ambientales en su desarrollo. La hipótesis de que la esclerosis múltiple puede ser el resultado de una respuesta inmune anormal posiblemente provocada por la exposición tardía a una infección común en la infancia, se basa principalmente en estudios de migración. El riesgo de desarrollar EM cambia con la migración antes pero no después de la edad de 15-20 años entre zonas con diferentes prevalencias de EM [29].

Estudios realizados en poblaciones caucásicas que emigran de las zonas de alta prevalencia a zonas de baja prevalencia sugieren que estas poblaciones pueden reducir su riesgo de desarrollar la enfermedad si la migración se realiza antes de los 15 años de edad [30].

El tabaco es uno de los factores ambientales que se ha señalado que participa en el desarrollo de la EM. De hecho, se ha relacionado al tabaquismo con un aumento en la frecuencia de recaídas y abundancia en el número de lesiones cerebrales activas en la resonancia magnética (RM) de los pacientes [31].

La relación de la vitamina D con la esclerosis múltiple está sustentada por varios estudios in vitro y en modelos animales, que han demostrado que la vitamina D activa (1,25-dihidroxitiamina D/calcitriol) induce a las células inmunes anti-inflamatorias, incluyendo las células T reguladoras [32]. Un estudio en enfermeras estadounidenses encontró que aquellas que tomaron suplementos dietéticos con más de 400 unidades internacionales (UI) de vitamina D por día tenían un riesgo 40% menor de desarrollar esclerosis múltiple que las que no usaron suplementos [33].

La participación de virus varicela-zóster en la esclerosis múltiple.

Diversos estudios epidemiológicos sugieren la participación de organismos infecciosos en el desarrollo de la EM. Uno de estos agentes es el virus de Epstein-Barr (EBV), un γ -herpesvirus humano con amplia distribución en la población humana, que puede infectar y activar a los linfocitos B y permanecer latente en el hospedero. Estudios seroepidemiológicos en poblaciones caucásicas han demostrado que podría haber una fuerte asociación entre la EM y EBV. El antecedente de mononucleosis infecciosa, la seroprevalencia de IgG anti-antígeno nuclear 1 de Epstein Barr y el anti-antígeno de la cápside viral fue más frecuente en los pacientes con EM que en los controles [34].

El virus varicela-zóster (VZV) es un herpesvirus ubicuo, exclusivo de humanos, que presenta un gran neurotropismo. La infección primaria (que es prácticamente universal en los niños) produce varicela, después de la cual el VZV permanece latente en las neuronas ganglionares a lo largo de todo el eje neural. Por lo tanto, VZV es un virus que, como EBV puede estar asociado al desarrollo del EM [35].

En México hay evidencia que indica que la prevalencia de EM ha ido continuamente en aumento, tanto que a finales de los años 90, esta enfermedad se convirtió en una de las causas más frecuentes de hospitalización por padecimientos neurológicos. En el año 2002, Tarrats

y colaboradores llevaron a cabo una encuesta en pacientes con EM, pacientes con otras enfermedades neurológicas (excluyendo enfermedades desmielinizantes) e individuos sanos, para identificar posibles factores de riesgo asociados con la esclerosis múltiple en la población mexicana. De los resultados obtenidos en esta encuesta, el que más resalta es la infección con el virus de varicela-zóster, ya que el porcentaje de los pacientes con EM que reportaron una infección previa con VZV fue significativamente mayor que los controles [36].

El DNA del VZV se ha encontrado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con EM durante la primera semana de la recaída [37]. En estudios posteriores, se ha demostrado la presencia del virus tanto en líquido cefalorraquídeo (LCR) como en PBMC, coincidiendo con la exacerbación clínica de la EM. Además, durante la remisión clínica de la EM, el VZV desaparece, como sucede en los breves períodos de infección activa causada por este virus en los casos de varicela y herpes zoster, donde el actividad viral es seguida por la desaparición del virus después del episodio agudo, devolviendo el virus a la latencia dentro de los ganglios neurales [38]. Estos resultados sugieren que si bien en las poblaciones caucásicas el EBV pudiera ser un factor en el desarrollo de la EM, en la población mexicana la evidencia favorece la participación del VZV. La discrepancia podría deberse a las diferencias genéticas entre las dos poblaciones.

Herpesvirus

Los herpesvirus se encuentran entre los virus más complejos; con viriones de 200 a 250 nm de diámetro. Las partículas virales están constituidas por tres elementos estructurales principales: el elemento más externo es una bicapa lipídica que proviene de las membranas de los organelos de la célula hospedera; contiene glicoproteínas virales. Dentro de la envoltura se encuentra el tegumento, que contiene numerosas proteínas virales y tiene un espesor variable. Rodeada por el tegumento se encuentra la nucleocápside icosaédrica bien definida de 90-110 nm formada por 162 capsómeros, que contiene un DNA lineal de doble cadena de entre 125 a 245 kpb.

La familia *Herpesviridae* se divide en tres familias: *Herpesviridae*, que contiene a los virus de mamíferos, aves y reptiles; *Alloherpesviridae*, que incluye a los virus de peces y ranas; y *Malacoherpesviridae*, que contiene al virus de bivalvos.

La familia *Herpesviridae* está formada por tres subfamilias que son *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, que se distinguen por su patogenicidad y propiedades de replicación. Los *Alphaherpesvirinae* se multiplican *in vitro* en ciclos cortos de replicación, lo que provoca una rápida propagación en cultivos celulares. Los virus *herpes simplex* y *varicela-zoster*, causan erupciones vesiculares en los humanos, son prototipos de esta subfamilia, que se divide en los géneros *Simplexvirus*, que incluye los virus *herpes simplex-1* (HVS-1), HVS-2 y *varicellovirus* representado por VZV. Los *Betaherpesvirinae* tienen un tropismo celular reducido, con ciclos de replicación relativamente amplios, y por lo tanto se diseminan lentamente *in vitro*. Los miembros de esta subfamilia son citomegalovirus humano (HCMV), herpesvirus humano-6 (HHV-6) y HHV-7. Los miembros de la tercer subfamilia, *Gammaherpesvirinae*, tienen un espectro de hospederos muy reducido, pero la duración de los ciclos de replicación es diferente entre los varios tipos de virus. A esta subfamilia pertenecen EBV y HHV-8. Los *Gammaherpesvirinae* pueden infectar tanto linfocitos B como linfocitos T, e inducir en ellos un estado de latencia del virus [39-42].

Virus varicela-zóster.

Como se mencionó anteriormente, el virus de Varicela-zoster, también conocido como herpesvirus virus humano-3 (HHV-3), pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*. Este virus es ubicuo en humanos y es el causante de la varicela y del herpes zoster (**figura 6**). La varicela resulta de una infección primaria con VZV; es una infección común en los niños, asociada con fiebre y con erupciones vesiculares generalizadas. Como es característico de los *Alphaherpesvirinae*, VZV establece latencia en células de los ganglios de la raíz dorsal. El herpes zoster es un padecimiento que se caracteriza erupción vesicular localizada y dolorosa que involucra uno o dos dermatomas adyacentes y es causado por la reactivación del virus. La incidencia de herpes zoster aumenta con la edad o con una inmunosupresión. VZV se caracteriza por un espectro limitado de células hospederas infectables, que son células provenientes de humano o simio.

Hace unas décadas se pensaba que las cepas de VZV alrededor del mundo eran muy similares debido a la estabilidad genética característica de los herpesvirus, por lo que no se podían distinguir entre ellas o no podían ser caracterizadas, sin embargo, estudios enfocados en la

búsqueda de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) han demostrado que existen más de 10 cepas distintas de VZV distribuidas en 5 clados [43-45].

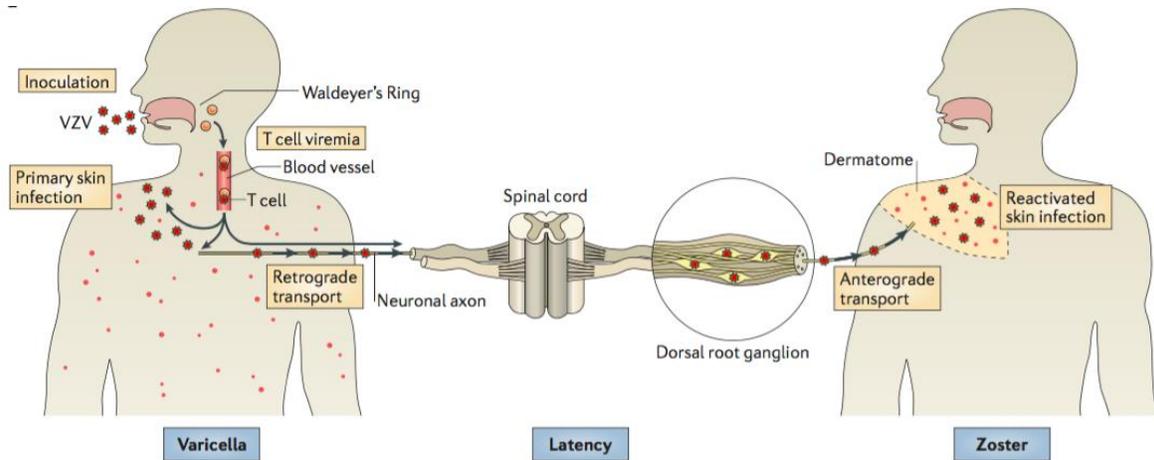


Figura 6. Modelo del ciclo de VZV. El ciclo comienza cuando las partículas virales alcanzan a los epitelios en los sitios de entrada. Después de una replicación local hay una propagación hacia otros tejidos linfoides regionales, donde VZV puede acceder a las células T. Las células T infectadas liberan a los virus en sitios cutáneos de replicación. VZV establece latencia en los ganglios sensoriales después de ser transportados a los núcleos neuronales mediante los axones neuronales o por una viremia. La reactivación del virus permite una segunda fase de replicación que se produce en la piel, lo que típicamente causa lesiones en el dermatoma que está inervado por el ganglio sensorial afectado. Fuente: Zerboni *et al.* 2014

La envoltura.

La envoltura del VZV consiste de elementos membranosos capturados durante el transporte de nuevas partículas a través de la membrana nuclear, del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso; esta envoltura está intercalada con glicoproteínas virales. El genoma de VZV codifica las glicoproteínas gB, gC, gE, gH, gI, gK y gL así como las glicoproteínas putativas gM y gN.

El tegumento.

La región localizada entre la cápside y la envoltura se conoce como tegumento, que puede diferir en tamaño, y su espesor determina el diámetro ligeramente variable de las partículas. El tegumento es una mezcla de proteínas que comprende hasta 20 componentes virales codificados por los marcos de lectura abiertos (ORFs) 4, 10, 47, 62 y 63 del genoma del VZV.

La nucleocápside.

El tegumento rodea a la nucleocápside, que tiene una forma icosaédrica de 100 a 110 nm de diámetro, compuesta por 162 capsómeros. La cápside está construida por las proteínas codificadas por los ORF 20, 23, 33, 33.5, 40 y 41 del genoma viral (figura 7).

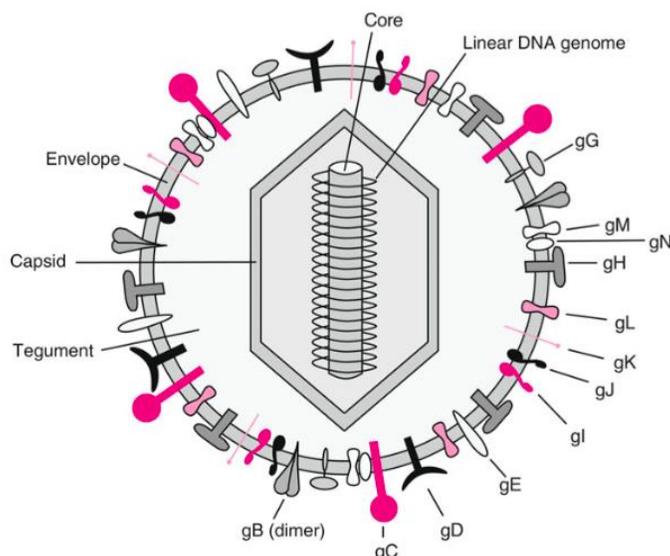


Figura 7. Estructura de la partícula de VZV. El genoma se empaqueta en un núcleo de la nucleocápside icosaédrica. La cápside está rodeada por una capa de tegumento, que es una estructura que se compone de proteínas con funciones reguladoras, incluyendo al factor de transactivación viral inmediato-temprano (IE). El componente exterior es una envoltura de membrana lipídica que se deriva de las membranas celulares con glicoproteínas virales incorporadas. (Fuente: Modrow *et al.* 2013)

El genoma

El genoma se encuentra dentro de la nucleocápside. El DNA está enrollado sobre un eje de proteínas; esta combinación de DNA lineal y proteínas se conoce como nucleoide [46, 47].

El genoma de VZV es una molécula de DNA lineal de doble cadena de 125 Kb (es el genoma más pequeño entre los herpesvirus humanos) y codifica al menos 71 genes, identificados numéricamente de acuerdo a la localización de su marco de lectura abierto con respecto al extremo 5' [48]. El genoma viral consiste de dos regiones codificantes únicas, la región única larga (UL) y la región única corta (US), cada una flanqueada por repetidos invertidos; repetidos cortos denominados repetidos terminales largos (TRL) y repetidos internos largos (IRL) rodeando la región única larga, mientras que repetidos más largos llamados repetidos

terminales cortos (TRS) y repetidos internos cortos (IRS) rodean la región única corta [49] (**figura 8**).

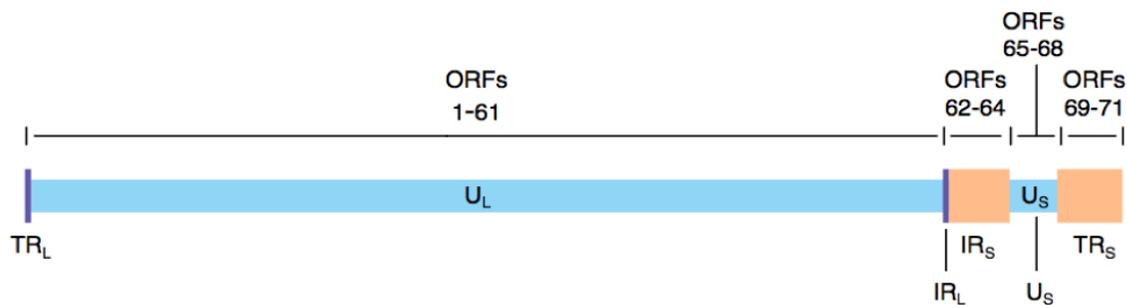


Figura 8. Organización del genoma de VZV. El genoma del virus varicela-zoster se divide en una región única larga (UL) y una región única corta (US). La región UL contiene 61 marcos de lectura abiertos (ORFs) y está unido a repeticiones cortas invertidas denominadas TRL e IRL. La región US contiene cuatro ORFs y es flanqueada por repeticiones largas invertidas denominadas TRS e IRS, cada una de las cuales contiene tres ORFs. Fuente: <http://journals.cambridge.org>

El virus de varicela es un virus asociado a las células, ya que a diferencia de otros herpesvirus, VZV no se libera en el medio cuando se encuentran en un cultivo celular. En cambio, el virus se dispersa a través de la fusión de la membrana plasmática de una célula infectada con una célula adyacente. La formación de sincitios es inducida por la expresión de glicoproteínas virales fusogénicas, que resulta en la formación de grandes policariones que pueden incluir cientos de núcleos [50]. Los herpesvirus generalmente requieren la gB y al complejo gH-gL, y en el caso de HSV, también se requiere la gD para la fusión de membranas. Sin embargo, VZV no presenta las glicoproteínas D y B, además, el complejo gH-gL se encuentra en una proporción muy baja, por lo que se ha sugerido que otras glicoproteínas como gE y gI podrían ser las responsables de llevar a cabo la fusión de membranas durante una infección. [51, 52].

Glicoproteína E.

La glicoproteína E (**figura 9**), es codificada por el ORF68 es una proteína integral de membrana tipo 1 con una longitud de 623 aminoácidos y se expresa tanto en el membrana como en el citoplasma de las células infectadas. Está involucrada en la infección célula-célula, la formación de la envoltura secundaria y en las infecciones en piel y de células T [53]. Todos los herpesvirus presentan homólogos de gE, sin embargo para VZV esta glicoproteína presenta una región larga N-terminal no conservada (aa 1-188) que es necesaria para su replicación. Se ha demostrado que esta región N-terminal, puede unirse a la proteína

celular enzima degradadora de insulina (IDE, insuline-degrading enzyme); esta interacción promueve la entrada y la propagación célula-célula de VZV [54, 55].



Figura 9. Estructura tridimensional de gE. Modelo tridimensional generado a partir de la secuencia completa de aminoácido de gE de VZV. (La predicción de la estructura se realizó en el sitio web RaptorX).

El dominio citosólico (aa 562-623) exhibe motivos de endocitosis y tráfico que contribuyen a la virulencia de VZV. Esta proteína forma un complejo con la glicoproteína I en el retículo endoplásmico rugoso, y la mayoría de la gE existe en forma de heterodímero gE-gI en las células infectadas [56].

De todos los herpesvirus humanos, VZV probablemente sea el virus que sufra menos ciclos de replicación durante la vida en el hospedero. Estudios realizados estiman que el virus se replica activamente durante un periodo de 10-14 días post infección. Durante un cuadro de varicela, VZV tiene un máximo de 20 ciclos de replicación, pasados estos ciclos, el virus entra en un estado de latencia donde no ocurren más ciclos replicativos, a menos que el hospedero desarrolle herpes zóster en la edad adulta. Debido a esto, se ha supuesto que VZV posee una gran estabilidad genética [57] (**figura 10**).

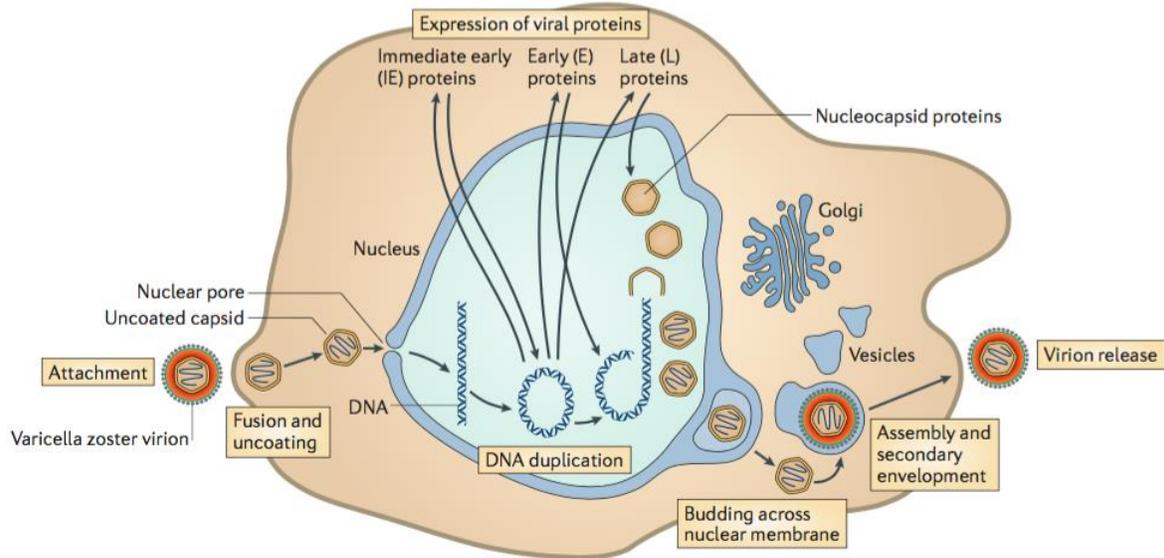


Figura 10. Modelo de replicación de VZV. Las partículas envueltas de VZV se unen a la membrana nuclear, se fusionan y liberan las proteínas de tegumento. Las cápsides sin envoltura se unen a los poros nucleares, donde el DNA es inyectado dentro del núcleo. Los genes inmediatos tempranos son expresados, seguidos de los genes inmediatos y por último los tardíos. Se ensambla la nucleocápside y el DNA empaquetado se mueven hacia la membrana nuclear interna y surge a través de la membrana nuclear. Las cápsides entran al citoplasma, las glicoproteínas virales maduran en la región trans-Golgi y las proteínas de tegumento se ensamblan en vesículas; las cápsides se someten a un envolvimiento secundario y son transportadas a la superficie celular, donde las partículas virales son liberadas. Fuente: Zerboni *et al.* 2014

Sin embargo, en 1995 se aisló una cepa de VZV (VZV-MSP) con una mutación en la secuencia que codifica para la glicoproteína E (gE) [58]. En 1999 se reportó otro caso de un virus aislado (VZV-BC) con una mutación similar sobre la misma secuencia [59] y por último en el año 2006 se reportaron dos aislados más (VZV-STO1 y VZV-STO2) con la mutación sobre gE [60] y un caso con una mutación que genera una sustitución de aminoácidos (D161G) [61]. Los aislados antes mencionados se caracterizaron por presentar infecciones de varicela o zóster más severas, además de un fenotipo con una dispersión célula a célula más rápida y una mayor capacidad de formar sincitios *in vitro*. La mutación sobre gE también elimina el epítipo de las células B definido por el anticuerpo monoclonal 3B3, esto puede tener como consecuencia una evasión de la respuesta inmune, provocando una infección primaria o en el caso de una re-infección, la reactivación del virus.[62].

Justificación.

La esclerosis múltiple es una enfermedad de etiología desconocida, en la cual factores ambientales y genéticos intervienen en su desarrollo. Dentro de los factores genéticos se encuentran los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II (6p21.3), que desempeñan un papel importante en la determinación del riesgo de EM ya que las poblaciones europeas -que presentan en mayor proporción el alelo HLA-DRB1*15:01- son más susceptibles al desarrollo de esta enfermedad. Los virus se han asociado con la esclerosis múltiple durante un largo tiempo y la búsqueda del agente causante ha llevado a proponer a distintos virus como posibles candidatos. Los herpesvirus humanos han sido el foco de la mayoría de los estudios que han intentado evaluar el papel de los virus en la EM [63]. Se ha observado que un gran número de pacientes con EM han presentado infecciones virales, principalmente con virus de la familia *Herpesviridae* como el virus de Epstein-Barr. Esta familia tiene en común la capacidad de entrar en latencia durante largos periodos y presentar neurotropismo. La esclerosis múltiple se ha convertido en una de las principales causas de hospitalización en salas de neurología en México, afectando principalmente a la población de jóvenes y adultos. Estudios realizados en la búsqueda de factores de riesgo para la población mexicana revelan que un alto porcentaje de pacientes con EM tienen en común una infección previa con el virus varicela-zóster [36]. En estudios posteriores, se ha detectado la presencia del VZV tanto en LCR como en PBMC durante los brotes de esclerosis múltiple. Sin embargo, el EBV relacionado con el desarrollo de la EM en poblaciones como la europea [64], se encuentra ausente en los pacientes mexicanos.

Hipótesis.

En los pacientes mexicanos existe una relación entre los brotes de esclerosis múltiple y la reactivación del virus de varicela-zóster. Una mutación en la glicoproteína E de VZV provoca un aumento en la virulencia e infectividad del virus, por lo que los pacientes con EM que presentan una infección con VZV podrían ser portadores de una cepa mutada.

Objetivo general.

- Identificar posibles mutaciones en el gen que codifica para la glicoproteína E del VZV aislado de LCR de pacientes con EM.

Objetivos particulares.

1. Extracción de DNA del LCR.
2. Clonación de la glicoproteína E de VZV.
3. Amplificación, purificación y secuenciación de gE.
4. Identificación de mutaciones en la glicoproteína E.

Estrategia experimental.

Selección de pacientes y recolección de datos clínicos.

Los pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) fueron diagnosticados y seleccionados de acuerdo a los criterios de McDonald. Una vez realizado el diagnóstico, se les explicó la naturaleza de la investigación, se les invitó a participar en el estudio y se les solicitó firmar el consentimiento que nos permitió hacer uso de sus muestras de sangre periférica y de líquido cefalorraquídeo.

Toma de muestra de LCR.

La toma de LCR fue realizada por personal del INNN. La muestra de líquido cefalorraquídeo (aproximadamente 9 ml) se obtuvo mediante una punción lumbar en condiciones estériles y se almacenó en tubo estéril de vidrio. Las muestras se tomaron en los primeros 7 días de brote clínico.

Extracción de DNA del LCR.

La extracción se realizó con la ayuda del kit Gentra Puregene Cell Kit de Qiagen. (# catalogo: 158908). En un tubo cónico estéril de 1.5 ml se agregaron 495 µl de buffer de lisis (Qiagen), 250 µl de la muestra de LCR y 5 µl de proteinasa K (Applied Biosystems) y se incubó durante 4 horas a 56° C. Una vez concluido el tiempo de incubación, se agregaron 100 µl de solución de precipitación de proteínas (Qiagen) y se incubó en refrigeración durante 5 minutos. El tubo se centrifugó durante 3 minutos a 14,000 rpm. En un tubo nuevo se agregaron 300 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich) y del tubo anterior se extrajo el sobrenadante sin desprender el botón, este sobrenadante se agregó al tubo con isopropanol y se mantuvo en agitación durante 5 minutos. El tubo se dejó toda la noche a -20° C. Al día siguiente se descongeló y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante, se agregaron 300 µl de etanol (Sigma-Aldrich) al 70 % y se mantuvo en agitación durante 3 minutos. Se centrifugó durante 1 minuto a 14,000 rpm, el tubo se decantó y se colocó boca abajo sobre

un papel absorbente durante 10 minutos. Una vez seco el tubo, el botón se disolvió en 30 µl de agua y se incubó durante 5 minutos a 56° C.

Determinación de la concentración de ácidos nucleicos.

Incluir metodología.

Amplificación de gE de VZV por PCR.

Debido a que la gE de VZV tiene un tamaño aproximado de 1,979 pares de bases, se diseñaron tres pares de oligonucleótidos que comprenden la secuencia completa del gen la glicoproteína; estos oligonucleótidos se utilizaron tanto para su amplificación como para su secuenciación. El marco de lectura del gen que codifica para gE se obtuvo del GenBank y cuenta con el código KC112914.1:

```
CTATATTCCGAGGGTCGCCTGTAATATGGGACAGTTAATAAACCTGTGGTGGGGTATTGATGGGGTTCGGAATTATCAC
GGGAACGTTGCGTATAACGAATCCGGTCAGAGCATCCGCTTTCGATACGATGATTTTCACATCGATGAAGACAACTGGA
TACAACTCCGTATATGAGCCTTACTACCATTAGATCATGCGGAGTCTTCATGGGTAAATCGGGGAGAGTCTTCGCGAAA
AGCGTACGATCATAACTCACCTTATATATGGCCAGTAATGATTATGATGGATTTTTAGAGAACGCACACGAACACCATGG
GGTGTATAATCAGGGCCGTGGTATCGATAGCGGGGAACGGTAAATGCAACCCACACAAATGTCTGCACAGGAGGATCTTGG
GGACGATACGGGCATCCACGTTATCCCTACGTTAAACGGCGATGACAGACATAAAATGTAAATGTGGACCAACGTCAATA
CGGTGACGTGTTTTAAAGGAGATCTTAATCCAAAACCCCAAGGCCAAAGACTCATTGAGGTGTCAGTGAAGAAAATCACCC
GTTTACTTTACGCGCACCGATTACGCGGATTTATGGAGTCCGGTACACCGAGACTTGGAGCTTTTTGCCGTCATTAACCTG
TACGGGAGAGCGCAGCGCCCGCCATCCAGCATATATCTTAAACATACAACATGCTTTCAAGACGTGGTGGTGGATGTGGA
TTGCGCGGAAAATACTAAAGAGGATCAGTTGGCCGAAATCAGTTACCGTTTTCAAGGTAAGAAGGAAGCGGACCAACCGTG
GATTGTTGTAAACACGAGCACACTGTTTGGATGAACTCGAATTAGACCCCCGAGATTGAACCGGTGTCTTGAAAGTACT
TCGGACAGAAAACAATACTTGGGTGTGTACATTTGGAACATGCGCGGCTCCGATGGTACGTCTACCTACGCCACGTTTTT
GGTCACCTGGAAGGGGATGAAAAACAAGAAACCTACGCCCGCAGTAACTCCTCAACCAAGAGGGGCTGAGTTTCATAT
GTGGAATTACCACTCGCATGTATTTTTCAGTTGGTGTACGTTTAGCTTGGCAATGCATCTTCAGTATAAGATACATGAAGC
GCCATTTGATTTGCTGTTAGAGTGGTGTATGTCCCATCGATCCTACATGTCAACCAATGCGGTTATATTCTACGTGTTT
GTATCATCCCAACGCACCCCAATGCCTCTCTCATATGAATTCGGTGTACATTTACCTCGCCACATTTAGCCCAGCGTGT
TGCAAGCACAGTGTATCAAAAATTGTGAACATGCAGATAACTACACCGCATATTGTCTGGGAATATCTCATATGGAGCCTAG
CTTTGGTCTAATCTTACACGACGGGGCACCACGTTAAAGTTTGTAGATACACCCGAGAGTTTGTGCGGATTATACGTTTT
TGTGGTGTATTTAACGGGCATGTTGAAGCCGTAGCATACACTGTTGTATCCACAGTAGATCATTTTGTAAACGCAATTGA
AGAGCGTGGATTTCCGCCAACGGCCGGTCAGCCACCGCGACTACTAAACCAAGGAAATTACCCCGTAAACCCCGGAAC
GTCACCACTTCTACGATATGCCGATGGACCGGAGGGCTTGCAGCAGTAGTACTTTTATGTCTCGTAATATTTTAACTCTG
TACGGCTAAACGAATGAGGGTTAAAGCCTATAGGGTAGACAAGTCCCGTATAACCAAAGCATGTATTACGCTGGCCTTCC
AGTGGACGATTTTCAGGACTCGGAATCTACGGATACGGAAGAAGAGTTTGGTAACGCGATTGGAGGGAGTCACGGGGTTC
GAGTTACCGGTGTATATAGATAAGACCCGGTGCATCCGAACCGGGCAACGTCGAGCGTGTAAATTTAAATAAAAAACA
GTACGCTTTTATCCGG
```

En color rojo se marcaron los codones de inicio y término de la traducción de la gE. Los oligonucleótidos se diseñaron de la siguiente manera:

Nombre del oligonucleótidos	Secuencia	Peso esperado (pb)
Start Forward (FS)	5'-CTATATTCCGAGGGTCGC-3'	684 pb
Start Reverse (RS)	5'-CATATATGCTGGATGGCG-3'	
Middle Forward (FM)	5'-CGCCATCCAGCATATATG-3'	647 pb
Middle Reverse (RM)	5'-GATACACTGTGCTTGCAAC-3'	
End Forward (FE)	5'-GTTGCAAGCACAGTGTATC-3'	666 pb
End Reverse (RE)	5'-CCGGATAAAAGCGTACTG-3'	

La reacción de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera:

Reactivos	Cantidades (μl)
• Agua-DEPC	14.5
• Buffer 10x (Jena Bioscience)	1.0
• dNTPs (Applied Biosystems)	0.5
• Primer 5' (Sigma-Aldrich)	1.0
• Primer 3' (Sigma-Aldrich)	1.0
• Polimerasa Pfu (Jena Bioscience)	1.0
• DNA (muestra)	5.0 ng/μl

1. Se realizó una mezcla con: Agua, Buffer 10x, dNTPs, oligonucleótidos y polimerasa Pfu en un tubo cónico para PCR.
2. Una concentración de 5.0 ng/μl de DNA se agregó en el tubo con la mezcla y se agitó en un vórtex
3. Una vez mezclados todos los reactivos, se centrifugó el tubo por unos segundos.
4. Los tubos se colocaron en el termociclador con el siguiente programa.

Termociclador:

- 95° 2 minutos
- 95° 20 segundos
- 59° 30 segundos 30 ciclos
- 68° 90 minutos
- 68° 2 minutos

- 4° ∞

Para probar si los oligonucleótidos funcionaban como iniciadores, fueron probados amplificando el DNA obtenido de la vacuna OKAVAX (SANOFI). Los oligonucleótidos se utilizaron en diferentes combinaciones para obtener productos de PCR de distintos tamaños (aproximadamente 600, 1,200 y 2,000 pb). Una vez que se obtuvieron los productos de PCR, se preparó un gel de agarosa (Sigma-Aldrich) al 0.8% para realizar la electroforesis de los productos amplificados. El gel se preparó agregando 0.8g de agarosa en 99 ml de buffer TAE 1X (Bio-Rad Laboratories) en un matraz Erlenmeyer, el matraz se calentó en un horno de microondas hasta que la agarosa se disolvió. Se añadieron 3 µl de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Se vertió la solución en una cámara horizontal, se colocó el peine adecuado para formar los pozos y se dejó enfriar para que se formara el gel. Una vez formado el gel, se retiró el peine y se colocó el gel en la cubeta de electroforesis. Se añadió buffer TAE 1X a la cámara de electroforesis de modo que el gel quedara cubierto. La muestra se preparó agregando 2 µl de buffer de carga (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25% glicerol, 5 mM EDTA, 0.2% azul bromophenol y 0.2% cianol xileno FF) (Bio-Rad Laboratories) y 3 µl del producto de PCR. En el primer pozo se colocó un marcador de peso molecular (1Kb plus DNA ladder, Invitrogen), seguido de un control positivo (secuencia clonada de gE) y un control negativo (DNA del paciente EMB-23), en los demás pozos se colocaron las muestras. Se aplicó una corriente de 100 volts durante 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el gel se retiró de la cámara y se colocó en un foto-documentador para observar la presencia de las bandas.

Clonación de la glicoproteína E de VZV.

Con el propósito de contar con un control positivo para los ensayos de amplificación, el gen de la glicoproteína E fue clonado utilizando el vector de clonación pJet (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) siguiendo el protocolo de clonación de extremos pegajosos, en el cual, el primer paso consistió en hacer romos los extremos del producto de PCR.

La reacción se realizó en hielo, en un tubo cónico de 600 µl se agregaron 10 µl de buffer de reacción 2x, 1 µl de producto de PCR sin purificar, agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen de 17 µl y 1 µl de la enzima DNA Blunting. La mezcla se agitó y centrifugó brevemente por 5 segundos, se incubó a 70° C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. El segundo paso correspondió a la reacción de ligación; esta reacción se realizó en hielo. A la

mezcla que se realizó anteriormente, se le agregaron 1 μ l del vector de clonación pJET1.2/blunt y 1 μ l de la enzima ligasa DNA T4, para tener un volumen final de 20 μ l. La mezcla se agitó y centrifugó brevemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos; esta mezcla de ligación se utilizó para llevar a cabo la transformación de bacterias competentes.

Se utilizaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α , las cuales se descongelaron en hielo, durante todo el procedimiento se utilizó mechero. Una vez descongeladas, se agregó 1 μ l de la mezcla anterior y se incubó 30 minutos en hielo. Mientras transcurría el tiempo, se preparó medio SOB en tubos cónicos de 1.5 ml. Pasado el tiempo, a las bacterias se les aplicó un choque térmico a 42° C durante 90 segundos y se incubaron durante 2 minutos sobre hielo. Después de la incubación, las bacterias se agregaron en los tubos cónicos de 1.5 ml previamente preparados con medio SOB y se mantuvieron en agitación durante 1 hora a 37° C. Posteriormente, se sembraron 100 μ l del medio SOB con bacterias en cajas con medio LB Agar para obtener colonias individuales y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Una vez que se formaron las colonias, se sembraron individualmente en tubos de cristal con 10 ml de medio SOB y 10 μ l de ampicilina durante un día a 37° C. Al día siguiente se realizó la extracción de DNA de las bacterias sembradas en los tubos de cristal.

La extracción de DNA se realizó con buffer STET (Fisher Scientific). En tubos de 1.5 ml se agregó el medio SOB con bacterias competentes obtenidas de los tubos de cristal, se centrifugaron a 12,000 RPM durante un minuto a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se agregó más medio SOB, esto se realizó hasta obtener un botón el cual se resuspendió en 100 μ l buffer SOB. Se agregó lisozima (7 μ l por cada 1.5 ml de medio SOB) y se hirvió el tubo durante 2 minutos.

Los tubos se centrifugaron a 12,000 RPM durante 5 minutos, se extrajo el material mucoso con un palillo estéril y se agregó isopropanol (100 μ l por cada 1.5 ml de medio SOB). Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 30 μ l de agua estéril.

Para confirmar que se había clonado exitosamente la glicoproteína E, se realizó un ensayo de PCR con los oligonucleótidos específicos gE. Además, se realizaron ensayos de restricción usando la enzima EcoR1 (New England BioLabs) que corta en la secuencia de la glicoproteína

y Xba1(New England BioLabs) que corta en la secuencia del vector pJet. La reacción de restricción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Reactivos	Volúmenes (μ l)
• Agua	12.5
• Plásmido	3.0
• Buffer NE 4 (New England BioLabs)	2.0
• Enzima EcoR1	0.5
• Enzima Xba1	1.0
• BSA 10x (New England BioLabs)	1.0

Purificación de los productos de PCR.

Para poder secuenciar los productos de PCR amplificados del DNA obtenido de LCR de pacientes con EM y de líquido vesicular de pacientes con zóster, estos productos fueron purificados por columna utilizando el kit de purificación de PCR de Jena Bioscience (# de catálogo PP-202S). Para productos con un tamaño entre 200 pb y 5kpb se siguió el siguiente protocolo: se agregaron 5 volúmenes de buffer de unión a 1 volumen de muestra. Por otro lado, las columnas fueron activadas agregando 100 μ l de buffer de activación en el centro de cada columna y centrifugando a 10,000 g por 30 segundos. Una vez activada, se agregó la muestra en la columna y se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos. El sobrenadante se descartó y en la columna se agregaron 700 μ l de buffer de lavado y se centrifugó, para remover los residuos del buffer de lavado, se centrifugó la columna durante dos minutos a 10,000 g. Por último, la columna se colocó dentro de un tubo cónico estéril de 1.5 ml y se agregaron 30 μ l de agua bi-destilada. Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por un 1 minuto a 10,000 g para recuperar el DNA en el tubo de 1.5 ml.

Las muestras fueron analizadas en Nanodrop 2000 para conocer su concentración y pureza.

Identificación de mutaciones en la glicoproteína E.

Los productos amplificados por PCR cuyo tamaño fue verificado en los geles de agarosa, fueron purificados y se mandaron a secuenciar.

Una vez que se tenga la secuencia, se comparará con las secuencias reportadas en las bases de datos, esto con el propósito de identificar posibles mutaciones en la glicoproteína.

Resultados.

La glicoproteína E de VZV amplificó con los distintos oligonucleótidos diseñados.

Los oligonucleótidos iniciadores de las reacciones de PCR se diseñaron utilizando la secuencia de la gE VZV de la cepa Oka, y probados con el DNA obtenido de la vacuna OKAVAX (SANOFI) mediante ensayos de PCR. Los iniciadores fueron utilizados en distintas combinaciones para obtener productos de tamaños aproximados a 600, 1,200 y 2000 pb. Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 0.8 % (**figura 11**) y las bandas observadas correspondieron a los pesos esperados, lo que demuestra que los oligonucleótidos fueron bien diseñados. Estos oligos iniciadores se utilizaron para la amplificación y la secuenciación de los virus obtenidos de las muestras de pacientes con EM y zóster.

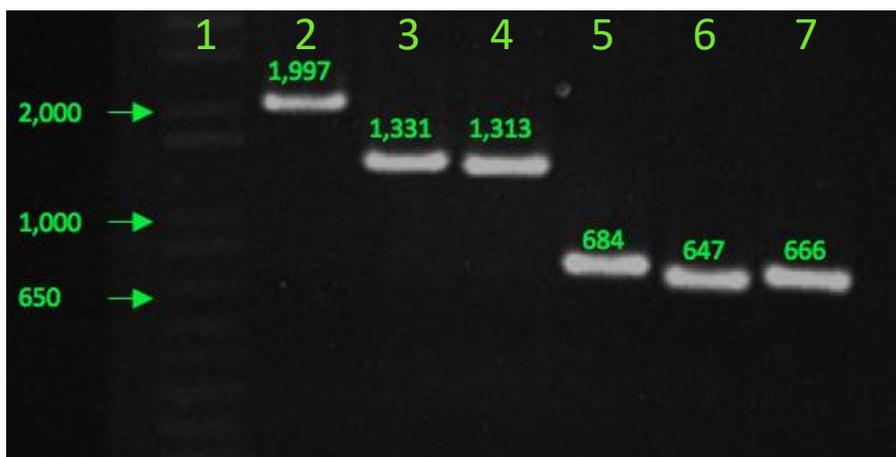


Figura 11. Amplificación de glicoproteína E de VZV obtenida de OKAVAX. El DNA fue analizado en gel de agarosa al 0.8% y teñido con EtBr donde se observan los productos de PCR en los pesos esperado, amplificados a partir del DNA obtenido de la vacuna OKAVAX. En el carril (1) se observa el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen). La combinación de iniciadores utilizada fue la siguiente: (2) FS-RE, (3) FS-RM, (4) FM-RE, (5) FS-RS, (6) FM-RM y (7) FE-RE. La migración de los marcadores de 2,000, 1,000 y 650 pb se señalan con flechas.

Clonación de la glicoproteína E.

Para garantizar que los ensayos de PCR con el DNA obtenido de pacientes con EM y con zóster se estaban realizando de forma correcta, era necesario contar con un control positivo, por lo que el gen de la glicoproteína E de VZV se clonó utilizando el vector pJet y se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α . Para demostrar que la secuencia de gE había sido clonada exitosamente, se realizó un ensayo de PCR similar al realizado con el DNA obtenido de la vacuna OKAVAX (**figura 12**). Además, se realizó un ensayo de

restricción con las enzimas EcoR1 y Xba1, que cortan en la secuencia de gE y en la secuencia de pJet respectivamente, obteniendo dos fragmentos del plásmido, uno con un tamaño de 727 pb y otro con un peso de 4,226 pb y se realizó un gel de agarosa al 0.8% (**figura 13**). Por último, se amplificó la secuencia completa de la glicoproteína E utilizando los oligonucleótidos FS y RE, se purificó el producto y se envió a secuenciar. Una vez obtenida la secuencia, ésta se alineó con la secuencia de la cepa de Oka obtenida del GenBank con la clave AB097933.1 (**figura 14**).

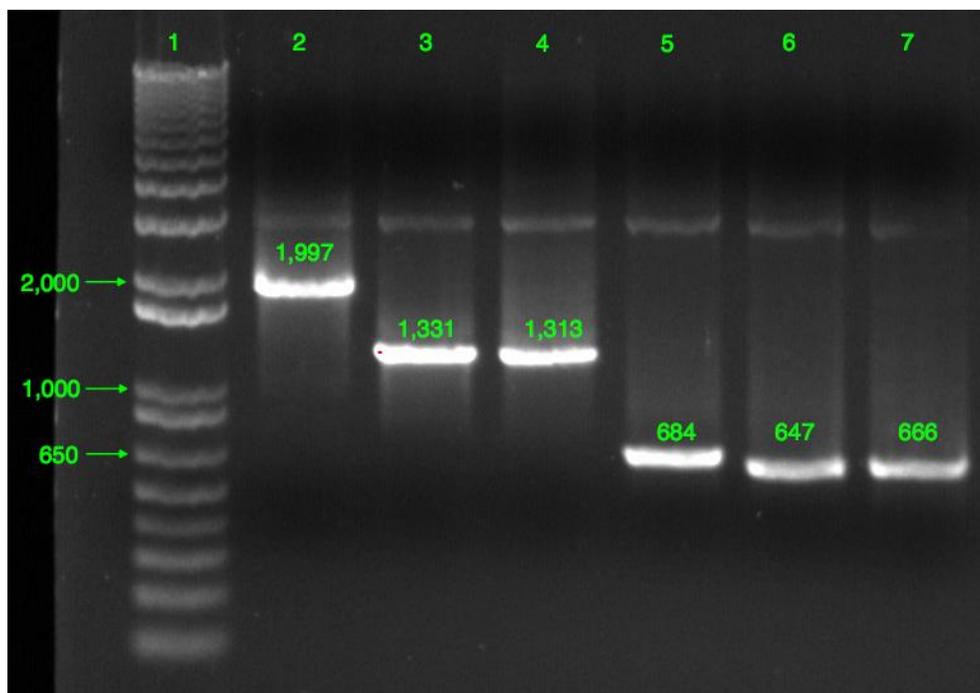


Figura 12. Amplificación de glicoproteína E obtenida por clonación. Se realizó la clonación del gen de gE de VZV en el vector pJet y las bacterias *E. coli* DH5 α . En DNA se analizó en un gel de agarosa al 0.8 % teñido con EtBr. Las bandas que se observan presentan el mismo peso que las bandas amplificadas con el DNA obtenido de la vacuna. En el carril (1) se observa el marcador de peso molecular 1 Kb plus. La combinación de iniciadores utilizada fue la siguiente: (2) FS-RE, (3) FS-RM, (4) FM-RE, (5) FS-RS, (6) FM-RM y (7) FE-RE. La migración de los marcadores de 2,000, 1,000 y 650 pb se señalan con flechas.

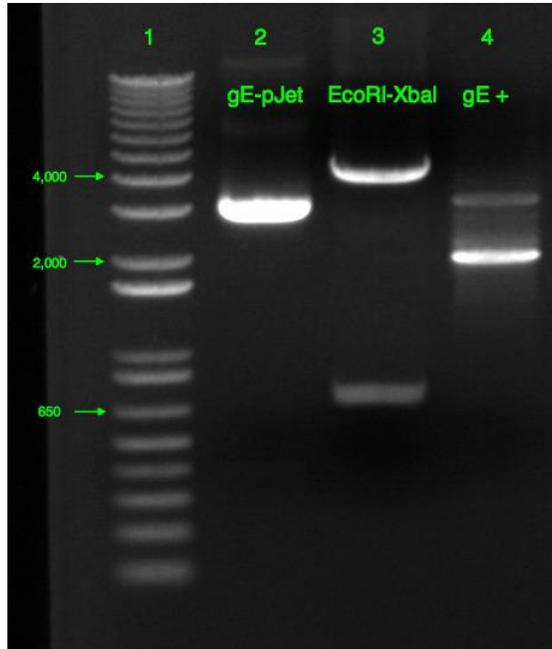


Figura 13. Restricción de glicoproteína E obtenida por clonación. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con EtBr. (1) Marcador de peso molecular 1 Kb plus, (2) Plásmido gE-pJet sin cortar, (3) Ensayo de restricción del plásmido gE-pJet utilizándose las enzimas EcoRI y XbaI obteniendo fragmentos de 4,226 y 727 pb y (4) Amplificación de gE. Si bien el peso del plásmido sin cortar es de 4,953, debido a que no se encuentra en forma lineal, se desplaza con mayor facilidad a través del gel de agarosa. La migración de los marcadores de 4,000, 2,000 y 650 pb se señalan con flechas.



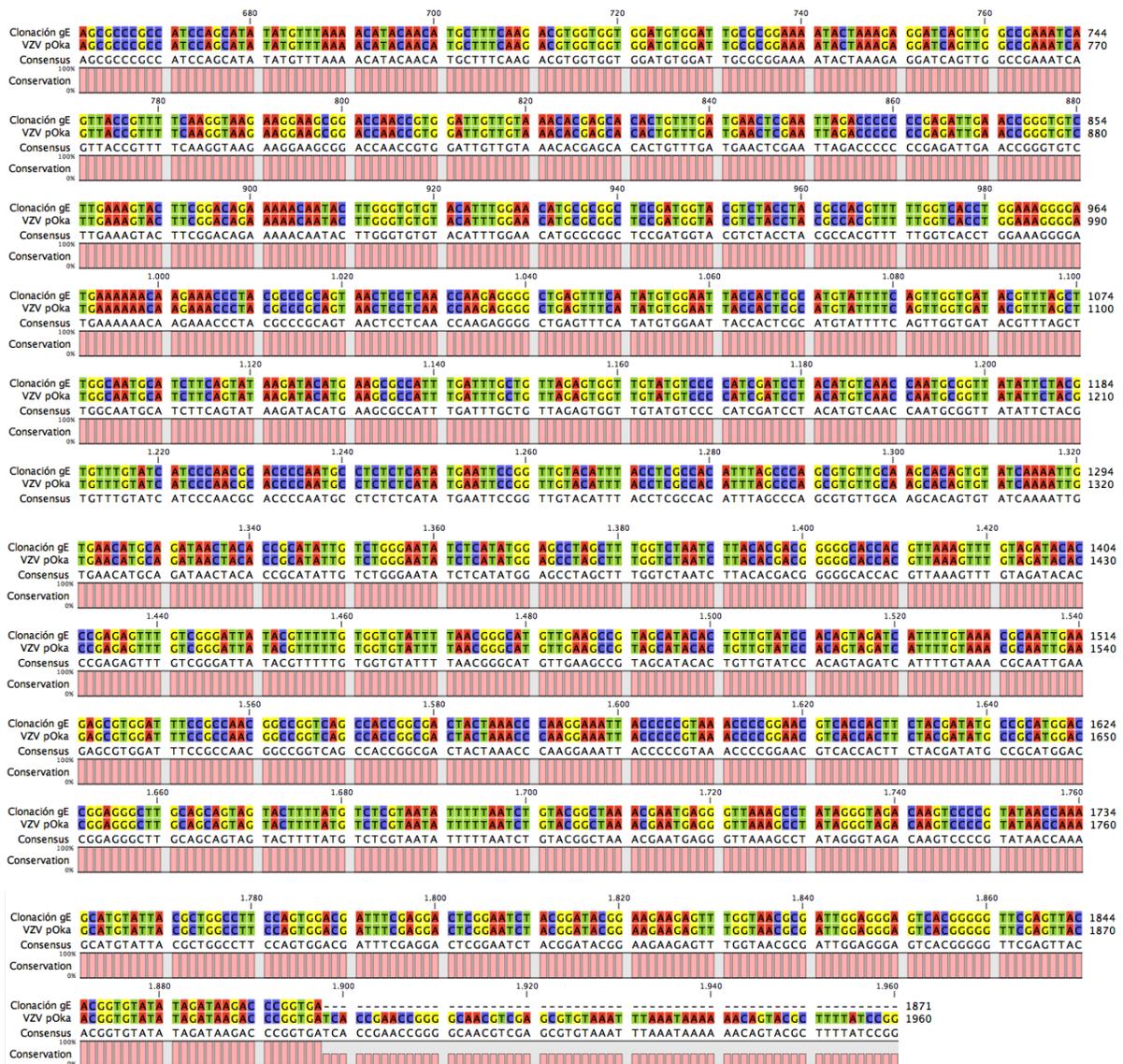


Figura 14. Secuenciación y alineamiento de la gE de VZV. Secuenciación y alineamiento del marco de lectura abierta de la gE clonada comparada con la secuencia de la cepa Oka.

Amplificación y purificación de la secuencia de gE obtenida del DNA aislado del LCR de paciente con EM y de líquido vesicular de zóster.

Una vez que se comprobó que los oligonucleótidos generaban productos con los pesos esperados y que la secuencia que se había clonado correspondía a la secuencia de VZV, se realizó la extracción de DNA de LCR de pacientes con EM y de líquido vesicular de pacientes con zóster. Las muestras de pacientes con zóster se utilizaron para comparar las secuencias que se obtuvieron de los pacientes con EM, con el propósito de buscar posibles diferencias entre las cepas de cada paciente. Las muestras de las tres colecciones fueron amplificadas

utilizando los oligonucleótidos de extremos (FS y RE) con el propósito de obtener la secuencia de gE completa. Una vez realizada la amplificación por PCR, los productos se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% (**figura 15**). Las muestras que amplificaron la gE completa fueron purificadas por columna para ser secuenciadas.

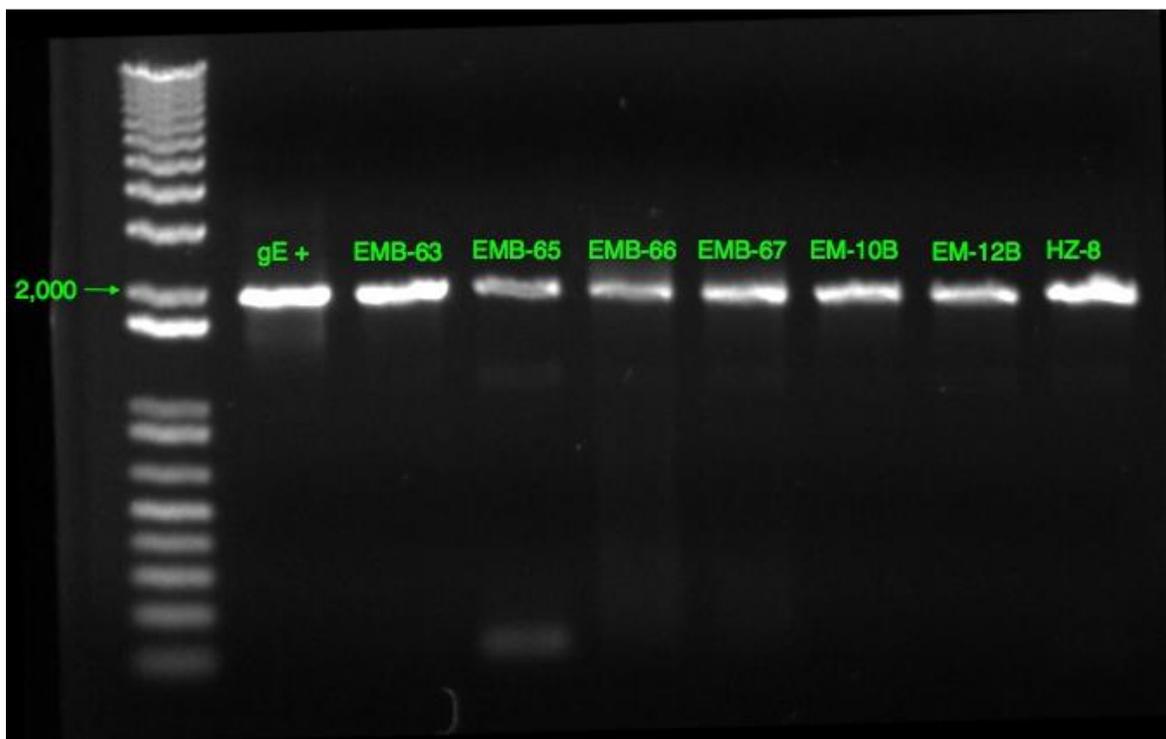


Figura 15. Amplificación de la secuencia de gE del VZV. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con EtBr donde se observan los fragmentos amplificados de la secuencia completa de la glicoproteína E con tamaño de 1,997 pb. De izquierda a derecha se observan el marcados de peso molecular 1 Kb plus, el control positivo (clonación), las colecciones EMB y EM (pacientes con EM en fase de brote) y la colección HZ (pacientes con zóster). La migración del marcador de 2,000 pb se señala con una flecha.

En la **tabla 1** se observan las colecciones de muestras utilizadas para este trabajo, las colecciones EMB y EM corresponden a pacientes con EM en fase de brote y la colección HZ corresponde a pacientes con zóster.

EMB	Amp	EMB	Amp	EM	Amp	HZ	Amp
EMB-23	-	EMB-66	+	EM-10B	+	HZ-1/12	+
EMB-24	-	EMB-67	+	EM-12B	+	HZ-4	+
EMB-37	-	EMB-68	+	EM-13B	-	HZ-5	+
EMB-43	-	EMB-69	-	EM-15B	-	HZ-8	+
EMB-62	-	EMB-76	-	EM-17B	+	HZ-9	+
EMB-63	+	EMB-92	-	EM-20B	-	HZ-10	+
EMB-64	+	EMB-93	-	EM-26B	-		
EMB-65	+			EM-27B	-		

Tabla 1. Colecciones utilizadas para amplificación de gE. Se utilizaron 23 muestras de las colecciones de pacientes con EM, de las cuales 9 muestras (39 %) amplificaron para la secuencia de gE (Amp +). Para la colección de pacientes con zóster, se obtuvo el producto de amplificación de las 6 muestras utilizadas.

Secuenciación y alineamiento de los productos de PCR purificados amplificados de las muestras de pacientes con EM y pacientes zóster.

Las muestras que amplificaron la secuencia de la gE fueron purificadas mediante un kit de purificación por columna y enviadas a la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para su secuenciación. Solo de las muestras EM-10B, EM-12B, EMB-63, EMB-65, EMB-67, HZ-1 y HZ-8 fue posible obtener la secuencia que corresponde al primer par de oligonucleótidos (FS-RS). Las secuencias fueron editadas y alineadas con el programa CLC Main Workbench 7, estas secuencias se compararon con secuencias de referencia obtenidas del GenBank.

Tanto en las colecciones de pacientes con EM (EMB y EM) como en la colección de pacientes con herpes zóster (HZ), no se observaron mutaciones, ya sea mutaciones no descritas o mutaciones ya reportadas por Santos *et al.*, 1998, Tipples *et al.*, 2002, Wirtgart *et al.*, 2006 y Natoli *et al.*, 2006.

La única diferencia que pudo observarse fue en el tipo de base nitrogenada en la posición 118; en las muestras de los pacientes con EM de las dos colecciones se encuentra una timina (T) igual que en la cepa pOka que corresponde al clado 2 del VZV, mientras que en las muestras de la colección HZ en la misma posición se encuentra una citosina (C) igual que la cepa Duma que está catalogada dentro del clado 1 (**Figura 16**).

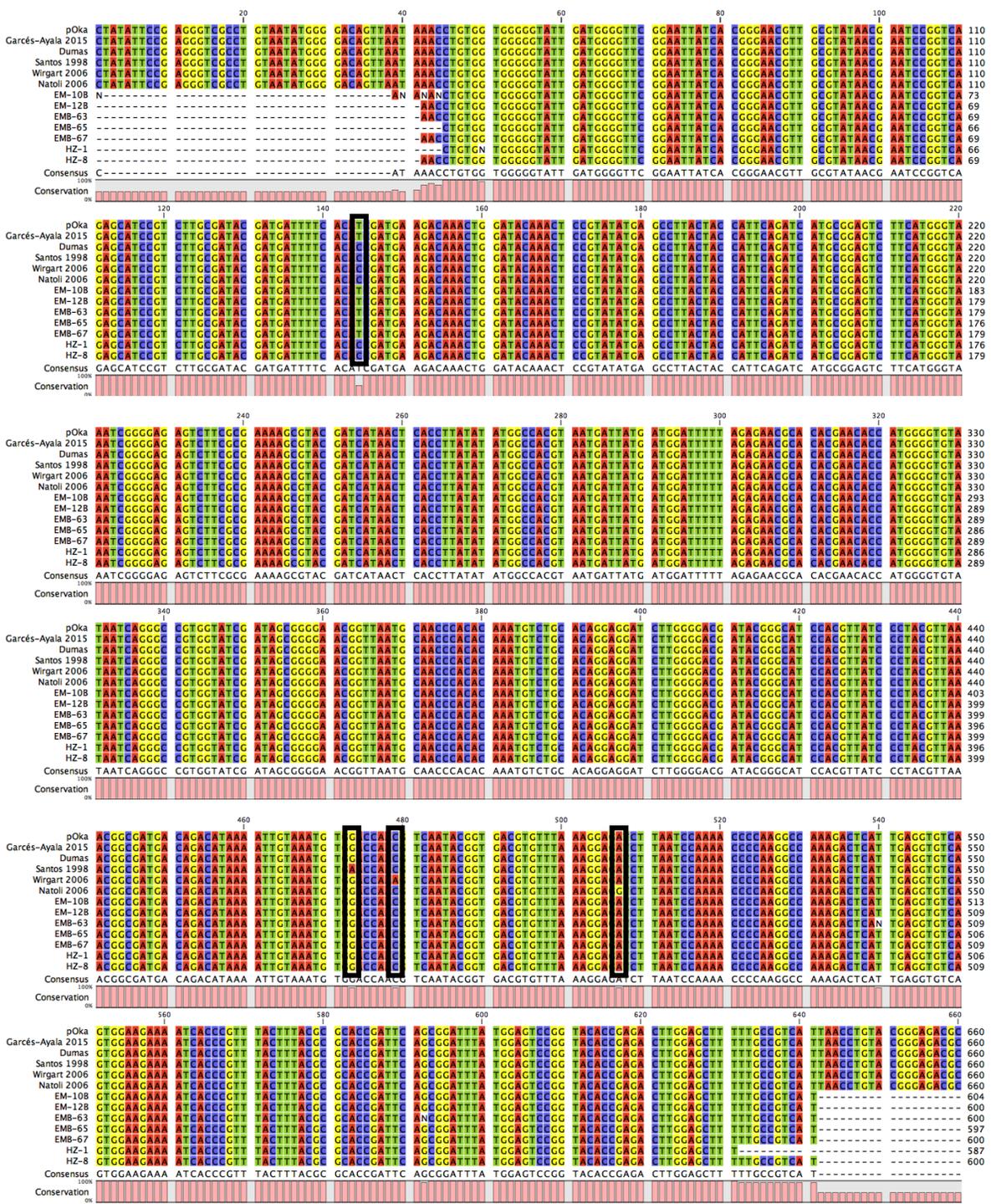


Figura 16. Secuenciación y alineamiento de muestras de EM y zóster. Los productos de PCR que amplificaron la gE fueron purificados y secuenciados. Estas secuencias se compararon (alineamiento) con cepas de referencia. En la posición 118 se observa un cambio de nucleótidos, en los pacientes con EM se encuentra una timina, mientras que en los pacientes con zóster una citosina, estos cambios fueron señalados con un recuadro, al igual que las mutaciones reportadas por Santos, Wirgart y Natoli.

Discusión.

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica degenerativa del sistema nervioso central que afecta principalmente a adultos-jóvenes. Si bien era considerada una enfermedad poco común en México y más común en países con una población mayormente caucásica como Estados Unidos y Canadá, en las últimas décadas ha habido un aumento en el número de pacientes mexicanos que son diagnosticados con esta enfermedad [65]. La EM es una enfermedad muy compleja; hay una gran cantidad de factores tanto genéticos como ambientales involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Entre estos factores se encuentran la presencia de alelos específicos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA), deficiencia de vitamina D, poca o nula exposición al sol en incluso, componentes propios del sistema inmune como linfocitos T y B autorreactivos [17, 66].

El ambiente puede ser un factor determinante en la prevalencia de la EM, ya que individuos que residen en zonas de alta prevalencia, al migrar a zonas de baja prevalencia antes de la adolescencia, reducen el riesgo de desarrollar la EM; lo mismo ocurre con individuos que migran de zonas de baja a zonas de alta prevalencia [30]. Además de los factores previamente mencionados, hay estudios que sugieren una posible participación de agentes patógenos como virus en el desarrollo de la EM, un ejemplo de esta posible participación es la aparición de esta enfermedad en las Islas Feroe en forma de epidemia, con tasas de incidencia de 10 casos por cada 100.000 habitantes en 1945 y 1946. La aparición de estos casos coincidió con la ocupación de las islas durante la Segunda Guerra Mundial por las tropas británicas que se cree transmitieron un agente patógeno a la población de la isla [35, 67]. Uno de los patógenos más estudiados relacionados al desarrollo de esta enfermedad es el virus de Epstein Barr ya que en muchos pacientes se ha detectado la presencia de este virus, aunque no se sabe cómo es que está relacionado este agente patógeno con la EM [34, 68, 69].

Si bien hay diversos estudios que demuestran la presencia de EBV en pacientes con EM, en los pacientes mexicanos este virus no se ha detectado. En su lugar se ha observado la presencia del virus de varicela zóster, un virus perteneciente a la misma familia que EBV. Este virus ha sido detectado en las fases de brote de EM en los pacientes mexicanos [26, 27, 36-38, 64, 70-72]. En las colecciones del INNN de DNA aislado del LCR de pacientes con EM y de DNA aislado de líquido vesicular de pacientes con zóster que fueron utilizadas para

este proyecto, fue posible amplificar la gE de VZV en 39 % de las muestras de EM y en 100 % de los pacientes con zóster.

El virus de varicela zóster ha acompañado al ser humano durante millones de años, por lo que es muy común que la gran mayoría de la población humana haya sido al menos una vez infectada con el virus, sin embargo, una infección con VZV no presenta un riesgo para la salud de los hospederos ya que se sabe que este virus permanecerá en latencia después de menos de 20 ciclos de replicación [73].

Se han descrito más de 10 cepas distintas de VZV clasificadas en 5 clados, que se diferencian entre sí por medio de mutaciones puntuales (SNPs). Dentro de estas cepas, solo 5 han demostrado un fenotipo distinto a las restantes, que se caracteriza por una mayor velocidad de dispersión célula a célula y una mayor formación de sincitios en ensayos *in vitro* [57-61]. Los 5 casos reportados en la literatura tienen en común que pertenecen al mismo clado (clado 1) y que al realizar la secuenciación completa de sus genomas, todos presentaron una mutación en la secuencia de la glicoproteína E. Esta glicoproteína cumple distintas funciones en el ciclo viral ya que está involucrada en la entrada, replicación y salida del virus de la célula, por lo que una mutación en su secuencia podría generar un cambio en el fenotipo del virus.

Es por esto que el objetivo de este proyecto se enfocó en la búsqueda de mutaciones en la secuencia de la glicoproteína E de VZV aislada del LCR de los pacientes con EM. Una mutación en la secuencia que genere un fenotipo más agresivo podría explicar o justificar la presencia del virus en las fases de brote y su posible participación en su inicio.

En las muestras de LCR de pacientes mexicanos con EM no se detectó ninguna mutación nueva o previamente reportada, de igual manera en las muestras de pacientes con herpes zóster. La única diferencia fue la presencia de una timina en la posición 188, similar a la cepa pOka (clado 2) de la secuencia de gE en los pacientes con EM y una citosina, similar a la cepa Dumas (clado 1) en los pacientes con zóster, lo que podría indicar que no es una mutación la que provoque la aparición de brotes en los pacientes con EM, sino una infección con una cepa distinta a la que se encuentra comúnmente en la población en general [44].

Conclusiones.

- Se realizó la extracción de DNA a partir de líquido cefalorraquídeo de pacientes en las primeras fases de brote y a partir de líquido vesicular de pacientes con herpes zóster teniendo un total de 29 muestras.
- Se utilizaron 23 muestras de las colecciones de pacientes con EM, de las cuales 9 muestras (39 %) amplificaron para la secuencia de gE. Para la colección de pacientes con zóster, se obtuvo el producto de amplificación de las 6 muestras utilizadas.
- Se realizó la construcción del gen que codifica para la glicoproteína E del VZV en el vector con el propósito de utilizarla como control positivos de los experimentos realizados.
- Se obtuvo la secuencia de la región amplificada con los oligonucleótidos Fstart y Rstart en pacientes con EM y en pacientes zóster. Estas secuencias se compararon con secuencias de referencia y no se encontró alguna mutación nueva o previamente descrita.
- Se observó una diferencia en la posición 188 de la secuencia de gE, siendo una timina en los pacientes como EM y una citosina en los pacientes con zóster.

Perspectivas.

1. Aumentar el número de pacientes.
2. Secuenciar completamente la glicoproteína E en pacientes con EM y zóster.
3. Realizar la predicción de la estructura tridimensional de las secuencias obtenidas.
4. Secuenciar distintos marcos de lectura del VZV para definir los clados presentes en los pacientes con EM.

Bibliografía.

1. Gourraud, P.A., et al., *The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review*. Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 87-103.
2. Calabrese, M., et al., *Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis*. Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(3): p. 147-58.
3. Akcam, H.T., et al., *Multiple sclerosis and optic nerve: an analysis of retinal nerve fiber layer thickness and color Doppler imaging parameters*. Eye (Lond), 2014. **28**(10): p. 1206-11.
4. Hernandez-Pedro, N.Y., et al., *Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 413465.
5. Ontaneda, D. and A.D. Rae-Grant, *Management of acute exacerbations in multiple sclerosis*. Ann Indian Acad Neurol, 2009. **12**(4): p. 264-72.
6. Matias-Guiu, J., et al., *Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis*. Neurologia, 2016.
7. Gaesser, J.M. and S.L. Fyffe-Maricich, *Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS*. Exp Neurol, 2016.
8. Organization, W.H. *Atlas: Multiple Sclerosis Resources in the World 2008*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2008.
9. Milo, R. and A. Miller, *Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(4-5): p. 518-24.
10. Kremenchutzky, M., et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: Observations on the progressive phase of the disease*. Brain, 2006. **129**(3): p. 584-594.
11. Rolak, L.A., *Multiple sclerosis: it's not the disease you thought it was*. Clin Med Res, 2003. **1**(1).
12. Sriram, S., *Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination*. J Neuroimmunol, 2011. **239**(1-2): p. 13-20.
13. Virtanen, J.O. and S. Jacobson, *Viruses and multiple sclerosis*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012. **11**(5): p. 528-44.
14. Watson, C.T., et al., *Revisiting the T-cell receptor alpha/delta locus and possible associations with multiple sclerosis*. Genes Immun, 2011. **12**(2): p. 59-66.
15. Iwakura, Y. and H. Ishigame, *The IL-23/IL-17 axis in inflammation*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1218-22.
16. Reza Dorosty-Motlagh, A., et al., *The Molecular Mechanisms of Vitamin A Deficiency in Multiple Sclerosis*. Journal of Molecular Neuroscience, 2016: p. 1-9.
17. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
18. Probstel, A.K., N.S. Sanderson, and T. Derfuss, *B Cells and Autoantibodies in Multiple Sclerosis*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(7): p. 16576-92.
19. Beltran, E., et al., *Intrathecal somatic hypermutation of IgM in multiple sclerosis and neuroinflammation*. Brain, 2014. **137**(Pt 10): p. 2703-14.
20. Bar-Or, A., et al., *Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?* Ann Neurol, 2010. **67**(4): p. 452-61.

21. Riedhammer, C. and R. Weissert, *Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 322.
22. Lassmann, H., *Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011. **37**(7): p. 698-710.
23. Haider, L., *Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 725370.
24. Leikfoss, I.S., et al., *Multiple Sclerosis Risk Allele in CLEC16A Acts as an Expression Quantitative Trait Locus for CLEC16A and SOCS1 in CD4+ T Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132957.
25. Handunnethi, L., S.V. Ramagopalan, and G.C. Ebers, *Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15*. Neurology, 2010. **74**(23): p. 1905-10.
26. Ordonez, G., et al., *Genomewide admixture study in Mexican Mestizos with multiple sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg, 2015. **130**: p. 55-60.
27. Cordova, J., S. Vargas, and J. Sotelo, *Western and Asian features of multiple sclerosis in Mexican Mestizos*. Clin Neurol Neurosurg, 2007. **109**(2): p. 146-51.
28. Flores, J., et al., *Absence of Multiple Sclerosis and Demyelinating Diseases among Lacandonians, a Pure Amerindian Ethnic Group in Mexico*. Mult Scler Int, 2012. **2012**: p. 292631.
29. Bager, P., et al., *Childhood infections and risk of multiple sclerosis*. Brain, 2004. **127**(Pt 11): p. 2491-7.
30. Cabre, P., et al., *Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies*. Brain, 2005. **128**(Pt 12): p. 2899-910.
31. Iridoy Zulet, M., et al., *Epigenetic changes in neurology: DNA methylation in multiple sclerosis*. Neurologia, 2015.
32. Loken-Amsrud, K.I., et al., *Impact of the environment on multiple sclerosis*. Tidsskr Nor Laegeforen, 2015. **135**(9): p. 856-60.
33. Munger, K.L., et al., *Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis*. Neurology, 2004. **62**(1): p. 60-5.
34. Castellazzi, M., et al., *Epstein-Barr virus-specific intrathecal oligoclonal IgG production in relapsing-remitting multiple sclerosis is limited to a subset of patients and is composed of low-affinity antibodies*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 188.
35. Owens, G.P., et al., *Viruses and multiple sclerosis*. Neuroscientist, 2011. **17**(6): p. 659-76.
36. Tarrats, R., et al., *Varicella, ephemeral breastfeeding and eczema as risk factors for multiple sclerosis in Mexicans*. Acta Neurol Scand, 2002. **105**(2): p. 88-94.
37. Ordonez, G., et al., *Brief presence of varicella-zoster viral DNA in mononuclear cells during relapses of multiple sclerosis*. Arch Neurol, 2004. **61**(4): p. 529-32.
38. Sotelo, J., et al., *The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg, 2014. **119**: p. 44-8.
39. Davison, A.J., *Evolution of the herpesviruses*. Vet Microbiol, 2002. **86**(1-2): p. 69-88.
40. McGeoch, D.J., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Topics in herpesvirus genomics and evolution*. Virus Res, 2006. **117**(1): p. 90-104.

41. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: an update*. *Virus Res*, 2009. **143**(2): p. 222-34.
42. Modrow, S., et al., *Viruses with a Double-Stranded DNA Genome*. 2013. 625-873.
43. Breuer, J., et al., *A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24-25 July 2008*. *J Gen Virol*, 2010. **91**(Pt 4): p. 821-8.
44. Schmidt-Chanasit, J. and A. Sauerbrei, *Evolution and world-wide distribution of varicella-zoster virus clades*. *Infect Genet Evol*, 2011. **11**(1): p. 1-10.
45. Chow, V.T., G.A. Tipples, and C. Grose, *Bioinformatics of varicella-zoster virus: single nucleotide polymorphisms define clades and attenuated vaccine genotypes*. *Infect Genet Evol*, 2013. **18**: p. 351-6.
46. Gross, G. and H.W. Doerr, *Molecular Biology of Varicella-Zoster Virus*. 2006. **26**: p. 1-8.
47. Arvin, A.M., *Varicella-zoster virus*. *Clin Microbiol Rev*, 1996. **9**(3): p. 361-81.
48. Khalil, M.I., et al., *Regulation of the varicella-zoster virus ORF3 promoter by cellular and viral factors*. *Virology*, 2013. **440**(2): p. 171-81.
49. Garces-Ayala, F., et al., *Full-Genome Sequence of a Novel Varicella-Zoster Virus Clade Isolated in Mexico*. *Genome Announc*, 2015. **3**(4).
50. Pasioka, T.J., et al., *Regulation of Varicella-Zoster Virus-Induced Cell-to-Cell Fusion by the Endocytosis-Competent Glycoproteins gH and gE*. *Journal of Virology*, 2004. **78**(6): p. 2884-2896.
51. Suenaga, T., et al., *Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(2): p. 866-71.
52. Suenaga, T., et al., *Sialic Acids on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(32): p. 19833-43.
53. Berarducci, B., et al., *Functions of the unique N-terminal region of glycoprotein E in the pathogenesis of varicella-zoster virus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 282-7.
54. Li, Q., M.A. Ali, and J.I. Cohen, *Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread*. *Cell*, 2006. **127**(2): p. 305-16.
55. Berarducci, B., et al., *Cellular and viral factors regulate the varicella-zoster virus gE promoter during viral replication*. *J Virol*, 2007. **81**(19): p. 10258-67.
56. Moffat, J., et al., *Functions of the C-terminal domain of varicella-zoster virus glycoprotein E in viral replication in vitro and skin and T-cell tropism in vivo*. *J Virol*, 2004. **78**(22): p. 12406-15.
57. Santos, R.A., et al., *Varicella-zoster virus gE escape mutant VZV-MSP exhibits an accelerated cell-to-cell spread phenotype in both infected cell cultures and SCID-hu mice*. *Virology*, 2000. **275**(2): p. 306-17.
58. Santos, R.A., et al., *Antigenic variation of varicella zoster virus Fc receptor gE: loss of a major B cell epitope in the ectodomain*. *Virology*, 1998. **249**(1): p. 21-31.
59. Tipples, G.A., et al., *New variant of varicella-zoster virus*. *Emerg Infect Dis*, 2002. **8**(12): p. 1504-5.

60. Wirgart, B.Z., et al., *A novel varicella-zoster virus gE mutation discovered in two Swedish isolates*. J Clin Virol, 2006. **37**(2): p. 134-6.
61. Natoli, S., et al., *A novel mutation of varicella-zoster virus associated to fatal hepatitis*. J Clin Virol, 2006. **37**(1): p. 72-4.
62. Tyler, S.D., et al., *Genomic cartography of varicella-zoster virus: a complete genome-based analysis of strain variability with implications for attenuation and phenotypic differences*. Virology, 2007. **359**(2): p. 447-58.
63. Alvarez-Lafuente, R., et al., *Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients*. Mult Scler, 2008. **14**(5): p. 595-601.
64. Sotelo, J. and T. Corona, *Varicella zoster virus and relapsing remitting multiple sclerosis*. Mult Scler Int, 2011. **2011**: p. 214763.
65. Gonzalez, O. and J. Sotelo, *Is the frequency of multiple sclerosis increasing in Mexico?* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1995. **59**(5): p. 528-30.
66. Yaldizli, O., et al., *HLA-DRB*1501 associations with magnetic resonance imaging measures of grey matter pathology in multiple sclerosis*. Mult Scler Relat Disord, 2016. **7**: p. 47-52.
67. Kurtzke, J.F. and A. Heltberg, *Multiple sclerosis in the Faroe Islands: an epitome*. J Clin Epidemiol, 2001. **54**(1): p. 1-22.
68. Lossius, A., et al., *Epstein-Barr Virus in Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis—Association and Causation*. Viruses, 2012. **4**(12): p. 3701-3730.
69. Veroni, C., et al., *Immune and Epstein-Barr virus gene expression in cerebrospinal fluid and peripheral blood mononuclear cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 132.
70. Sotelo, J., *On the viral hypothesis of multiple sclerosis: participation of varicella-zoster virus*. J Neurol Sci, 2007. **262**(1-2): p. 113-6.
71. Sotelo, J., et al., *Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2008. **63**(3): p. 303-11.
72. Ordonez, G., et al., *Varicella zoster virus in progressive forms of multiple sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg, 2010. **112**(8): p. 653-7.
73. Wagenaar, T.R., et al., *The out of Africa model of varicella-zoster virus evolution: single nucleotide polymorphisms and private alleles distinguish Asian clades from European/North American clades*. Vaccine, 2003. **21**(11-12): p. 1072-81.