

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Esclerosis múltiple: análisis del repertorio de receptores de células T en la  
población mexicana”**

**TESIS**

Que presenta

**M. EN C. HUGO DAVID GONZÁLEZ CONCHILLOS**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Directora de la tesis:**

**Dra. Martha Espinosa Cantellano**

**Ciudad de México**

**Marzo, 2023**

Este trabajo se realizó en el laboratorio 1 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) bajo la dirección de la Dra. Martha Espinosa Cantellano, en colaboración con el laboratorio de neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, el laboratorio de medicina de precisión de la Fundación Japonesa para la Investigación del Cáncer y el Centro de Inteligencia de la Salud de la Universidad de Tokio.

Este trabajo se realizó con los siguientes financiamientos:

- Beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)
- FOSISS 2015-1-261698 (Conacyt)
- Estímulos a Investigaciones Médicas “Miguel Alemán Valdés” 2016
- Estímulos a Investigaciones Médicas “Miguel Alemán Valdés” 2017
- Fondo SEP-Cinvestav de Apoyo a la Investigación, Convocatoria 2018
- Beca mixta 2017 movilidad en el extranjero (No. 291212)
- Beca de movilidad 2018 en el extranjero (No. 291250)
- Beca para asistencias a congresos, estancias de investigación o cursos para estudiantes del centro 2020
- Beca de obtención de grado 2020
- Proyecto de Investigación Conjunta Internacional del Instituto de Ciencias Médicas de la Universidad de Tokio (IMSUT) 2020

## **Asesores**

### **Internos**

Dr. Adolfo Martínez Palomo

(Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav)

Dr. José Luis Rosales Encina

(Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav)

### **Interno-Cinvestav**

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

(Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav)

### **Externo**

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

(Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN)

**“Success is not final; failure is not fatal: it is the courage to continue that counts”**

Winston Churchill

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al Cinvestav, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado dentro de sus instalaciones donde viví momentos invaluable.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía que ha sido como un segundo hogar para mí.

A la Dra. Martha Espinosa Cantellano por aceptarme en su laboratorio durante mi maestría y permitirme continuar durante el doctorado. Por confiar en mí, por sus consejos y por apoyarme siempre.

A mis asesores internos y externos, Dr. Adolfo Martínez Palomo, Dr. José Luis Rosales Encina, Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Dr. Alfredo Hidalgo Miranda por su apoyo y por compartirme sus conocimientos y experiencia.

A la Dra. Graciela Ordoñez que nunca ha dejado a apoyarme y siempre busca la manera de ayudarme.

A la Dra. Lorena Gutiérrez por tener esa empatía que le permite ayudar a toda persona que la rodea.

A mis amigos de laboratorio y del Cinvestav en general Karla, Patricia, Dani, Liz, Ranfe, Judith, Anel, Adán, Adriana, Suilma, Dulce, Paulina y Ausencio por apoyarme y por los momentos inolvidables que vivimos juntos.

## **Dedicatorias**

A mi querida familia, que siempre han estado a mi lado para celebrar mis logros y para abrazarme durante los momentos más oscuros. A mis padres, María Lydia y José Luis y mi hermano Eduardo, que siempre me han hecho sentir amado, por la confianza que han depositado en mí y por siempre apoyarme. Todo logro que alcance en mi vida será gracias a ustedes.

A mi sobrina Elisa que me ha hecho ver la vida con más alegría.

A mis tíos, primos y sobrinos por todo su cariño y por siempre festejar nuestros logros.

A mis amigos de toda la vida Mayte, Damián, José y Beto por siempre estar a mi lado y hacer de esta vida algo increíble.

A Daniela por todo el amor y felicidad que has traído a mi vida y por desenterrar la mejor versión de mí. “Si tan sólo pudiera ser la mitad de lo que tú piensas de mí, podría hacer cualquier cosa, incluso aprender a amar”.

## Resumen

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) que inicia con la activación de linfocitos T, que dañan la mielina de los nervios en el SNC. Se activan mediante la interacción del receptor de célula T (TCR) con un complejo antígeno-HLA en la célula presentadora de antígeno. Se desconocen los factores involucrados en el desarrollo y activación de la EM; sin embargo, se ha reportado una posible correlación de infecciones previas con virus de la familia de los herpesvirus y la activación de la EM. **Hipótesis.** El repertorio de TCR de los pacientes con EM disminuye durante la fase de exacerbación comparado con la fase de remisión y con pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI). Los alelos de HLA-II de pacientes con EM presentan una mayor cantidad de péptidos propios y externos (herpesvirus). **Objetivos.** Analizar el repertorio de TCR mediante secuenciación de alto rendimiento en pacientes con EM en fase de brote y remisión. Realizar la predicción de unión de alelos de HLA y péptidos de SNC y herpesvirus. **Estrategia experimental.** Se generaron bibliotecas de cDNA a partir del RNA obtenido de las subpoblaciones de linfocitos T para secuenciar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR. Se analizó el repertorio de TCR de los pacientes con EM. Asimismo, se llevó a cabo la tipificación de alelos de HLA-II a partir de ADN de pacientes con EM y OENI. Se predijo la capacidad de unión de los alelos de HLA a péptidos de SNC y herpesvirus. **Resultados.** Se secuenciaron las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los TCR de diez pacientes con EM, en ambas fases de la enfermedad, seis pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI) y diez individuos sanos, obteniendo un total de 28,508,914 lecturas. La diversidad del repertorio fue menor durante la fase de brote, al igual que las clonas totales, únicas, de clonas que representan el 50% del repertorio total y del número de clonas compartidas al menos entre dos pacientes. Estos resultados sugieren la concentración de la respuesta inmune en un número reducido de clonas. Se tipificaron los alelos HLA II de diez pacientes con EM y de seis pacientes con OENI. Se predijo *in silico* la unión de 60 millones de péptidos de VZV, EBV, HHV-1, HHV-6A y SNC a alelos de HLA, obteniendo 938 péptidos que pueden de ser presentados de manera natural y con mayor afinidad. Los alelos de pacientes con EM pueden reconocer un mayor número de proteínas virales. Un solo alelo de EM (DPA1\*01:03/B1\*02:01) tiene la capacidad de presentar péptidos de los cuatro herpesvirus y de las proteína de SNC incluidas en este trabajo.

## Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that begins with the activation of T cells, which cross the blood-brain barrier and damage the myelin of nerves in the CNS. They are activated by the interaction of the T cell receptor (TCR) and an antigen-HLA complex from an antigen presenting cell. The factors involved in the development and activation of MS are unknown; however, a possible correlation of previous infections with viruses of the herpesvirus family and the activation of MS has been reported. **Hypothesis.** The TCR repertoire of MS patients is decreased during the exacerbation phase compared with the remission phase. HLA-II alleles from patients with MS recognize self and foreign peptides (herpesvirus) with greater affinity. **Objectives.** The TCR repertoire was analyzed using high-throughput sequencing in patients with MS in relapse and remission. Binding prediction of HLA alleles and CNS and herpesvirus peptides was performed. **Experimental strategy.** cDNA libraries were generated from RNA obtained from T cell subpopulations to sequence the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of the TCR. The TCR repertoire of MS patients was analyzed. HLA-II allele typing was carried out from DNA from patients with MS and other inflammatory neurological diseases (OIND). The binding ability of HLA alleles to CNS and herpesviruses peptides was predicted. **Results.** The  $\alpha$  and  $\beta$  chains of the TCRs of ten patients with MS, in both phases of the disease, six patients with OIND and ten healthy individuals were sequenced, obtaining a total of 28,508,914 readings. The diversity of the repertoire was lower during the relapse phase, as were the total clones, unique clones, of clones representing 50% of the total repertoire and the number of clones shared between at least two patients. These results suggest the concentration of the immune response in a reduced number of clones. The HLA II alleles of ten patients with MS and six patients with OENI were typified. The binding of 60 million VZV, EBV, HHV-1, HHV-6A and SNC peptides was predicted, obtaining 938 peptides that could be presented naturally and with greater affinity to HLA alleles. HLA alleles from MS patients recognized a greater number of viral proteins. A single EM allele (DPA1\*01:03/DPB1\*02:01) can present peptides from the four herpesviruses and the CNS proteins included in this work.



## ÍNDICE

Asesores .....	3
Agradecimientos .....	5
Dedicatorias .....	6
Resumen.....	7
Abstract .....	8
Lista de figuras .....	12
Lista de tablas.....	13
Lista de abreviaturas .....	14
Introducción .....	16
Epidemiología.....	19
Manifestaciones clínicas .....	20
Patogénesis y patología.....	21
Etiología.....	24
Complejo principal de histocompatibilidad de clase I .....	26
Complejo principal de histocompatibilidad de clase II .....	27
Receptor de células T (TCR).....	31
Secuenciación de alto rendimiento.....	35
Justificación .....	37
Hipótesis.....	37
Objetivo general.....	38
Objetivos específicos.....	38
Estrategia experimental .....	39
Selección de pacientes y toma de muestra.....	39
Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).....	39
Conteo y evaluación de la viabilidad de las CMSP .....	39
Aislamiento de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> , CD25 <sup>+</sup> .....	39
Identificación de poblaciones de linfocitos T por citometría de flujo.....	40
Extracción de RNA de CMSP.....	41
Cuantificación de la concentración de RNA .....	43
Síntesis de cDNA.....	43
Purificación de cDNA.....	44

Amplificación por PCR (Fusion PCR) .....	45
Purificación de productos de PCR .....	45
Cuantificación de la concentración de los productos de PCR .....	45
Selección de tamaño del producto de PCR .....	45
Purificación de productos de PCR seleccionados.....	46
Índex PCR.....	46
Purificación de productos de Índex PCR .....	46
Cuantificación de la concentración de los productos de Índex PCR .....	46
qPCR .....	46
Secuenciación de las muestras.....	47
Análisis de los resultados de la secuenciación del TCR.....	47
Análisis estadístico .....	47
Extracción de DNA de sangre periférica.....	48
Tipificación de HLA .....	49
Predicción <i>in silico</i> de la unión de MHC-II y predicción de epítomos de anticuerpos .....	49
Resultados .....	50
Grupos de estudio .....	50
Datos de secuenciación.....	50
Longitud de segmentos CDR3 .....	51
Expansión clonal del repertorio de TCR. ....	52
Diversidad del repertorio de TCR .....	54
Distribución clonal del TCR.....	55
Riqueza del repertorio de TCR .....	56
Clonotipos compartidos .....	56
Logos de secuencias de clonotipos compartidos .....	57
Uso de segmentos de unión y variables.....	58
Tipificación y clasificación HLA II .....	61
Predicciones de afinidad de unión entre alelos HLA y péptidos VZV, EBV, HHV-1, HHV-6A o SNC .....	62
Predicción de epítomos de proteínas VZV, EBV, HHV-6A, HHV-1 y CNS.....	63
Uso de alelos de HLA.....	65
Logos de secuencia de péptidos predichos.....	68

Identificación de proteínas basada en la predicción de unión de alta afinidad de péptidos de VZV, EBV, HHV-1, HHV-6A y del SNC a los alelos HLA .....	70
Discusión .....	72
Conclusiones .....	76
Perspectivas .....	76
Referencias.....	77
Material suplementario .....	86
Tabla complementaria 1. ....	89
Tabla complementaria 2 .....	90
Tabla complementaria 3. ....	92

## Lista de figuras

1. Activación de linfocitos T autorreactivos.
2. Formas clínicas de la EM
3. Prevalencia de EM en el mundo
4. Escala del estado de discapacidad expandido
5. Patología de la EM
6. Presentación de antígenos por el MHC clase I
7. Presentación de antígenos por el MHC clase II
8. Mecanismos de activación periférica de linfocitos T
9. Recombinación V(D)J
10. Mapeo representativo de la secuenciación de alto rendimiento de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR a partir de CMSP
11. Distribución de longitud del segmento CDR3
12. Expansión clonal del repertorio de TCR
13. Índice de diversidad de repertorios de TCR
14. Distribución de los segmentos CDR3
15. Clonotipos únicos
16. Clonotipos compartidos
17. Logos de secuencias de clonas compartidas
18. Uso de segmentos de unión y variables
19. Predicción de epítomos lineales
20. Reconocimiento de péptidos del SNC o de herpesvirus
21. Logos de secuencia de núcleos de unión

## **Lista de tablas**

1. Datos clínicos y demográficos
2. Tipificación de alelos de HLA clase II
3. Número de péptidos de VZV, EBV, HHV-6A, HHV-1, o SNC, predichos para unirse a los distintos alelos HLA
4. Predicción de epítomos lineales
5. Número de proteínas reconocidas por los alelos más frecuentes de cada grupo
6. Proteínas reconocidas con mayor frecuencia por los alelos HLA Clase II de cada grupo

## Lista de abreviaturas

<b>AP1</b>	Adaptador de la red trans-golgi	<b>EMPP</b>	Esclerosis múltiple primaria progresiva
<b>AP2</b>	Adaptador de membrana plasmática	<b>EMR</b>	Esclerosis múltiple - remisión
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígenos	<b>EMRR</b>	Esclerosis múltiple recurrente-remite
<b>BCR</b>	Receptor de células B	<b>EMSP</b>	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica	<b>FABP7</b>	Fatty acid-binding protein 7
<b>C</b>	Constante	<b>FISH</b>	Hibridación fluorescente in situ
<b>CCL20</b>	Ligando 20 de quimiocina	<b>HECAM</b>	Hepatocyte cell adhesion molecule
<b>cdNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario	<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>CDR</b>	Regiones determinantes de complementariedad	<b>HVH-6A</b>	Herpes virus humano 6A
<b>CGH</b>	Hibridación genómica comparativa	<b>ICAM</b>	Moléculas de adhesión celular intracelular
<b>CIS</b>	Síndrome clínicamente aislado	<b>IEDB</b>	Base de datos de epítomos inmunes y recursos de análisis
<b>CLIP</b>	Péptido de la cadena invariable asociado a la clase II	<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangre periférica	<b>ii</b>	Cadena invariable
<b>CNPase</b>	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	<b>IL</b>	Interleucina
<b>c-SMAC</b>	Región central del clúster de activación supramolecular	<b>IMGT</b>	International immunogenetics information system
<b>D</b>	Diversidad	<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>DI</b>	Índice de diversidad	<b>IS</b>	Individuos sanos
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>J</b>	Unión
<b>dNTPs</b>	Nucleósido trifosfato	<b>Lck</b>	Tirosina cinasa específica de linfocitos
<b>DTT</b>	Ditioteitol	<b>LFA-1</b>	Antígeno asociado a la función leucocitaria de alta afinidad
<b>DTU</b>	Universidad Técnica de Dinamarca	<b>MACS</b>	Magnetic-activated cell sorting
<b>EBNA-1</b>	Antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr	<b>MAG</b>	Myelin-associated glycoprotein
<b>EDSS</b>	Expanded disability status scale	<b>MBP</b>	Myelin basic protein
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético	<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple	<b>MiIC</b>	Compartimento del MHC de clase II
<b>EMB</b>	Esclerosis múltiple - brote	<b>mL</b>	Mililitro

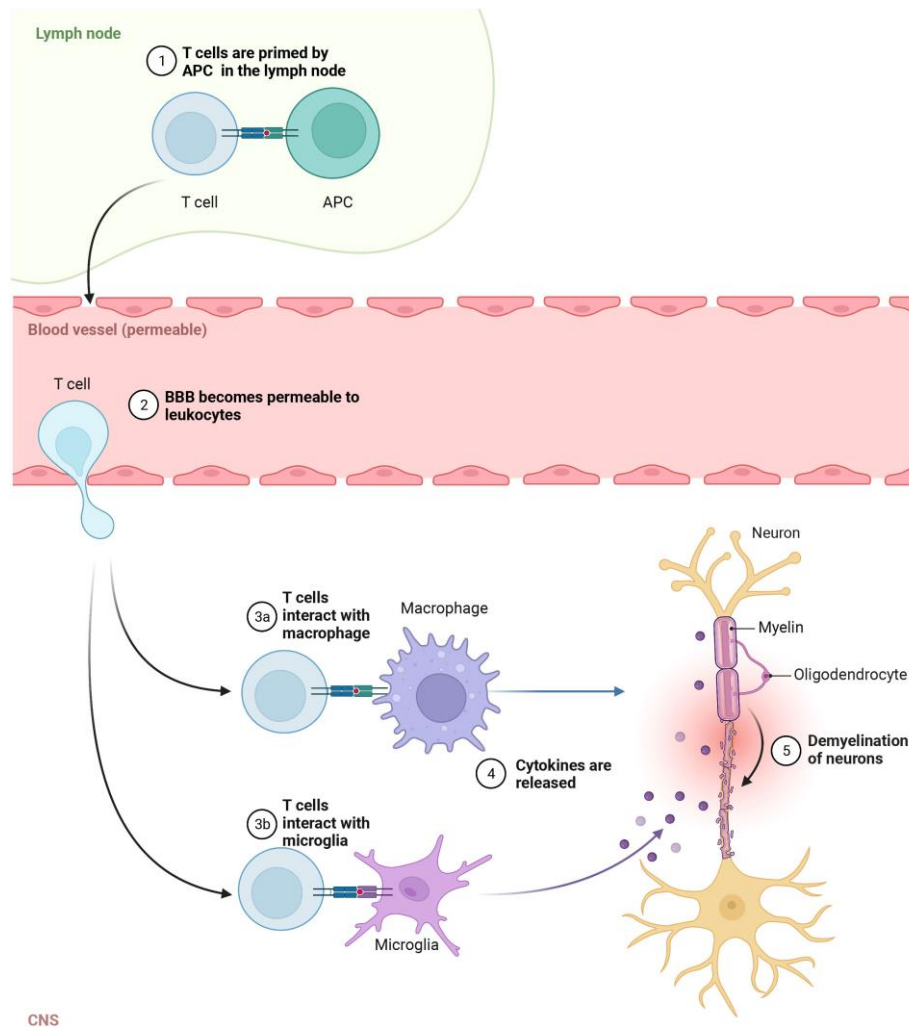
<b>MMLV</b>	Virus de leucemia murina	<b>RSSs</b>	Secuencias señal de recombinación
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de matriz	<b>RTN3</b>	Reticulon-3
<b>MOBP</b>	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	<b>SMAC</b>	Clúster de activación supramolecular
<b>MOG</b>	Myelin oligodendrocyte glycoprotein	<b>SNAP91</b>	Synaptosome associated protein 91
<b>MRI</b>	Imagen de resonancia magnética	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>NGS</b>	Next generation sequencing	<b>TAP</b>	Proteína transportadora asociada al procesamiento de antígenos
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos	<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>NO</b>	Neuritis óptica	<b>Tcrip</b>	T cell receptor immuno-profiler
<b>nTregs</b>	Células T reguladoras naturales	<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>OENI</b>	Otras enfermedades neurológicas inflamatorias	<b>Th</b>	Células T colaboradoras
<b>OL</b>	Oligodendrocitos	<b>TIL</b>	Linfocitos infiltrantes del tumor
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>TNF-a</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino	<b>TNF-b</b>	Factor de necrosis tumoral beta
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	<b>TransH</b>	Transaldolase
<b>PKCθ</b>	Proteína cinasa Cθ	<b>Treg1</b>	Células T reguladoras adaptativas
<b>PLC</b>	Complejo de carga del péptido	<b>Tris</b>	Trisaminometano
<b>PLP</b>	Proteolipid protein	<b>μL</b>	Microlitro
<b>PROK2</b>	Prokineticin-2	<b>V</b>	Variable
<b>p-SMAC</b>	Región periférica del clúster de activación supramolecular	<b>VCAM</b>	Moléculas de adhesión celular vascular
<b>RAG</b>	Genes de activación de recombinación	<b>VEB</b>	Virus de Epstein-Barr
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico	<b>VHS-1</b>	Herpes virus simple 1
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico	<b>VVZ</b>	Virus varicela zóster
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto	<b>ZAP-70</b>	Proteína cinasa asociada a la cadena zeta

## Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria y neurodegenerativa del sistema nervioso que se caracteriza por el daño y pérdida de oligodendrocitos, desmielinización y degeneración axonal en el sistema nervioso central (SNC). Los oligodendrocitos (OL) son células gliales especializadas que proveen soporte a las neuronas produciendo una capa rica en mielina, que envuelve a los axones neuronales y favorece la transmisión eficiente del impulso nervioso. Esta envoltura lipídica contiene la proteína proteolipídica (PLP), la proteína básica de mielina (MBP), la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), la glicoproteína asociada a mielina (MAG), entre otras (Riedhammer & Weissert, 2015).

En la EM, la pérdida de la tolerancia inmunológica puede provocar la generación de células autorreactivas como linfocitos B y T. En particular, la activación de los linfocitos  $T_H17$  en la periferia provoca la alteración de la barrera hematoencefálica, promoviendo la infiltración de las células del sistema inmune innato y adaptativo al sistema nervioso central. Dentro del SNC, los linfocitos T  $CD8^+$  pueden ser activados por células B que actúan como células presentadoras de antígenos; esta activación promueve un estado de inflamación que recluta y activa células del sistema inmune innato de la periferia como macrófagos y células residentes del SNC como microglía, que contribuyen al mantenimiento del estado de inflamación (**Figura 1**) (Dobson & Giovannoni, 2019; Liu et al., 2022; Tian et al., 2022). En la fase avanzada de la enfermedad se dañan los oligodendrocitos y las células precursoras, resultando en una remielinización insuficiente que compromete la integridad física y funcional de los axones (Dulamea, 2017).

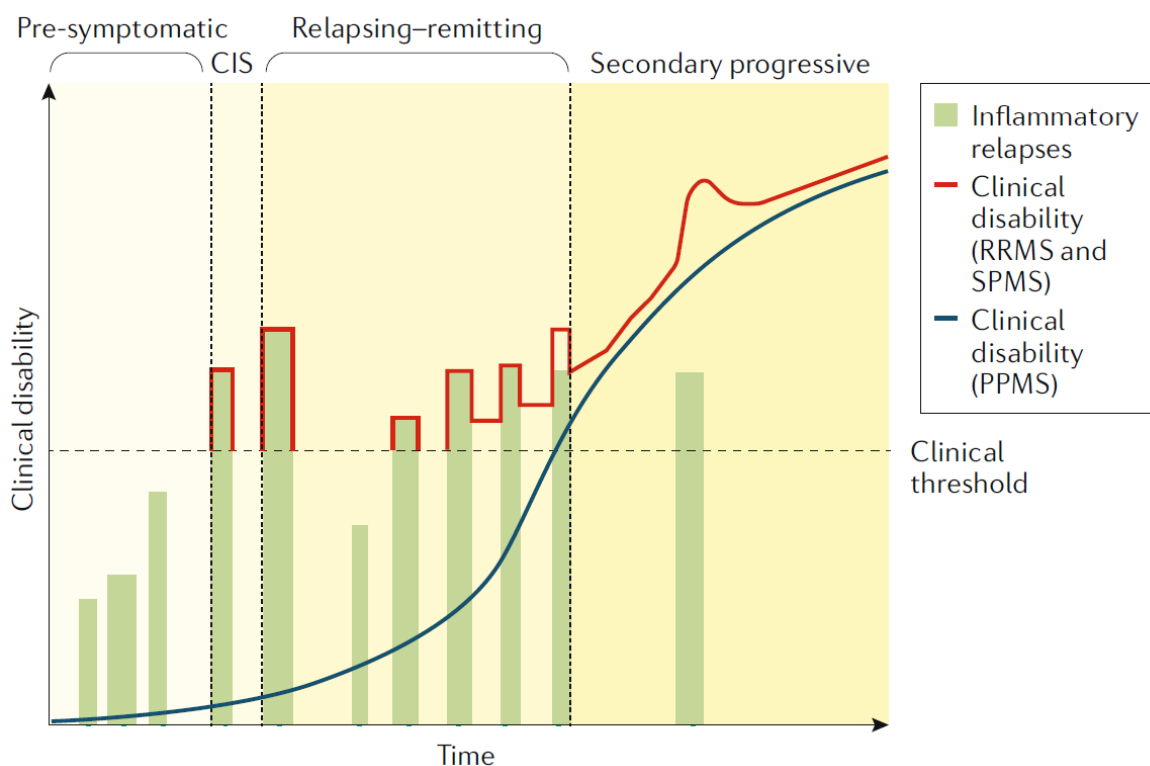




**Figura 1.** Activación de linfocitos T autorreactivos. La interacción de linfocitos T autorreactivos con células presentadoras de antígenos dentro de los nódulos linfáticos promueve su infiltración al SNC a través de la barrera hematoencefálica. Los linfocitos T activados pueden dañar directamente a las células del SNC o puede activar a las células inmunes innatas que liberarán citocinas proinflamatorias. (Fuente: Liu *et al*, 2022)

En la mayoría de los casos, la enfermedad es diagnosticada cuando el paciente presenta un síndrome clínicamente aislado (CIS), que corresponde a un episodio agudo que afecta a uno o varios sitios del sistema nervioso central (SNC), que se resuelve sin dejar secuelas. Sin embargo, la EM se desarrolla antes de manifestar el CIS, pues los pacientes presentan lesiones inactivas que sólo pueden ser observadas por imágenes de resonancia magnética (MRI). De ese primer episodio se pueden derivar ataques subsecuentes de desmielinización y manifestar la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR), que es la forma más frecuente de presentación clínica (~85% de los casos) y se caracteriza por episodios agudos de inflamación en el SNC, seguidos de periodos de recuperación (Compston & Coles, 2008). Aproximadamente el 75% de los pacientes con EMRR evolucionan a la esclerosis múltiple

secundaria progresiva (EMSP) diez a 15 años después del diagnóstico de EMRR, en la cual las fases de recuperación son menos frecuentes, provocando un aumento continuo de la discapacidad. Entre 8 y 10% de los pacientes presentan esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP), en la que existe un constante deterioro funcional. La forma menos común se denomina esclerosis múltiple recurrente-progresiva (EMRP) que afecta a menos del 5% de los pacientes y se caracteriza por un deterioro neurológico continuo desde el inicio de la enfermedad con brotes ocasionales (Figura 2) (Karussis, 2014; Koukoulitsa et al., 2020; Lublin et al., 2014).

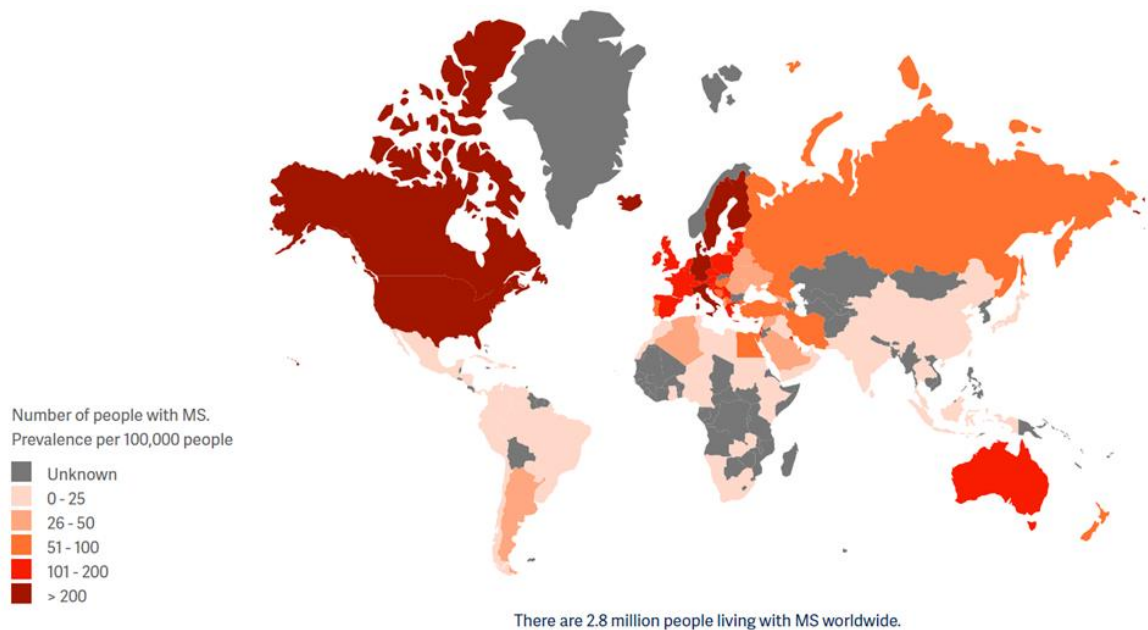


**Figura 2.** Formas clínicas de la EM. La enfermedad inicia con ataques a la cubierta de mielina de los nervios del SNC, sin que se presenten manifestaciones clínicas. La primera manifestación puede ser el CIS, que corresponde a un episodio agudo que afecta a uno o varios sitios del SNC, que se resuelve sin dejar secuelas. La EMRR es la forma clínica más común; se caracteriza por periodos de exacerbación seguidos de periodos de recuperación total o parcial. Después de varios años, muchos de estos pacientes desarrollan EMSP, donde los periodos de recuperación disminuyen y la progresión de la discapacidad continúa. Los pacientes con EMPP exhiben una progresión de la enfermedad desde el inicio de ésta, con un déficit neurológico gradual. En la forma menos común, EMRP, la progresión de la enfermedad es continua desde el inicio, pero presenta recaídas agudas con una recuperación total o parcial. (Fuente: Filipp *et al*, 2018)

## Epidemiología

La EM afecta principalmente a adultos jóvenes de 20 a 40 años, con una edad media de inicio de 30 años, es más frecuente en mujeres en relación de 2:1 (M:H). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia media mundial de EM aumentó de 2008 a 2020, de 30 a 36 casos por cada 100,000 habitantes. El número de personas afectadas con EM es creciente pues se estima en más de 2.8 millones en el mundo demostrado un aumento de casos del 30% en comparación de los datos obtenidos por la OMS en 2013. La EM pediátrica es rara, aunque ha aumentado con más de 30,000 casos diagnosticados antes de los 18 años con incidencia de 2.9 casos por cada 100,000 habitantes. El aumento en el número de casos reportados puede deberse a un mayor acceso a herramientas de diagnóstico como la resonancia magnética (MRI), el aumento en el número de profesionales (neurólogos) y mejores criterios de diagnóstico. Sin embargo, dada la participación de factores genéticos y ambientales en el desarrollo de la enfermedad, el aumento en el número de casos también pudiera explicarse por una mayor exposición a estos últimos, en especial a algunos virus de la familia herpesvirus, como se describirá más adelante (*The Multiple Sclerosis International Federation, Atlas of MS, 2020*).

La mayor prevalencia de EM se encuentra en América del Norte y Europa (288 y 303 por 100.000 respectivamente) y la menor en África Subsahariana y Pacífico Occidental (5 por 100,000 para ambas) (Browne et al., 2014; Walton et al., 2020). En América Latina, la prevalencia varía de 3.2 a 30 casos por cada 100,000 habitantes, mientras en México fluctúa entre 12 a 30 casos/100,000 habitantes y en las últimas décadas se ha convertido en una de las principales causas de consulta por enfermedades neurológicas y en la principal enfermedad incapacitante entre jóvenes adultos (**Figura 3**) (Gonzalez & Sotelo, 1995; Rivera, 2017; Rivera et al., 2014).



**Figura 3.** Prevalencia de EM en el mundo. La prevalencia media de EM a nivel mundial es de 36 casos por cada 100,000 habitantes. Sin embargo, algunos países presentan una prevalencia mayor a 300 casos por cada 100,000 habitantes. (Fuente: <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>)

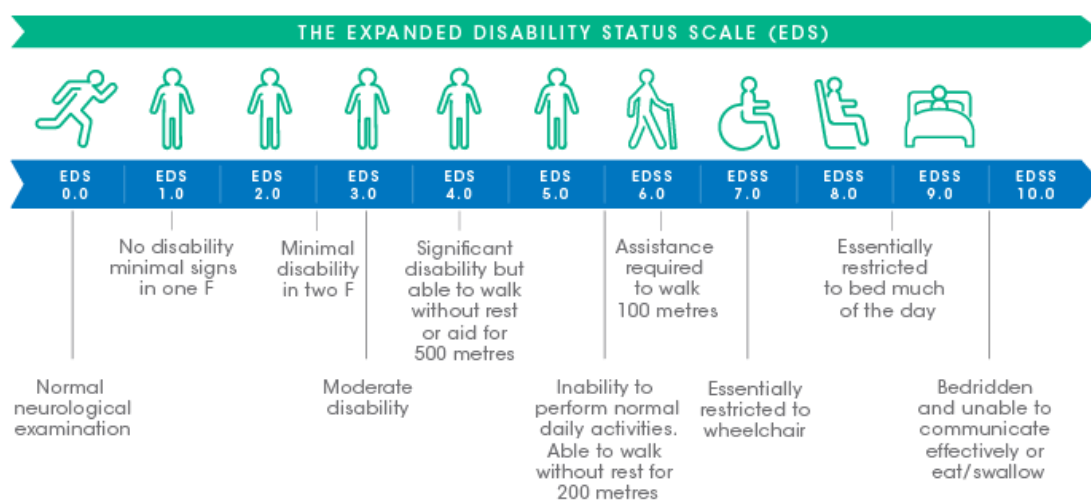
### Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la EM dependen de la zona afectada en el SNC. En los pacientes con EM se presentan zonas con desmielinización tanto en la materia blanca como en la materia gris del cerebro y la médula espinal; en las etapas tempranas de la enfermedad, los axones y las neuronas se conservan, sin embargo, la progresión de la enfermedad produce una pérdida axonal gradual que se correlaciona con la discapacidad del paciente. Los síntomas pueden ser sensoriales o motores. Los síntomas más comúnmente asociados a la EM son neuritis óptica unilateral aguda, visión doble debido a oftalmoplejía internuclear (parálisis del sexto nervio), pérdida sensorial facial (neuralgia del trigémino), ataxia cerebelosa, nistagmos, mielopatía parcial, síntoma de Lhermitte, debilidad asimétrica de las extremidades e incontinencia de urgencia o disfunción eréctil (Brownlee et al., 2017).

La neuritis óptica (NO) es el primer evento desmielinizante en aproximadamente el 20% de los pacientes con EM y se desarrolla en aproximadamente 40% de los pacientes durante el curso de la enfermedad. Se caracteriza por pérdida unilateral de la visión o de la visión de color y dolor al movimiento del ojo.

La escala EDSS (Expanded Disability Status Scale) mide la discapacidad producida por la EM, asignando números del 0 al 10 (**Figura 4**). La evolución es particular en cada

paciente y depende de factores aún no entendidos. Por ejemplo, una EDSS de 6 implica que el paciente requiere de un bastón para caminar. En promedio, los pacientes con EM alcanzan esta discapacidad a los 59 años, o 27.9 años después del diagnóstico inicial de la enfermedad. Aproximadamente 20% de pacientes estarán postrados en cama u hospitalizados 15 años después de la aparición de los primeros síntomas de EM (Rolak, 2003; Sara & Ruth, 2020).



**Figura 4.** Escala del estado de discapacidad expandido. Se utiliza para evaluar la progresión de la enfermedad a través de puntuaciones de 0 a 10. (Fuente: <https://www.msonetoone.ch/en/>)

## Patogénesis y patología

Las células T CD4<sup>+</sup> son consideradas las iniciadoras de la patogénesis de la EM, ya que se ha observado una expansión clonal de células T autorreactivas en presencia de componentes del SNC. Sin embargo, se desconoce cuál de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th9 y Th17) es responsable de iniciar la enfermedad (Murphy et al., 2010; Watson et al., 2011).

La población Th1 produce y secreta citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , interleucina-2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ), que promueven la activación de macrófagos y microglía que provocan daño a la mielina (Kostic et al., 2015). La población Th2 regula la respuesta del sistema inmune, pero su función parece estar alterada en la EM (Podbielska et al., 2018).

Los linfocitos Th9 (productores de IL-9), estimulan a los astrocitos para que expresen un ligando de quimiocina (CCL20) que favorece la migración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th17 (Deng et al., 2017; Elyaman & Houry, 2017; Kostic et al., 2015). Estas células a su vez, producen una gran cantidad de citocinas proinflamatorias como IL-17A, IL-17F y TNF- $\alpha$ ,

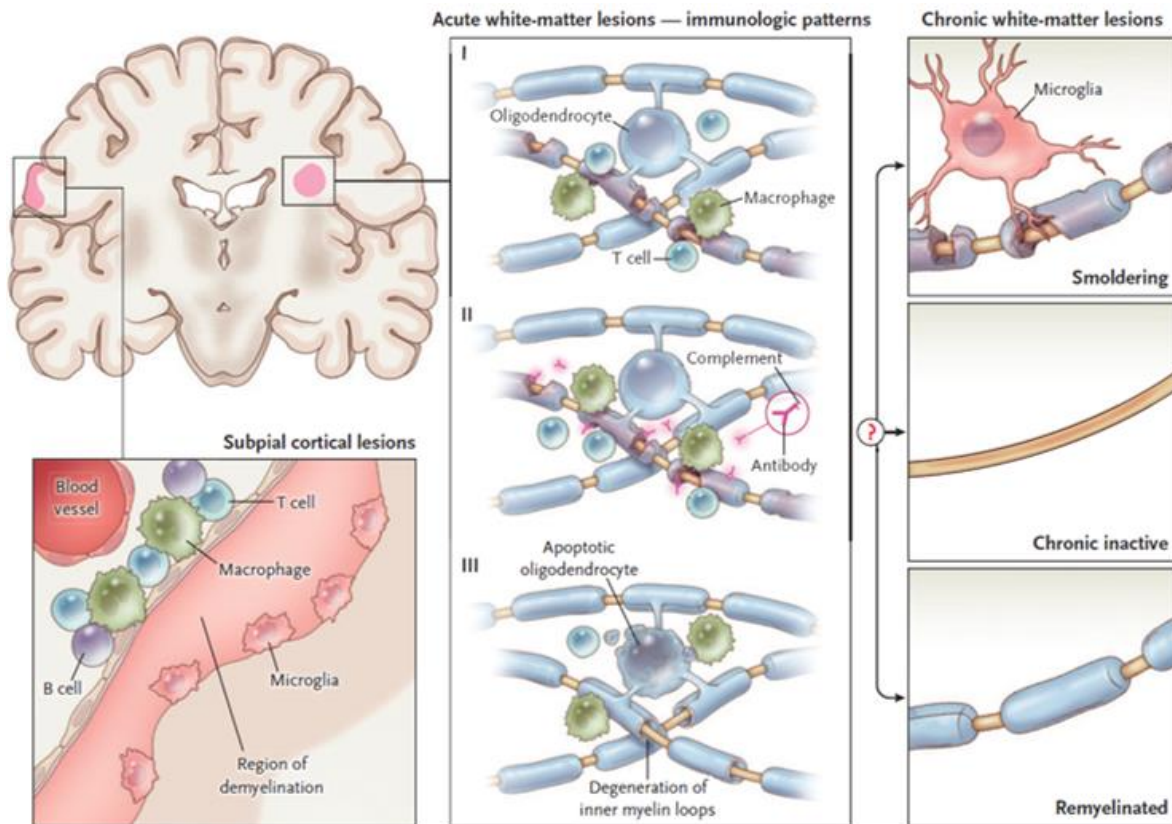
que alteran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo la entrada de otras células inmunológicas (McGinley et al., 2018).

Las células T reguladoras naturales (nTreg) y las células T reguladoras adaptativas (Treg-1, Th3 y algunas poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup>) son esenciales para controlar la respuesta inmune generada por las células efectoras. Aunque existe un número similar de células T reguladoras en pacientes con EM y en individuos sanos, estas células presentan una función reducida en la regulación de poblaciones autorreactivas en los pacientes con EM (Fletcher et al., 2010; Mallucci et al., 2015).

Además de los linfocitos T, las células B también participan en el desarrollo de la EM; en pacientes que presentan una mayor presencia de células B y células plasmáticas que otras poblaciones del sistema inmune dentro del líquido cefalorraquídeo, la velocidad de la progresión de la enfermedad aumenta y la presencia de agregados de células B en las lesiones acelera la necesidad de uso de bastón o silla de ruedas (Jain & Yong, 2022). Durante la fase de remisión, las células B pueden migrar a través barrera hematoencefálica y transformarse en células plasmáticas dentro del SNC, donde sintetizan inmunoglobulinas, principalmente IgG1 e IgG3 que reconocen péptidos intracelulares propios que podrían generarse por la muerte celular generada por la inflamación dentro del SNC. También se ha identificado la participación de los linfocitos B independientemente de la generación de anticuerpos ya que se ha reportado que pacientes que han recibido tratamientos que disminuyen el número linfocitos B, pero no el de células productoras de anticuerpos (linfocitos B que han madurado a células plasmáticas) presentan una disminución en la actividad de la enfermedad. Los linfocitos B pueden actuar como células presentadoras de antígenos que activen a las células T autorreactivas que ya se encuentran en la zona de la lesión (Cencioni et al., 2021; Podbielska et al., 2018). A diferencia de otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso y artritis reumatoide donde se presentan deficiencias en la tolerancia central y periférica de los linfocitos B, en la EM sólo se han reportado deficiencias en la tolerancia periférica, este fenómeno podría ser consecuencia de actividad deficiente que presentan los linfocitos T reguladores de los pacientes con EM (Li et al., 2018).

La inflamación está presente en todas las etapas de la EM, pero es más pronunciada en las fases agudas. En las lesiones tempranas hay invasión de células del sistema inmune y ruptura de la barrera hematoencefálica. Los macrófagos representan la población más

abundante en el infiltrado, seguido por las células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>, células B y células plasmáticas (Dendrou et al., 2015). Con la progresión de la enfermedad los astrocitos forman cicatrices denominadas placas escleróticas, de donde deriva el nombre de esclerosis múltiple (Lassmann, 2013). Existen lesiones activas, lesiones en expansión, lesiones inactivas y regiones de remielinización. Las lesiones activas se clasifican de acuerdo con el daño producido y el tipo de células involucrado. Las lesiones agudas son de tipo I a III y las crónicas de tipo IV. Las lesiones de tipo I se caracterizan por estar bien definidas, presentar desmielinización activa producida por macrófagos fagocíticos, infiltración de células T y presencia de microglía. En las lesiones de tipo II hay una mayor infiltración de linfocitos T y mayor número de macrófagos con mielina en su interior; además, se pueden identificar inmunoglobulinas como IgG y moléculas del complemento en los sitios de desmielinización. En las lesiones de tipo III, las regiones de lesión que previamente estaban definidas ahora son difusas, se observan oligodendrocitos en proceso de muerte. Por último, en las lesiones de tipo IV hay mayor infiltración de células T, macrófagos activados y microglía; además, se observa expansión de la desmielinización debido a la muerte de oligodendrocitos en las zonas adyacentes a la región de la lesión (**Figura 5**) (Lucchinetti et al., 2000).



**Figura 5.** Patología de la EM. En las etapas tempranas de la enfermedad, las lesiones se presentan principalmente en la materia blanca, en donde se concentran los axones neuronales. A medida que avanza la enfermedad, el daño se expande a la materia gris, en donde se encuentran los cuerpos neuronales. Las lesiones activas se clasifican en 4 tipos: el tipo I se caracteriza por la presencia de macrófagos y linfocitos T, cuyo infiltrado aumenta en el tipo II, al que se agrega la deposición de inmunoglobulinas y moléculas del sistema de complemento. En el tipo III se observan oligodendrocitos en proceso de apoptosis acompañados de regiones de desmielinización. En las lesiones de tipo IV se pueden observar diversos procesos, como la remielinización de los axones, la disminución de la inflamación sin remielinización o una degeneración constante por inflamación. (Fuente: Reich *et al.*, 2018)

## Etiología

La EM es causada por desregulación del sistema inmune producida por factores genéticos y ambientales aún desconocidos. Entre los factores ambientales se han reportado infecciones por virus pertenecientes a la familia de los *Herpesviridae* como los virus Epstein-Barr (VEB), varicela zóster (VVZ), herpes virus simple 1 (HVS-1) y herpesvirus humano 6A (HHV-6A) (Carneiro *et al.*, 2022; Fierz, 2017; Pérez-Saldívar *et al.*, 2021; Veroni *et al.*, 2015). En las personas con una infección previa con VEB, el riesgo de desarrollar EM se incrementa 15 veces si la infección fue durante la infancia y 30 veces si ocurrió durante la adolescencia (Bjornevik *et al.*, 2023; Soldan & Lieberman, 2023).



Como se describió en el apartado de *Epidemiología* la prevalencia de EM es mayor en América del Norte y Europa y menor en África Subsahariana y Pacífico Occidental (Browne et al., 2014; *The Multiple Sclerosis International Federation, Atlas of MS*, 2020). Estudios de migración de poblaciones concluyen que, si la migración ocurre durante la infancia, los individuos adquieren la prevalencia de la región de destino, mientras que si ocurre más tarde mantienen la prevalencia de la región de origen (Cabre et al., 2005).

Otros factores ambientales que han sido mencionados en el desarrollo de la EM incluyen baja exposición al sol, deficiencia de vitamina D, índice de masa corporal alto, y tabaquismo (Kakalacheva & Lunemann, 2011). El organismo produce la vitamina D cuando la piel se expone directamente al sol, por lo que es posible que la mayor prevalencia de EM en América del Norte y Europa pudiera tener un componente ambiental en el que su población no tiene suficiente exposición al sol durante el año. Numerosos estudios reportan que el consumo de vitamina D durante la adolescencia puede tener efectos protectores contra el desarrollo de la enfermedad (Plantone et al., 2022).

El tabaquismo ha sido señalado como un factor de riesgo debido a que la tasa de brotes en pacientes con EM fumadores es mayor que en los no fumadores y a que los pacientes que han dejado de fumar por más de diez años presentan una mejor respuesta a los tratamientos (como INF- $\beta$ ), comparado con aquellos que han suspendido el tabaquismo por 12 meses (Petersen et al., 2018).

Se ha reportado una predisposición genética para el desarrollo de la EM, aunque aún no se conocen todos los genes de susceptibilidad. Los genes de mayor relevancia se encuentran en variantes del antígeno leucocitario humano (HLA), también conocido como complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las moléculas codificadas por el HLA cumplen distintas funciones durante la presentación del antígeno, en el sistema de complemento y en las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Lysandropoulos et al., 2017; Matzaraki et al., 2017). Al parecer los alelos HLA II como el HLA-DRB15 desempeñan un papel importante en el desarrollo de la EM debido a la reactividad cruzada del receptor de células T (TCR) de clonas de células T CD4+ específicas a péptidos de proteína básica de mielina (MBP); estas células linfoides también pueden reconocer péptidos del virus Epstein-Barr. No solo el alelo HLA-DRB15 exhibe esta reactividad cruzada; otros alelos de clase II, como HLA-DQw6, pueden reconocer múltiples péptidos. Este alelo puede estimular a los

linfocitos T con péptidos de herpesvirus como el herpesvirus humano 6 (RIVVRRRLIR), pero también con autoantígenos de proteínas del SNC como la metaslantina 1 (FVYSRGRKLV) (Martin et al., 2021; Sospedra et al., 2006). Algunos alelos de HLA parecen provocar mayor susceptibilidad para el desarrollo de EM. El alelo HLA-DRB1\*15:01 es el más mencionado, aunque también se han descrito los alelos HLA-A\*03, HLA-B\*07. Se han reportado también alelos asociados con una reducción de la susceptibilidad a la EM, como el HLA-A\*02:01 o el HLA-B\*44:02) (Yaldizli et al., 2016).

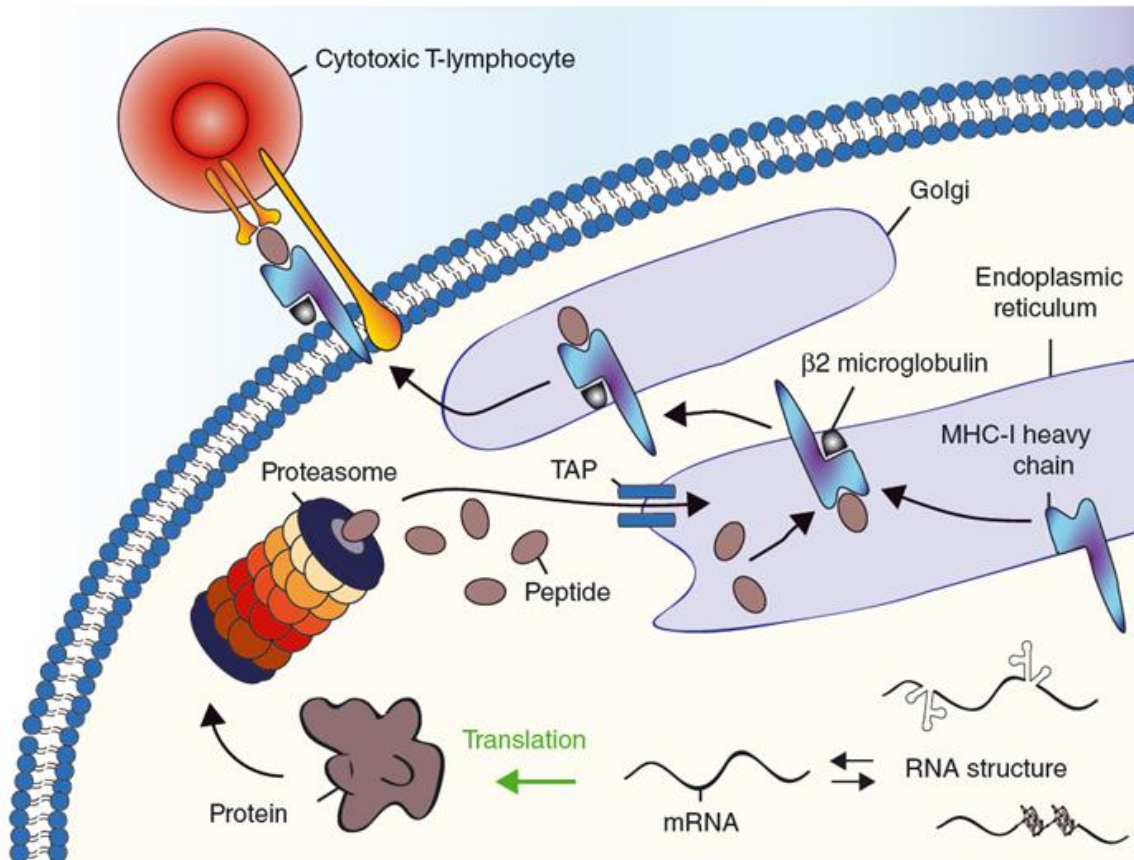
### **Complejo principal de histocompatibilidad de clase I**

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I se expresan en todas las células que tienen núcleo y reconocen antígenos de origen citosólico o nuclear. Las moléculas de clase I son codificadas por varios genes y son clasificadas como genes clásicos (Ia) o genes no clásicos (Ib). Los genes clásicos incluyen a HLA-A, -B, -C, mientras que los genes no clásicos incluyen a HLA-E, -G, -F (Downs et al., 2016). La expresión de MHC I es inducida por IFN- $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$ .

Las moléculas de clase I están compuestas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena  $\alpha$  dispuesta en tres dominios ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) y una segunda cadena denominada  $\beta$ -microglobulina. La región de unión del péptido y de reconocimiento del linfocito T se encuentra en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ; el dominio  $\alpha_3$  es necesario para el reconocimiento del receptor CD8. La cadena  $\beta$ -microglobulina interactúa con el dominio  $\alpha_3$ .

Cuando antígenos extraños son reconocidos en el núcleo o citoplasma se marcan para su degradación a través de la unión de ubiquitina; la degradación de los antígenos se lleva a cabo principalmente mediante proteólisis en el proteasoma 20S/26S. La traslocación de los péptidos del citoplasma al retículo endoplásmico (RE) es llevada a cabo por la proteína transportadora asociada al procesamiento de antígenos (TAP), la cual transporta péptidos de entre 8 y 16 aminoácidos.

En el RE la proteína chaperona tapasina se une al HLA y el complejo es estabilizado por la unión de dos chaperonas residentes más, calreticulina y ERp57, formando el complejo de carga del péptido (PLC). Cuando los péptidos se estabilizan por la unión al MHC, el complejo péptido-MHC puede dejar el RE y ser presentado en la membrana plasmática (**Figura 6**) (Blander, 2016; Murat & Tellam, 2015).



**Figura 6.** Presentación de antígenos por el MHC clase I. Los antígenos presentados por esta molécula tienen un origen nuclear o citoplásmico, si es RNA mensajero, este es primero transcrito a proteína, la cual será degradada por el proteasoma. Los péptidos generados son transportados por la proteína TAP al retículo endoplásmico donde se unirán a una molécula de MHC I. Este complejo péptido-MHC es transportado a la membrana plasmática para ser reconocido por un linfocito T citotóxico. (Fuente: Murat & Tellam, 2018)

## Complejo principal de histocompatibilidad de clase II

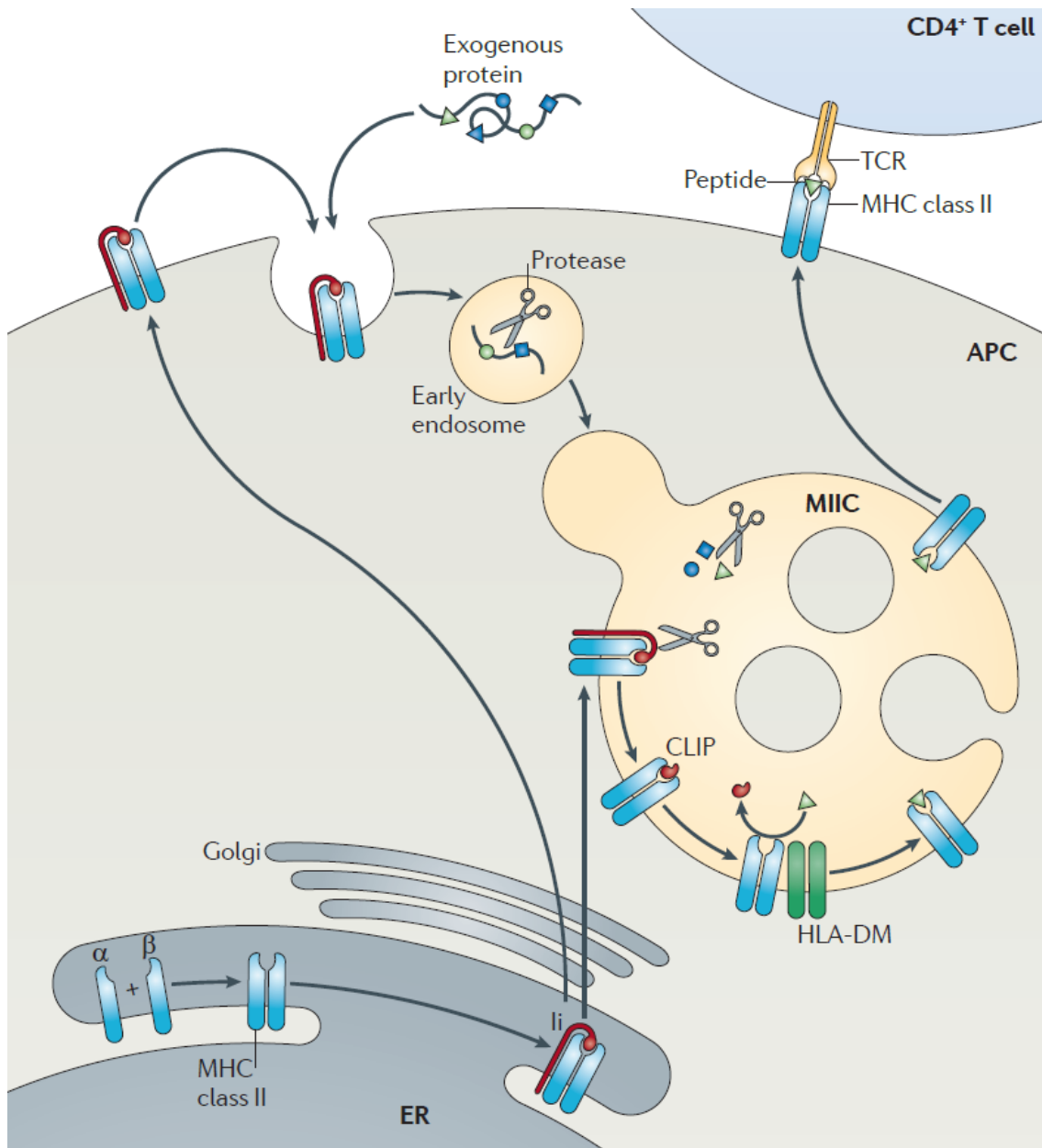
Las moléculas de clase II se expresan en células especializadas (células presentadoras de antígenos, APC) como células dendríticas, linfocitos B y macrófagos y responden a antígenos de origen extracelular. Estas moléculas están codificadas por los genes HLA-DRB1, -DQA1, y -DQB1. La internalización de los antígenos puede variar dependiendo de la célula que reconozca al antígeno: las células B internalizan a los antígenos mediante una endocitosis mediada por receptor (BCR), mientras que en las células dendríticas la internalización puede estar mediada por macropinocitosis o por fagocitosis (Bretou et al., 2016).

El HLA II está compuesto por dos cadenas polipeptídicas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Cada una comprende dos dominios ( $\alpha 1 - \alpha 2$  y  $\beta 1 - \beta 2$ ). En la región conformada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  se localizan los aminoácidos encargados del reconocimiento de los péptidos

antigénicos. Los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  presentan una conformación de tipo Ig y en el dominio  $\beta 2$  se encuentra el punto de unión con el receptor CD4 (Wieczorek et al., 2017).

Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del HLA II forman un complejo con una molécula denominada cadena invariable (Ii). La cadena invariable cuenta con dos dominios de leucina que pueden ser reconocidos por distintos adaptadores para dirigir a las moléculas de HLA a diferentes compartimentos: el adaptador de la red *trans*-Golgi (AP1) induce el transporte a través del aparato de Golgi hacia un endosoma tardío llamado compartimento del MHC de clase II (MIIC); el adaptador de membrana plasmática (AP2) dirige el transporte hacia la membrana y su posterior endocitosis en vesículas de clatrina que son transportadas al MIIC; dentro de este compartimento, la cadena invariable es degradada, dejando solo un residuo denominado péptido de la cadena invariable asociado a la clase II (CLIP) en la región de unión del péptido (Roche & Furuta, 2015).

Dentro del MIIC, las moléculas de clase II requieren de la participación de la molécula HLA-DM que evita la degradación del HLA antes de unirse a los péptidos antigénicos. El complejo HLA-péptido es transportado a la membrana, donde las vesículas que contienen el HLA se fusionan con la membrana plasmática para presentar el complejo formado por el HLA y el péptido antigénico a las células T CD4<sup>+</sup> (Neeffjes et al., 2011) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Presentación de antígenos por el MHC clase II. Los antígenos presentados por esta molécula tienen un origen extracelular. Las cadenas que conforman el MHC se ensamblan dentro del RE junto con la cadena invariable (Ii), este complejo es transportado al compartimiento del MHC II (MIIC) donde la Ii es degradada y sustituida por un péptido. Este complejo péptido-MHC es transportado a la membrana para ser presentado a linfocitos T cooperadores. (Fuente: Neeffjes *et al*, 2011)

El reconocimiento específico del complejo péptido-MHC por parte del receptor de células T (TCR) es de suma importancia, pues esta interacción promueve la activación eficiente de la respuesta inmune adaptativa. Cuando esta interacción es alterada, se desarrollan diversos padecimientos como las enfermedades autoinmunes, entre las que se encuentra la esclerosis múltiple (Lang *et al.*, 2002).

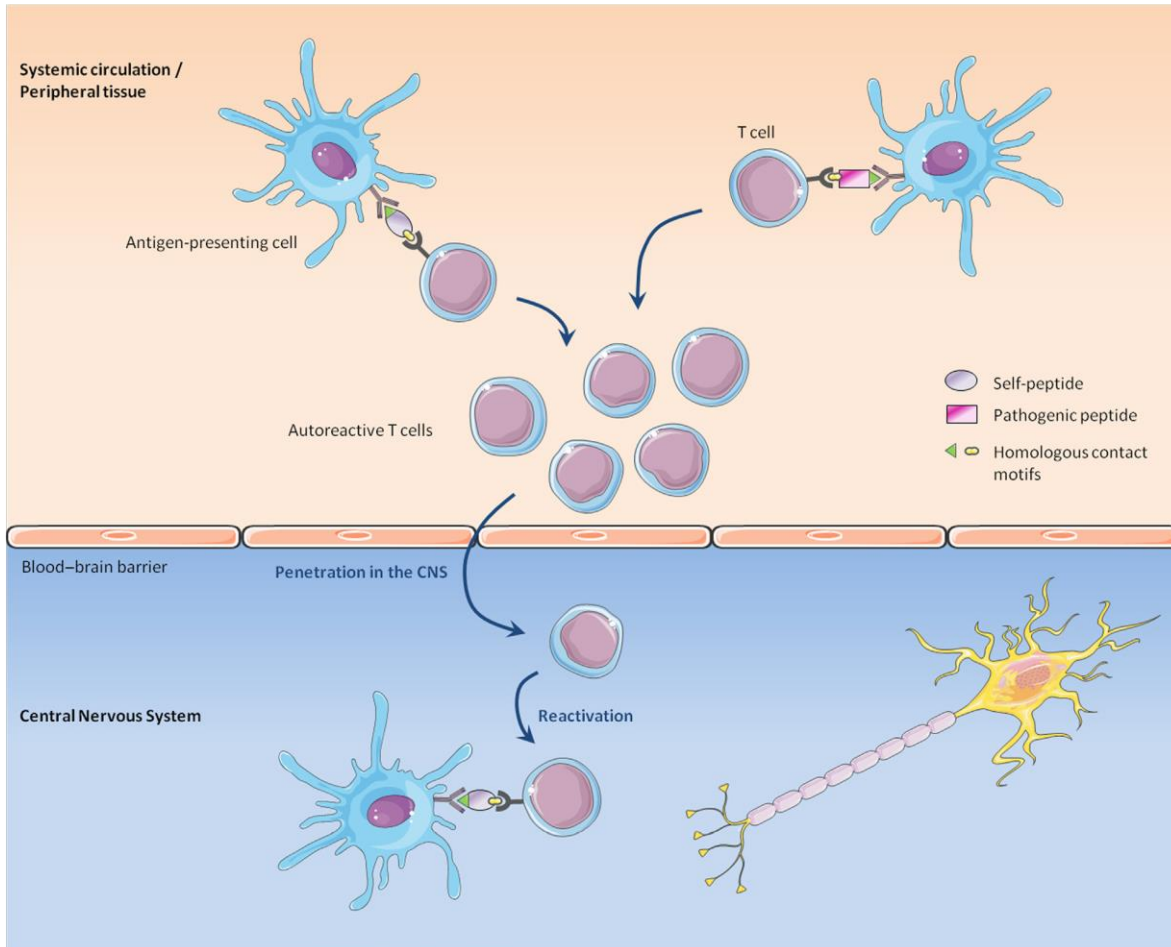
Uno de los mecanismos que afectan la interacción del TCR con el complejo péptido-MHC es el acoplamiento alternativo, en donde el receptor se une de manera incorrecta al complejo, reduciendo la afinidad de la interacción y propiciando la evasión de la selección negativa de clonas autorreactivas dentro del timo. Otro mecanismo que afecta la interacción es la estabilidad de los complejos péptido-MHC, cuando a pesar de tener una unión inestable o débil, el reconocimiento por un receptor de células T les provee la estabilidad necesaria y promueve su activación (Dendrou et al., 2018).

Como se mencionó anteriormente, el alelo HLA-DRB1\*15:01 es uno de los más comúnmente descritos en pacientes con EM. Este alelo pertenece al HLA de clase II, por lo que solo podrá ser reconocido por el TCR presente en las células T CD4<sup>+</sup>. Se ha demostrado que el alelo 15:01 es capaz de formar complejos con péptidos propios, como péptidos provenientes de la proteína básica de mielina (MBP), o con péptidos externos, como péptidos derivados de la proteína conocida como antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr (EBNA-1). Este reconocimiento de péptidos propios y ajenos (mimetismo molecular) puede provocar la activación del sistema inmune adaptativo (Kumar et al., 2013; Parnell & Booth, 2017).

Las evidencias mencionadas sustentan la idea de que el comienzo y desarrollo de la EM se debe a una respuesta anormal del sistema inmune dirigida por los linfocitos T, que podrían desencadenar defectos en la tolerancia central y periférica y permitir el mantenimiento de células autorreactivas, que en un individuo sano serían eliminadas (Filippi et al., 2018; Reich et al., 2018; Riedhammer & Weissert, 2015).

La respuesta inflamatoria en la EM inicia con la activación periférica de linfocitos T autorreactivos, los cuales expresan moléculas de unión (integrinas  $\alpha 4$ ) en su superficie, que se unen de manera transitoria a moléculas de adhesión celular vascular (VCAM) expresadas en células endoteliales. Esta unión promueve la migración de las células T a través de la barrera hematoencefálica (BHE) interactuando con la VCAM-1 endotelial. Un aumento en la afinidad de las integrinas  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  hacia las VCAM permite la adhesión de los linfocitos T al endotelio, el cual está regulado por el antígeno asociado a la función leucocitaria de alta afinidad (LFA-1) y sus ligandos endoteliales denominados moléculas de adhesión intercelular (ICAMs) -1/2. En estas condiciones, los linfocitos T atraviesan el endotelio mediante diapédesis, y la membrana basal endotelial y la glía mediante la secreción de las metaloproteinasas de la matriz (MMP-2 y MMP-9). Una vez dentro del SNC, los linfocitos

T activados liberan citocinas proinflamatorias que activan la microglía (**Figura 8**) (Engelhardt & Ransohoff, 2012; Laroche et al., 2011; Mallucci et al., 2015).



**Figura 8.** Mecanismos de activación periférica de linfocitos T. Se ha sugerido que las células T autorreactivas que atraviesan la barrera hematoencefálica y generan inflamación son activadas por un proceso de mimetismo molecular al reconocer péptidos propios como antígenos, o por activación inespecífica, que consiste en la activación de células T autorreactivas TCR-independientes, que se encuentran en un ambiente inflamatorio. (Fuente: Schaeffer *et al.*, 2015)

### Receptor de células T (TCR)

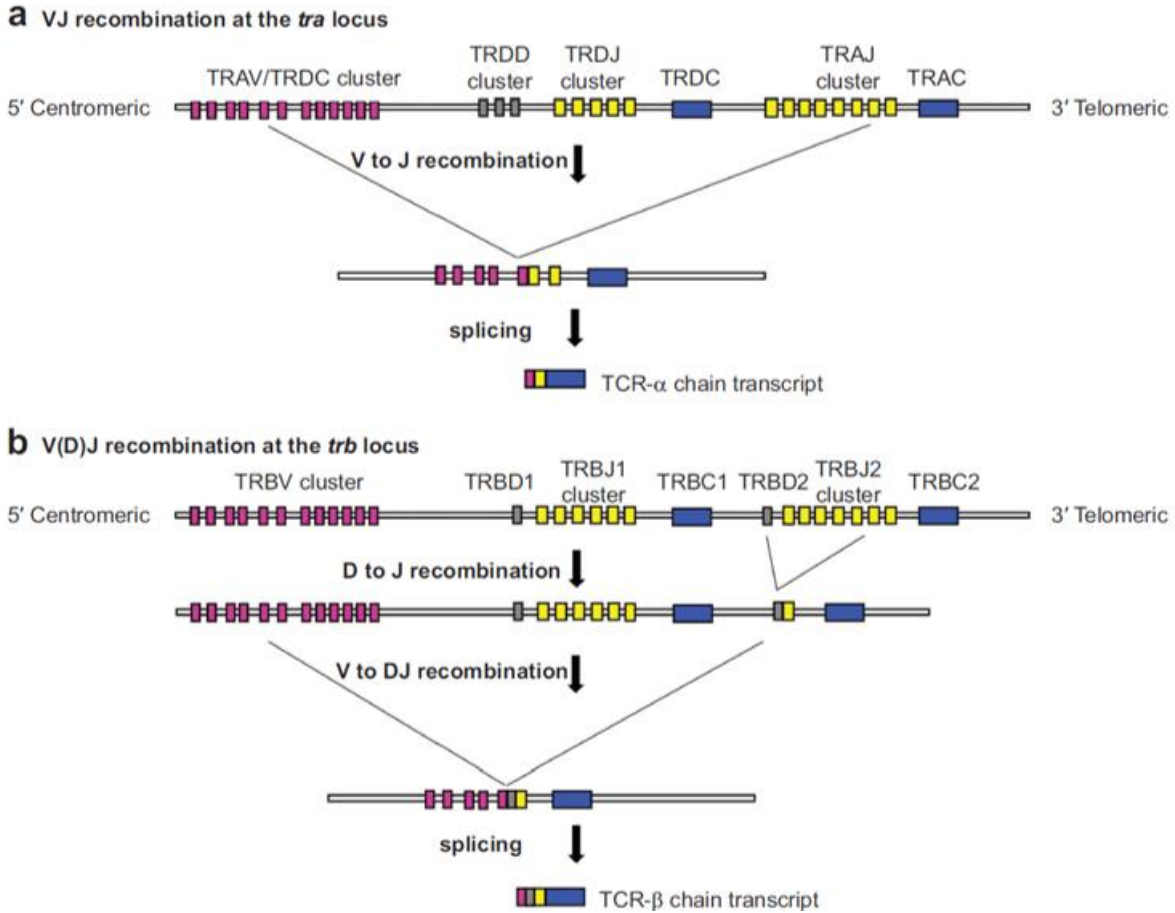
La activación de los linfocitos T requiere de dos señales: el reconocimiento del complejo péptido-MHC por parte del TCR y la interacción de CD28 con CD80 o CD86 que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). Este proceso se conoce como sinapsis inmunológica o clúster de activación supramolecular (SMAC). Esta estructura está compuesta por dos regiones, una región central (c-SMAC), donde se localizan la mayoría de las proteínas involucradas en la activación de los linfocitos T, tales como CD3, CD28, proteína cinasa C $\theta$  (PKC $\theta$ ), tirosina cinasa específica de linfocitos (Lck) y proteína

cinasa asociada a la cadena zeta (ZAP-70), mientras que la región periférica de SMAC (p-SMAC) tiene como función estabilizar la unión (Zumerle et al., 2017).

El reconocimiento de péptidos extraños por el TCR es fundamental para la homeostasis inmunológica, ya que de él depende la activación de una respuesta inmune adaptativa eficiente. El TCR es ensamblado a partir de la codificación de segmentos génicos que se encuentran separados entre sí sobre la línea germinal del ADN, en un proceso conocido como recombinación V(D)J. Cada TCR está formado por dos cadenas (**Figura 9**): una cadena  $\alpha$ , que está codificada en uno de 54 segmentos V (variable) y 61 segmentos J (unión); y una cadena  $\beta$  que, además de estar codificada por 64-67 segmentos V y 14 segmentos J, cuenta con 2 segmentos extra llamados D (diverso). A su vez, el heterodímero  $\alpha\beta$  del TCR está conformado por tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR): los segmentos CDR1 y CDR2 se unen a dominios de la molécula de MHC, mientras que el segmento CDR3, una región altamente variable puesto que en ella se ubican los segmentos VJ en la cadena  $\alpha$  y V(D)J en la cadena  $\beta$ , reconocen al complejo péptido-MHC.

En el núcleo celular, la recombinación V(D)J inicia con el reconocimiento de secuencias señal de recombinación (RSSs) en los extremos de cada segmento V, D y J por un complejo de proteínas conocidas como genes de activación de recombinación 1 y 2 (RAG1 y RAG2). RAG 1 es la encargada de unirse a las regiones RSSs y generar un corte en el DNA, mientras que RAG2 estabiliza la interacción de RAG1 con el DNA. Una vez que se ha llevado a cabo el corte, los extremos del DNA son reparados por enzimas reparadoras de DNA que forman parte de la vía de reparación clásica de unión de extremos no homólogos (NHEJ). La recombinación del receptor se lleva a cabo de manera secuencial: primero se ensambla la cadena  $\beta$ , uniendo uno de los segmentos D con uno de los segmentos J, posteriormente se une un segmento V con el segmento recombinado DJ y, por último, se une el segmento VDJ con una de las dos regiones constantes (C). Una vez formada la cadena  $\beta$  inicia la recombinación de la cadena  $\alpha$  uniendo un segmento V a un segmento J, y uniendo estos segmentos recombinados a su única región C. Esta recombinación de segmentos génicos, acompañados de la eliminación e inserción de nucleótidos en las regiones de unión de los segmentos, son los responsables de generar la diversidad de los TCRs de cada individuo (Clambey et al., 2014; Schatz & Ji, 2011).





**Figura 9.** Recombinación V(D)J. El ensamblaje del TCR se lleva a cabo durante el desarrollo de los linfocitos T. El locus de la cadena  $\beta$  es el primero en recombinarse al unir un segmento D con un segmento J para posteriormente unir este nuevo segmento D-J a un segmento V. El locus de la cadena  $\alpha$  carece de segmento D por lo que la recombinación se realiza entre un segmento V y un segmento J. Durante el proceso de recombinación se lleva a cabo la delección e inserción de nucleótidos entre los segmentos unidos. Por último, la región entre el segmento recombinado y la región constante (C) es eliminada por corte y empalme. (Fuente: Attaf *et al.*, 2015).

El repertorio de TCR incluye todas las combinaciones posibles de receptores que puede generar cada individuo. Teóricamente se estima que se pueden producir  $10^{15-18}$  TCR diferentes. Esta inmensa diversidad permite que el sistema inmune pueda reconocer a una amplia gama de moléculas. Debido a esto, el proceso de desarrollo y maduración de los linfocitos T tiene que ser altamente regulado. El desarrollo de los linfocitos T comienza en el timo donde se conocen como timocitos, estas células carecen de los marcadores típicos de los linfocitos T (CD4 y CD8), por lo tanto, se denominan dobles negativos (DN). A su vez, las células DN se pueden distinguir por los marcadores de superficie que expresan durante su estadio dentro del timo. Las células DN1 ( $CD44^+ CD25^-$ ) tienen la capacidad de comprometerse en distintos linaje, por ejemplo, pueden dar origen a células T  $\alpha\beta$ , células

dendríticas, entre otras. Una vez que se compromete con un linaje, las células DN2 (CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), migran a la corteza del timo donde iniciará un proceso conocido como selección- $\beta$  donde los segmentos que darán origen a las cadenas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  se reacomodan. Las células que lograron reacomodar su segmento  $\beta$ , que no expresan CD44, pero si expresan CD25 (DN3), unen su cadena  $\beta$  con una cadena pre-T $\alpha$ ; esta interacción promueve la supervivencia y proliferación de la célula y la sobreexpresión de los marcadores CD4 y CD8 denominándose ahora células doble positivas (DP). Es hasta este momento que las células serán seleccionadas positivamente dentro de la corteza del timo. La cadena pre-T $\alpha$  será sustituida por una cadena  $\alpha$  para finalmente formar un receptor de células T maduro, que interactuará con complejos péptido-MHC presentes en las células epiteliales corticales, esta interacción promueve la diferenciación de células doble positivas a células positivas simples (SP) pues expresarán CD4 o CD8 además de expresar el receptor de quimiocina CCR7. Sólo aquellos que presenten una afinidad adecuada sobrevivirán, mientras que aquellas que presenten una afinidad baja serán eliminadas por apoptosis. Por último, las células que fueron seleccionadas positivamente migran a la médula del timo para ser seleccionadas negativamente. La selección negativa consiste en la presentación de antígenos propios mediante un mecanismo conocido como factor transcripcional regulador de autoinmunidad (AIRE) que es expresado por las células epiteliales medulares del timo (mTEC). Los receptores que se unan con una gran afinidad a los antígenos propios serán eliminados por apoptosis, de hecho, el 98% de los timocitos son eliminados durante el proceso de selección puesto que podrían ser potencialmente dañinos (Dzhagalov & Phee, 2012; Kim et al., 2021; Klein et al., 2014; Shah & Zúñiga-Pflücker, 2014). Sin embargo, esta diversidad también representa un desafío para determinar la especificidad antigénica de cada TCR (Reddy, 2017).

El modelo animal de la EM conocido como encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) ha demostrado la participación de los linfocitos T en la patogénesis de la EM al transferir la enfermedad de un animal con EAE a otro mediante la transfusión sanguínea y no mediante la transfusión de suero. Además, reafirma el reconocimiento de antígenos propios por parte del sistema inmune puesto que proteínas del SNC como la proteína básica de mielina, proteína proteolipídica de la mielina y la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito son utilizadas para iniciar el desarrollo de la EAE (Ransohoff, 2012). Además, el modelo de EAE y el modelo denominado como encefalitis autoinmune por

cuprizona (CAE) han propuesto la autoinmunidad de la EM mediada por células T autorreactivas que provocan inflamación y desmielinización mediante dos modelos: el modelo “de afuera hacia adentro” que sugiere que las células T se activan en la periferia para posteriormente atacar al SNC y el modelo “de adentro hacia afuera” que propone que un proceso citotóxico dentro del SNC desencadena una respuesta autoinmune secundaria. Mediante la eliminación de los oligodendrocitos maduros y a pesar de la presencia de péptidos de la mielina, los linfocitos T no actúan en contra de la mielina. Esto sugiere que un proceso inflamatorio como la muerte celular no es suficiente para la activación de la respuesta inmune ni de la movilización de los linfocitos de la periferia al SNC (Gharagozloo et al., 2022). Distintas técnicas tales como clonación y secuenciación de un solo TCR, espectratipificación, citometría de flujo y secuenciación de alto rendimiento han sido utilizados para estudiar el repertorio de TCR (Fozza et al., 2017; Lossius et al., 2014).

### **Secuenciación de alto rendimiento**

La secuenciación de alto rendimiento (HTS) es una potente herramienta capaz de secuenciar genomas completos o restringirse a regiones específicas de interés, superando las técnicas convencionales de secuenciación como la de Sanger, la hibridación fluorescente in situ (FISH) o la hibridación genómica comparativa (CGH) (Behjati & Tarpey, 2013; Fang et al., 2014; Kitaura et al., 2016). La HST se ha aplicado al estudio de enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn, donde se ha observado acumulación y expansión de linfocitos T activados, lo que sugiere que la inflamación es mediada por células T CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, no se ha podido identificar cuál o cuáles son los antígenos reconocidos por las células autorreactivas. Con la ayuda de la HST es posible comparar el repertorio del TCR de pacientes con la enfermedad de Crohn con el fin de identificar clones de células T que compartan la región CDR3 (Chapman et al., 2016).

En pacientes con cáncer la secuenciación de nueva generación ha permitido la comparación de las secuencias de TCR de los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) antes, durante y después de un tratamiento. Una expansión clonal refleja que el paciente está respondiendo a un tratamiento, mientras que una nula o baja expansión indica que los TILs de este paciente no son capaces de responder. Asimismo, la amplificación de clones de linfocitos T durante el tratamiento de un tumor permiten identificar TCRs que reconocen

antígenos generados por las células tumorales y, por lo tanto, estas clonas podrían ser estimuladas para responder de una manera favorable contra el cáncer (Choudhury & Nakamura, 2016).

Debido a que los antígenos que desencadenan la respuesta autoinmune en la EM siguen siendo desconocidos, el estudio del repertorio de TCR ha sido de gran interés incluso antes de la aplicación de tecnologías como la HTS. Además, tanto en la EM como en otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y la enfermedad celiaca, los estudios del repertorio de TCR se han enfocado en la cadena  $\beta$  debido a que esta cadena genera la mayor variabilidad del repertorio, sin embargo, la cadena  $\alpha$  también puede generar rearrreglos de su segmento variable, por lo tanto, el estudio de la diversidad de los repertorios de TCR de ambas cadenas es necesario para caracterizar la evolución de la enfermedad (Amoriello et al., 2021).

## **Justificación**

La etiología de la EM sigue siendo desconocida. Se han implicado factores genéticos y ambientales que inician una respuesta inmune anormal contra la cubierta de mielina de los nervios del SNC. La patogénesis de la EM inicia con la activación del linfocito T CD4<sup>+</sup>, que atraviesa la barrera hematoencefálica y desencadena una cascada inmunológica que incluye la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y macrófagos, entre otros. Para la activación del linfocito T es necesario el reconocimiento del complejo antígeno-MHC sobre la célula presentadora de antígeno por el TCR en la membrana del linfocito. El análisis sistemático del repertorio completo de TCR en los pacientes con EM comparando las fases de brote y en remisión y la tipificación de los alelos de HLA pueden proporcionar información valiosa sobre el antígeno disparador del episodio de brote en la EM. Debido a la enorme diversidad del repertorio de TCR la secuenciación de NGS constituye una herramienta invaluable para llevar a cabo este tipo de estudios.

## **Hipótesis**

Como resultado de la focalización de la respuesta inmune en respuesta a antígeno(s) disparadores el repertorio de TCR de los pacientes con EM en la fase de brote presentará un menor número de clonas de linfocitos T comparado con los mismos pacientes en la fase de remisión y con pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias.

La capacidad de los alelos de HLA de clase II de reconocer diferentes péptidos confiere una ventaja evolutiva; sin embargo, en un contexto inflamatorio, se puede presentar una gran cantidad de péptidos provenientes de proteínas propias que podrían desencadenar una respuesta autoinmune.

## **Objetivo general**

Comparar el repertorio de TCR en pacientes con EM en fase de brote y de remisión con los de pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias e individuos sanos, mediante NGS.

Comparar la posibilidad de unión con alta afinidad de los péptidos provenientes de herpesvirus y SNC con los alelos de pacientes con EM, pacientes con OENI e individuos sanos.

## **Objetivos específicos**

1. Separar las subpoblaciones de linfocitos T a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EM, pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias e individuos sanos.
2. Generar bibliotecas de cDNA a partir del RNA obtenido de las subpoblaciones de linfocitos T.
3. Amplificar y secuenciar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los linfocitos T.
4. Analizar el repertorio de TCR de los pacientes con EM en fase de brote y en fase de remisión, pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias e individuos sanos.
5. Tipificar los alelos de HLA de los integrantes de cada grupo de estudio a partir del DNA genómico obtenido de sangre periférica.
6. Analizar los epítomos provenientes de péptidos de herpesvirus y de proteínas del SNC que puedan ser reconocidos por los alelos de HLA exclusivos de EM, de OENI e IS.
7. Identificar los péptidos de VVZ, VEB, VHS-1, HHV-6A y SNC con mayor afinidad de unión a los alelos de HLA en todos los subgrupos de estudio.

## **Estrategia experimental**

### **Selección de pacientes y toma de muestra**

Los pacientes de EM fueron evaluados de acuerdo con los criterios de McDonald del 2010 (Polman et al., 2011) y, junto con los pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias, estudiados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (México, Ciudad de México). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y se solicitó el consentimiento informado de todos los participantes. Se colectó sangre periférica de 10 pacientes con EMRR durante la fase de brote y la fase de remisión y de 6 pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI). Se obtuvieron 9 ml de sangre por punción venosa, que fue almacenada en tubos estériles.

### **Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)**

La sangre fue mezclada con un volumen de PBS, colocada sobre 2 volúmenes de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich), y centrifugada a 2,000 rpm durante 20 minutos a 25°C, lo que permitió la separación en 4 fases: pastilla con el paquete eritrocitario, Histopaque-1077, concentrado de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y plasma. Se colectaron las CMSP con una micropipeta y se depositaron en otro tubo estéril. Se lavaron con PBS y el tubo se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 minutos a 25°C. Se realizó un segundo lavado con 1 mL de PBS. El botón celular fue resuspendido en 1 mL de buffer de separación (Miltenyi).

### **Conteo y evaluación de la viabilidad de las CMSP**

Se tomaron 10  $\mu$ L de la suspensión celular y se mezclaron con 40  $\mu$ L de azul tripano al 0.4%. Se cargaron 10  $\mu$ L en una cámara de Neubauer y se realizó el conteo celular en los 4 cuadrantes de los extremos. Se calculó el número de células totales con la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = \text{total de células contadas} \times 5 \times 10,000/4$$

### **Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>**

Las distintas poblaciones de linfocitos T fueron separadas utilizando perlas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos para cada población (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>). De acuerdo con los kits utilizados, se separaron primero los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

El botón de CMSP fue resuspendido en 80  $\mu\text{L}$  de buffer de separación y 20  $\mu\text{L}$  de perlas CD8 Microbeads (Miltenyi). Las células se incubaron en hielo durante 15 minutos, se lavaron con 1 mL buffer de separación y se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de buffer para su separación magnética en columnas MS (Miltenyi) acopladas a un separador magnético (Miltenyi). Las columnas se enjuagaron con buffer de separación antes de aplicar la suspensión celular. Se colectaron las células no retenidas en un tubo estéril, mientras que la población CD8<sup>+</sup> se quedó retenida en la columna. La columna se retiró del separador magnético, las células marcadas (linfocitos T CD8<sup>+</sup>) fueron eluidas con 1 mL de buffer y se mantuvieron en refrigeración.

Las células no retenidas fueron cuantificadas, resuspendidas en 40  $\mu\text{L}$  de buffer, se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de anticuerpo CD4 CD25 CD27<sup>dim</sup> T cell biotin cocktail (Miltenyi) y se incubaron en hielo durante 5 mL. Se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de buffer y 20  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-biotin Microbeads (Miltenyi) y se incubaron durante 10 minutos. Se ajustó el volumen a 500  $\mu\text{L}$  de buffer y se realizó la separación magnética.

La población CD4<sup>-</sup> se queda retenida en la columna magnética mientras que la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> son eluidos de la columna magnética por gravedad y colectados en un tubo estéril. Esta fracción enriquecida en linfocitos T CD4<sup>+</sup> se resuspendió en 90  $\mu\text{L}$  de buffer y 10  $\mu\text{L}$  de CD25 Microbeads y se incubó durante 15 minutos. Se lavó con buffer, se centrifugó durante 5 minutos a 2,000 RPM y el botón se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de buffer para su separación magnética. La población no retenida en la columna magnética corresponde a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, mientras que la población retenida en la columna MS corresponde a las células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), la cual fue recuperada aplicando presión con un embolo sobre la columna magnética colocada en tu tubo estéril

### **Identificación de poblaciones de linfocitos T por citometría de flujo**

Se utilizó un citómetro de flujo BD LSFortesa para identificar las distintas poblaciones y corroborar su pureza utilizando los anticuerpos monoclonales fluorocromados (BioLegend) de CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PB y CD25-APC específicos para cada población. La tinción se realizó agregando 1  $\mu\text{L}$  de anticuerpo por cada millón de células e incubando por 30 minutos a 4°C sin exposición directa a la luz. La compensación del citómetro de flujo se realizó con 6 tubos de citometría, cada uno con  $1 \times 10^6$  CMSP resuspendidas en 300  $\mu\text{L}$  de PBS y con el siguiente panel de tinción:



1. Células sin teñir. Células con tamaño y granularidad similar a linfocitos T
2. Ab. CD3-FITC. Linfocitos T
3. Ab. CD4-PE. Linfocitos T cooperadores
4. Ab. CD8-PB. Linfocitos T citotóxicos
5. Ab. CD25-APC. Linfocitos T reguladores
6. Ab. CD3, CD4, CD8 y CD25. Linfocitos T totales

Una vez que se ajustó la compensación del citómetro de flujo y antes de la separación magnética, se tomó una alícuota de CMSP de cada paciente, que se utilizó como fracción de pre-purificación. Esta fracción se resuspendió en 200  $\mu$ L de buffer y se repartió en 2 tubos de citometría de flujo con 100  $\mu$ L cada uno; en uno de los tubos no se incluyó ningún anticuerpo, mientras que en el segundo tubo se añadieron los anticuerpos descritos anteriormente. Después de centrifugar las 3 poblaciones separadas magnéticamente ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$  y  $CD4^+CD25^+$ ) se retiró el sobrenadante, se resuspendieron en 100  $\mu$ L de buffer MACS y se agregó 1  $\mu$ L de cada anticuerpo por cada millón de células, mientras que las células sin teñir sólo se resuspendieron en 300  $\mu$ L de buffer MACS. Los tubos fueron agitados en vórtex, se cubrieron de la luz y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Una vez incubados, a cada tubo se le agregó 1 mL de buffer MACS, se resuspendieron las células y se centrifugaron a 2,000 RPM durante 5 minutos 4°C. Por último, se retiró el sobrenadante, se agregaron 300  $\mu$ L de buffer MACS y se agitaron con vórtex.

### **Extracción de RNA de CMSP**

Se utilizó el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Se agregaron 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) por cada mililitro de buffer RLT Plus. La muestra descongelada fue resuspendida en 1 mL de PBS, centrifugada por 5 minutos a 1,000 rpm y el botón fue resuspendido en 600  $\mu$ L de Buffer RLT Plus. Se aplicó el lisado celular directamente sobre una columna QIAshredder spin column (Qiagen) colocada sobre un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó por 3 minutos a 16,000 rpm. El eluido fue transferido a una columna AllPrep DNA spin column colocada sobre un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó por 30 segundos a 16,000 rpm. La columna AllPrep DNA spin column se mantuvo a temperatura ambiente para la purificación de DNA. El eluido se usó para la purificación de RNA.

Se agregó un volumen (600  $\mu\text{L}$ ) de etanol al 70% al eluido y se mezcló con la pipeta. Se transfirieron 700  $\mu\text{L}$  de esta mezcla, incluyendo cualquier precipitado a una columna RNeasy spin column colocada sobre un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó por 15 segundos. El nuevo eluido fue desechado puesto que el RNA se retuvo en la columna. Si la mezcla de eluido y etanol excedía los 700  $\mu\text{L}$ , se centrifugaba el resto en la misma columna, descartando el eluido en cada centrifugación.

Se agregaron 350  $\mu\text{L}$  de Buffer RW1 a la columna RNeasy spin column y se centrifugó por 15 segundos a 16,000 rpm para lavar la columna. Se utilizó el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen) para eliminar los restos de DNA mezclando 10  $\mu\text{L}$  de la solución stock de DNasa I a 70  $\mu\text{L}$  del Buffer RDD. Esta mezcla (80  $\mu\text{L}$ ) se agregó directamente en la membrana de la columna y se incubó a temperatura ambiente (20-30°C) por 15 minutos. Se agregaron 350  $\mu\text{L}$  de Buffer RW1 a la columna RNeasy spin column y se centrifugó por 15 segundos a 16,000 rpm descartando el eluido. Se agregaron 700  $\mu\text{L}$  de Buffer RW1 a la columna RNeasy spin column y se centrifugó 15 segundos a 16,000 rpm. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Buffer RPE a la columna RNeasy spin column y se centrifugó 15 segundos a 16,000 rpm. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Buffer RPE a la columna RNeasy spin column y se centrifugó 2 minutos a 16,000 rpm.

La columna RNeasy spin column fue colocada en un tubo nuevo de recolección de 1.5 mL y se agregaron de 30 a 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa directamente en la membrana de la columna. Se centrifugó por 1 minuto a 16,000 rpm para eluir el RNA.

En muestras con menos de  $1 \times 10^6$  células se utilizó el kit Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Roche). Las células se centrifugaron a 3,000 x g por 5 minutos, la pastilla se resuspendió en 150  $\mu\text{L}$  de Extraction Buffer (XB) y se incubó a 42°C por 30 minutos. Se centrifugó a 3,000 x g por 2 minutos, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de etanol (EtOH) al 70%. Se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de Conditioning Buffer (CB) en la columna de purificación, se incubó la columna durante 5 minutos a temperatura ambiente, y la columna fue centrifugada en un tubo de recolección a 16,000 x g por 1 minuto. Se agregó la mezcla (células + EtOH) en la columna de purificación de RNA y se centrifugó durante 2 minutos a 100 x g, y se centrifugó de nuevo a 16,000 x g durante 30 segundos sin sacar la columna de la centrífuga. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de buffer Wash Buffer (W1) a la columna de purificación y se centrifugó por 1 minuto a 8,000 x g.

Se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de DNase I Stock Solution + 35  $\mu\text{L}$  de Buffer RDD a la columna y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 40  $\mu\text{L}$  del buffer PicoPure RNA Kit Wash Buffer 1 (W1) y se centrifugó a 8,000 x g por 15 segundos. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de buffer Wash Buffer 2 (W2) se centrifugó por 1 minuto a 8,000 x g. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  buffer Wash Buffer 2 (W2) y la columna se centrifugó por 2 minutos a 16,000 x g; sin sacar los tubos de la centrifuga, se centrifugó a 16,000 x g durante 1 minuto.

La columna se colocó en un tubo de 1.5 mL y se agregaron 11  $\mu\text{L}$  de Elution Buffer (EB) directamente en la columna. Se incubó la columna durante 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó por 1 minuto a 1,000 x g y se realizó una segunda centrifugación por 1 minuto a 16,000 x g para eluir el DNA.

### **Cuantificación de la concentración de RNA**

Se utilizó el equipo TapeStation System 2200 (Agilent) con la cinta Agilent High Sensitivity RNA ScreenTape (Agilent) mezclando 1  $\mu\text{L}$  de High Sensitivity RNA Sample Buffer con 2  $\mu\text{L}$  de RNA.

### **Síntesis de cDNA**

Se utilizó el kit SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech).

Se agregaron los siguientes reactivos en un tubo de PCR:

1-3 $\mu\text{L}$	RNA (0.05-1.0 $\mu\text{g}$ de RNA total)
0-2 $\mu\text{L}$	ddH <sub>2</sub> O
1 $\mu\text{L}$	SMART IV Oligonucleotide
1 $\mu\text{L}$	CDS III/3' Primer
5 $\mu\text{L}$	Volumen total

Se mezclaron con la pipeta, se centrifugaron brevemente y se incubaron a 72°C por 2 minutos y a 4°C por 2 minutos.

Se centrifugó brevemente y se agregaron los siguientes reactivos en el mismo tubo de PCR:

2 $\mu\text{L}$	5x First-Strand Buffer
1 $\mu\text{L}$	20 mM DTT
1 $\mu\text{L}$	10 mM dNTP Mix
1 $\mu\text{L}$	SMARTScribe MMLV Reverse Transcriptase
5 + (5) $\mu\text{L}$	Volumen total

Se mezclaron con la pipeta y se centrifugaron brevemente.

Se incubaron a 42°C por una hora, después a 4°C para terminar la síntesis de la primera hebra (First-strand cDNA).

Se agregaron los siguientes reactivos en un tubo nuevo de PCR:

2 µL	First-strand cDNA
25 µL	Q5 High-Fidelity 2x Master Mix
1 µL	5' PCR Primer
1 µL	CDS III/2' Primer
21 µL	ddH <sub>2</sub> O
50 µL	Volumen total

Los tubos se centrifugaron y se realizó la reacción de PCR con las siguientes condiciones:

95°C	20 s	20 ciclos
95°C	5 s	
68°C	6 min	
4°C	∞	

### **Purificación de cDNA**

La purificación de cDNA se llevó a cabo utilizando las perlas AMPure XP Beads (Beckman) y una base magnética de 96 pozos DynaMag™-96 Side Magnet (ThermoFisher Scientific). Se agregó un volumen (50 µL) de AMPure XP Reagent a cada tubo, se mezcló con micropipeta y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se colocaron en la base magnética y se incubaron por 5 minutos. Una vez que el DNA es retenido por las perlas magnéticas, la fracción líquida se retiró con una micropipeta de 200 µL sin quitar los tubos de la base y se agregaron 200 µL de etanol al 80%, este paso se realizó dos veces. Se retiró la mayor cantidad de etanol con una micropipeta de 200 µL, el resto con una micropipeta de 20 µL y se dejó secar al aire por 2 minutos con la tapa abierta. Los tubos se retiraron de la base magnética, se agregaron 25 µL de Buffer TE bajo en EDTA (Fisher Scientific) en cada uno, se mezclaron con micropipeta y se incubaron por 1 minuto. Se colocaron de nuevo en la base magnética e incubaron por 1 minuto o hasta que el sobrenadante fuera claro. Por último, de cada tubo se transfirieron 23 µL del sobrenadante como cDNA purificado a un nuevo tubo de PCR sin tocar la fracción sólida que se depositó en el fondo del tubo.

## Amplificación por PCR (Fusion PCR)

Cada cadena fue amplificada por separado; es decir, de cada paciente se hicieron dos reacciones, una para amplificar TCR $\alpha$  y otra para TCR $\beta$ .

Se agregaron los siguientes reactivos a un tubo nuevo de PCR:

25 $\mu$ L	Q5 High-Fidelity 2x Master Mix
5 $\mu$ L	cDNA
1 $\mu$ L	10 $\mu$ M Forward Primer (Smart adaptor)
1 $\mu$ L	10 $\mu$ M Reverse Primer (TCR $\alpha$ o $\beta$ )
18 $\mu$ L	ddH <sub>2</sub> O
50 $\mu$ L	Volumen total

Se mezclaron, centrifugaron y se realizó la reacción de PCR con las siguientes condiciones:

94°C	3 min	20 ciclos
94°C	30 s	
65°C	30 s	
72°C	1 min	
4°C	$\infty$	

## Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR de fusión se llevó a cabo utilizando la metodología para purificar el cDNA con la única diferencia de que se agregaron 35  $\mu$ L de buffer TE y se recuperaron los productos purificados en 33  $\mu$ L de buffer TE.

## Cuantificación de la concentración de los productos de PCR

Para la cuantificación de la concentración de los productos de PCR se utilizó el equipo TapeStation System 2200 con la cinta Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent) mezclando 2  $\mu$ L de High Sensitivity D1000 Sample Buffer y 2  $\mu$ L de muestra.

## Selección de tamaño del producto de PCR

Se utilizó el equipo Pippin Prep (Sage Science) con los cassettes 2% Agarose, dye-free, w/int stds, Pippin Prep.100-600bp (Sage Science) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra de DNA se ajustó a un volumen de 30  $\mu$ L con Buffer TE. Por cada 30  $\mu$ L de muestra, se agregaron 10  $\mu$ L de solución de carga/marcador (Marker L). Transcurrido el tiempo del protocolo (aproximadamente 4 horas), se agregaron 20  $\mu$ L de buffer TE al pozo para lavarlo y recuperar el DNA con el tamaño seleccionado.

## Purificación de productos de PCR seleccionados

La purificación del producto de PCR seleccionado se llevó a cabo utilizando las perlas AMPure XP Beads, Beckman, obteniendo un volumen final de 13  $\mu\text{L}$  del producto purificado.

## Índex PCR

Se agregaron los siguientes reactivos en un tubo de PCR:

25 $\mu\text{L}$	2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix
5 $\mu\text{L}$	Nextera XT Index 1 primer (N7XX) ~Forward
5 $\mu\text{L}$	Nextera XT Index 2 primer (S5XX) ~Reverse
10 $\mu\text{L}$	ddH <sub>2</sub> O
5 $\mu\text{L}$	Producto de PCR
50 $\mu\text{L}$	Volumen total

Para cada cadena de TCR ( $\alpha$  y  $\beta$ ) se utilizó un primer distinto. Por ejemplo: N701 – S505 para TCR $\alpha$  y N702 – S506 para TCR $\beta$ . Se mezcló y centrifugó cada tubo. Se realizó reacción de PCR con las siguientes condiciones:

95°C	3 min	8 ciclos
95°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	
4°C	$\infty$	

## Purificación de productos de Índex PCR

La purificación del producto de índex PCR se llevó a cabo siguiendo los mismos pasos que la purificación de los productos de PCR seleccionados.

## Cuantificación de la concentración de los productos de Índex PCR

Se utilizó el equipo TapeStation System 2200 con la cinta Agilent D1000 ScreenTape (Agilent) mezclando 3  $\mu\text{L}$  de D1000 Sample Buffer y 1  $\mu\text{L}$  de muestra. Las muestras fueron diluidas para tener una concentración 4nM.

## qPCR

Se utilizó el equipo Viiia7, Appied Biosystems. Los productos de Índex PCR de todos los pacientes se colocaron en un solo tubo (pooled library) y se ajustaron a una concentración de 10 pM. Se agregaron los siguientes reactivos a un tubo nuevo de PCR:

5 $\mu$ L	SYBR Master Mix
0.1 $\mu$ L	10 $\mu$ M Illumina Primer Mix
2.9 $\mu$ L	ddH <sub>2</sub> O
2 $\mu$ L	10 pM pooled library
10 $\mu$ L	Volumen total

Se preparó el estándar PhiX (Illumina) en las siguientes concentraciones: 40  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2.5, 1.25  $\mu$ M y 0.625  $\mu$ M. Se mezcló y se centrifugó. Se realizó la reacción de qPCR con las siguientes condiciones:

50°C	2 min	30 ciclos
95°C	2 min	
95°C	15 s	
60°C	1 min	
+ curva de fusión (melting)		

### **Secuenciación de las muestras**

Las muestras mezcladas en un solo pool fueron secuenciadas utilizando un cartucho MiSeq Reagent v3 600-cycles kit (Illumina) en la configuración de lectura pareada de 300 pares de bases con un equipo MiSeq System (Illumina).

### **Análisis de los resultados de la secuenciación del TCR**

Los repertorios de TCR fueron analizados usando el algoritmo Tcrip (T cell receptor immuno-profiler) el cual mapea cada lectura con una secuencia de referencia obtenida de la base de datos IMGT (the international ImMunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>), identificando los segmentos génicos del TCR (V, D, J y C) y las regiones determinantes de complementariedad 3 (CDR3) de cada paciente.

### **Análisis estadístico**

Se realizó una prueba de normalidad de D'Agostino a todos los datos. Los datos que pasaron la prueba de normalidad fueron analizados mediante la prueba de t de Student y aquellos que no pasaron la prueba, se analizaron con la prueba de los rangos de los signos de Wilcoxon considerando el valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

El índice de diversidad (DI) de las combinaciones únicas de secuencias de CDR3 fue calculado usando el inverso del índice de Simpson:

$$DI = \left[ \frac{\sum_{i=1}^K n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \right]^{-1}$$

Donde  $K$  es el número total de clonotipos,  $n_i$  es el número de secuencias de clonotipos que pertenecen a  $i$ , y  $N$  es el número total de secuencias por las cuales cada clonotipo es determinado.

### **Extracción de DNA de sangre periférica**

La extracción de DNA genómico se realizó con el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). En un tubo cónico de 1.5 mL se agregaron 20  $\mu$ L de proteinasa K, 200  $\mu$ L de sangre periférica y 200  $\mu$ L de buffer AL, se mezcló por vórtex por 15 segundos y se incubó a 56°C por 10 minutos. Después de la incubación, cada tubo se centrifugó brevemente, se agregaron 200  $\mu$ L de etanol absoluto y se mezclaron por vórtex por 15 segundos. Con una micropipeta se tomó el contenido del tubo y se agregó a una columna DNeasy spin column contenida en un tubo de recolección y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto. Se agregaron 500  $\mu$ L de buffer AW1 a la columna y se centrifugó el tubo a 8,000 rpm por 1 minuto. Se retiró el tubo de recolección que contenía los desechos y la columna se colocó un tubo de recolección nuevo. Se agregaron 500  $\mu$ L de buffer AW2 a la columna y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos. Se retiró el tubo de recolección que contenía los desechos y la columna se colocó un tubo de recolección nuevo. Para retirar la mayor cantidad de residuos, la columna se colocó en un tubo de recolección nuevo y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Se retiró la columna del tubo de recolección evitando que la columna tocara las paredes y se colocó en un tubo cónico de 1.5 mL nuevo. Se agregaron 50  $\mu$ L de buffer AE en la columna y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Cada tubo se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto. Para aumentar el rendimiento de obtención de DNA, el contenido del tubo cónico se agregó de nuevo en la columna, se colocó en el mismo tubo cónico, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto. Cada muestra fue analizada con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific) para determinar la concentración y la pureza, en el pedestal inferior se colocó 1  $\mu$ L del ADN obtenido previamente y se seleccionó la aplicación de ácidos nucleicos desde el software del equipo. Las muestras que tuvieran un valor aproximado de 1.8 en el rango de absorbancia de 260/280 y 260/230 se consideraron como puras. Posteriormente fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.



## **Tipificación de HLA**

Se realizó la tipificación de alta resolución (3 campos) de HLA clase II (DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1: exones 1-4) utilizando una plataforma de secuenciación de alto rendimiento basada en amplicones (Cisco Genetics, Inc., Seattle, Washington). Se incluyó en el análisis un conjunto de datos de alelos DQ y DR de diez individuos mexicanos sanos (HI) publicados por Pérez-Saldívar (Pérez S et al., 2015).

## **Predicción *in silico* de la unión de MHC-II y predicción de epítomos de anticuerpos**

Los genomas completos de EBV, VZV HHV-1 y HHV-6A separados en marcos de lectura abiertos (ORF) (GCF\_002402265.1, GCF\_000858285.1, GCF\_000859985.2 y KP257584.1, respectivamente) y las siguientes proteínas del SNC: 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (P09543), proteína de unión a ácidos grasos 7 (O15540), molécula de adhesión celular de hepatocitos (Q14CZ8), glicoproteína asociada a mielina (P20916.1), proteína básica de mielina (AAC41944.1), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (CAA52617.1), proteína básica de oligodendrocitos asociada a mielina (Q13878), proteína proteolipídica (AAA60117.1), procinética-2 (Q9HC23), reticulón-3 (O95197), proteína S100- $\beta$  (P04271), proteína de ensamblaje de cubierta de clatrina AP180 (O60641) y la transaldolasa (P37837) se descargaron del NCBI.

Las predicciones de unión de MHCII se realizaron utilizando el software NetMHCIIpan (ver. 4.1) de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) como se describe en la ref. (Reynisson et al., 2020). La predicción de epítomos se realizó en los genomas y proteínas utilizando la herramienta de predicción de epítomos de anticuerpos proporcionada por la plataforma IEDB (Base de datos de epítomos inmunes y recursos de análisis).

## Resultados

### Grupos de estudio

El estudio incluyó diez pacientes con esclerosis múltiple (EM), seis pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI) y diez individuos sanos (IS) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de pacientes con EM, pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias (OENI) e individuos sanos (IS).

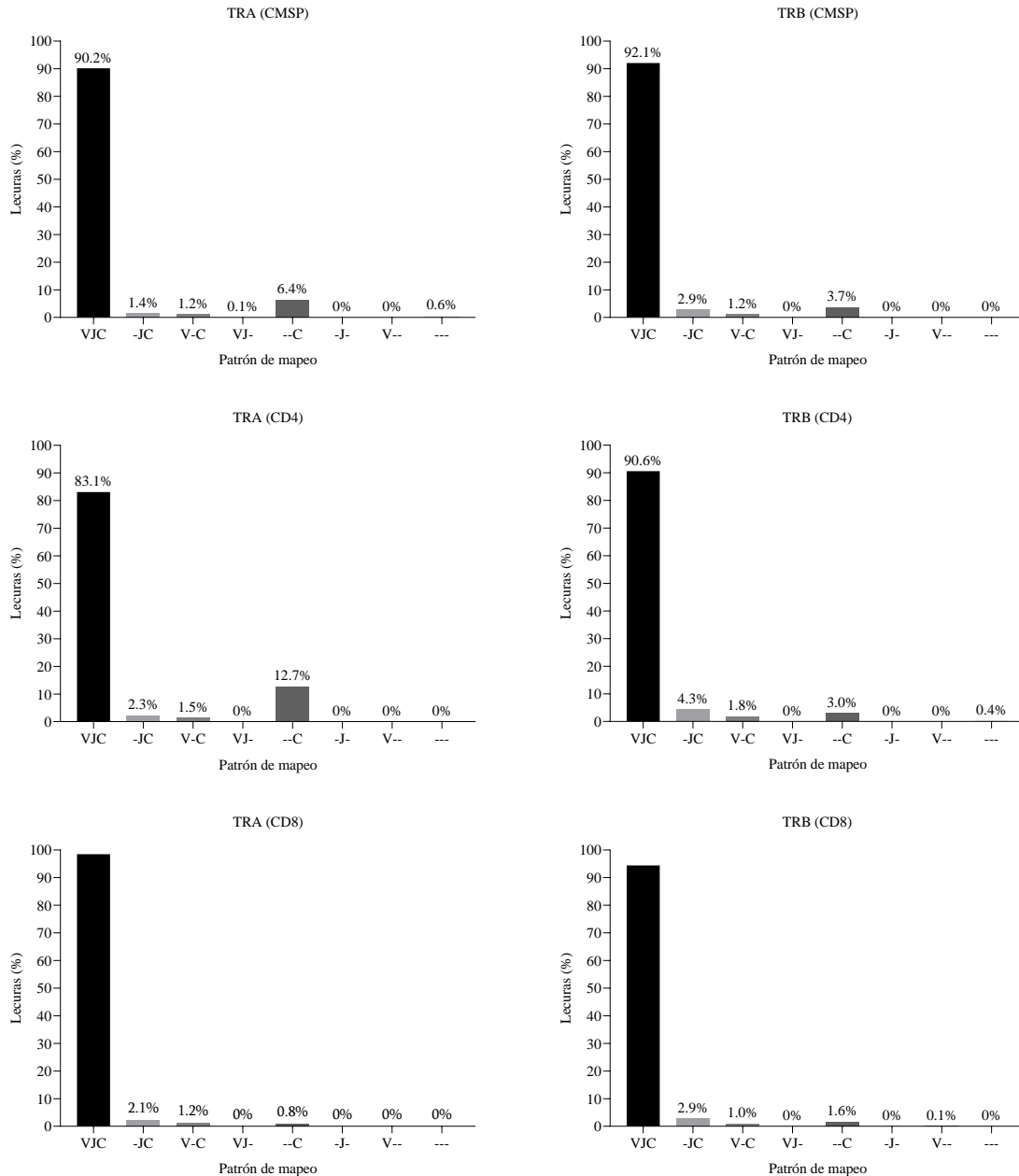
Características	EM	OENI	IS
Edad <sup>a</sup>	31 ± 10	36 ± 15	28 ± 3
Sexo (M/F)	4/6	2/4	5/5
Evolución (años) <sup>a</sup>	8 ± 8	NA	NA
Brotos/año <sup>a</sup>	1.5 ± 1	NA	NA
EDSS <sup>a</sup>	4±2.1	NA	NA

<sup>a</sup> Datos mostrados como la media ± desviación estándar; EDSS, Escala Ampliada de Estado de Discapacidad; NA, no aplicable

### Datos de secuenciación

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 10 pacientes con EM (en fase de brote y de remisión), 6 pacientes OENI y 10 IS y se realizó la secuenciación de alto rendimiento de las cadenas alfa y beta del TCR. Para la cadena alfa, se obtuvieron un total de 16,051,255 lecturas con un promedio de 433,818 lecturas por paciente. Del total de lecturas, 13,226,594 pertenecen a la región CDR3 (V-J-C) con un promedio de 357,476 lecturas por paciente. Para la cadena beta se obtuvieron 12,457,659 lecturas totales con un promedio de 336,693 lecturas por paciente, 8,803,918 lecturas totales de la región CDR3 con un promedio de 237,944 lecturas por paciente (**Figura 10**).

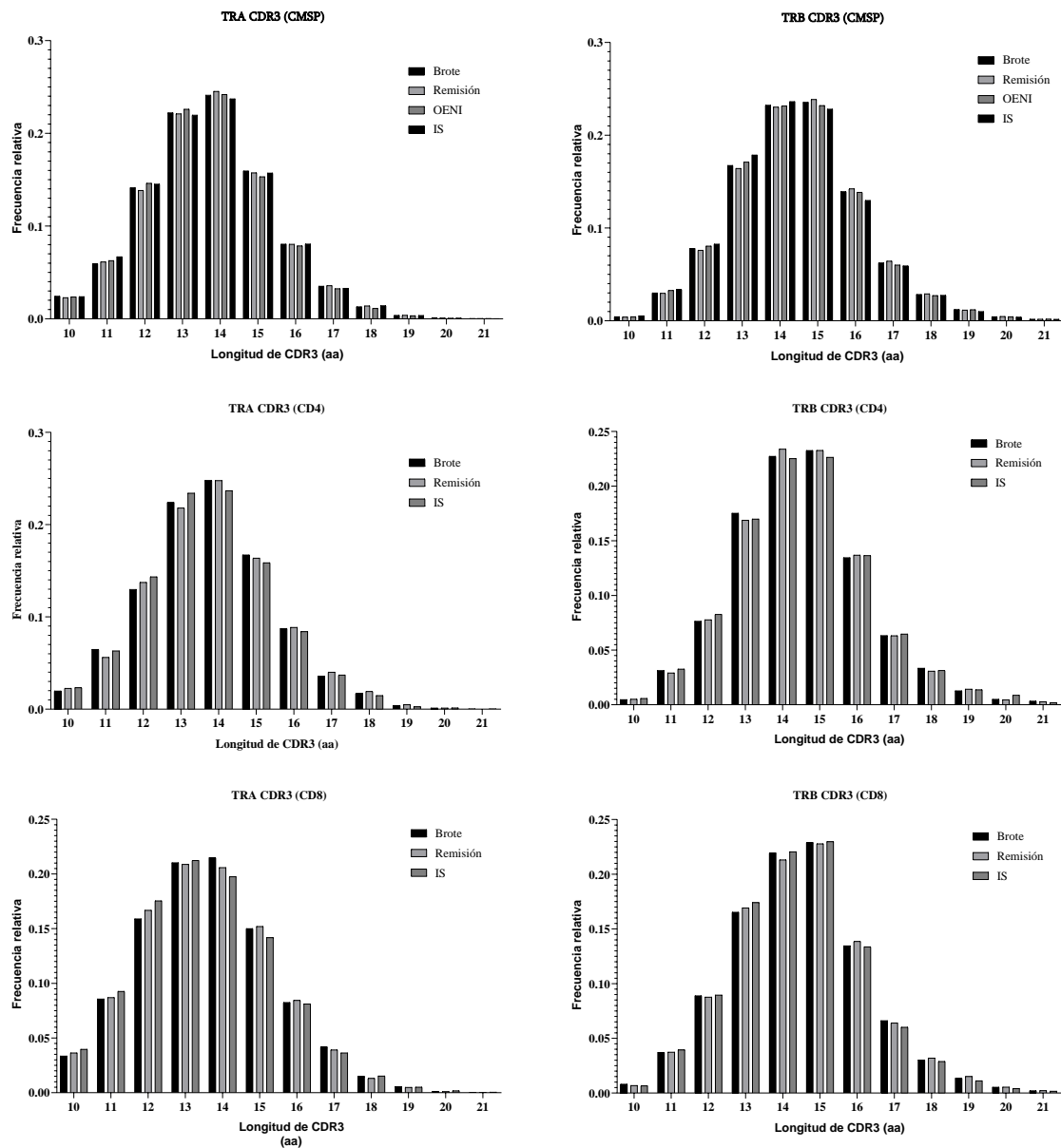
Entre todos los pacientes se observaron 57 genes V y 13 genes J pertenecientes a la cadena beta, con un promedio de 54 genes V, siendo el mínimo número observado 44 genes y el máximo 57 y todos los pacientes presentaron 13 genes J. Para la cadena alfa, se observaron 45 genes V y 53 genes J entre todos los pacientes, con un promedio de 43 genes V y 53 genes J, con rangos máximos y mínimos de 41 a 45 y 49 a 55 respectivamente.



**Figura 10.** Mapeo representativo de la secuenciación de alto rendimiento de las cadenas alfa y beta del TCR a partir de CMSP. El mayor porcentaje de lecturas se realizó sobre los segmentos VJC de ambas cadenas.

### Longitud de segmentos CDR3

Para determinar si la fase de la EM puede influir en la diversidad de los repertorios, se analizó la longitud de los segmentos CDR3 de cada grupo, sin encontrar diferencias significativas en la distribución de la longitud de los segmentos (**Figura 11**).

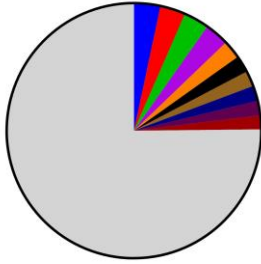


**Figura 11.** Distribución de longitud del segmento CDR3. La longitud de los segmentos CDR3 (aa) para ambas cadenas no presenta una diferencia significativa entre los 3 grupos.

### Expansión clonal del repertorio de TCR.

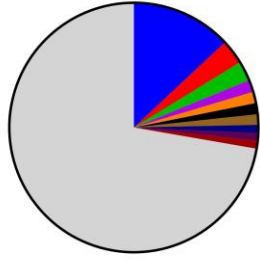
Se secuenció el repertorio de TCR de cada paciente y se obtuvo el número total de lecturas de todos los CDR3, mediante el cual se calculó su frecuencia relativa. Las diez CDR3 más frecuentes de cada paciente fueron identificadas (Figura 12). Durante la fase de exacerbación observamos que los diez CDR3 más frecuentes representan del 20 al 25% del repertorio total mientras que, durante la fase de remisión los 10 CDR3 más frecuentes representan del 10 al 15% del repertorio de TCR.

TRA (CMSP) Re1 184



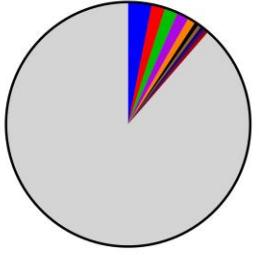
- CAVDDYKLSF
- CADPPGGYNKLIIF
- CAVNPSGGSNYKLTFF
- CAVGVYNFNKFYF
- CAENAPQAAGNKLTFF
- CAVRPTGNQFYF
- CAARLGGSQGNLIF
- CATRALSGGSNYKLTFF
- CAVGGLGGGNKLTFF
- CALSASGGSYIPTF
- Otras

TRB (CMSP) Re1 184



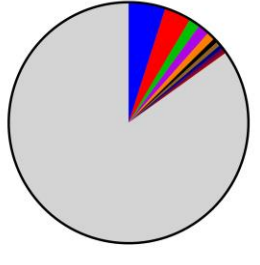
- CASSTFLAGGADTQYF
- CASSSGTFGNTIYF
- CASSLGGDPYNEQFF
- CASSLGGPRGYNEQFF
- CASSLTTREQYF
- CASTPVSTYEQYF
- CSVEPGSTDTQYF
- CATGPANTEAFF
- CSARDQTHWGYTF
- CASSLGPLAGGTDQYF
- Otras

TRA (CMSP) Rem 184



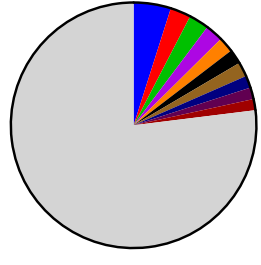
- CAVNPSGGSNYKLTFF
- CADPPGGYNKLIIF
- CAVRDKRYSSASKIIF
- CAALRAGNNRKLIIW
- CAVEKGNFGNEKLTFF
- CAASPERGGGTSYGKLTFF
- CAVGVYNFNKFYF
- CAVTIQGGSYIPTF
- CALSGSYNFNKFYF
- CAVMDSNYQLIIW
- Otras

TRB (CMSP) Rem 184



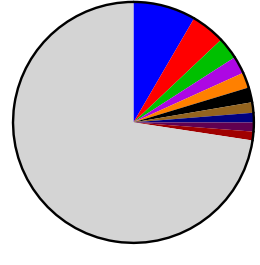
- CASSLGGDPYNEQFF
- CASSYYARGTNSPLHF
- CASSLYRKQGEREKLFF
- CASGKGGQPQHF
- CASTPVSTYEQYF
- CASSLQSKTQYF
- CASSGHNEQFF
- CASGGYGYTF
- CASSQDAGNTEAFF
- CASNPLARFTYQTGELFF
- Otras

TRA (CMSP) OENI 270



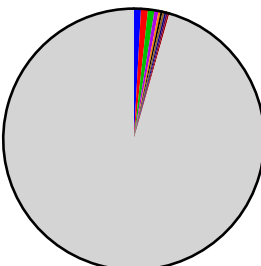
- CAVRGASGGSYIPTF
- CVVTPGDDKIIF
- CAAPPAGGFKTIIF
- CVRRTDKLIIF
- CATDGNTGNQFYF
- CAATNARLMF
- CIVRPTDSWGKLQF
- CAAVARNNAGNMLTF
- CVVNPGRSGGYQKVTF
- CAVVTTDSWGKLQF
- Otras

TRB (CMSP) OENI 270



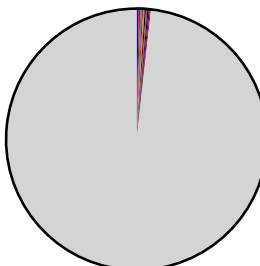
- CASSSTVAGGENIQYF
- CASSPPGPTYEQYF
- CASWVTSHEQFF
- CAITHSEAGEAFF
- CAIRPGQTSVEQYF
- CASSLDWRGNTHYNEQFF
- CATSRLAGETQYF
- CSATEGGDNQPQHF
- CSAITDSRVEQYF
- CASSKAELLSYEQYF
- Otras

TRA (CMSP) HC 006

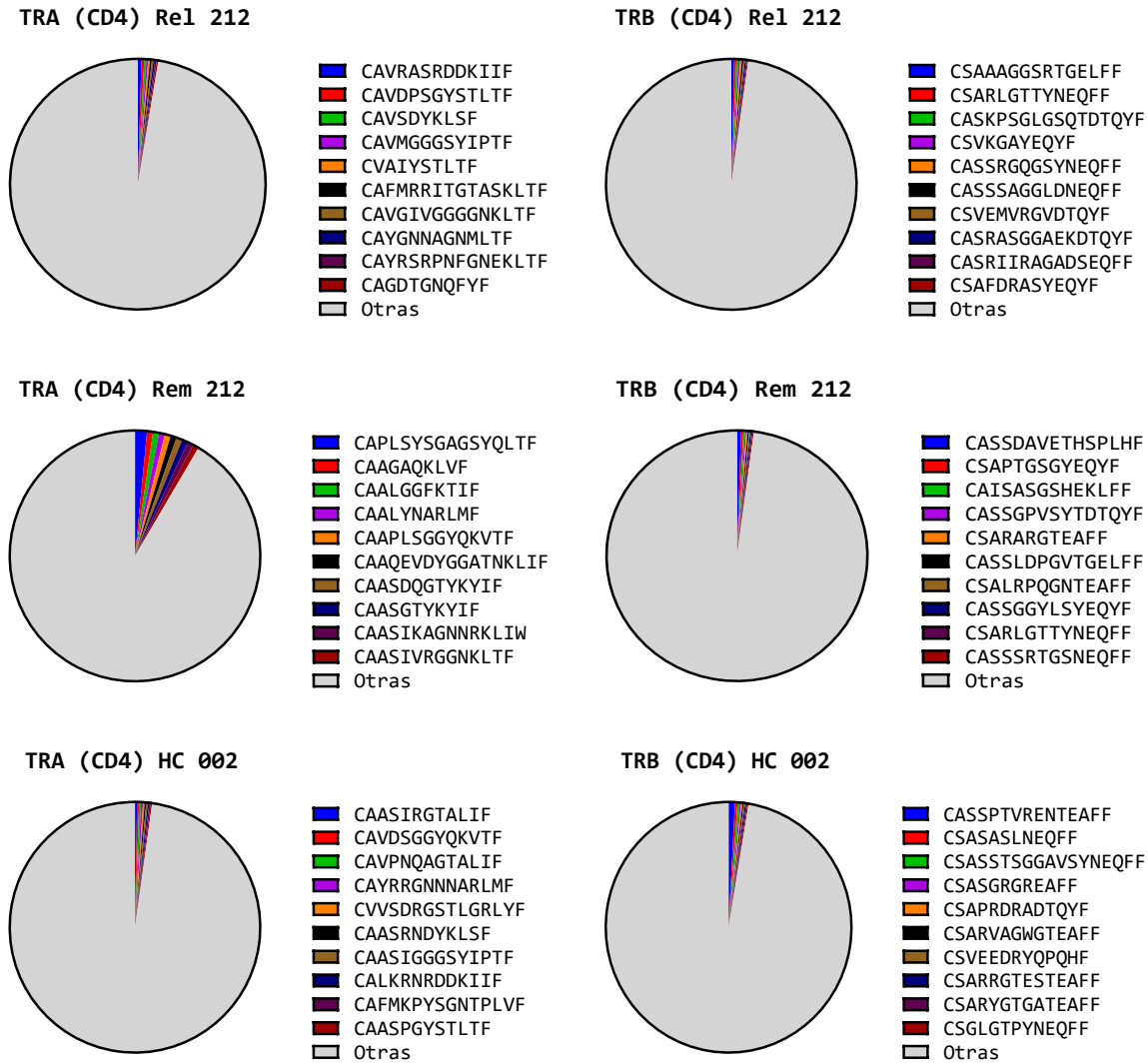


- CAVMDSNYQLIIW
- CVVSDRGSTLGRLYF
- CAVRDSNYQLIIW
- CAVMSSYKLIIF
- CAAMDSNYQLIIW
- CAVLTTDSWGKLQF
- CAVLDSNYQLIIW
- CAVPPTGNQFYF
- CAPMDSNYQLIIW
- CAVKDSNYQLIIW
- Otras

TRB (CMSP) HC 006



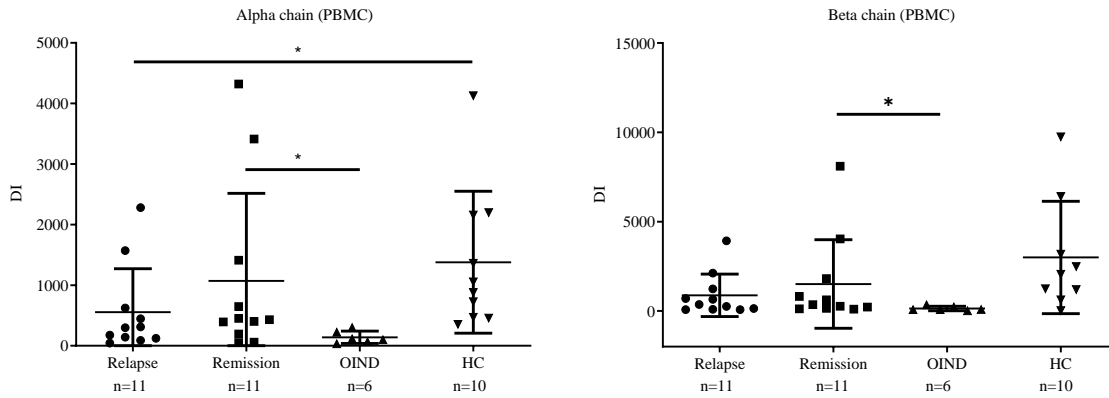
- CASSSDSYEQYF
- CSARLAIEYEQYF
- CASSSQGYEQYF
- CSASVLAGGPNEQFF
- CSVEDLRTGNYGTYF
- CSAREREVEQFF
- CASSHGSEYQYF
- CSARGGLQSETQYF
- CSARDGVVEYQYF
- CAMTPGGTGELFF
- Otras



**Figura 12.** Expansión clonal del repertorio de TCR. Porcentaje que representa cada clona dentro del repertorio de TCR de cada paciente. En colores se muestran las 10 clonas más frecuentes.

## Diversidad del repertorio de TCR

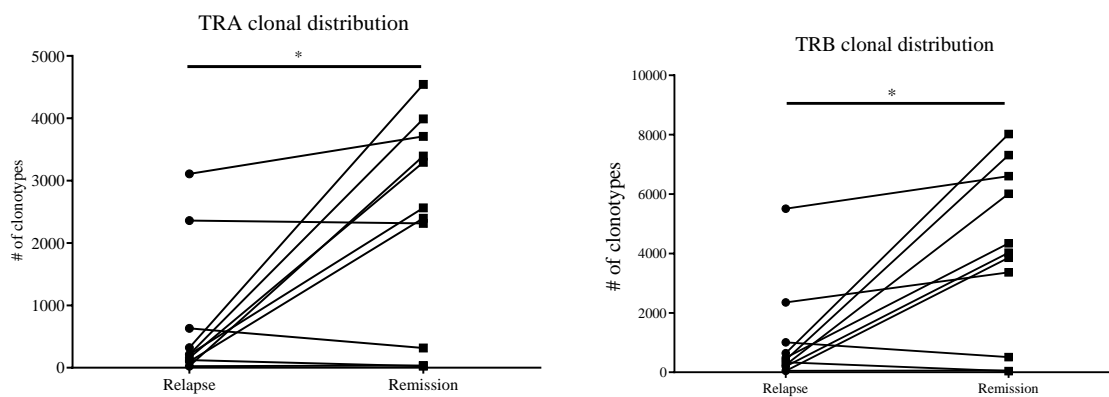
Se calculó el índice de diversidad (inverso del índice de Simpson) del repertorio de TCR de cada paciente y se comparó entre los grupos Brote, Remisión, OENI e IS. Para la cadena alfa sólo observamos una diferencia significativa ( $p=0.0127$ ) entre el grupo Brote ( $554.8 \pm 716$ ) y el grupo IS ( $1,379 \pm 1,171$ ) y entre el grupo Remisión ( $1,071 \pm 1,445$ ) y el grupo OENI ( $139.6 \pm 101.5$ ). Los resultados de la cadena beta mostraron una diferencia significativa ( $p=0.0145$ ) en el índice de diversidad entre los grupos Remisión ( $1,507 \pm 2,480$ ) y OENI ( $136.5 \pm 123.8$ ) (**Figura 13**).

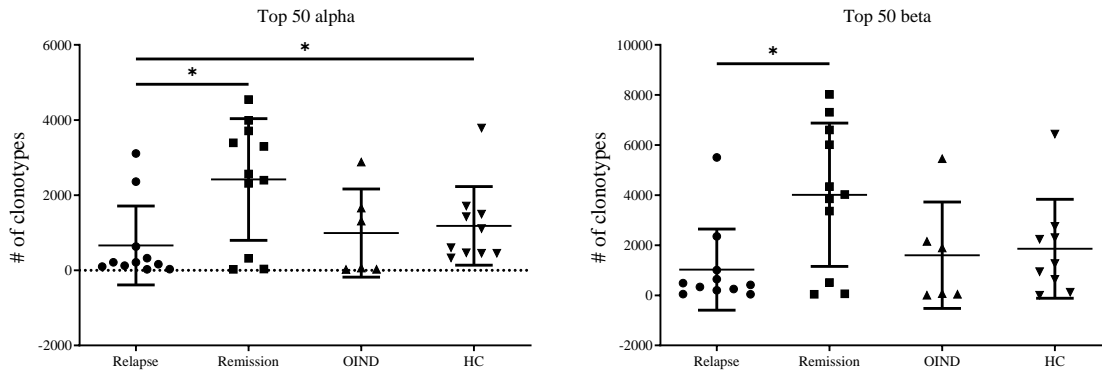


**Figura 13.** Índice de diversidad de repertorios de TCR.

### Distribución clonal del TCR

Debido a que no existe una diferencia significativa entre el índice de diversidad de ambas condiciones, se calculó la expansión clonal del repertorio del TCR mediante la distribución de los segmentos CDR3. Los resultados demuestran que el 50% del repertorio está compuesto por un menor número de clonas para ambas cadenas en la fase exacerbación con una diferencia significativa de  $p = 0.0336$ , con un promedio de 662 clonas en la fase de brote y 2,417 en la fase de remisión para la cadena alfa, mientras que para la cadena beta se observan 1027 y 4,014 clonas con una diferencia significativa de  $p = 0.098$  respectivamente (**Figura 14**).

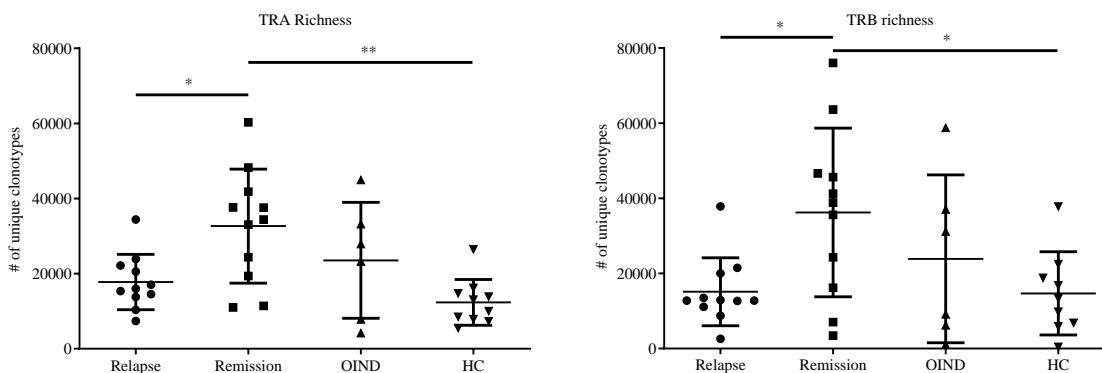




**Figura 14.** Distribución de los segmentos CDR3. El 50% del repertorio de TCR está compuesto por un menor número de clonas en la fase de brote (662 clonas para la cadena alfa y 1,027 para la cadena beta) comparado con la fase de remisión (2,417 TRA y 4,014 TRB).

### Riqueza del repertorio de TCR

La riqueza (número de clonas únicas) fue menor con una diferencia significativa para ambas cadenas (TRBA,  $p = 0.0015$  y TRB,  $p = 0.0192$ ) en la fase de brote comparados con la fase de remisión. También se observó una diferencia significativa entre la riqueza del grupo Remisión y la riqueza del grupo IS para ambas cadenas (**Figura 15**).

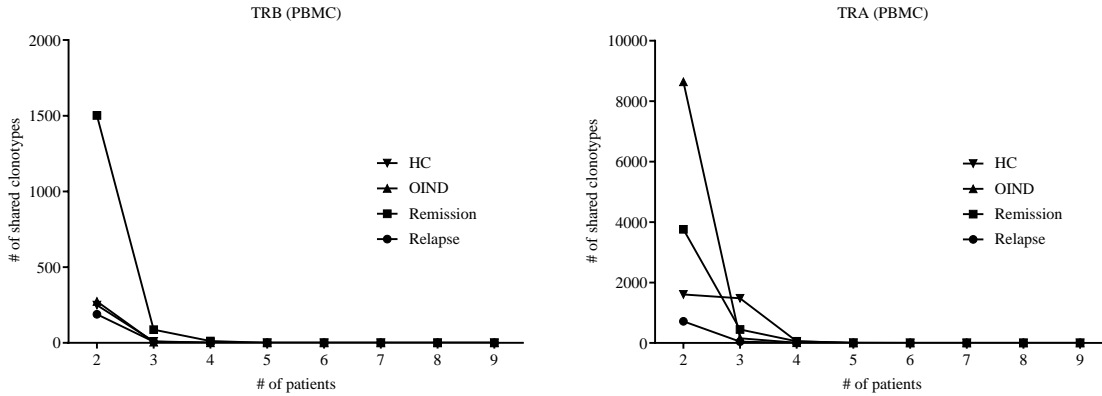


**Figura 15.** Clonotipos únicos. No solo hay un menor número de clonotipos totales en la fase de brote de ambas cadenas, también se observa un menor número de clonotipos únicos (riqueza) comparado con los mismos pacientes durante la fase de remisión.

### Clonotipos compartidos

Una vez que se separaron los clonotipos únicos de cada condición, se determinó cuántos y cuáles clonotipos se compartían entre al menos dos pacientes en ambas fases de la enfermedad y para ambas cadenas del receptor (**Figura 16**). Para la cadena alfa, se comparten entre al menos dos pacientes en fase de exacerbación 716 clonotipos únicos, mientras que durante la fase de remisión 3,760 son compartidos. Para la cadena beta, se comparten 189 clonotipos en la fase de brote y 1,502 en la fase de remisión.

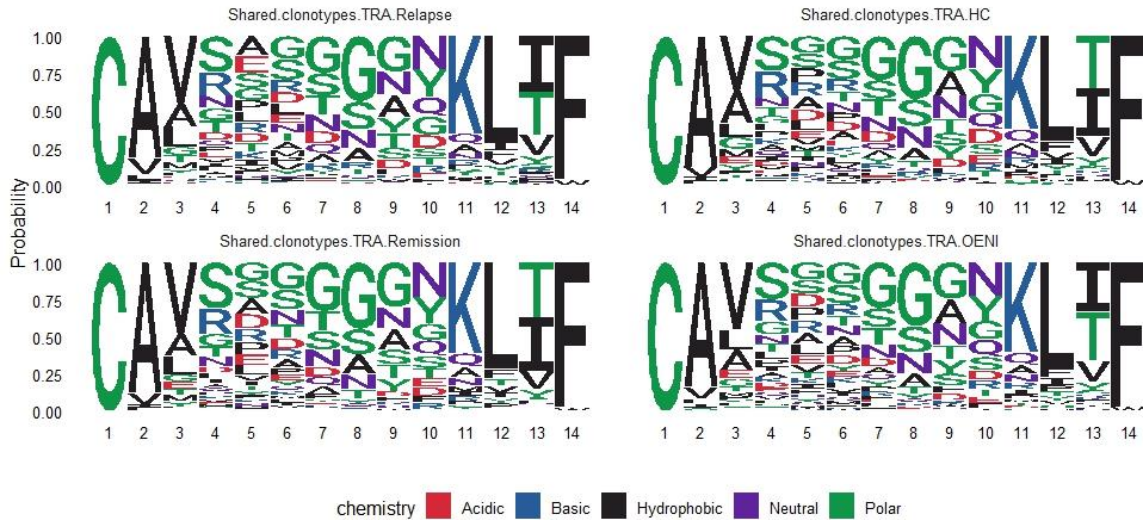


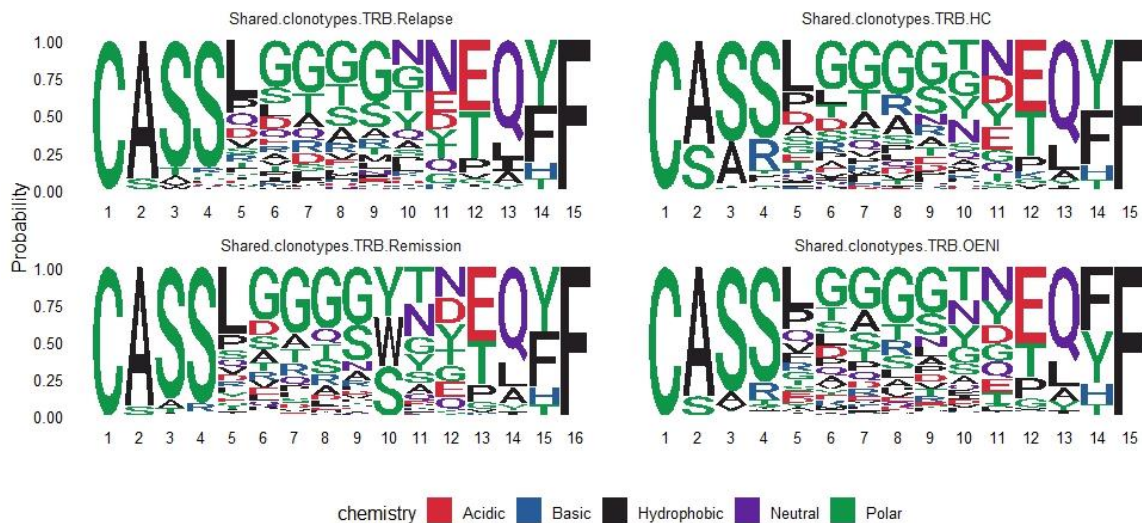


**Figura 16.** Clonotipos compartidos. El número de clonas compartidas entre pacientes es menor en los pacientes con EM durante la fase de exacerbación en comparación de los mismos pacientes durante la remisión y de los pacientes OENI e individuos sanos.

### Logos de secuencias de clonotipos compartidos

Para buscar la presencia de algún patrón entre los segmentos CDR3 de cada condición, se realizó un logo de secuencia de cada grupo. Se seleccionó la longitud de CDR3 más frecuente de cada grupo para realizar el logo (**Figura 17**). Los logos de los grupos Brote y Remisión, presentan una frecuencia relativa de aminoácidos diferente en la posición 5 de la cadena  $\alpha$  (cambio de una Alanina por una Guanina) y en la posición 10 de la cadena  $\beta$ .



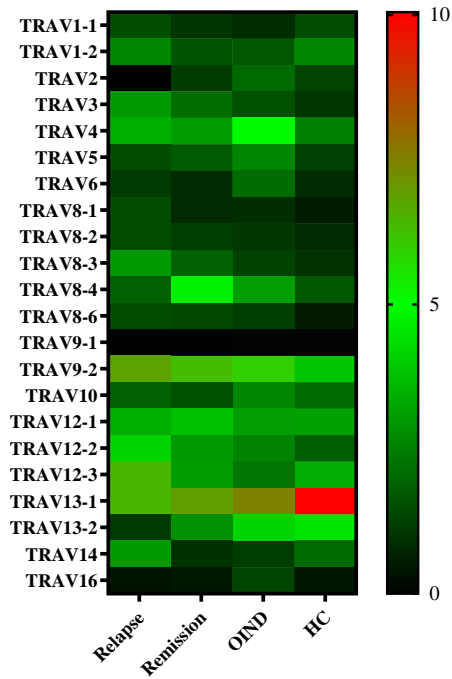


**Figura 17.** Logos de secuencias de clonas compartidas. Se realizaron logos de secuencia a partir de los clonotipos compartidos entre grupos. No se observaron diferencias entre los logos de los grupos Remisión, OENI e IS, sin embargo, entre los grupos Brote y Remisión se presentan cambios de aminoácidos.

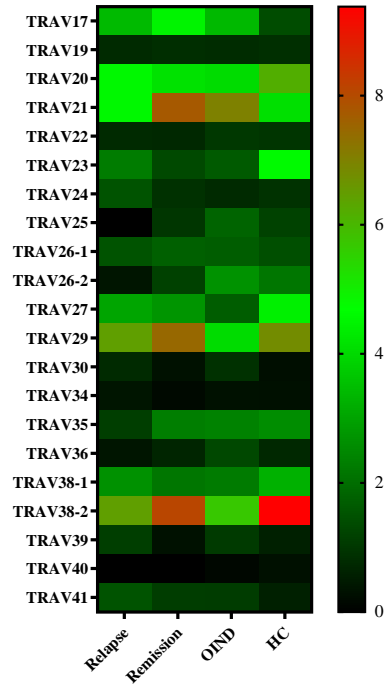
### Uso de segmentos de unión y variables.

Con el objetivo de identificar qué segmentos de unión y variabilidad de ambas cadenas del TCR están presentes en cada grupo, se calculó la frecuencia relativa de 43 segmentos  $V\alpha$  y  $V\beta$ , 52 segmentos  $J\alpha$  y 13 segmentos  $J\beta$  (**Figura 18**). No se encontró una diferencia significativa en la frecuencia relativa entre los cuatro grupos; sin embargo, sí podemos observar una tendencia a favorecer el uso de algunos segmentos en particular.

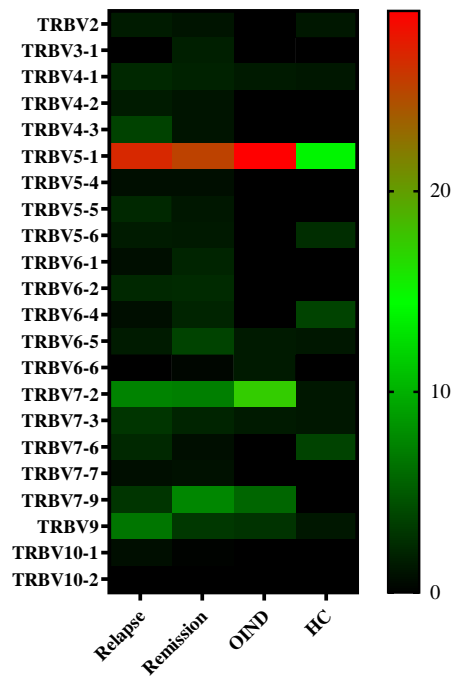
TRAV usage (parte 1)



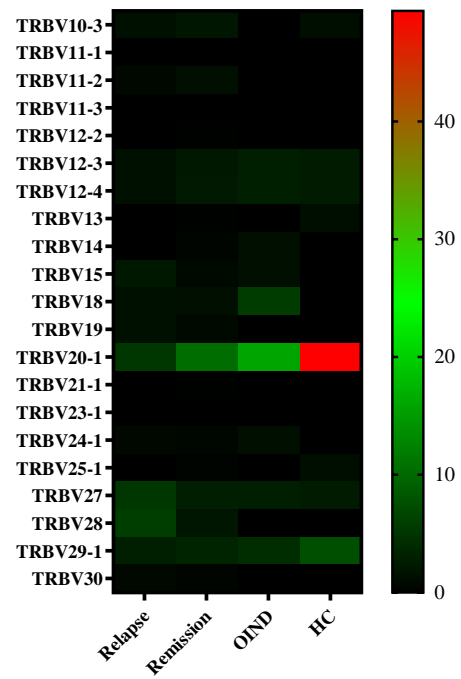
TRAV usage (parte 2)



TRBV usage (parte 1)



TRBV usage (parte 2)



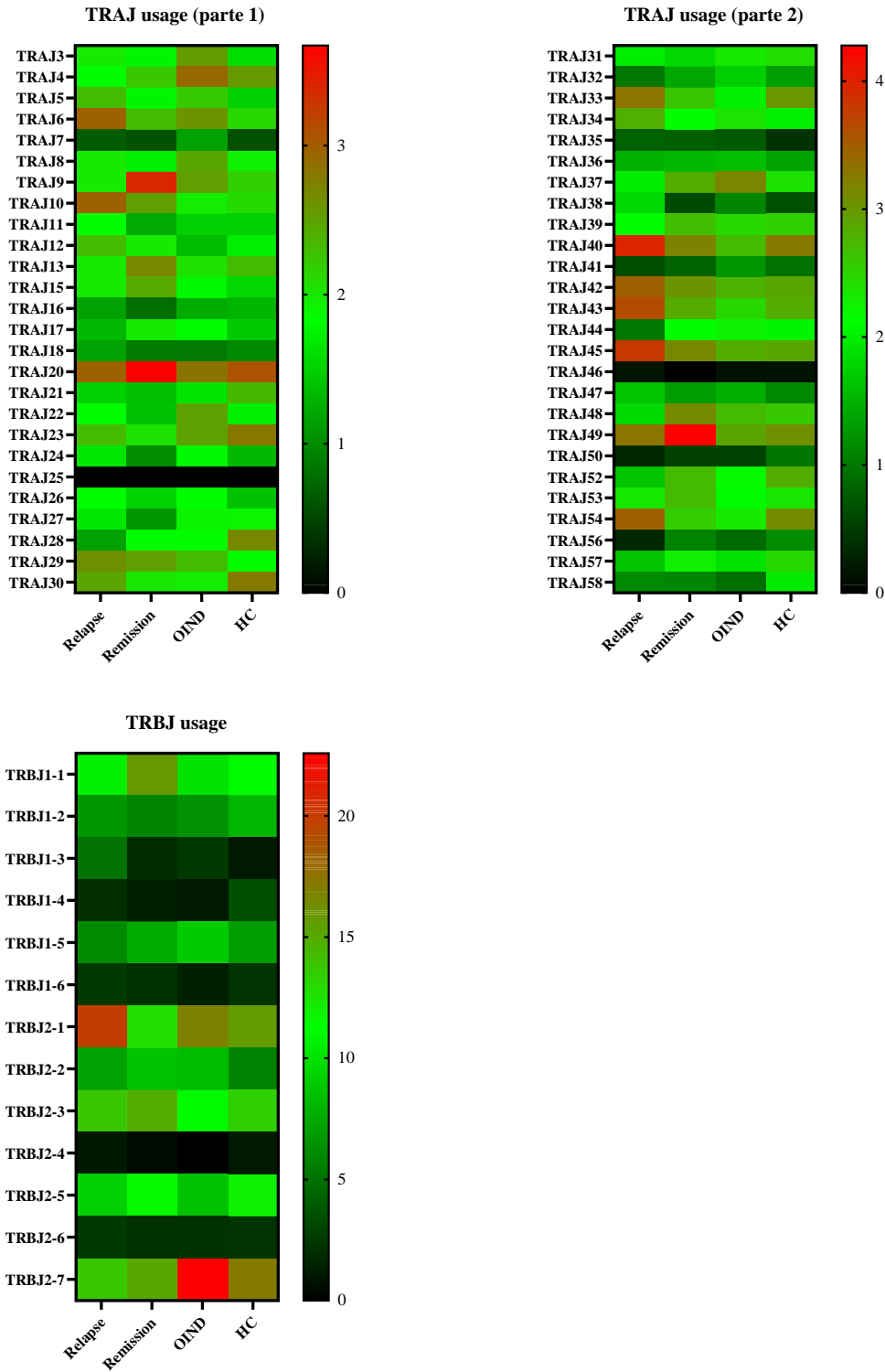


Figura 18. Uso de segmentos de unión y variables.

## Tipificación y clasificación HLA II

Se tipificaron los alelos HLA II de cada sujeto. Se obtuvieron un total de 88 alelos (**Tabla complementaria 1**), de los cuales 33 eran exclusivos de uno de los dos grupos de estudio (Tabla 2). Se obtuvieron 20 alelos únicos de pacientes con EM (7 alelos HLA-DP, 10 alelos HLA-DQ y 3 alelos HLA-DR) y 13 de pacientes OENI (3 alelos HLA-DP, 6 alelos HLA-DQ y 4 alelos HLA-DR). Además, se incluyó en el análisis un conjunto de datos de alelos DQ y DR de diez individuos mexicanos sanos (IS) publicados por Pérez-Saldívar (Pérez S et al., 2015), de los cuales se identificaron 16 alelos únicos DQ y 5 DR (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Tipificación de alelos de HLA clase II. Los alelos presentes en más de un grupo fueron eliminados.

EM		
DP	DQ	DR
DPA1*01:03/DPB1*02:01	DQA1*01:02/DQB1*02:01	DRB1*04:02
DPA1*01:03/DPB1*104:01	DQA1*01:04/DQB1*03:02	DRB1*14:54
DPA1*01:03/DPB1*11:01	DQA1*02:01/DQB1*02:02	DRB4*01:01
DPA1*02:01/DPB1*10:01	DQA1*02:01/DQB1*06:02	
DPA1*02:01/DPB1*11:01	DQA1*03:01/DQB1*05:03	
DPA1*02:01/DPB1*14:01	DQA1*03:03/DQB1*03:01	
DPA1*02:01/DPB1*18:01	DQA1*03:03/DQB1*03:02	
	DQA1*04:01/DQB1*02:01	
	DQA1*05:01/DQB1*04:02	
	DQA1*05:01/DQB1*06:02	
OENI		
DP	DQ	DR
DPA1*01:03/DPB1*01:01	DQA1*01:02/DQB1*03:01	DRB1*04:03
DPA1*01:03/DPB1*03:01	DQA1*01:03/DQB1*03:02	DRB1*11:02
DPA1*02:01/DPB1*04:01	DQA1*03:01/DQB1*06:03	DRB1*13:01
	DQA1*05:03/DQB1*03:01	DRB4*01:03
	DQA1*05:03/DQB1*06:02	
	DQA1*05:05/DQB1*03:19	
IS		
DP	DQ	DR
	DQA1*01:01/DQB1*02:01	DRB1*01:01
	DQA1*01:01/DQB1*03:02	DRB1*04:04
	DQA1*01:02/DQB1*03:02	DRB1*08:02
	DQA1*02:01/DQB1*02:01	DRB1*13:02
	DQA1*02:01/DQB1*02:02	DRB1*14:06
	DQA1*02:01/DQB1*06:09	
	DQA1*03:01/DQB1*03:01	
	DQA1*03:01/DQB1*03:02	
	DQA1*03:01/DQB1*05:01	
	DQA1*03:01/DQB1*06:04	
	DQA1*03:02/DQB1*03:01	
	DQA1*04:01/DQB1*04:02	
	DQA1*05:01/DQB1*02:02	
	DQA1*05:01/DQB1*03:02	
	DQA1*05:03/DQB1*03:02	
	DQA1*05:03/DQB1*05:01	

## Predicciones de afinidad de unión entre alelos HLA y péptidos VZV, EBV, HHV-1, HHV-6A o SNC

Se usaron los alelos de HLA únicos para predecir su capacidad de presentación de péptidos provenientes de proteínas de VZV, EBV, HHV-1, HHV-6A o SNC.

**Tabla 3.** Número de péptidos de VZV, EBV, HHV-6A, HHV-1, o SNC con predicción para unirse a los distintos alelos HLA.

Péptidos	EM		OENI		IS	
	Total	Afinidad de unión $\leq 50$ nM	Total	Afinidad de unión $\leq 50$ nM	Total	Afinidad de unión $\leq 50$ nM
<b>VZV</b>						
DP	1,798,055	1	770,595	2	NA	NA
DQ	2,311,785	2	1,541,190	10	3,852,975	3
DR	770,595	1	1,027,460	3	1,284,325	47
<b>EBV</b>						
DP	2,183,146	84	935,634	4	NA	NA
DQ	2,806,902	7	1,871,268	59	4,678,170	2
DR	935,634	4	1,247,416	9	1,559,390	131
<b>HHV-6A</b>						
DP	2,046,044	52	876,876	7	NA	NA
DQ	2,630,628	2	1,753,752	14	4,384,380	8
DR	876,876	9	1,006,364	24	1,461,460	84
<b>HHV-1</b>						
DP	1,172,031	49	811,797	1	NA	NA
DQ	2,516,283	2	1,677,522	55	4,193,805	1
DR	838,761	7	1,118,320	10	1,397,935	187
<b>CNS</b>						
DP	220,745	4	69,027	1	NA	NA
DQ	304,164	5	202,776	35	506,940	5
DR	101,388	3	135,184	2	168,980	2

VZV, virus Varicela-Zoster; VEB, virus de Epstein-Barr; HHV-1, virus del herpes simple tipo 1; HHV-6A, herpesvirus humano 6; SNC, Sistema nervioso central; EM, esclerosis múltiple; OENI, Otras enfermedades neurológicas inflamatorias; IS, individuos sanos.

Se aplicó el método NetMHCIIpan para péptidos de 12 a 18 aminoácidos de longitud. Esta búsqueda arrojó un resultado de 60 millones de péptidos, en su mayoría (58,3 millones)

de herpes virus y 1,7 millones pertenecientes a SNC. Estos datos se utilizaron para limitar aún más la búsqueda de péptidos que el MHCII podría presentar de forma natural y que mostraran una fuerte afinidad de unión igual o inferior a 50 nM (**Tabla 3**).

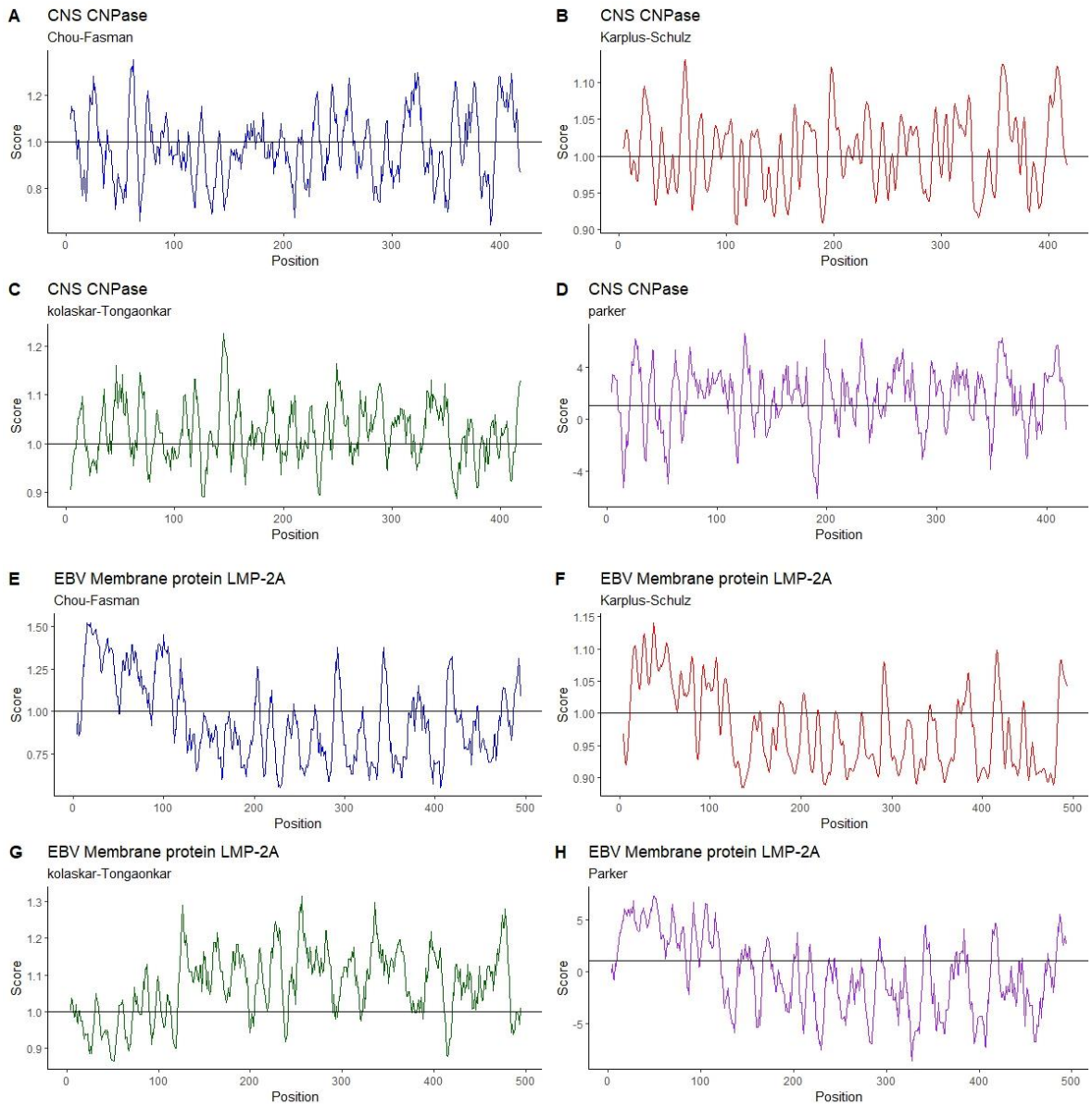
### **Predicción de epítomos de proteínas VZV, EBV, HHV-6A, HHV-1 y CNS**

Las proteínas se analizaron utilizando la herramienta de predicción de epítomos de IEDB, aplicando una colección de métodos que calculan la probabilidad de que una secuencia de aminoácidos en particular forme parte de un epítomo, en función de características tales como hidrofiliidad (Karplus & Schulz, 1985), flexibilidad (Kolaskar & Tongaonkar, 1990) y antigenicidad (Parker et al., 1986). Las secuencias con un valor por encima de los niveles establecidos para cada método se consideraron como parte de un epítomo (**Figura 19**). Se predijeron un total de 634,521 péptidos, de los cuales 141,118 cumplen con los criterios de cada método para ser considerados como parte de un epítomo (**Tabla 4**).

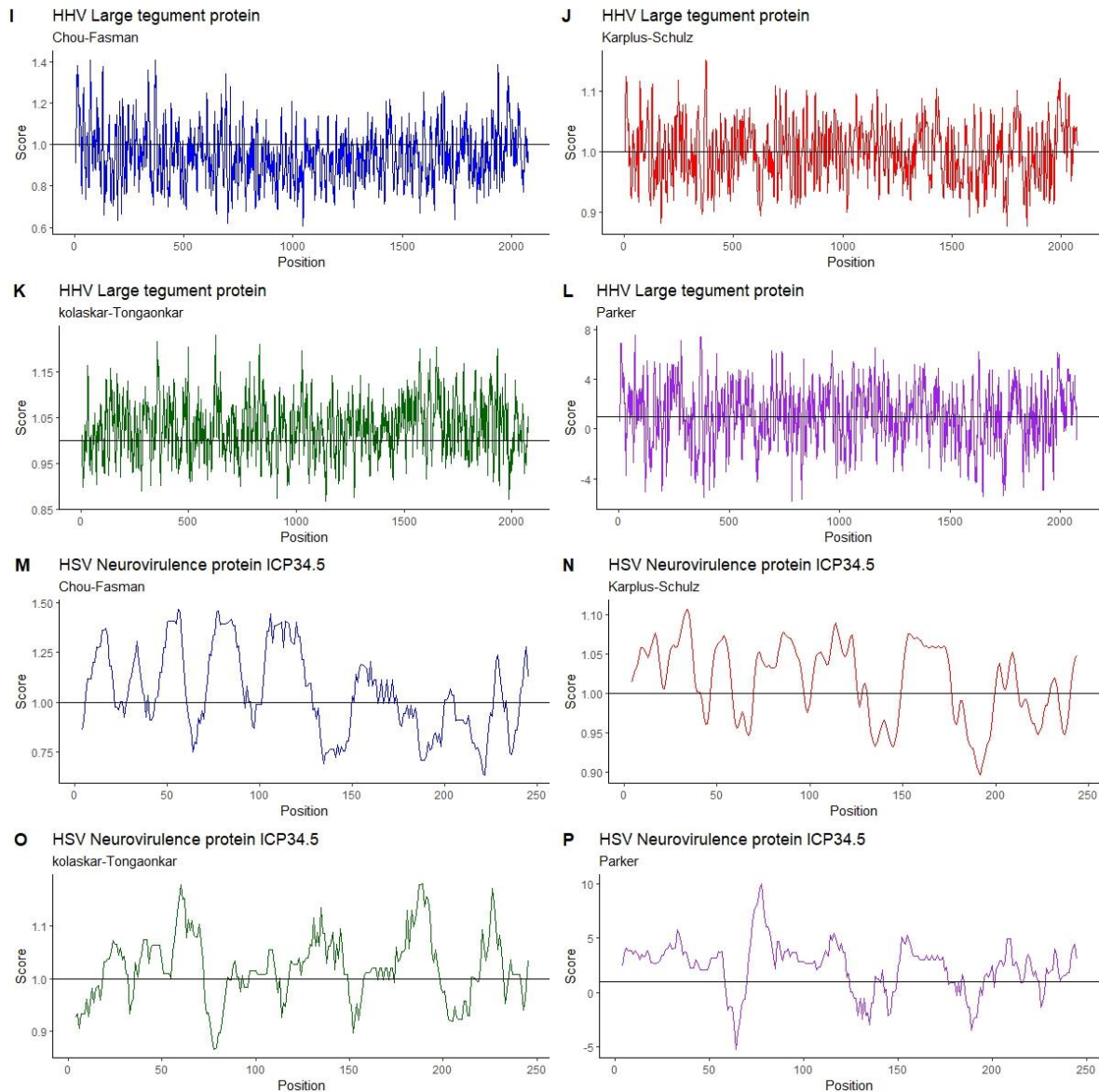
**Tabla 4.** Predicción de epítomos lineales. Las secuencias de aminoácidos de VZV, EBV, HHV-1, HHV-6A y CNS se dividieron en heptapéptidos y se calculó la probabilidad de formar parte de un epítomo. Se eliminaron las secuencias repetidas de heptapéptidos con una puntuación superior a 1.

	<b>Número total péptidos</b>	<b>Péptidos con un score &gt;1</b>	<b>Péptidos únicos con un score &gt;1</b>
CNS	18,557	11,316	4,822
EBV	169,615	88,685	39,291
HHV-6A	155,926	84,059	39,869
HHV-1	152,036	83,057	37,185
VZV	138,387	74,267	34,347
Total	634,521	341,384	155,514

VZV, virus Varicela-Zoster; VEB, virus de Epstein-Barr; HHV-1, virus del herpes simple tipo 1; HHV-6A, herpesvirus humano 6; SNC, Sistema nervioso central







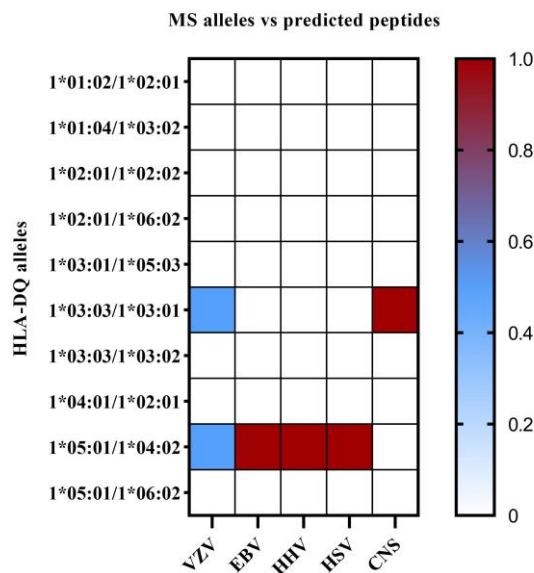
**Figura 19.** Predicción de epítomos lineales. Se realizó la predicción de epítomos lineales para cada proteína de SNC y para cada herpesvirus. Las secuencias de aminoácidos con un valor por encima del score definido por cada método fueron seleccionadas.

## Uso de alelos de HLA

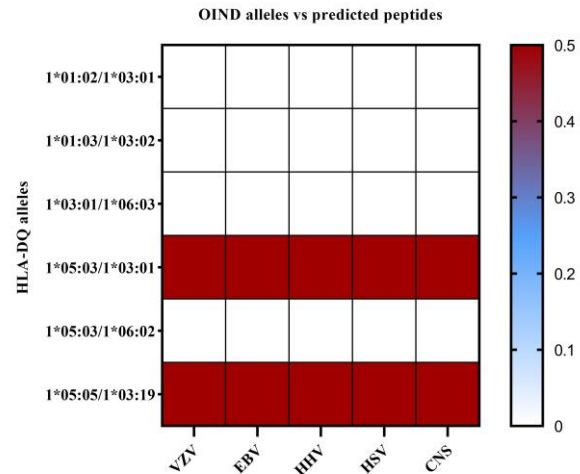
La base de datos de 60 millones de péptidos de proteínas VZV, EBV, HHV-6A, HHV-1 o CNS predichas para unirse a alelos HLA únicos, se utilizó para identificar péptidos presentados naturalmente por MHCII con la afinidad de unión más fuerte ( $\leq 50$  nM). Se identificaron los alelos de cada grupo que presentan el mayor número de péptidos. El alelo de pacientes con EM DQA1\*05:01/B1\*04:02 puede presentar todos los péptidos de herpesvirus y algunos péptidos de VZV y todos los péptidos de CNS son presentados por el alelo DQA1\*03:03/B1\*03:02 MS (**Figura 20A**). Los péptidos de todos los herpesvirus y del

SNC fueron presentados por los alelos DQA1\*05:03/B1\*03:01 y DQA1\*05:05/B1\*03:19 de pacientes ONID (**Figura 20B**). El alelo DQA1\*04:01/B1\*04:02 de IS reconoció solo los péptidos provenientes de herpesvirus. Los péptidos del SNC y VZV fueron presentados por los alelos DQA1\*03:01/B1\*03:01 y DQA1\*03:02/B1\*03:01 (**Figura 20C**). Los péptidos de todos los herpesvirus y proteínas del SNC fueron reconocidos por el alelo DRB4\*01:01 de pacientes con MS, además, algunos péptidos de EBV y HHV también se unen al alelo DRB1\*14:54 MS, el resto de los péptidos de HHV son reconocidos por el alelo DRB1\*04:02 (**Figura 20D**). Los alelos DRB1\*11:02 y DRB1\*13:01 de los pacientes OIND presentan a todos los péptidos del SNC y a todos los herpesvirus, el alelo DRB4\*01:03 también presenta algunos péptidos de HHV (**Figura 20E**). Todos los péptidos de herpesvirus y SNC pueden ser presentados por el alelo DRB1\*01:01 de individuos sanos (**Figura 20F**); también el alelo DPA1\*01:03/B1\*02:01 de pacientes con EM puede presentar péptidos de herpesvirus y SNC (**Figura 20G**). Por último, los alelos OIND fueron más diversos, los péptidos de CNS, VZV y algunos péptidos de HHV son presentados por el alelo DPA1\*01:03/B1\*01:01, los péptidos de EBV y HHV se unen al alelo DPA1\*01:03/B1\*03:01 y el resto de los péptidos de HHV al alelo DPA1\*01:02/B1\*04:01 (**Figura 20H**).

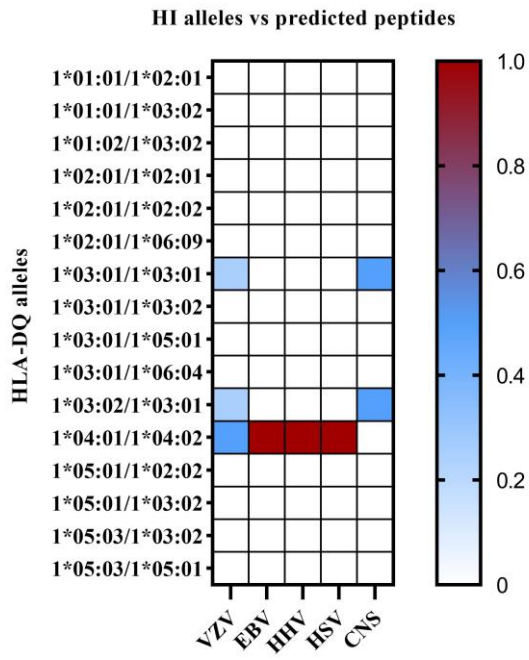
A



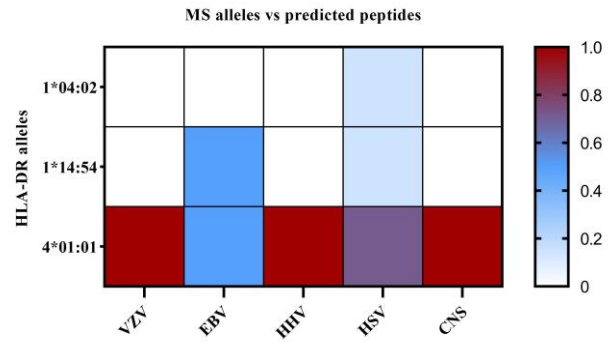
B



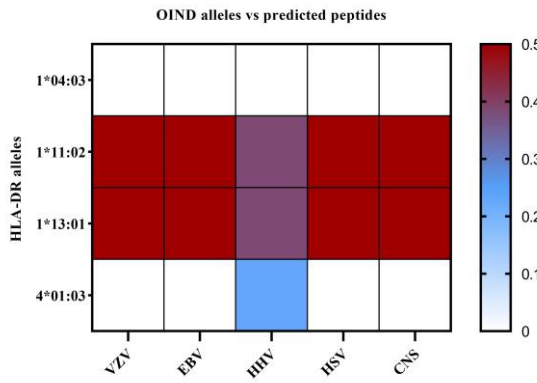
C



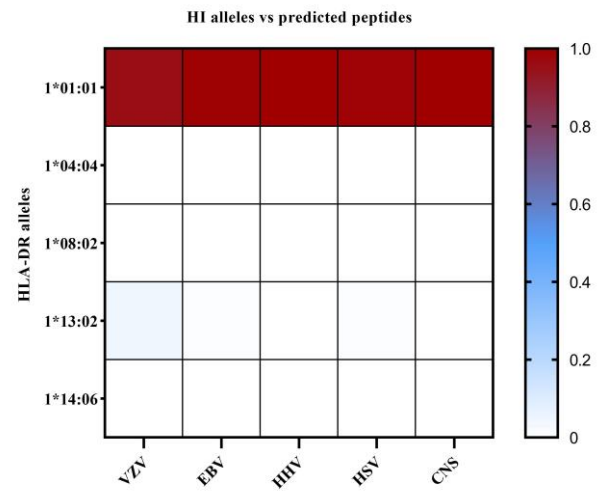
D



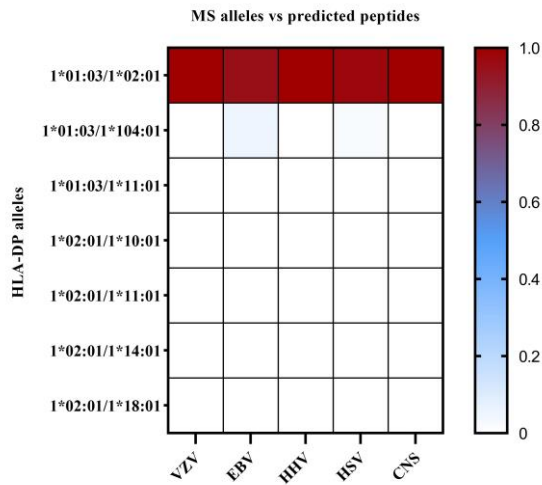
E



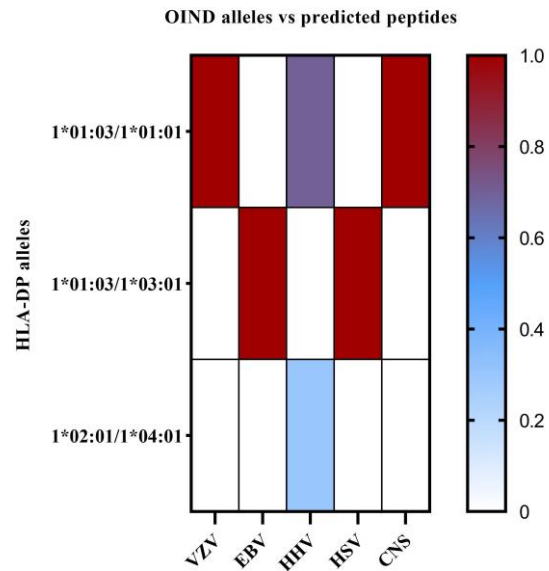
F



G



H

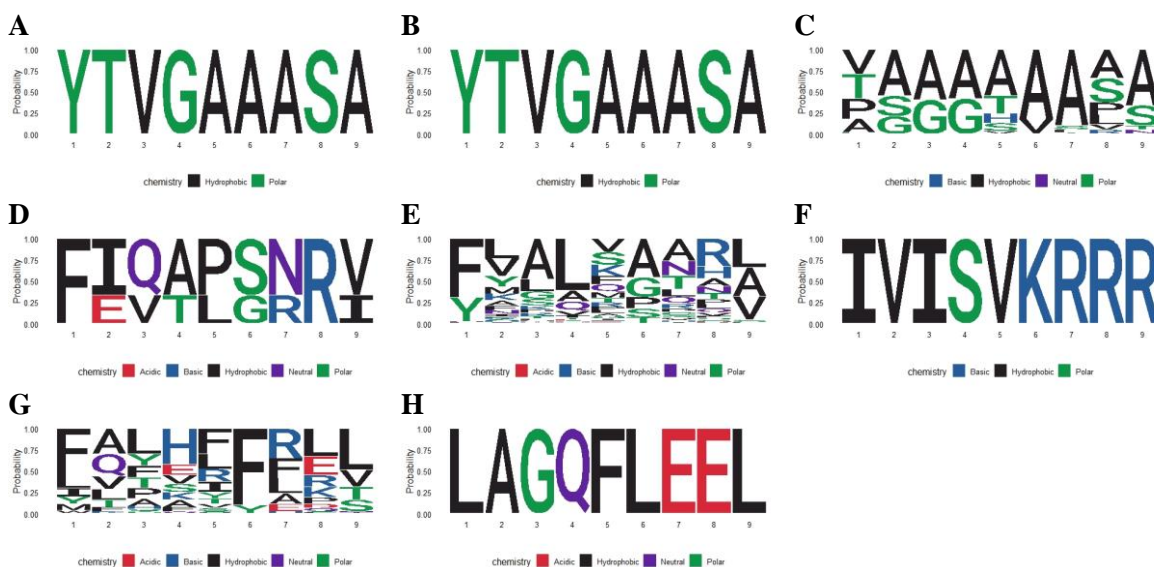


**Figura 20.** Presentación de péptidos del SNC o de herpesvirus. Se muestran los alelos de cada grupo de estudio predicho para unirse a péptidos del CNS y herpesvirus con gran afinidad ( $\leq 50$  nM). Es más probable que los péptidos sean presentados por un número limitado de alelos y, en algunos casos, el mismo alelo puede presentar péptidos de los tres grupos de proteínas con gran afinidad.

### Logos de secuencia de péptidos predichos

Para identificar los motivos de unión que podrían ser presentados por los alelos HLA, se crearon logos de secuencia del núcleo de unión de todos los péptidos predichos para cada alelo. Los logos de secuencia se realizaron dentro de RStudio utilizando el paquete ggseqlogo. Encontramos el mismo núcleo de unión (YTVGAAASA) perteneciente a un péptido de VZV presentado por el alelo DQA1\*03:03/B1\*03:01 de EM (**Figura 21A**) y el alelo DQA1\*03:01/B1\*03:01 de IS (**Figura 21B**). Además de este núcleo de unión, estos alelos pueden presentar péptidos del SNC y del HHV que tienen secuencias enriquecidas con alanina(A) como característica. Los alelos DQ de OIND no reconocen los mismos aminoácidos que los grupos EM y IS, pero sí pueden presentar núcleos de unión enriquecidos con alanina (**Figura 21C**). Aunque los alelos DR de EM no reconocen los mismos núcleos de unión, los núcleo de unión que pertenecen a los herpesvirus tienen aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas en las posiciones P1, P4 y P9 y aminoácidos con cadenas laterales básicas en la posición P6 (**Figura 21D**). Los núcleos de unión del herpesvirus que se unen a los alelos DR de IS tienen fenilalanina y leucina en las posiciones P1 y P4 respectivamente, mientras que en la posición P6 el aminoácido más frecuente es la alanina y

en la posición P9 puede ser alanina o leucina; estas cuatro posiciones están representadas por aminoácidos hidrofóbicos (**Figura 21E**). Al igual que los alelos DQ de OIND, los alelos DR de OIND no presentan los mismos núcleos de unión, pero sí se unen a secuencias con aminoácidos hidrofóbicos en la posición P1 y aminoácidos cargados positivamente en las posiciones P6 y P9 (**Figura 21F**). Finalmente, los núcleos de unión de los péptidos seleccionados como los mejores candidatos para unirse al alelo DPA1\*01:03/B1\*02:01 de pacientes con EM tienen con mayor frecuencia aminoácidos hidrofóbicos como la fenilalanina (F) en las posiciones P1 y P6, mientras que en la posición P9 pueden tener una leucina (L) o una valina (V). Curiosamente, los péptidos de EBV, HHV, HHV y VZV comparten algunas de estas características (**Figura 21G**). Los núcleos de unión de los péptidos de HHV, VZV y CNS presentados por el alelo DPA1\*01:03/B1\*01:01 de OIND tienen aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones P1 y P9 y ácido glutámico (E) en la posición P7; sin embargo, esta posición no se considera como uno de los residuos de anclaje del núcleo de unión (**Figura 21H**).



**Figura 21.** Logos de secuencia de núcleos de unión. Los núcleos de unión de los péptidos candidatos de cada alelo se alinearon para identificar los motivos de unión. A) el alelo DP EM y el alelo DQ IS B) presentan el mismo núcleo de VZV mientras que los péptidos que se unen al alelo DQ OENI C) se unen a secuencias ricas en alanina. D) Los núcleos de unión presentados por los alelos DR EM tienen aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones P1, P4 y P9 y un aminoácido básico en P6. E) Las cuatro posiciones de anclaje de los alelos DR IS están ocupadas por aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas. F) Los alelos DR OENI no tienen un motivo de unión, pero presentan secuencias ricas en aminoácidos básicos. Los alelos G) DP EM y H) OENI, al igual que los alelos DQ, presentan aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones P1, P6 y P9.

## **Identificación de proteínas basada en la predicción de unión de alta afinidad de péptidos de VZV, EBV, HHV-1, HHV-6A y del SNC a los alelos HLA**

Para identificar los péptidos con mayor afinidad y las proteínas a las que pertenecen, desarrollamos un script interno. Se eliminaron todas las secuencias con baja probabilidad de presentarse de forma natural en APCs y con una afinidad de unión superior a 50 nM, para centrar el análisis en los mejores candidatos. Cada grupo de estudio se alineó con las proteínas de EBV, VZV, HHV-1, HHV-6A y SNC por separado (**Tablas 5 y 6**). Para acotar aún más el análisis, se buscaron heptapéptidos con probabilidad de formar parte de un epítipo (**Tabla 4**) dentro de las proteínas que resultaron del alineamiento con los péptidos de alta afinidad.

Los alelos DP de pacientes con EM presentan 10 proteínas de EBV, 13 de HHV, 6 de HHV, 1 de VZV y 1 de SNC. Las proteínas virales presentadas por los alelos DP de pacientes con EM están involucradas en diferentes procesos como la replicación de ADN, el ensamblaje de la cápside y la entrada/salida de partículas virales. La única proteína del SNC que se une a los alelos de pacientes con EM es la PLP, que es responsable de la formación y el mantenimiento de la mielina, uno de los principales blancos de la enfermedad. Los alelos DP de los pacientes OENI se unieron a menos proteínas de herpesvirus, con respecto a las proteínas del SNC, solo se presentó la proteína MOG, proteína que se sabe que está involucrada en otras enfermedades autoinmunes o neurodegenerativas.

Por otro lado, algunos alelos DQ de los tres grupos de estudio presentaron las mismas proteínas, como la proteína pequeña de la cápside de VZV y la proteína grande del tegumento de EBV. Los alelos OENI fueron los que se unieron a una mayor cantidad de proteínas virales, mientras que los alelos EM e IS presentaron una menor cantidad, sin embargo, las proteínas presentadas por ambos grupos son las mismas. En el caso de las proteínas del SNC, todos los grupos sólo se unieron a la proteína AP180. Finalmente, los alelos EM DR fueron los que presentaron un menor número de proteínas en total. Curiosamente, los alelos OENI e IS son capaces de interactuar con un mayor número de proteínas virales; estas proteínas cumplen distintas funciones como la degradación del ARNm celular, fusión de membranas, entrada y salida del virus, entre otras. Sólo que en el caso de las proteínas del SNC, los alelos MS interactúan con más proteínas.

**Tabla 5.** Número de proteínas presentadas por los alelos más frecuentes de cada grupo.

	Alelos DP			Alelos DQ			Alelos DR		
	EM	OENI	IS	EM	OENI	IS	EM	OENI	IS
SNC	1	1	NA	1	1	1	3	2	1
EBV	10	1	NA	2	6	1	2	6	25
VZV	1	1	NA	2	1	2	1	1	12
HHV-1	6	1	NA	1	6	1	6	5	30
HHV-6	13	1	NA	2	2	1	2	7	21

**Tabla 6.** Proteínas presentadas con mayor frecuencia por los alelos HLA Clase II de cada grupo

	VZV	EBV	HHV-1	HHV-6A	CNS
<b>MS</b>	Large tegument protein	Large tegument protein	Glycoprotein O	Tegument protein UL14	Clathrin-coat assembly protein
		Ribonucleotide reductase subunit 1	U7		
<b>OIND</b>	Small capsid protein	Large tegument protein	U7	Single-stranded DNA-binding protein	Clathrin-coat assembly protein
<b>HI</b>	Large tegument protein	DNA packaging tegument protein UL25 Helicase-primase helicase subunit Large tegument protein Major capsid protein Tegument protein UL37	U50	Large tegument protein	Clathrin-coat assembly protein

## Discusión

La secuenciación de alto rendimiento ha representado un parteaguas en el análisis genético de una gran variedad de padecimientos, incluyendo las enfermedades autoinmunes. Previo a la aplicación de esta tecnología, el estudio del repertorio de TCR en pacientes con esclerosis múltiple, por ejemplo, estaba limitado principalmente a la región variable de la cadena  $\beta$  mediante tecnologías como citometría de flujo y espectratipificación (Amoriello et al., 2021), dejando fuera secuencias del repertorio de TCR de pacientes con EM que podrían aportar información importante para el entendimiento de este padecimiento. En este trabajo, se obtuvieron más de 50 millones de lecturas de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR de pacientes con EM durante la fase de brote y remisión, y fueron comparadas con aquellas obtenidas de pacientes con OENI e IS. Los resultados demuestran la disminución de la expansión clonal y del índice de diversidad durante la fase de exacerbación en los pacientes con EM. Se ha reportado disminución del repertorio de TCR debido a procesos como el envejecimiento (Sun et al., 2022). Sin embargo, el aumento en la clonalidad durante la etapa de remisión en los mismos pacientes y la edad de los pacientes con EM, con OENI y los individuos sanos permiten descartar esta posibilidad. Otra explicación podría encontrarse en el proceso inflamatorio generado durante la fase de brote. El índice de Simpson calcula la probabilidad de que dos individuos seleccionados aleatoriamente pertenezcan a la misma especie. Por su parte, el índice de diversidad, obtenido mediante el inverso del índice de Simpson, toma en cuenta la riqueza de las especies (el número total de clonas) y la uniformidad (abundancia relativa de cada clona). Por lo tanto, la disminución en el índice de diversidad durante la fase de exacerbación implicaría una menor probabilidad de que diferentes pacientes presenten o compartan las mismas clonas. Sin embargo, es posible observar clonas compartidas entre los pacientes durante la fase de exacerbación. El número de clonas compartidas durante la fase de remisión (3,760 TRA y 1,502 TRB, que representan el 2.54% y 0.69% respectivamente del total de clonas) disminuye significativamente durante la fase de exacerbación (716 TRA y 189 TRB que representan el 0.33% y 0.05% respectivamente del total de clonas).

Este reducido número de clonas compartidas entre pacientes en brote podría sugerir la existencia de un repertorio de TCR común entre pacientes con EM como se ha reportado previamente (Alves Sousa et al., 2019). El análisis de las secuencias consenso obtenidas de las clonas compartidas en ambas fases de la EM apoyan esta suposición. No se observó una



diferencia estadísticamente significativa en el uso de segmentos de unión o variables entre los cuatro grupos de estudio. Sin embargo, en el grupo de pacientes con EM en exacerbación se observó una mayor frecuencia en el uso de los genes TRBV5, TRBV7-2, TRBV7-9, TRBV9, TRAJ40, TRAJ42, TRAJ43, TRAJ45 y TRAJ54 que, de acuerdo con la base de datos VDJdb (<https://vdjdb.cdr3.net/>), tienen la capacidad de presentar péptidos de EBV, citomegalovirus (CMV), virus de herpes simple tipo 2 (HHV-2) y péptidos de humano. Esta observación fue realizada también para el gen TRBV4-3 que puede presentar específicamente el péptido RPHERNNGFTVL de citomegalovirus. Hayashi et al., 2021, describió el enriquecimiento de este gen en pacientes con EM comparado con individuos sanos.

El número de alelos únicos de HLA-DP/DQ/DR fue mayor en el grupo de pacientes con EM (20 pares) en comparación con los pacientes con OIND (13 pares). Esta diferencia podría deberse a la diversidad genética de la población mexicana, con una gran carga de ancestría nativo-americana del sur al sureste de México y europea en el norte de México, es esta carga genética de ancestría europea la que genera mayores niveles de diversidad (Barquera et al., 2020). El número total de péptidos de EBV, HHV, HHV, VZV y CNS que se predijo que presentarían estos alelos varió entre los grupos. Se predijo que entre hasta 16,2 millones de péptidos se unirían a los alelos de HLA de clase II. Sin embargo, una vez que se seleccionaron aquellos con potencial para actuar como antígenos, el número se redujo a 938 péptidos. Las proteínas de EBV, HHV, HHV, VZV y CNS se identificaron a partir de los péptidos predichos que son presentados con mayor afinidad a los alelos de HLA de clase II, dando como resultado 128 proteínas capaces de ser presentadas por alelos de HLA-II (**tabla complementaria 2**). Los alelos de HLA de los pacientes con EM son capaces de presentar un mayor número de proteínas virales (44), en comparación con los pacientes con OENI que podrían presentar 32 proteínas virales (**tabla complementaria 3**).

En algunos casos, las proteínas de EBV, HHV, HHV, VZV y CNS mostraron una alta probabilidad de ser presentadas por el mismo alelo, como DPA1\*01:03/DPB1\*02:01 en pacientes con EM. Esto podría dar lugar a una reacción cruzada, en la que los péptidos virales presentados por este alelo podrían desencadenar una respuesta inmunitaria contra los péptidos del SNC. Un escenario similar ocurre con el alelo DRB4\*01:01 de pacientes con EM, que se predijo que puede unirse y presentar todos los péptidos de herpesvirus y del SNC con alta afinidad. Históricamente, el desarrollo de la EM se ha relacionado a una infección

previa con EBV; sin embargo, en el caso de la población mexicana de acuerdo a lo reportado por Sotelo et al., 2014, el virus presente en pacientes mexicanos con EM es VZV, otro miembro de la familia de los herpesvirus. Nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de la participación de factores virales en el desarrollo de la EM, particularmente de los herpesvirus (Tarlinton et al., 2020). Se ha descrito la presencia de células T autorreactivas que reconocen péptidos del SNC en pacientes con EM (Lang et al., 2002). Nuestros resultados demuestran que los pacientes con EM presentan una serie de alelos con alta afinidad predicha por EBV, VZV y péptidos del SNC que podrían participar en el desencadenamiento de la enfermedad, una vez que se altera la fase latente de los herpesvirus (Bar-Or & Li, 2021). Tal es el caso del alelo DQA1\*03:03/B1\*03:01 de pacientes con EM que tiene la capacidad de presentar péptidos de CNS y de VZV.

La presentación por un mismo alelo de péptidos que forman parte de diferentes proteínas, o incluso de diferentes organismos puede deberse a los aminoácidos que se encuentran en las posiciones de anclaje entre el péptido y la molécula de HLA. Los resultados de los logos de secuencia demuestran, por un lado, que diferentes alelos como DQA1\*03:03/B1\*03:01 de pacientes con EM y DQA1\*03:01/B1\*03:01 de individuos sanos, pueden presentar el mismo núcleo de unión de las proteínas de VZV y, por otro lado, algunos alelos no presentan el mismo núcleo de unión, pero sí presentan aminoácidos que comparten características como la hidrofobicidad que se encuentran en posiciones específicas dentro del surco de la molécula de HLA. La presentación de un mismo péptido por diferentes alelos puede representar una ventaja evolutiva para responder eficientemente ante infecciones comunes; sin embargo, también puede facilitar una respuesta autoinmune. Como demuestran nuestros resultados, un solo alelo puede unirse a péptidos del SNC, EBV, HHV, HHV y VZV con alta afinidad y puede presentarse de forma natural a las células del sistema inmunitario. Esta presentación cruzada entre péptidos virales y péptidos propios pudiera jugar un papel importante en el desarrollo o desencadenamiento de recaídas de EM: debido al neurotropismo de los virus analizados, la presentación cruzada por estos alelos pudiera despertar la respuesta autoinmune que ataca la cubierta de mielina, característica de la enfermedad.

Se ha reportado que los alelos DRB1\*15:01 y DQB1\*06:02 participan en el desarrollo de la EM en la población caucásica. Sin embargo, la población mexicana exhibe una mezcla de ascendencia indígena y europea, y estos alelos no parecen influir en el desarrollo de la EM (De Silvestri et al., 2019; Flores et al., 2015; Ordonez et al., 2015).

La presentación de péptidos antigénicos y propios por el mismo alelo puede deberse a una similitud estructural o de secuencia. Lang et al. demostraron que el mismo receptor de células T puede interactuar tanto con la proteína básica de mielina (MBP) como con la ADN polimerasa de EBV (Lang et al., 2002). Una infección viral puede generar inflamación que dañará las células circundantes (Sedighi et al., 2022). Después de la migración al SNC, los herpesvirus pueden dañar indirectamente las células a través de la inflamación, que libera péptidos que pueden ser presentados por las APC. La proteína proteolipídica (PLP) y la proteína básica de mielina (MBP) son componentes principales de la mielina, y la lisis de las neuronas durante el proceso inflamatorio puede liberar péptidos autorreactivos (Cavallo, 2020; Greer, 2013). Nuestros resultados demuestran que los alelos de HLA de pacientes con EM, específicamente el alelo DPA1\*01:03/B1\*02:01 puede presentar péptidos de la proteína PLP, además, mediante los alelos DQ y DR, es posible presentar péptidos de la proteína de CNS AP180.

## Conclusiones

- 1) La expansión clonal observada durante la exacerbación está representada por un menor número de clonas, observando clonas que representan más del 1% del repertorio de TCR, mientras que durante la fase de remisión y en los individuos sanos ninguna clona representa más del 1%
- 2) El índice de diversidad es menor durante la exacerbación comparado con los mismos pacientes durante la remisión y con pacientes OENI e IS
- 3) El número de clonas totales, únicas y que representan el 50% del repertorio es significativamente menor en la fase de brote
- 4) El número de clonas compartidas entre dos o más pacientes es al menos 5 veces menor durante la fase de exacerbación
- 5) Las secuencias consenso de las regiones determinantes de complementariedad compartidas entre pacientes con EM durante ambas fases difieren en las posiciones 5 y 10 de la cadena TRA y TRB respectivamente.
- 6) Los pacientes con EM en exacerbación presentan con mayor frecuencia los genes TRBV5, 7-2, 7-9 y 9 y TRAVJ40, 42, 43, 45 y 54. Estos genes tienen la capacidad de reconocer péptidos antigénicos y péptidos propios.
- 7) Los alelos DR de pacientes mexicanos con EM presentan una menor afinidad frente a los péptidos de VZV y EBV. Es posible que, a diferencia de la población caucásica donde se ha asociado la participación del alelo DBR1\* 15:01 a la EM, en la población mexicana los alelos DP y DQ jueguen un papel más importante en el desarrollo de la enfermedad.

## Perspectivas

- Ampliar la población de estudio para aclarar la importancia de la ancestría de la población mexicana para explicar, por ejemplo, por qué los pacientes con EM de ascendencia afroamericana y latinoamericana muestran una progresión más severa de los síntomas (Telesford et al., 2020)
- Identificar la conformación del heterodímero de los receptores de células T de los pacientes con EM, es decir, reconstruir el TCR con sus cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ .
- Una vez identificados los heterodímero de TCR, predecir los péptidos que pueden ser reconocidos por ellos
- Aislar las clonas de pacientes con EM que se encuentran con mayor frecuencia durante la fase de exacerbación y retarlas con péptidos sintetizados de proteínas de SNC y herpesvirus que tiene la capacidad de ser presentados por los alelos de HLA de los pacientes con EM para confirmar la posible reacción cruzada entre péptidos propios y externos.

## Referencias

- Alves Sousa, A. P., Johnson, K. R., Ohayon, J., Zhu, J., Muraro, P. A., & Jacobson, S. (2019). Comprehensive Analysis of TCR- $\beta$  Repertoire in Patients with Neurological Immune-mediated Disorders. *Sci Rep*, 9(1), 344. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36274-7>
- Amoriello, R., Mariottini, A., & Ballerini, C. (2021). Immunosenescence and Autoimmunity: Exploiting the T-Cell Receptor Repertoire to Investigate the Impact of Aging on Multiple Sclerosis. *Front Immunol*, 12, 799380. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.799380>
- Bar-Or, A., & Li, R. (2021). Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. *Lancet Neurol*, 20(6), 470-483. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00063-6)
- Barquera, R., Hernández-Zaragoza, D. I., Bravo-Acevedo, A., Arrieta-Bolaños, E., Clayton, S., Acuña-Alonzo, V., . . . Granados, J. (2020). The immunogenetic diversity of the HLA system in Mexico correlates with underlying population genetic structure. *Hum Immunol*, 81(9), 461-474. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.06.008>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? In *Arch Dis Child Educ Pract Ed* (Vol. 98, pp. 236-238). <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Bjornevik, K., Münz, C., Cohen, J. I., & Ascherio, A. (2023). Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nat Rev Neurol*, 19(3), 160-171. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00775-5>
- Blander, J. M. (2016). The comings and goings of MHC class I molecules herald a new dawn in cross-presentation. *Immunological Reviews*, 272(1), 65-79. <https://doi.org/10.1111/imr.12428>
- Bretou, M., Kumari, A., Malbec, O., Moreau, H. D., Obino, D., Pierobon, P., . . . Lennon-Dumenil, A. M. (2016). Dynamics of the membrane-cytoskeleton interface in MHC class II-restricted antigen presentation. *Immunological Reviews*, 272(1), 39-51. <https://doi.org/10.1111/imr.12429>
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V., & Thompson, A. J. (2014). ATLAS OF MULTIPLE SCLEROSIS 2013: A GROWING GLOBAL PROBLEM WITH WIDESPREAD INEQUITY. *Neurology*, 83(11), 1022-1024. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000000768>
- Brownlee, W. J., Hardy, T. A., Fazekas, F., & Miller, D. H. (2017). Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*, 389(10076), 1336-1346. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30959-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30959-x)
- Cabre, P., Signate, A., Olindo, S., Merle, H., Caparros-LefEBVre, D., Bera, O., & Smadja, D. (2005). Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies [Article]. *Brain*, 128, 2899-2910. <https://doi.org/10.1093/brain/awh624>
- Carneiro, V. C. S., Pereira, J. G., & de Paula, V. S. (2022). Family Herpesviridae and neuroinfections: current status and research in progress. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 117, e220200. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220200>

- Cavallo, S. (2020). Immune-mediated genesis of multiple sclerosis. *J Transl Autoimmun*, 3, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2020.100039>
- Cencioni, M. T., Mattoscio, M., Magliozzi, R., Bar-Or, A., & Muraro, P. A. (2021). B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat Rev Neurol*, 17(7), 399-414. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00498-5>
- Chapman, C. G., Yamaguchi, R., Tamura, K., Weidner, J., Imoto, S., Kwon, J., . . . Kiyotani, K. (2016). Characterization of T-cell Receptor Repertoire in Inflamed Tissues of Patients with Crohn's Disease Through Deep Sequencing. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(6), 1275-1285. <https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000752>
- Choudhury, N., & Nakamura, Y. (2016). Importance of immunopharmacogenomics in cancer treatment: Patient selection and monitoring for immune checkpoint antibodies. *Cancer Science*, 107(2), 107-115. <https://doi.org/10.1111/cas.12862>
- Clambey, E. T., Davenport, B., Kappler, J. W., Marrack, P., & Homann, D. (2014). Molecules in medicine mini review: the alphabeta T cell receptor. *J Mol Med (Berl)*, 92(7), 735-741. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1145-2>
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, 372(9648), 1502-1517. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)61620-7)
- De Silvestri, A., Capittini, C., Mallucci, G., Bergamaschi, R., Rebuffi, C., Pasi, A., . . . Tinelli, C. (2019). The Involvement of HLA Class II Alleles in Multiple Sclerosis: A Systematic Review with Meta-analysis. *Dis Markers*, 2019, 1409069. <https://doi.org/10.1155/2019/1409069>
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis [Review]. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545-558. <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Dendrou, C. A., Petersen, J., Rossjohn, J., & Fugger, L. (2018). HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol*, 18(5), 325-339. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.143>
- Deng, Y. X., Wang, Z. J., Chang, C., Lu, L. W., Lau, C. S., & Lu, Q. J. (2017). Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials. *Human Immunology*, 78(2), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.12.010>
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*, 26(1), 27-40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Downs, I., Vijayan, S., Sidiq, T., & Kobayashi, K. S. (2016). CITA/NLRC5: A critical transcriptional regulator of MHC class I gene expression. *Biofactors*, 42(4), 349-357. <https://doi.org/10.1002/biof.1285>
- Dulamea, A. O. (2017). The contribution of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitor cells to central nervous system repair in multiple sclerosis: perspectives for remyelination therapeutic strategies. *Neural Regeneration Research*, 12(12), 1939-1944. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.221146>
- Dzhagalov, I., & Phee, H. (2012). How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells. *Cell Mol Life Sci*, 69(5), 663-682. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0791-6>
- Elyaman, W., & Houry, S. J. (2017). Th9 cells in the pathogenesis of EAE and multiple sclerosis. *Seminars in Immunopathology*, 39(1), 79-87. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0604-y>
- Engelhardt, B., & Ransohoff, R. M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends in Immunology*, 33(12), 579-589. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004>

- Fang, H., Yamaguchi, R., Liu, X., Daigo, Y., Yew, P. Y., Tanikawa, C., . . . Nakamura, Y. (2014). Quantitative T cell repertoire analysis by deep cDNA sequencing of T cell receptor alpha and beta chains using next-generation sequencing (NGS). *Oncoimmunology*, 3(12), e968467. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.968467>
- Fierz, W. (2017). Multiple sclerosis: an example of pathogenic viral interaction? *Virology*, 14(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0719-3>
- Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., & Rocca, M. A. (2018). Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 43. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0041-4>
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N., & Mills, K. H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*, 162(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x>
- Flores, J., Granados, J., Alonso, E., Rito, Y., Ortega-Hernández, E., Mena-Hernández, L., & Corona, T. (2015). Presence of the HLADR13 allele among Mexican Mestizos suggests a protective factor against relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). *Clin Neurol Neurosurg*, 138, 184-187. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2015.08.016>
- Fozza, C., Barraqueddu, F., Corda, G., Contini, S., Viridis, P., Dore, F., . . . Longinotti, M. (2017). Study of the T-cell receptor repertoire by CDR3 spectratyping. *Journal of Immunological Methods*, 440, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.11.001>
- Gharagozloo, M., Mace, J. W., & Calabresi, P. A. (2022). Animal models to investigate the effects of inflammation on remyelination in multiple sclerosis. *Front Mol Neurosci*, 15, 995477. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.995477>
- Gonzalez, O., & Sotelo, J. (1995). Is the frequency of multiple sclerosis increasing in Mexico? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 59(5), 528-530.
- Greer, J. M. (2013). Autoimmune T-cell reactivity to myelin proteolipids and glycolipids in multiple sclerosis. *Mult Scler Int*, 2013, 151427. <https://doi.org/10.1155/2013/151427>
- Hayashi, F., Isobe, N., Glanville, J., Matsushita, T., Maimaitijiang, G., Fukumoto, S., . . . Kira, J. I. (2021). A new clustering method identifies multiple sclerosis-specific T-cell receptors. *Ann Clin Transl Neurol*, 8(1), 163-176. <https://doi.org/10.1002/acn3.51264>
- Jain, R. W., & Yong, V. W. (2022). B cells in central nervous system disease: diversity, locations and pathophysiology. *Nat Rev Immunol*, 22(8), 513-524. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00652-6>
- Kakalacheva, K., & Lunemann, J. D. (2011). Environmental triggers of multiple sclerosis [Review]. *Febs Letters*, 585(23), 3724-3729. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.006>
- Karplus, P. A., & Schulz, G. E. (1985). Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*, 72, 212-213. <https://doi.org/10.1007/BF01195768>
- Karussis, D. (2014). The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 48-49, 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.022>
- Kim, S., Park, G. Y., Park, J. S., Park, J., Hong, H., & Lee, Y. (2021). Regulation of positive and negative selection and TCR signaling during thymic T cell development by capicua. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.71769>



- Kitaura, K., Shini, T., Matsutani, T., & Suzuki, R. (2016). A new high-throughput sequencing method for determining diversity and similarity of T cell receptor (TCR)  $\alpha$  and  $\beta$  repertoires and identifying potential new invariant TCR  $\alpha$  chains. In *BMC Immunol* (Vol. 17). <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0177-5>
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*, 14(6), 377-391. <https://doi.org/10.1038/nri3667>
- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*, 276(1-2), 172-174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-q)
- Kostic, M., Stojanovic, I., Marjanovic, G., Zivkovic, N., & Cvetanovic, A. (2015). Deleterious versus protective autoimmunity in multiple sclerosis. *Cellular Immunology*, 296(2), 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.04.006>
- Koukoulitsa, C., Chontzopoulou, E., Kiriakidi, S., Tzacos, A. G., & Mavromoustakos, T. (2020). A Journey to the Conformational Analysis of T-Cell Epitope Peptides Involved in Multiple Sclerosis. *Brain Sci*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/brainsci10060356>
- Kumar, A., Cocco, E., Atzori, L., Marrosu, M. G., & Pieroni, E. (2013). Structural and Dynamical Insights on HLA-DR2 Complexes That Confer Susceptibility to Multiple Sclerosis in Sardinia: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Plos One*, 8(3), Article e59711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059711>
- Lang, H. L., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., . . . Fugger, L. (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol*, 3(10), 940-943. <https://doi.org/10.1038/ni835>
- Larochelle, C., Alvarez, J. I., & Prat, A. (2011). How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett*, 585(23), 3770-3780. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.066>
- Lassmann, H. (2013). Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 333(1-2), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.05.010>
- Li, R., Patterson, K. R., & Bar-Or, A. (2018). Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol*, 19(7), 696-707. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0135-x>
- Liu, R., Du, S., Zhao, L., Jain, S., Sahay, K., Rizvanov, A., . . . Baranwal, M. (2022). Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol*, 13, 996469. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.996469>
- Lossius, A., Johansen, J. N., Vartdal, F., Robins, H., Saltyte, B. J., Holmoy, T., & Olweus, J. (2014). High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8(+) T cells. *European Journal of Immunology*, 44(11), 3439-3452. <https://doi.org/10.1002/eji.201444662>
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sorensen, P. S., Thompson, A. J., . . . Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions [Review]. *Neurology*, 83(3), 278-286.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, 47(6), 707-717. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200006\)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q)

- Lysandropoulos, A. P., Mavrouidakis, N., Pandolfo, M., El Hafsi, K., van Hecke, W., Maertens, A., . . . Ribbens, A. (2017). HLA genotype as a marker of multiple sclerosis prognosis: A pilot study. *Journal of the Neurological Sciences*, *375*, 348-354. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.02.019>
- Mallucci, G., Peruzzotti-Jametti, L., Bernstock, J. D., & Pluchino, S. (2015). The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology*, *127*, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.02.003>
- Martin, R., Sospedra, M., Eiermann, T., & Olsson, T. (2021). Multiple sclerosis: doubling down on MHC. *Trends Genet.* <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.04.012>
- Matzaraki, V., Kumar, V., Wijmenga, C., & Zhernakova, A. (2017). The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol*, *18*(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1207-1>
- McGinley, A. M., Edwards, S. C., Raverdeau, M., & Mills, K. H. G. (2018). Th17 cells, gammadelta T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. *J Autoimmun.* <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.01.001>
- Murat, P., & Tellam, J. (2015). Effects of messenger RNA structure and other translational control mechanisms on major histocompatibility complex-I mediated antigen presentation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *6*(2), 157-171. <https://doi.org/10.1002/wrna.1262>
- Murphy, A. C., Lalor, S. J., Lynch, M. A., & Mills, K. H. G. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behavior and Immunity*, *24*(4), 641-651. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.01.014>
- Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*, *11*(12), 823-836. <https://doi.org/10.1038/nri3084>
- Ordonez, G., Romero, S., Orozco, L., Pineda, B., Jimenez-Morales, S., Nieto, A., . . . Sotelo, J. (2015). Genomewide admixture study in Mexican Mestizos with multiple sclerosis [Article]. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *130*, 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2014.11.026>
- Parker, J. M., Guo, D., & Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*, *25*(19), 5425-5432. <https://doi.org/10.1021/bi00367a013>
- Parnell, G. P., & Booth, D. R. (2017). The Multiple Sclerosis (MS) Genetic Risk Factors Indicate both Acquired and Innate Immune Cell Subsets Contribute to MS Pathogenesis and Identify Novel Therapeutic Opportunities. *Frontiers in Immunology*, *8*, Article 425. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00425>
- Petersen, E. R., Oturai, A. B., Koch-Henriksen, N., Magyari, M., Sorensen, P. S., Sellebjerg, F., & Sondergaard, H. B. (2018). Smoking affects the interferon beta treatment response in multiple sclerosis. *Neurology*, *90*(7), e593-e600. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000004949>
- Plantone, D., Primiano, G., Manco, C., Locci, S., Servidei, S., & De Stefano, N. (2022). Vitamin D in Neurological Diseases. *Int J Mol Sci*, *24*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010087>

- Podbielska, M., O'Keeffe, J., & Hogan, E. L. (2018). Autoimmunity in multiple sclerosis: role of sphingolipids, invariant NKT cells and other immune elements in control of inflammation and neurodegeneration. *J Neurol Sci*, 385, 198-214. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.12.022>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., . . . Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69(2), 292-302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Pérez S, M. P., Rivera, M. d. P., & Alcántara, L. E. (2015). *Predisposición del HLA para el desarrollo de cicatriz hipertrófica: La población Mexicana como objeto de estudio* (AbeBooks, Ed.).
- Pérez-Saldívar, M., Ordoñez, G., Pineda, B., Sotelo, J., Martínez-Palomo, A., Flores-Rivera, J., & Espinosa-Cantellano, M. (2021). T-Cell Response against Varicella Zoster Virus in Patients with Multiple Sclerosis during Relapse and Remission. *Int J Mol Sci*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010298>
- Ransohoff, R. M. (2012). Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci*, 15(8), 1074-1077. <https://doi.org/10.1038/nn.3168>
- Reddy, S. T. (2017). Immunology: The patterns of T-cell target recognition. *Nature*, 547(7661), 36-38. <https://doi.org/10.1038/nature23091>
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 378(2), 169-180. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483>
- Reynisson, B., Barra, C., Kaabinejadian, S., Hildebrand, W. H., Peters, B., & Nielsen, M. (2020). Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. *J Proteome Res*, 19(6), 2304-2315. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00874>
- Riedhammer, C., & Weissert, R. (2015). Antigen presentation, autoantigens, and immune regulation in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 6, Article 322. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00322>
- Rivera, V. M. (2017). Multiple Sclerosis in Latin Americans: Genetic Aspects. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(8), Article 57. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0768-4>
- Rivera, V. M., Medina, M. T., Duron, R. M., & Macias, M. A. (2014). Multiple sclerosis care in Latin America. *Neurology*, 82(18), 1660-1661. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000000376>
- Roche, P. A., & Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 15(4), 203-216. <https://doi.org/10.1038/nri3818>
- Rolak, L. A. (2003). Multiple sclerosis: it's not the disease you thought it was. *Clin Med Res*, 1(1), 57-60.
- Sara, L., & Ruth, D. (2020). Multiple sclerosis. In (pp. 588-594). Medicine.
- Schatz, D. G., & Ji, Y. H. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature Reviews Immunology*, 11(4), 251-263. <https://doi.org/10.1038/nri2941>
- Sedighi, S., Gholizadeh, O., Yasamineh, S., Akbarzadeh, S., Amini, P., Favakehi, P., . . . Dadashpour, M. (2022). Comprehensive Investigations Relationship Between Viral Infections and Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Curr Microbiol*, 80(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03112-z>

- Shah, D. K., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2014). An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol*, *192*(9), 4017-4023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302259>
- Soldan, S. S., & Lieberman, P. M. (2023). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol*, *21*(1), 51-64. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00770-5>
- Sospedra, M., Muraro, P. A., Stefanová, I., Zhao, Y., Chung, K., Li, Y., . . . Martin, R. (2006). Redundancy in antigen-presenting function of the HLA-DR and -DQ molecules in the multiple sclerosis-associated HLA-DR2 haplotype. *J Immunol*, *176*(3), 1951-1961. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1951>
- Sotelo, J., Ordonez, G., Pineda, B., & Flores, J. (2014). The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *119*, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.12.020>
- Sun, X., Nguyen, T., Achour, A., Ko, A., Cifello, J., Ling, C., . . . Weng, N. P. (2022). Longitudinal analysis reveals age-related changes in the T cell receptor repertoire of human T cell subsets. *J Clin Invest*, *132*(17). <https://doi.org/10.1172/JCI158122>
- Tarlinton, R. E., Martynova, E., Rizvanov, A. A., Khaiboullina, S., & Verma, S. (2020). Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Viruses*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/v12060643>
- Telesford, K. M., Kaunzner, U. W., Perumal, J., Gauthier, S. A., Wu, X., Diaz, I., . . . Vartanian, T. (2020). Black African and Latino/a identity correlates with increased plasmablasts in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, *7*(1). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000634>
- The Multiple Sclerosis International Federation, Atlas of MS*. (2020). (3<sup>rd</sup> ed.). The Multiple Sclerosis International Federation (MSIF).
- Tian, J., Jiang, L., Chen, Z., Yuan, Q., Liu, C., He, L., . . . Rui, K. (2022). Tissue-resident immune cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Inflamm Res*. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01677-w>
- Veroni, C., Marnetto, F., Granieri, L., Bertolotto, A., Ballerini, C., Repice, A. M., . . . Aloisi, F. (2015). Immune and Epstein-Barr virus gene expression in cerebrospinal fluid and peripheral blood mononuclear cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis [Article]. *Journal of Neuroinflammation*, *12*, 18, Article 132. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0353-1>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., . . . Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*, *26*(14), 1816-1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Watson, C. T., Para, A. E., Lincoln, M. R., Ramagopalan, S. V., Orton, S. M., Morrison, K. M., . . . Ebers, G. C. (2011). Revisiting the T-cell receptor alpha/delta locus and possible associations with multiple sclerosis. *Genes and Immunity*, *12*(2), 59-66. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.65>
- Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. (2017). Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol*, *8*, 292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292>
- Yaldizli, O., Sethi, V., Pardini, M., Tur, C., Mok, K. Y., Muhlert, N., . . . Chard, D. T. (2016). HLA-DRB\*1501 associations with magnetic resonance imaging measures of grey

matter pathology in multiple sclerosis [Article]. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 7, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.03.003>

Zumerle, S., Molon, B., & Viola, A. (2017). Membrane Rafts in T Cell Activation: A Spotlight on CD28 Costimulation. *Frontiers in Immunology*, 8, Article 1467. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01467>

## Material suplementario

### Separación y conteo de células mononucleares de sangre periférica

Nombre de reactivo	Marca	Número de catálogo
Buffer salino de fosfatos de Dubelcco (DPBS)	Sigma-Aldrich	D8537-500ML
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich	10771-500ML
Azul tripano	Sigma-Aldrich	302643-25G
CD8 Microperlas, humano	Miltenyi biotec	130-045-201
Kit de aislamiento de células T reguladoras CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>dim/-</sup>	Miltenyi biotec	130-094-775
Solución stock MACS BSA	Miltenyi biotec	130-091-376
Solución de enjuague autoMACS	Miltenyi biotec	130-091-222

#### Preparación de azul tripano al 0.4%

Disolver 40 mg de azul tripano en 10 mL de agua destilada y agitar

#### Buffer MACS

Preparar una solución 1:20 de Solución stock MACS BSA y Solución stock MACS BSA

#### Anticuerpos para citometría de flujo

Nombre	Marca	Número de catálogo
CD3-FITC anti-humano	Biologend	981002
CD4-PE anti-humano	Biologend	980804
CD8-PB anti-humano	Biologend	980906
CD25-APC anti-humano	Biologend	985810

### Extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA)

Nombre	Marca	Número de catálogo
AllPrep DNA/RNA Kit	Qiagen	80284
QIAshredder	Qiagen	79656
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74106
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	69504
RNase-Free DNase Set	Qiagen	79254
2-Mercaptoethanol	Bio-Rad	1610710
Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit	Applied Biosystems	KIT0204

### Cuantificación y síntesis de cDNA y PCR de fusión

Nombre	Marca	Número de catálogo
High Sensitivity RNA ScreenTape	Agilent	5067-5579
High Sensitivity RNA ScreenTape Sample Buffer	Agilent	5067-5580
SMART cDNA Library Construction Kit	Takara	634901
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	New England Biolabs	M0492L
Buffer Tris-HCL/EDTA	Invitrogen	12090015
AMPure XP Beads	Beckman Coulter	A63881
High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent	5067-5584
High Sensitivity D1000 Reagents	Agilent	5067-5585
Gel Cassettes 2% Agarose, dye-free	Sage Science	CDF2010

### PCR de índice

Nombre	Marca	Número de catálogo
2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix	Roche	50-196-5217
Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina	FC-131-1096
D1000 ScreenTape	Agilent	5067-5582
D1000 Reagents	Agilent	5067-5583

### Secuenciación de alto rendimiento

Nombre	Marca	Número de catálogo
SYBR Select Master Mix	Applied Biosystems	4472908
PhiX Control v3	Illumina	FC-110-3001
MiSeq Reagent Kit v3	Illumina	MS-102-3003

### Iniciadores de Illumina para qPCR

Primer 1: 5' AATGATACGGCGACCACCGAGAT 3'

Primer 2: 5' CAAGCAGAAGACGGCATACGA 3'



## Tabla complementaria 1.

Alelos totales de HLA-II de pacientes con EM y OENI

HLA-II de pacientes con EM	
EM-1 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*02:01:01	EM-6 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*02:01:01
EM-1 DPB1 DPB1*04:01:01 DPB1*10:01:01	EM-6 DPB1 DPB1*11:01:01 DPB1*18:01:01
EM-1 DQA1 DQA1*01:02:01 DQA1*02:01:01	EM-6 DQA1 DQA1*02:01:01 DQA1*03:03:01
EM-1 DQB1 DQB1*02:02:01 DQB1*06:02:01	EM-6 DQB1 DQB1*02:02:01 DQB1*03:02:01
EM-1 DRB1 DRB1*07:01:01 DRB1*15:01:01	EM-6 DRB1 DRB1*04:05:01 DRB1*07:01:01
EM-1 DRB345 DRB4*01:01:01 DRB5*01:01:01	EM-6 DRB345 DRB4*01:01:01 DRB4*01:03:01
EM-2 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01	EM-7 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*02:01:01
EM-2 DPB1 DPB1*04:02:01 DPB1*104:01:01	EM-7 DPB1 DPB1*04:01:01 DPB1*11:01:01
EM-2 DQA1 DQA1*04:01:01 DQA1*05:01:01	EM-7 DQA1 DQA1*01:02:01 DQA1*05:01:01
EM-2 DQB1 DQB1*02:01:01 DQB1*04:02:01	EM-7 DQB1 DQB1*02:01:01 DQB1*06:02:01
EM-2 DRB1 DRB1*03:01:01 DRB1*08:02:01	EM-7 DRB1 DRB1*03:01:01 DRB1*15:01:01
EM-2 DRB345 DRB3*02:02:01 DRB345*Not_Present	EM-7 DRB345 DRB3*02:02:01 DRB5*01:01:01
EM-3 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01	EM-8 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*02:01:01
EM-3 DPB1 DPB1*02:01:02 DPB1*02:01:02	EM-8 DPB1 DPB1*04:01:01 DPB1*14:01:01
EM-3 DQA1 DQA1*01:04:01 DQA1*03:01:01:01	EM-8 DQA1 DQA1*03:01:01:01 DQA1*04:01:01
EM-3 DQB1 DQB1*03:02:01 DQB1*05:03:01	EM-8 DQB1 DQB1*03:02:01 DQB1*04:02:01
EM-3 DRB1 DRB1*04:02:01 DRB1*14:54:01	EM-8 DRB1 DRB1*04:04:01 DRB1*08:02:01
EM-3 DRB345 DRB3*02:02:01 DRB4*01:03:01	EM-8 DRB345 DRB345*NP DRB4*01:03:01
EM-4 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01	EM-9 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01
EM-4 DPB1 DPB1*04:01:01 DPB1*04:02:01	EM-9 DPB1 DPB1*04:02:01 DPB1*04:02:01
EM-4 DQA1 DQA1*03:03:01 DQA1*05:05:01	EM-9 DQA1 DQA1*04:01:01 DQA1*05:05:01
EM-4 DQB1 DQB1*03:01:01 DQB1*03:02:01	EM-9 DQB1 DQB1*03:01:01 DQB1*04:02:01
EM-4 DRB1 DRB1*04:05:01 DRB1*16:02:01	EM-9 DRB1 DRB1*08:02:01 DRB1*14:06:01
EM-4 DRB345 DRB4*01:03:01 DRB5*02:02:01	EM-9 DRB345 DRB3*01:01:02 DRB345*Not_Present
EM-5 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01	EM-10 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01
EM-5 DPB1 DPB1*04:02:01 DPB1*04:02:01	EM-10 DPB1 DPB1*04:02:01 DPB1*04:02:01
EM-5 DQA1 DQA1*04:01:01 DQA1*05:05:01	EM-10 DQA1 DQA1*04:01:01 DQA1*05:05:01
EM-5 DQB1 DQB1*03:01:01 DQB1*04:02:01	EM-10 DQB1 DQB1*03:01:01 DQB1*04:02:01
EM-5 DRB1 DRB1*08:02:01 DRB1*16:02:01	EM-10 DRB1 DRB1*08:02:01 DRB1*14:06:01
EM-5 DRB345 DRB345*NP DRB5*02:02:01	EM-10 DRB345 DRB3*01:01:02 DRB345*Not_Present
HLA-II de pacientes con OENI	
OENI-11 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01	OENI-14 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*02:07:01
OENI-11 DPB1 DPB1*04:02:01 DPB1*04:02:01	OENI-14 DPB1 DPB1*03:01:01 DPB1*19:01:01
OENI-11 DQA1 DQA1*03:01:01:01 DQA1*04:01:01	OENI-14 DQA1 DQA1*01:03:01 DQA1*03:01:01:01
OENI-11 DQB1 DQB1*03:02:01 DQB1*04:02:01	OENI-14 DQB1 DQB1*03:02:01 DQB1*06:03:01
OENI-11 DRB1 DRB1*04:07:01 DRB1*08:02:01	OENI-14 DRB1 DRB1*04:04:01 DRB1*13:01:01

OENI-11 DRB345 DRB345*NP DRB4*01:03:02	OENI-14 DRB345 DRB3*02:02:01 DRB4*01:03:01
OENI-12 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01	OENI-15 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*02:01:01
OENI-12 DPB1 DPB1*04:02:01 DPB1*04:02:01	OENI-15 DPB1 DPB1*01:01:01 DPB1*04:01:01
OENI-12 DQA1 DQA1*04:01:01 DQA1*05:05:01	OENI-15 DQA1 DQA1*05:03:01 DQA1*05:05:01
OENI-12 DQB1 DQB1*03:01:01 DQB1*04:02:01	OENI-15 DQB1 DQB1*03:01:01 DQB1*03:19:01:01
OENI-12 DRB1 DRB1*08:02:01 DRB1*16:02:01	OENI-15 DRB1 DRB1*11:02:01 DRB1*14:06:01
OENI-12 DRB345 DRB345*NP DRB5*02:02:01	OENI-15 DRB345 DRB3*01:01:02 DRB3*02:02:01
OENI-13 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01	OENI-16 DPA1 DPA1*01:03:01 DPA1*01:03:01
OENI-13 DPB1 DPB1*04:01:01 DPB1*04:02:01	OENI-16 DPB1 DPB1*03:01:01 DPB1*04:02:01
OENI-13 DQA1 DQA1*01:02:01 DQA1*05:03:01	OENI-16 DQA1 DQA1*03:01:01:01 DQA1*04:01:01
OENI-13 DQB1 DQB1*03:01:01 DQB1*06:02:01	OENI-16 DQB1 DQB1*03:02:01 DQB1*04:02:01
OENI-13 DRB1 DRB1*14:02:01 DRB1*15:01:01	OENI-16 DRB1 DRB1*04:03:01 DRB1*08:02:01
OENI-13 DRB345 DRB3*01:01:02 DRB5*01:01:01	OENI-16 DRB345 DRB345*NP DRB4*01:03:01

## Tabla complementaria 2

Proteínas de herpesvirus y SNC identificadas mediante el alineamiento de los péptidos presentados por HLA

EBV	
Deoxyribonuclease	Envelope glycoprotein B
DNA packaging terminase subunit 1	Helicase-primase helicase subunit
Envelope glycoprotein H	Helicase-primase subunit
Helicase-primase primase subunit	Multifunctional expression regulator
Large tegument protein	Nuclear antigen EBNA-2
Major capsid protein	Nuclear antigen EBNA-3A
Nuclear antigen EBNA-1	Nuclear egress membrane protein
Protein UL49	Protein BARF0, partial
Ribonucleotide reductase subunit 1	Protein G10
Tegument protein UL37	Protein Rta
DNA packaging protein UL32	Protein UL87
Nuclear egress lamina protein	Single-stranded DNA-binding protein
Apoptosis regulator BALF1	Capsid maturation protease
Capsid portal protein	Capsid scaffold protein
DNA packaging tegument protein UL17	Small capsid protein
DNA packaging tegument protein UL25	Virion protein G11
DNA polymerase catalytic subunit	Membrane protein LMP-2A
Envelope glycoprotein 48	Membrane protein LMP-2B
Deoxyribonuclease	Envelope glycoprotein B

<b>HHV</b>	
U10	U14
U24a	IE glycoprotein
U26	Glycoprotein
U29	Glycoprotein B
U3	U40
U30	Glycoprotein H
Major DNA binding protein	U50
Helicase/primase complex protein	U58
Glycoprotein O	U60/66
Gcr	Ganciclovir kinase
Major capsid protein	Alkaline exonuclease
U7	Origin-binding protein
Helicase	Rep
U2	Dr1
Pp41 transactivator	U4
Large tegument protein	U76
<b>HHV</b>	
Capsid portal protein	Envelope glycoprotein G
DNA packaging terminase subunit 2	Envelope glycoprotein H
Nuclear egress lamina protein	Helicase-primase primase subunit
Tegument protein UL37	Large tegument protein
Uracil-DNA glycosylase	Major capsid protein
Envelope protein UL20	Neurovirulence protein ICP34.5
Tegument protein UL14	Nuclear protein UL24
Membrane protein UL45	Ribonucleotide reductase subunit 1
Deoxyribonuclease	Single-stranded DNA-binding protein
DNA packaging tegument protein UL25	Small capsid protein
Envelope glycoprotein B	Tegument protein VP13/14
Helicase-primase helicase subunit	Tegument protein VP22
Nuclear egress membrane protein	Thymidine kinase
Envelope glycoprotein E	Transcriptional regulator ICP4
DNA packaging protein UL32	Ubiquitin E3 ligase ICP0
DNA packaging tegument protein UL17	Virion protein US10
DNA packaging terminase subunit 1	Virion protein US2
DNA polymerase catalytic subunit	Helicase-primase subunit
DNA polymerase processivity subunit	Capsid triplex subunit 2
Envelope glycoprotein D	Envelope glycoprotein G
<b>CNS</b>	
PLP proteolipid protein	Rtn3 reticulon-3

AP180 Clathrin coat assembly protein	MOG myelin oligodendrocyte glycoprotein
CN37 2,3-cyclic-nucleotide-3-phosphodiesterase	HECAM Hepatocyte cell adhesion molecule
<b>VZV</b>	
Large tegument protein	Multifunctional expression regulator
Small capsid protein	Nuclear protein UL24
DNA packaging tegument protein UL25	Ribonucleotide reductase subunit 1
Deoxyuridine triphosphatase	Single-stranded DNA-binding protein
DNA polymerase catalytic subunit	Tegument protein UL37
Envelope glycoprotein B	Tegument protein VP11/12
Envelope glycoprotein H	Envelope glycoprotein I
Helicase-primase helicase subunit	

### Tabla complementaria 3.

Proteínas virales presentadas por los alelos de HLA de pacientes con EM y OENI

<b>Proteínas virales presentadas por alelos de pacientes con EM</b>	
EBV-deoxyribonuclease	HHV-U10
EBV-DNA packaging terminase subunit 1	HHV-U24A
EBV-envelope glycoprotein H	HHV-GCR
EBV-helicase-primase primase subunit	HHV-pp41 transactivator
EBV-large tegument protein	HHV-U2
EBV-major capsid protein	HHV-large tegument protein
EBV-nuclear antigen EBNA-1	HHV-DNA packaging terminase subunit 2
EBV-protein UL49	HHV-tegument protein UL37
EBV-ribonucleotide reductase subunit 1	HHV-nuclear egress lamina protein
EBV-tegument protein UL37	HHV-uracil-DNA glycosylase
EBV-DNA packaging protein UL32	HHV-capsid portal protein
EBV-nuclear egress lamina protein	HHV-envelope protein UL20
HHV-U29	HHV-tegument protein UL14
HHV-U30	HHV-deoxyribonuclease
HHV-U7	HHV-envelope glycoprotein B
HHV-helicase/primase complex protein	HHV-DNA packaging tegument protein UL25
HHV-glycoprotein O	HHV-nuclear egress membrane protein
HHV-U3	HHV-membrane protein UL45
HHV-helicase	HHV-helicase-primase helicase subunit
HHV-major DNA binding protein	VZV-large tegument protein
HHV-U26	VZV-small capsid protein

HHV-major capsid protein	VZV-DNA packaging tegument protein UL25
<b>Proteínas virales presentadas por alelos de pacientes con OENI</b>	
EBV-large tegument protein	HHV-helicase/primase complex protein
EBV-capsid maturation protease	HHV-U4
EBV-capsid scaffold protein	HHV-envelope protein UL20
EBV-virion protein G11	HHV-ubiquitin E3 ligase ICP0
EBV-helicase-primase primase subunit	HHV-large tegument protein
EBV-small capsid protein	HHV-single-stranded DNA-binding protein
EBV-membrane protein LMP-2A	HHV-helicase-primase subunit
EBV-membrane protein LMP-2B	HHV-transcriptional regulator ICP4
EBV-tegument protein UL37	HHV-DNA polymerase catalytic subunit
EBV-protein Rta	HHV-capsid triplex subunit 2
EBV-envelope glycoprotein B	HHV-helicase-primase primase subunit
HHV-U7	HHV-DNA packaging terminase subunit 2
HHV-U2	HHV-DNA packaging terminase subunit 1
HHV-DR1	VZV-large tegument protein
HHV-U76	VZV-small capsid protein
HHV-large tegument protein	VZV-envelope glycoprotein I
HHV-U58	HHV-helicase/primase complex protein